

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

ANDRÉ LUPP MOTA

Azul de metileno como adjuvante na ressuscitação volêmica nos primeiros sessenta minutos de choque hemorrágico em porcos

Ribeirão Preto

2023

ANDRÉ LUPP MOTA

Azul de metileno como adjuvante na ressuscitação volêmica nos primeiros sessenta minutos de choque hemorrágico em porcos

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

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

Área de Concentração: Clínica Cirúrgica –
Opção: Cirurgia

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Barbosa
Évora

Ribeirão Preto

2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Mota, André Lupp

Azul de metileno como adjuvante na ressuscitação volêmica nos primeiros sessenta minutos de choque hemorrágico em porcos. Ribeirão Preto, 2023.

105 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Clínica Cirúrgica.

Orientador: Évora, Paulo Roberto Barbosa.

1. Choque hemorrágico 2. Azul de metileno. 3. Hemorragia. 4. Modelo animal. 5. Suíno.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: André Lupp Mota

Título: Azul de metileno como adjuvante na ressuscitação volêmica nos primeiros sessenta minutos de choque hemorrágico em porcos.

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

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.

Instituição:

Julgamento:

Prof. Dr.

Instituição:

Julgamento:

Prof. Dr.

Instituição:

Julgamento:

Prof. Dr.

Instituição:

Julgamento:

DEDICATÓRIA

À Suely, minha esposa.

A Marlene e Lucilio, meus pais.

Ao meu orientador Paulo Roberto Barbosa Évora.

AGRADECIMENTOS

Ao amigo e mestre Prof. Dr. Paulo Roberto Barbosa Évora pelo incentivo, pelo apoio, pela sua grande vocação em ensinar e pela sua grande generosidade.

À Agnes Afrodite Sumarelli Albuquerque, por todo o suporte, dedicação e empenho na execução deste projeto.

À minha esposa Suely Fazio Ferraciolli, por todo o apoio, sugestões e pela revisão deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Sérgio Wechsler por sua atenção e orientação na análise estatística deste trabalho.

A Maher Hassan Musleh por todo o apoio e aconselhamento para que este trabalho pudesse ser finalizado.

Aos técnicos do laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pelo apoio técnico.

Aos funcionários do Departamento de Cirurgia e Anatomia e da Pós Graduação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, em especial à Sra. Juliana Pischiottin da Silva Moraes.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

À CAPES – o presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil (CAPES) Código do financiamento 001.

RESUMO

Mota, A. L. **Azul de metileno como adjuvante na ressuscitação volêmica nos primeiros sessenta minutos de choque hemorrágico em porcos**. 2023. Tese (Doutorado em Ciência) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

Objetivo: O tratamento precoce do choque hemorrágico é fundamental para prevenir a disfunção orgânica e a morte. Este estudo investigou o uso do azul de metileno (AM) nos primeiros 60 minutos após o choque em um modelo experimental de choque hemorrágico em porcos. Métodos: Após a indução do choque hemorrágico por meio de retirada de volume de sangue suficiente para alcançar um valor de pressão arterial média (PAM) = 55mmHg, os animais (n=30) foram distribuídos aleatoriamente em um dos seis grupos: grupo 1 (60 TS: retransusão de sangue (TS) após 60 min), grupo 2 (60AM: infusão de AM após 60 min), grupo 3 (60AM+TS: AM e TS após 60 min), grupo 4 (15AM+TS: AM e TS após 15 min), grupo 5 (15TS + 60AM: TS após 15 min e infusão de AM após 60 min), e grupo 6 (15AM + 60TS: infusão de AM após 15 min e TS após 60 min). Foram registrados parâmetros hemodinâmicos e laboratoriais. Resultados: Os maiores valores de PAM máxima/ PAM basal foram alcançados pelos grupos que receberam AM concomitantemente a TS aos 15 e 60 minutos, ou seja, grupos 3 (60AM+TS) e 4 (15AM+TS) e não houve diferença estatística entre eles. Conclusão. O uso de AM em associação com a transfusão sanguínea permitiu a reversão do choque hemorrágico com níveis de pressão arterial média mais altos do que a transfusão apenas ou a combinação de AM e transfusão em momentos diferentes.

Palavras-chave: Choque hemorrágico. Azul de metileno. Hemorragia. Modelo animal. Suíno.

ABSTRACT

Mota, A. L. **Methylene blue as an adjuvant in volemic resuscitation in the first sixty minutes of hypovolemic shock in pigs**. 2023. Tese (Doutorado em Ciência) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

Objective: Early hemorrhagic shock treatment prevents organic dysfunction and death. This study aimed to investigate the use of methylene blue (MB) in the first sixties minutes after shock in an experimental pig model of hemorrhagic shock. Methods. After shock promotion by blood withdrawal, until reach the mean arterial pressure (MAP) of 55mmHg, animals (n=30) were randomly assigned to one of six groups: group 1 (60 BT: retransfusion (BT) after 60 min), group 2 (60MB: MB infusion after 60 min), group 3 (60MB+BT: MB and BT after 60 min), group 4 (15MB+BT: MB and BT after 15 min), group 5 (15BT + 60MB: BT after 15 min and MB infusion after 60 min), and group 6 (15MB + 60BT: MB infusion after 15 min and BT after 60 min). Hemodynamic and blood tests were collected. Results. The highest values of maximum MAP/basal MAP ratio were achieved by groups that received MB concomitant with BT at the 15th and 60th minutes, that is, groups 3 (60MB+BT) and 4 (15MB+BT), and there was no statistical difference between them. Conclusion. Using MB concomitant with BT allowed the reversal of hemorrhagic shock with higher median arterial pressure levels than BT alone or the combination of MB and BT in different moments.

Keywords: Hemorrhagic Shock. Methylene blue. Hemorrhage. Animal models. Swine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação dos mecanismos que levam à descompensação do choque hemorrágico.....	27
Figura 2. Cadeia de eventos desencadeada pelo trauma associado a hemorragia e choque.....	28
Figura 3. Esquema da teoria das duas ondas na resposta imuno-inflamatória pós-trauma.....	30
Figura 4. Os três principais níveis que regulam o tônus vascular na vasoplegia.....	31
Figura 5. Via do óxido nítrico / guanosina monofosfato cíclico (GMPc).....	33
Figura 6. Azul de metileno.....	35
Figura 7. Preparo animal para o experimento.....	40
Figura 8. Cronologia dos diferentes grupos experimentais.....	41
Figura 9. Evolução da pressão arterial média (PAM) ao longo do experimento.....	45
Figura 10. Valores da pressão arterial média (PAM) basal dos animais dos grupos experimentais.....	46
Figura 11. Relação entre a pressão arterial média (PAM) máxima alcançada e a PAM basal entre os grupos experimentais.....	47
Figura 12. Pressão arterial pulmonar (PAP).....	49
Figura 13. Pressão capilar pulmonar (PCP).....	49
Figura 14. Pressão venosa central (PVC).....	50
Figura 15. Débito e Índice cardíaco.....	51
Figura 16. Resistência vascular sistêmica e índice de resistência vascular sistêmica.....	52
Figura 17. Resistência vascular pulmonar e índice de resistência vascular pulmonar.....	53
Figura 18. Nitrito/Nitrato (NOx).....	54

Figura 19. Malondialdeído (MDA).....	54
Figura 20. Ph.....	70
Figura 21. pO2.....	71
Figura 22. pCO2.....	72
Figura 23. Excesso de bases (BE).....	73
Figura 24. Bicarbonato.....	74
Figura 25. Glicose.....	75
Figura 26. Lactato.....	76
Figura 27. Hemoglobina.....	77
Figura 28. Hematócrito.....	78
Figura 29. Sódio.....	79
Figura 30. Potássio.....	80

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Avaliação estatística pareada das respostas das relações entre a pressão arterial média máxima e a pressão arterial média basal entre os seis grupos experimentais.....48
- Tabela 2. Valores basais das variáveis hemodinâmicas de cada grupo experimental.....81

LISTA DE ABREVIATURAS

AM – azul de metileno

TS – transfusão sanguínea

AT1 - receptores da angiotensina 1

ATP - trifosfato de adenosina

ATPase - adenosinatrifosfatases

BASF - *Badische Anilin & Soda Fabrik*

BE – excesso de base

BKCa – *Large-conductance calcium and voltage activated K⁺ channel* (canais de potássio ativados por cálcio de grande condutância)

Bpm – batimentos por minutos

Ca⁺⁺ - íon cálcio

Ca-CaM/MLCK - complexo cálcio-calmodulina

CETEA - Comitê de Ética em Experimentação Animal

cmH₂O – centímetro de água

COX -2 - ciclo-oxigenase-2

DAG - diacilglicerol

DC – débito cardíaco

EDRF - fator relaxante derivado do endotélio

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

eNOS – oxido nítrico sintase endotelial

EUA – Estados Unidos da América

FC – frequência cardíaca

FDA - *Food and Drug Administration*

Fr – *french*

g – força gravitacional

GMPC – guanosina 3',5'-monofosfato cíclico

GTP - guanosina 5'-trifosfato

H – hora

IL - interleucina

H₃PO₄ – ácido fosfórico

Hb - hemoglobina

HCl – ácido clorídrico

HCO₃ - bicarbonato

Ht - hematócrito

IC – índice cardíaco

IL - interleucina

iNOS – óxido nítrico sintase induzível

IP₃ - 1,4,5 inositol trifosfato

IRVP – índice de resistência vascular pulmonar

K - potássio

K⁺ - potássio

Kg - quilograma

L - Litro

L-NAME - NG-nitro-L-arginina metil éster

L-NMMA - NG metil-L-arginina

MDA - malondialdeído

min - minuto

mL - mililitro

mm³ – milímetro cúbico

mmHg – milímetro de mercúrio

Na - sódio

NaOH – hidróxido de sódio

NF- κ B - fator de transcrição nuclear κ B

NO – óxido nítrico

NOX – nitrito/nitrato

°C – grau Celsius

PAM – pressão arterial média

PAP – pressão arterial pulmonar

PAS – pressão arterial sistólica

pCO₂ – pressão parcial do gás carbônico no sangue

PCP – pressão capilar pulmonar

pH - potencial hidrogeniônico

PiP2 - fosfatidilinositol 4,5-bifosfato

PKC - proteína quinase C

PKG - proteína quinases dependente de GMPc

PLC- fosfolipase C

pO₂ – pressão parcial do gás oxigênio no sangue

PVC- pressão venosa central

RVP – resistência vascular pulmonar

RVS – resistência vascular sistêmica

IRVS – índice de resistência vascular sistêmica

s - segundos

SARA – síndrome da angústia respiratória aguda

SCAI – síndrome compensatória anti-inflamatória

SDMO – síndrome da disfunção de múltiplos órgãos

SERCA - retículo sarcoplasmático Ca^{2+} - adenosinatrifosfatases

SRIS – síndrome da resposta inflamatória sistêmica

TBA - ácido tiobarbitúrico

TEP - 1,1,3,3-tetramotoxipropano

TNF α – fator de necrose tumoral - α

UI – unidades internacionais

US – *United States*

V1 - receptores vasopressina 1

VCl₃ – cloreto de vanádio

α 1AR - α 1 adreno receptores

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS	22
3 REVISÃO DA LITERATURA	24
3.1 Choque hemorrágico.....	24
3.2.2 Definição.....	24
3.1.2 Etiologia.....	24
3.1.3 Trauma.....	24
3.1.4 Fisiopatologia.....	26
3.1.4.1 Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SRIS).....	29
3.1.4.2 Vasoplegia.....	30
3.1.4.3 Óxido Nítrico.....	32
3.2 Azul de Metileno.....	34
3.1 Origem.....	34
3.2 Azul de Metileno.....	35
4 MÉTODOS	39
4.1 Preparação animal.....	39
4.2 Desenho do estudo.....	41
4.3 Infusão do azul de metileno.....	42
4.4 Análise laboratorial.....	42
4.5 Dosagem plasmática do nitrato/nitrito (NOx).....	42
4.6 Malondialdeído.....	43

4.7 Análise estatística.....	43
5 RESULTADOS.....	45
5.1 Pressão arterial média (PAM).....	45
5.2 Pressão arterial pulmonar (PAP).....	48
5.3 Pressão capilar pulmonar (PCP).....	49
5.4 Pressão venosa central (PVC).....	50
5.5 Débito cardíaco (DC) e Índice cardíaco (IC).....	50
5.6 Resistências vasculares.....	51
5.7 Gasometria arterial, hemoglobina, hematócrito e análises bioquímicas.....	53
5.8 Nitrito/Nitrato (NOx).....	54
5.9 Malondialdeído.....	54
6 DISCUSSÃO.....	56
7 CONCLUSÃO.....	62
REFERÊNCIAS.....	64
APÊNDICE A – FIGURAS COMPLEMENTARES.....	70
APÊNDICE B – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO.....	82
APÊNDICE C – ARTIGO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO.....	83
APÊNDICE D – AVERIGUAÇÃO DE PLAGIARISMO (TURNITIN).....	105

1 INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial de Saúde, o trauma causa a morte de cerca de 4,4 milhões de pessoas no mundo a cada ano, sendo a principal causa de morte em jovens (1). Apesar de importantes avanços em medidas preventivas e nos protocolos de tratamento, o sangramento ainda é a principal causa de morte potencialmente tratável dentre essas vítimas (2). Em pacientes traumatizados, a presença de choque está relacionada a pior prognóstico, atribuído a mecanismos imunológicos e inflamatórios com origem na lesão tecidual inicial e agravada pelo sangramento, pela isquemia e pela lesão de reperfusão (3).

Muitas dessas alterações são causadas por respostas do organismo na tentativa de manter a homeostase em resposta à agressão, mas também podem ser agravadas por medidas empregadas no tratamento de resgate como a reposição volêmica e procedimentos cirúrgicos. Como consequência, esses pacientes estão predispostos a complicar com disfunção de múltiplos órgãos, sepse e morte (4).

Em estados avançados de choque, o esgotamento dos mecanismos compensatórios leva à perda da responsividade às aminas vasoativas, perda do tônus vascular da microcirculação e hipotensão refratária. Esse efeito tem origem no endotélio e nas células da musculatura lisa vascular, tendo como principal protagonista a via do óxido nítrico (NO) e da guanosina 3',5'-monofosfato cíclico (GMPc), um dos mais estudados e promissores alvos terapêuticos da condição (5).

O azul de metileno (AM) é um corante criado sinteticamente para uso na indústria têxtil, entretanto, logo após seu desenvolvimento, passou a ser empregado como corante biológico e como medicamento. Em 1976 foi observado pela primeira vez que o AM endovenoso durante uma nefrolitotomia, utilizado para demarcação de planos cirúrgicos, levou a um aumento da pressão arterial (6). Em 1981 foi descoberto que o AM reduzia a formação do GMPc por meio da inibição da guanilato ciclase, elucidando a causa da resposta pressórica descrita em 1976 (7, 8).

As propriedades do AM sobre a via do NO/GMPc motivaram uma série de investigações no tratamento do choque séptico. Em 1992, Schneider utilizou de forma pioneira o AM em duas pacientes com choque séptico refratário e, apesar da evolução para disfunção de múltiplos órgãos, observou que a administração da droga foi associada ao aumento da pressão arterial e permitiu a redução das doses de vasopressores (9).

Desde então, uma série de estudos com um número relativamente pequeno de pacientes foram conduzidos com o objetivo de avaliar o uso da droga no tratamento do choque séptico refratário. Em todos eles o AM esteve associado a aumento da pressão arterial, permitindo a redução das doses de vasopressores. Apesar disso, as informações presentes na literatura até o momento e ausência de estudos randomizados controlados não demonstraram benefícios na redução da mortalidade nesse contexto (10, 11).

Em 2001, Levin publicou o resultado de um estudo incluindo 638 pacientes submetidos a cirurgia cardíaca e que evoluíram com síndrome vasoplégica pós-operatória, concluindo que o uso do AM reduziu a mortalidade nesses pacientes, observação que foi confirmada em revisões sistemáticas posteriores (12, 13).

Potenciais cenários podem beneficiar-se da ação do AM como estratégia terapêutica e tem sido alvos de estudos experimentais, como por exemplo anafilaxia, parada cardíaca, grandes queimados, choque hemorrágico, dentre outros (14).

A perda da responsividade pressórica e a resposta inflamatória observadas em fases avançadas do choque hemorrágico levantam a hipótese de que o bloqueio da via do GMPc/No possa ser um alvo terapêutico para reduzir a disfunção de múltiplos órgãos e morte neste cenário. Em teoria, o AM poderia atuar reduzindo a hiperreatividade vascular e requerer menores volumes de soluções cristalóides e de drogas vasoativas durante a ressuscitação volêmica. Além disso, extrapolando os efeitos do AM estudados em outros contextos, a droga poderia ter efeitos adicionais no politraumatismo protegendo ativamente a microcirculação dos efeitos deletérios de altas doses de vasopressores; reduzindo a permeabilidade alveolar-capilar (responsável pela síndrome da angustia respiratória aguda – SARA); prevenindo a lesão de isquemia-reperfusão pela sua ação antioxidante e promovendo proteção neurológica na síndrome pós parada cardíaca (14).

Em 2001, Jeroukhimov estudou o uso de AM na ressuscitação de modelos de choque hemorrágico em ratos Wistar e observou que o AM reduziu a perda sanguínea e o volume necessário para o reestabelecimento da pressão arterial (15). Em 2004, Ghiassi conduziu um experimento avaliando a ressuscitação volêmica de cães em choque refratário utilizando um modelo de hemorragia de pressão fixa. Ele observou que, após o choque refratário, a combinação de AM com uma solução de volume limitado de ringer lactato melhorou a pressão arterial, o débito cardíaco e reduziu o lactato sérico, relacionando-se com melhora da sobrevida (16).

Em 2018, Volpon publicou um artigo relatando o uso do AM em uma criança politraumatizada evoluindo com choque hemorrágico refratário e que, após a

administração do AM, evoluiu com desmame progressivo de drogas vasoativas e posterior recuperação em boas condições (17).

De acordo com as diretrizes para o tratamento do choque hemorrágico, uma abordagem precoce é obrigatória e até o momento as estratégias são restritas à reposição volêmica, medidas de suporte e contenção da hemorragia (2). A natureza da resposta inflamatória ao trauma abre caminho para a investigação da sua abordagem precoce, reduzindo complicações posteriores e até o momento nenhuma estratégia farmacológica foi proposta com esse objetivo. Estudos experimentais em modelos animais avaliando o bloqueio da via do NO/GMPc podem elucidar esses mecanismos e servir de base para investigações futuras que possam mudar o paradigma do tratamento do choque hemorrágico.

2 OBJETIVOS

Avaliar a resposta pressórica da administração de azul de metileno (AM) nos primeiros sessenta minutos de choque hemorrágico em suínos.

Avaliar a segurança da droga na reversão do estado de choque.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Choque Hemorrágico

3.1.1 Definição

Choque é definido como uma falha circulatória aguda, ameaçadora a vida, na qual a circulação é incapaz de manter a oferta adequada de oxigênio para as demandas metabólicas teciduais. Como consequência, desenvolve-se um estado de anaerobiose, resultando em disfunção celular e acúmulo de lactato, fosfatos inorgânicos e radicais livres (18). Existem 4 tipos básicos de choque: hipovolêmico, distributivo, cardiogênico e obstrutivo. O Choque Hipovolêmico é decorrente da perda de volume intravascular e, quando resultante de perda sanguínea, é também referido como choque hemorrágico (19).

Clinicamente, o choque comumente associa-se a hipotensão grave (pressão arterial sistólica $< 90\text{mmHg}$), taquicardia (frequência cardíaca $> 120\text{bpm}$), acidose metabólica (lactato sérico $> 2\text{-}3\text{mmol/L}$ ou excesso de base $< -4\text{mmol/L}$), aumento da frequência respiratória (> 20 respirações/minutos), queda do débito urinário ($< 0,5\text{ml/kg/h}$), sudorese fria e alteração do estado mental (desorientação e confusão) (20).

3.1.2 Etiologia

A principal causa de choque hemorrágico é traumática, seguida dos sangramentos gastrointestinais. Causas menos comuns incluem sangramentos cirúrgicos, erosões tumorais, rupturas da aorta ou do ventrículo esquerdo, hemorragias ginecológicas, dentre outras. Os sangramentos podem ser evidentes ou ocultos (21).

3.1.3 Trauma

Trauma é definido como uma condição provocada por um agente externo de forma acidental ou intencional, resultando em lesão ou ferimento (22). Representa um grande problema de saúde pública no mundo, pois provoca 4,4 milhões de mortes por ano e deixa um número 3 vezes maior de inválidos permanentemente; além disso, afeta principalmente a população jovem, sendo a principal causa de morte de indivíduos entre 5 – 29 anos (1). Os principais mecanismos de trauma são penetrantes e contusos, sendo

que esses últimos ocorrem principalmente em acidentes automobilísticos, quedas e agressões, enquanto que os penetrantes são decorrentes principalmente de ferimentos por armas brancas ou de fogo. A maioria dos traumas decorre de ferimentos por arma de fogo ou acidentes automobilísticos (23).

Em 1983, Trunkey (22) descreveu que as mortes por trauma ocorriam em três picos diferentes. O primeiro pico correspondia às mortes quase que instantâneas e era causado principalmente por lacerações do sistema nervoso central, coração ou grandes vasos. Correspondia a cerca de 50% das mortes e, segundo o autor, só poderia ser modificado por medidas preventivas.

O segundo pico caracterizava-se por óbitos que ocorriam poucas horas após o trauma e correspondia a 30% das mortes. Era frequentemente ocasionado por grandes sangramentos envolvendo a cabeça, o sistema respiratório, os órgãos abdominais ou lesões múltiplas e, portanto, constituíam-se situações potencialmente tratáveis através do atendimento precoce e rápido acesso ao tratamento definitivo (22).

Por fim, o terceiro pico era composto por mortes tardias em dias ou semanas após o trauma e estava relacionado a infecções e falência de múltiplos órgãos. Foi observado que esse grupo era responsável por 20% das mortes e que elas poderiam ser evitadas por melhorias na qualidade assistencial, incluindo a ressuscitação, os cuidados intensivos e a reabilitação (22).

Em 1976, o cirurgião R Adams Cowley propôs o conceito de “hora de ouro” para o atendimento das vítimas de trauma, no qual esses pacientes deveriam receber tratamento definitivo em até 60 minutos após a ocorrência da lesão (24). Embora o tempo escolhido para a “hora de ouro” fosse alvo de críticas pela falta de embasamento científico para a sua definição, os centros de trauma e os sistemas de transporte rápido de vítimas surgiram a partir desse conceito e tornaram-se padrão no atendimento a politraumatizados no mundo todo (25).

As várias medidas para prevenções de acidentes, a agilidade no atendimento às vítimas e a elaboração de protocolos assistenciais pré e intra-hospitalares baseados em evidência científica mudaram a epidemiologia do trauma. Em 2005, Gunst comparou os dados coletados por Trunkey em 1983 com o cenário de 22 anos depois e observou que o padrão composto por três picos originalmente descrito havia mudado para um padrão mais próximo a dois picos, com manutenção do primeiro e segundo picos de mortes, e redução significativa do pico tardio às custas das melhorias nos cuidados intensivos e nas medidas de ressuscitação (26).

Apesar da implementação de medidas preventivas e modificações nos protocolos assistenciais, a mortalidade por traumatismos ainda permanece elevada. A principal causa de morte no trauma são as lesões do sistema nervoso central, em segundo lugar, o sangramento, causando 30 a 40% dos óbitos, sendo 33 a 56% deles ainda período pré-hospitalar. Dos pacientes que chegam ao hospital, a hemorragia é a causa de morte de 50% das mortes nas primeiras 24 horas após a lesão, as quais se reduzem drasticamente a seguir (27).

O choque hemorrágico em vítimas de trauma é um preditor de mal prognóstico e quanto maior o volume de sangue perdido, maior a repercussão bioquímica e pressórica e, conseqüentemente, piores os desfechos (27). A presença de hipotensão (pressão arterial sistólica ≤ 90 mmHg) devido à hemorragia no atendimento pré-hospitalar ou na admissão no serviço de emergência foi associada a alta mortalidade (54%) e aumento da morbidade (3, 28). O choque hipovolêmico logo após o trauma acaba por refletir-se em aumento da mortalidade tardia resultando em disfunção de múltiplos órgãos em 24% dos casos e infecção em 39% dos casos (27).

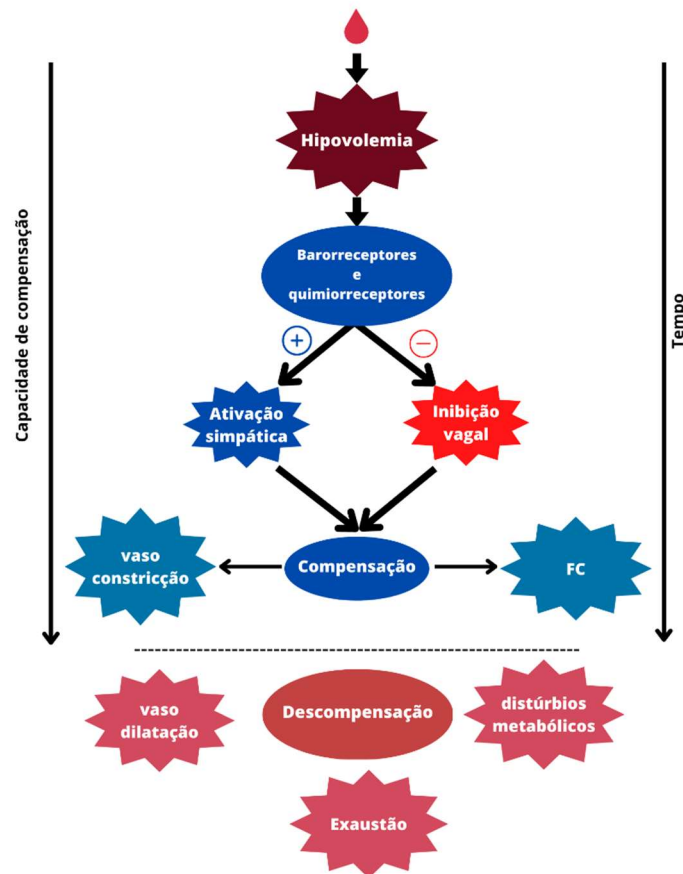
Considerando a importância do choque hemorrágico na morbimortalidade do trauma, bem como em outras condições, é um grande desafio buscar estratégias que previnam a disfunção de múltiplos órgãos e a morte ainda antes do controle definitivo do sangramento (15). Apesar de grandes esforços para melhorar os desfechos no tratamento da hemorragia grave, estudos experimentais falharam em propor novas estratégias que pudessem ser incorporadas aos protocolos de atendimento, sendo assim, novos estudos experimentais são necessários para avaliar a fisiopatologia do choque hemorrágico e buscar novos alvos terapêuticos (29).

3.1.4 Fisiopatologia

Os fenômenos implicados no aumento da mortalidade e da morbidade associados ao choque hemorrágico são relacionados a uma série complexa de fatores que se sobrepõem e contribuem para a deterioração do paciente (27). Os primeiros eventos ocorrem como resposta ao trauma e são conseqüências da lesão tecidual, deflagrando as primeiras respostas inflamatórias. O sangramento e o choque também deflagram resposta inflamatória, a qual é diretamente proporcional ao tempo até a reposição volêmica (30, 31).

Uma vez instalada a hemorragia, uma série de mecanismos compensatórios são deflagrados objetivando-se a manutenção da perfusão, incluindo ativação simpática, redução da atividade vagal e ativação do sistema renina angiotensina-aldosterona, objetivando o aumento do débito cardíaco, a vasoconstrição periférica e a consequente manutenção da pressão arterial e da perfusão tissular. Continuando o sangramento, os mecanismos de compensação progressivamente se esgotam e inicia-se a fase de descompensação, com queda da oxigenação tissular e aparecimento de distúrbios metabólicos. Inicialmente as alterações são reversíveis, porém, persistindo a condição, advém a irreversibilidade, caracterizada por aumento da vasodilatação, perda da responsividade às aminas vasoativas e disfunção orgânica (figura 1) (20).

Figura 1. Representação dos mecanismos que levam à descompensação do choque hemorrágico.



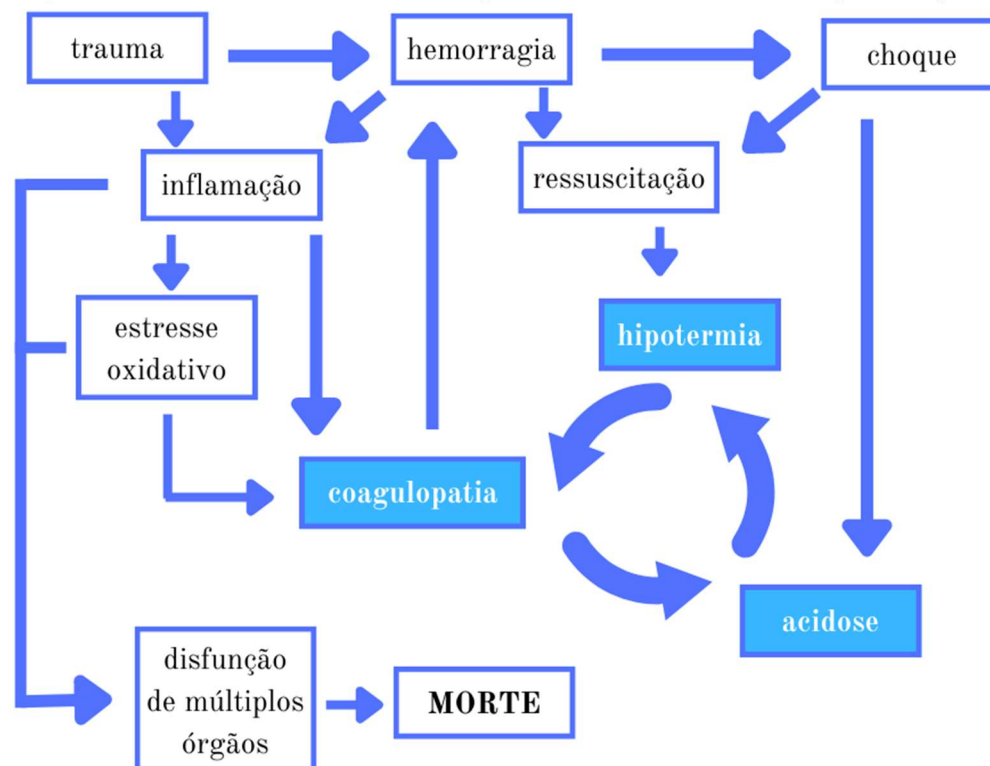
O sangramento resultando em redução da volemia leva à estimulação de baro e quimiorreceptores, desencadeando uma resposta simpática e atenuando a resposta vagal como forma de compensação. Os distúrbios metabólicos e a exaustão dos mecanismos compensatórios levam à descompensação, caracterizando o estado de choque. FC (frequência cardíaca). Adaptado de: The physiology of blood loss and shock: New insights from a human laboratory model of haemorrhage, Schiller (20).

A tentativa de manutenção da pressão arterial utilizando soluções cristaloides, coloides ou concentrados de hemácias podem contribuir para a redução da temperatura

corporal do paciente, que comumente já apresenta uma tendência a hipotermia. Além disso, essas soluções diluem os fatores de coagulação, contribuindo para o aumento da perda sanguínea. A acidose metabólica, comumente encontrada em decorrência da hipoperfusão, é agravada pela administração de grandes volumes de solução salina. Esses três componentes formam um ciclo vicioso da famosa tríade da morte no trauma: hipotermia, coagulopatia e acidose metabólica (32).

Ao longo de toda essa cadeia de eventos, ocorre a ativação de leucócitos (polimorfonucleares), endotélio, macrófagos e linfócitos como resultado da liberação de citocinas, óxido nítrico, fator ativador de plaquetas, espécies reativas do oxigênio, fatores de crescimento e eicosanóides. Além disso, uma série de hormônios como adrenalina, glucagon, hormônio adrenocorticotrófico, cortisol e citocinas (como TNF α , IL-1, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-18, dentre outras), que atuam modulando a resposta inflamatória, que converge para uma síndrome de resposta inflamatória sistêmica (SRIS), que pode levar à falência de múltiplos órgãos (figura 2) (31).

Figura 2. Cadeia de eventos desencadeada pelo trauma associado a hemorragia e choque.



A presença de acidose, hipotermia e coagulopatia constituem um ciclo vicioso, conhecido como tríade morte, que contribui para a resposta inflamatória, podendo levar à disfunção de múltiplos órgãos e morte. Adaptado de: Vascular Endothelium and Hypovolemic Shock. Gulati (32).

3.1.4.1 Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SRIS)

A síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SRIS) é definida como resposta a uma ampla variedade de insultos e é caracterizada por dois ou mais dos seguintes critérios:

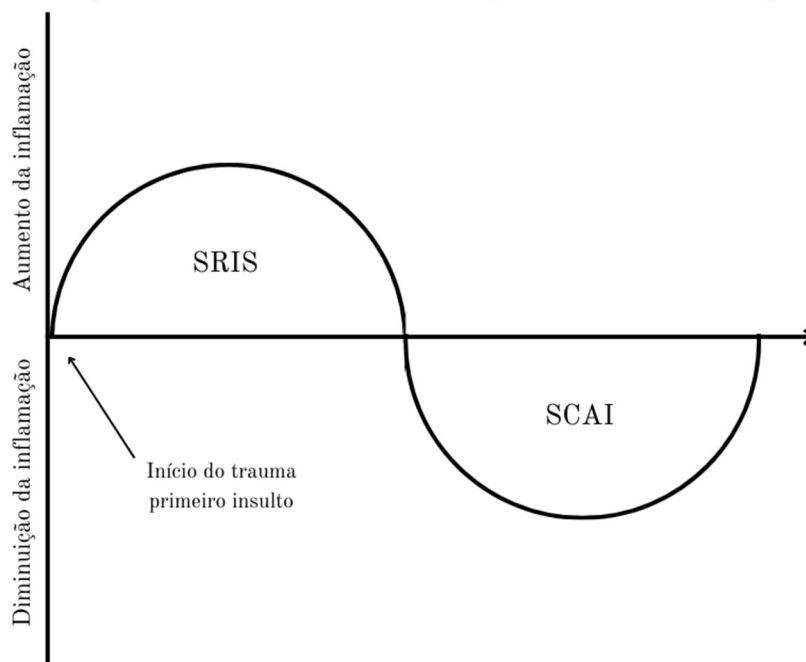
- 1) temperatura $> 38^{\circ}\text{C}$ ou $< 36^{\circ}\text{C}$;
- 2) frequência cardíaca > 90 batimentos por minutos;
- 3) frequência respiratória maior que 20 incursões por minuto ou $\text{pCO}_2 < 32\text{mmHg}$;
- 4) contagem de leucócitos maior que $12.000/\text{mm}^3$ ou menor que $4.000/\text{mm}^3$ ou a presença de mais de 10% de bastões (33).

Vários insultos podem levar à SRIS, dentre as quais as mais comuns são: infecção, trauma, lesão de isquemia reperfusão, doenças autoimunes e procedimentos cirúrgicos. Quando a resposta inflamatória é exagerada ou perpetuada, pode complicar com sepse, lesão pulmonar aguda, choque distributivo, insuficiência renal aguda e síndrome de disfunção de múltiplos órgãos (SDMO), que é definida como o estado de alteração aguda da função orgânica, com perda da capacidade de manutenção da homeostase (33).

O estudo do processo inflamatório relacionado ao trauma identificou dois componentes antagônicos que agem para manter a homeostase após a lesão. Um dos componentes seria a SRIS, pro inflamatória, e a outra, a resposta anti-inflamatória, denominada síndrome compensatória anti-inflamatória (SCAI), de caráter imunossupressor. Os pacientes que evoluem sem complicações apresentam resolução do processo inflamatório, porém, naqueles pacientes que apresentam desbalanço entre esses dois mecanismos antagônicos, complicam com SDMO e sepse (34, 35).

Uma das teorias mais utilizadas para explicar como esses dois mecanismos atuam após a lesão, é a teoria das duas ondas (figura 3). Nessa teoria, após um trauma grave (insulto inicial), o paciente desenvolve uma SRIS e a seguir, uma SCAI, visando conter o insulto inflamatório inicial. Entretanto, um segundo insulto (hemorragia, transfusão, cirurgia, infecção etc.) acomete o paciente em uma fase de vulnerabilidade, que pode levar ao desenvolvimento de uma SRIS descontrolada, SDMO e óbito (4). De acordo com essa teoria, uma das formas de bloquear os efeitos da segunda onda seria a intervenção precoce, ainda durante a primeira onda (34).

Figura 3. Esquema da teoria das duas ondas na resposta imuno-inflamatória pós-trauma.



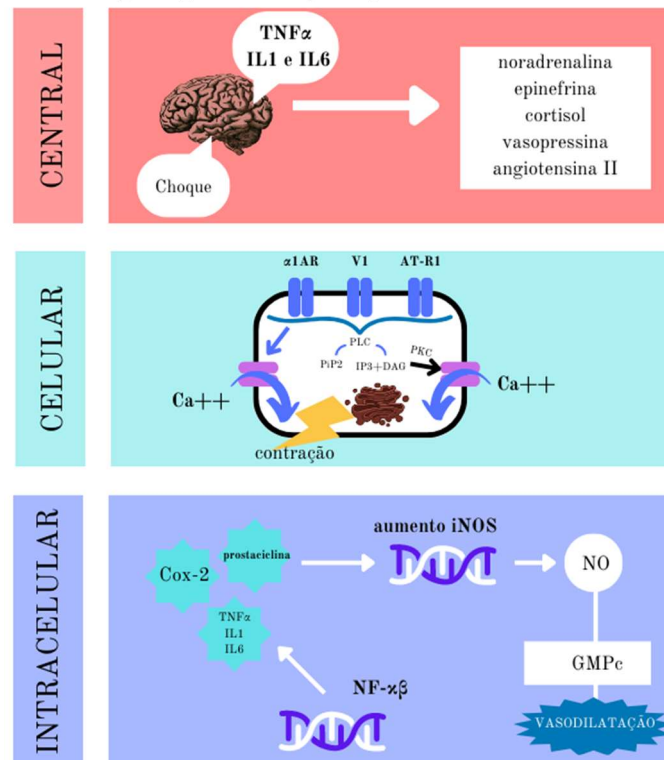
A resposta inicial ao trauma pode desencadear uma síndrome de resposta inflamatória sistêmica (SRIS), que é contrabalanceada por uma síndrome compensatória anti-inflamatória (SCAI). A ocorrência de novos insultos após a ocorrência do trauma, como sangramentos, cirurgias, hipóxia, infecções e lesão de isquemia reperfusão podem desequilibrar esse mecanismo e ocasionar disfunção de múltiplos órgãos, sepse e morte. Adaptado de: Acetylation: a novel method for modulation of the immune response following trauma/hemorrhage and inflammatory second hit in animals and humans. Sailhamer (4).

3.1.4.2 Vasoplegia

A vasoplegia é um fenômeno observado em estágios avançados de todos os tipos de choque acarretando em uma vasodilatação descontrolada e refratária à terapia vasopressora. A origem da vasoplegia é multifatorial, mas está intimamente ligada à disfunção endotelial e à inflamação sistêmica (36).

A gênese da vasoplegia envolve vários níveis (figura 4). O primeiro deles é o sistema nervoso central, que é estimulado por baro e quimiorreceptores, bem como por citocinas inflamatórias como $TNF\alpha$, interleucina 1 e interleucina 6 em resposta ao choque. Como consequência, o sistema nervoso simpático libera norepinefrina, epinefrina e cortisol, e o sistema nervoso autônomo, vasopressina. Essas substâncias agem na periferia para manter o tônus vascular no início do choque, porém a ativação sustentada desse sistema pode levar à refratariedade no choque (36).

Figura 4. Os três principais níveis que regulam o tônus vascular na vasoplegia.



Central: o estímulo do sistema nervoso central por baro e quimiorreceptores, bem como por citocinas pró-inflamatórias como TNF α , interleucinas 1 e 6 levam à produção de noradrenalina, epinefrina, cortisol, vasopressina e angiotensina II. O aumento dos níveis de catecolaminas associa-se a dessensibilização de seus receptores e queda da responsividade a vasopressores. Celular: Os receptores ligados à proteína G, tais como α 1 adrenorreceptores, (α 1AR); receptores vasopressina 1 (V1) e receptores da angiotensina 1 (AT1), controlam a contração muscular lisa por meio da ativação da fosfolipase C (PLC), formando 1,4,5 inositol trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG) a partir de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2). O IP3 atua no retículo sarcoplasmático, liberando cálcio para o citoplasma. O DAG estimula a proteína quinase C (PKC), que, juntamente com o receptor α 1AR estimulam os canais de cálcio para o influxo de cálcio para o interior da célula, causando a contração muscular lisa. A estimulação adrenérgica sustentada dos receptores α 1AR, V1 e AT1, leva à sua fosforilação com consequente perda da resposta aos vasopressores. Intracelular: estímulos inflamatórios levam à desinibição do fator nuclear κ β (NF- κ β), que leva à produção de TNF α , interleucinas 1 e 6 que, conjuntamente à atividade da ciclo-oxigenase-2 (COX-2) e da prostaciclina estimulam a expressão da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) com grande aumento na produção de óxido nítrico (NO), que por sua vez aumenta a produção da guanosina monofosfato cíclico (GMPc), que leva à vasodilatação. O azul de metileno age inibindo a formação do GMPc. Adaptado de: Vasoplegia treatments: the past, the present, and the future. Levy. (36).

O segundo nível é o celular e envolve os três principais receptores que regulam o tônus vascular, que são receptores ligados a proteína G, sendo eles: adrenérgico, vasopressina 1 e receptores angiotensina 1. Quando há estimulação adrenérgica sustentada, esses receptores sofrem fosforilação por meio das quinases do receptor da proteína G, inibindo a ligação das catecolaminas e a sinalização subsequente, o que se traduz em baixa responsividade aos principais vasopressores (36).

Por fim, o terceiro nível é o ambiente intracelular das células endoteliais e de músculo liso vascular, que apresenta grande importância na refratariedade no choque.

Estímulos pró inflamatórios como as citocinas IL1 e TNF α levam à ativação do fator de transcrição nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$), que expressa genes pró-inflamatórios de citocinas e moléculas de adesão (37). A expressão de citocinas como TNF α , IL1 e IL6 estimulam a expressão do óxido nítrico sintase induzível (iNOS), que leva à produção de grande quantidade de óxido nítrico. O óxido nítrico ativa a produção de guanosina monofosfato cíclico (GMPc) que é um mediador da vasodilatação (36).

Atualmente, o estudo de opções terapêuticas atuando nos três nichos implicados no desenvolvimento da vasoplegia representam perspectivas no tratamento desta condição. Assim, constituem opções terapêuticas possíveis: os bloqueadores beta1, atuando tanto em nível central quanto no bloqueio intracelular da expressão do NF- $\kappa\beta$; os glicocorticoides, que também reduzem a produção do NF- $\kappa\beta$ e a síntese de iNOS, por meio da inibição da ciclo-oxigenase-2 (COX2); e, por fim, o azul de metileno, que age na redução da produção de GMPc (36).

3.1.4.3 Óxido Nítrico

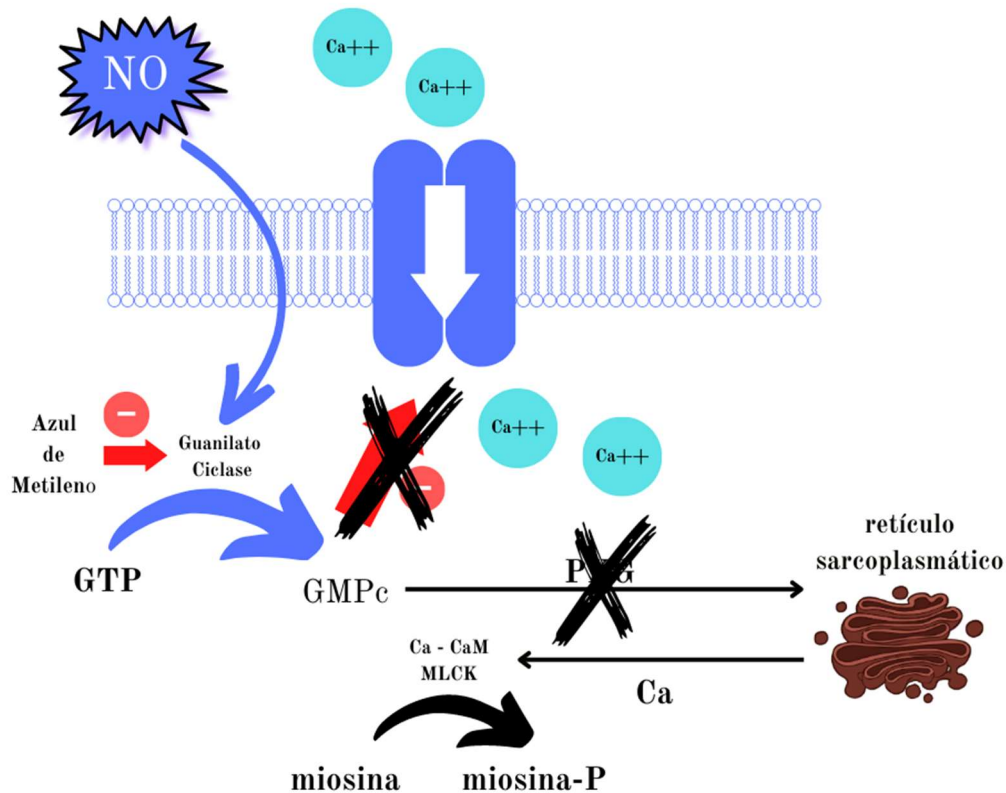
Em 1976, Moncada descreveu o primeiro vasodilatador endotelial, a prostaciclina (PGI₂) (38). Na década de 80, um outro potente vasodilatador foi descoberto e denominado fator relaxante derivado do endotélio (EDRF), que mais tarde, foi identificado como sendo o óxido nítrico (39). Mais adiante, foi descrito também o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) de menor expressão no mecanismo de vasodilatação (40).

O óxido nítrico é sintetizado pelas diferentes formas de óxido nítrico sintases a partir do amino ácido semi-essencial L-arginina. Uma dessas enzimas é a eNOS (óxido nítrico sintase endotelial) e a sua expressão é normalmente encontrada no organismo, fazendo com que o NO atue fisiologicamente mantendo um tônus vasodilatador e auxiliando na regulação da pressão arterial e do fluxo sanguíneo. Além disso, o NO participa: da regulação da coagulação, contribuindo para a atividade antitrombótica do endotélio; de atividades neurais; de funções imunes; da angiogênese; da modulação da adesão leucocitária e da permeabilidade vascular a líquidos e proteínas. Em condições normais, ele é produzido pelo endotélio em concentrações pico molares (41).

Uma outra forma de NO sintase é a iNOS (NO sintase induzível), que é produzida pelas células após estímulos inflamatórios ou imunológicos, aumentando a produção de NO 100 a 1000 vezes a mais em relação à eNOS. A ativação dessa enzima requer várias

horas e resulta na produção exagerada de NO, que leva à vasodilatação, à alteração da permeabilidade vascular, bem como à migração e ativação de leucócitos (figura 5) (42).

Figura 5. Via do óxido nítrico / guanosina monofosfato cíclico (GMPc).



O óxido nítrico (NO) liga-se à guanilato ciclase ativando-a para a conversão da guanosina 5'-trifosfato em guanosina 3',5'-monofosfato cíclico (GMPc). O GMPc bloqueia os canais de cálcio dependentes de voltagem e ativa a proteína quinase dependente de GMPc, a qual ativa a adenossinatrifosfatases (ATPase), que sequestra o cálcio para o retículo sarcoplasmático. A queda do cálcio intracelular impede a ativação do complexo cálcio-calmodulina (Ca-CaM/MLCK), com isso não há fosforilação da miosina e, conseqüentemente, não há contração muscular lisa. O azul de metileno inibe a guanilato ciclase e leva à redução da produção do GMPc, inibindo o relaxamento da musculatura lisa. Adaptado de *Endothelial Dysfunction in Hemorrhagic Shock*. Évora. (44).

O NO atua como sinalizador ao ligar-se ao grupo heme da porção N terminal da enzima guanilato ciclase, levando a sua ativação como catalítico na conversão de guanosina 5'-trifosfato (GTP) em guanosina 3',5'-monofosfato cíclico (GMPc) (44).

O GMPc, por sua vez, possui uma série de funções no organismo e, no sistema cardiovascular, atua regulando a agregação plaquetária (por meio do controle intracelular de cálcio), bem como a contratilidade do músculo cardíaco e da musculatura lisa. Nas células de músculo liso, o GMPc reduz a concentração de cálcio intracelular bloqueando os canais de cálcio e ligando-se a receptores em proteína quinases dependente de GMPc (PKG). A PKG ativa o transportador SERCA (retículo sarcoplasmático Ca^{2+} - ATPase),

que sequestra o cálcio para o interior do retículo sarcoplasmático. Como o íon cálcio é necessário para a ativação da miosina na contração muscular, a queda da sua concentração intracelular por ação do GMPc leva ao relaxamento da musculatura lisa e consequente vasodilatação (44).

Devido aos efeitos vasodilatadores da via do NO/GMPc, alguns alvos terapêuticos potenciais foram testados como tratamento do choque. Uma das vias estudadas foi o bloqueio da NOS por meio de inibidores, como NG-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) e NG metil-L-arginina (L-NMMA) que, apesar de promover melhora hemodinâmica, causaram efeitos secundários com aumento de complicações e da mortalidade, sendo, portanto, necessária a interrupção de seus estudos (43). O azul de metileno, que atua bloqueando a enzima guanilato ciclase é o componente mais estudado e mais promissor no controle da vasodilatação dentro da via NO/GMPc.

Outros alvos terapêuticos baseados em outras vias vasodilatadoras foram estudados como: a via da PGI₂ por meio de inibição da COX-2; a inibição dos canais de potássio (K⁺) trifosfato de adenosina (ATP); e o bloqueio de canais de potássio ativados por cálcio de grande condutância (BKCa). Contudo, seus estudos falharam em provar o benefício destas terapias no controle da vasodilatação periférica (43).

3.2 Azul de Metileno

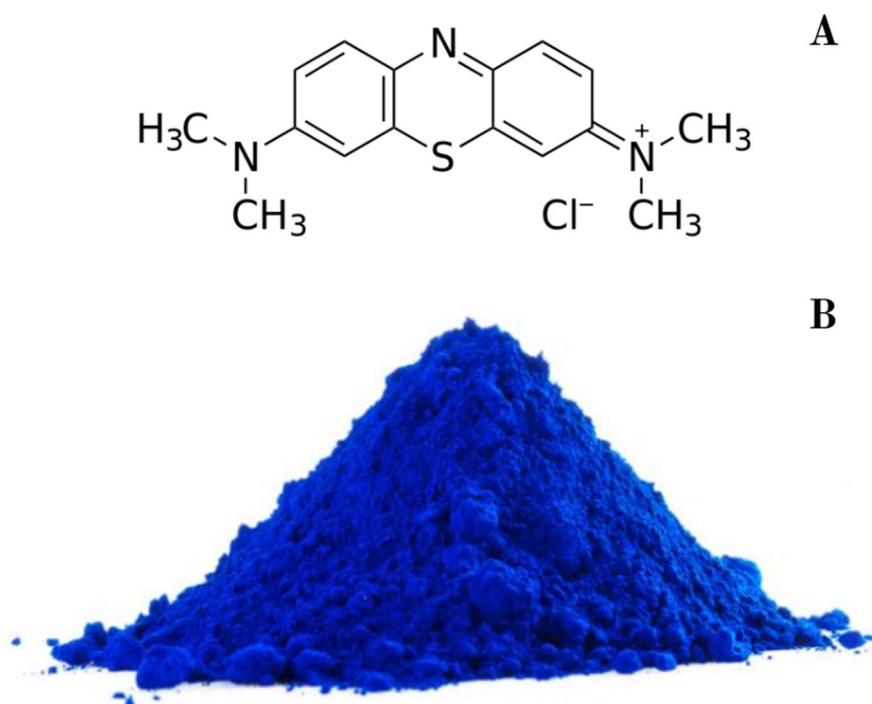
3.1 Origem

A cor azul é uma das três cores primárias e historicamente é difícil de se obter naturalmente um pigmento com tons intensos e duradouros. No antigo Egito, essas propriedades eram obtidas a partir da pedra semipreciosa lápis lazúli. Durante a idade média a cor era difícil de ser obtida e sua principal fonte era proveniente do vegetal *Isatis tinctora*, que produzia um pigmento de má qualidade. A dificuldade em obter pigmentos tornaram os tecidos azuis artigos de luxo e a lucratividade em torno dos pigmentos fomentaram os negócios de Marco Polo no Afeganistão em busca de lápis lazúli e de Vasco da Gama nas Índias para levar *Indigofera tinctoria* à Europa. Ainda no século XIX a produção de tinturas azuis movimentava um lucrativo mercado, até que em 1868 o alemão Johan Friedrich Wilhelm Adolf von Bayer, trabalhando para a indústria química alemã *Badische Anilin & Soda Fabrik* (BASF), sintetizou o primeiro corante azul índigo sintético, utilizado para colorir o algodão do recém criado jeans (45).

3.2 Azul de Metileno

A BASF tornou-se pioneira na produção de corantes sintéticos e, em 1876, Henrich Caro, químico alemão a serviço da BASF, sintetizou um novo corante: o Azul de Metileno. Quimicamente, trata-se de um composto heterocíclico da classe das fenotiazinas, sólido verde escuro e que diluído em água produz uma solução azul. Sua fórmula molecular é $C_{16}H_{18}ClN_3S$ (figura 6) (46).

Figura 6. Azul de metileno.



A. Estrutura química do azul de metileno. B. Aspecto do azul de metileno em pó. Fonte: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Methylene-blue#section=Structures>.

Buscando formas de identificar diferentes patógenos, a microbiologia estudava o uso de corantes que pudessem auxiliar a identificação de microrganismos. A interação entre o Azul de Metileno e as estruturas de bactérias e parasitas levaram ao seu uso como corante na identificação do *Mycobacterium tuberculosis* por Robert Koch e na composição da coloração de Giemsa. A observação de que o AM possuía também efeitos no crescimento de micro-organismos levou em 1891 à descoberta de sua ação contra o *Plasmodium* causador da malária, creditada a Paul Guttman e Paul Ehrlich. Assim, o AM passou a ser considerado a primeira droga totalmente sintética produzida. Uma vez incorporada no arsenal farmacêutico, a droga foi testada para várias condições e, no início

do século XX, ganhou novos empregos dentre as quais o uso como antidepressivo e psicotrópico, servindo mais tarde de base para o desenvolvimento da clorpromazina e dos antidepressivos tricíclicos (47).

Nos dias atuais o azul de metileno apresenta várias indicações na prática clínica, com uso aprovado pelo *US Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos da América para algumas delas. Trata-se de uma droga segura, empregada no tratamento da metahemoglobinemia, na prevenção de infecção do trato urinário, na prevenção e tratamento da toxicidade por ifosfamida em pacientes com câncer e como corante cirúrgico para identificação de fistulas, glândulas e trajeto de nervos. Além disso, a droga pode também ser utilizada como antimalárico e no tratamento do priapismo e do prurido anal refratário (47). Mais recentemente, o AM tem sido utilizado para o tratamento dos choques refratários como na vasoplegia após cirurgia cardíaca. Adicionalmente, droga ainda vem apresentando resultados promissores em novas pesquisas no tratamento da doença de Alzheimer (48).

A apresentação do AM é de ampolas de 5ml contendo azul de metileno a 2%. A meia vida da droga é de aproximadamente 5 horas e a dose terapêutica convencional recomendada é de 1-2mg/kg. Os efeitos de intoxicação pela droga começam a aparecer a partir de 7mg/kg e a sua dose letal é de 40mg/kg. Embora a maioria dos trabalhos utilizem a dose 2mg/kg em bolus no choque, a observação de que o efeito da droga parece decair com o tempo, motivou a realização de estudos da utilização da droga em bolus de 2mg/kg, associada a infusão contínua a 0,25-0,5mg/kg/h, o que vem demonstrando resultados promissores (49).

As principais contra indicações para o seu uso são: alergia a sua composição; utilização de inibidores de recaptção da serotonina e deficiência de glicose-6-fosfato (46). Os principais efeitos colaterais da droga são a coloração azul esverdeada da urina e a coloração azulada da pele e mucosas, de caráter autolimitado. Além disso, pode causar síndrome serotoninérgica potencialmente grave, quando associado ao uso de drogas serotoninérgicas; a anemia hemolítica em pacientes com deficiência de glicose-6-fosfato; e quando em doses tóxicas, arritmias, vasoconstrição coronariana, queda do débito cardíaco, redução do fluxo visceral e aumento da pressão arterial pulmonar e da resistência vascular pulmonar levando à queda de saturação (50).

Estudos *in vitro* demonstraram que o azul de metileno era capaz de inibir a vasodilatação agindo na via do NO / GMPc por meio da inibição da guanilato ciclase (51). Estudos utilizando um número limitado de pacientes avaliando o papel do AM em

paciente com choque séptico foram promissores ao demonstrar o papel da droga no aumento da pressão arterial e na redução da dose de vasopressores, porém não demonstraram benefícios na redução de mortalidade. Novos estudos são necessários para investigar o papel do AM na redução da mortalidade no choque séptico (52).

Os resultados encontrados no uso do AM em outras modalidades de choque levaram à hipótese de seu uso como adjuvante no tratamento do choque hemorrágico. Atualmente, o tratamento padrão do choque hemorrágico é a reposição volêmica e, em casos que cursem com refratariedade, drogas vasoativas. Como visto anteriormente, o uso de soluções salinas e transfusões está relacionado a diluição de fatores de coagulação e aumento da resposta inflamatória. Além disso, maiores períodos de hipotensão estão associados a piores desfechos.

Um estudo conduzido por Jeroukhimov avaliando a ressuscitação volêmica em modelos de choque hemorrágico em ratos associado a inibição da formação de radicais livres pelo azul de metileno mostrou que a droga quando associada a reposição volêmica prevenia os efeitos negativos da lesão de reperfusão (15). Um outro experimento realizado por Ghiassi estudou a combinação de AM com solução de ringer lactato em modelos de choque refratário em cães e constatou que essa combinação favoreceu a estabilidade hemodinâmica e reduziu o dano isquêmico (16).

O entendimento dos mecanismos inflamatórios com início logo após a lesão no trauma levantou a hipótese de que os efeitos do azul de metileno utilizado precocemente poderiam atuar como adjuvante no reestabelecimento da pressão arterial, prevenir os efeitos deletérios da isquemia e evitar o uso de quantidades excessivas de soluções cristaloides, de hemocomponentes e vasopressores.

4 MÉTODOS

O protocolo experimental utilizou porcos machos da raça Daland pesando entre 22 e 26 Kg, provenientes de criadores especializados. O protocolo experimental do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto sob o protocolo número 23/2015.

4.1 Preparação animal

Os animais receberam medicações pré-anestésicas com injeção intramuscular de xilazina (2 mg/kg) combinada com cetamina (20 mg/kg) no músculo quadríceps de um dos membros posteriores. A seguir, a anestesia foi mantida por via endovenosa (veia jugular interna direita pela via central do cateter Swan-Ganz) com midazolam 0,5 mg/kg/h e fentanil 3 mcg/kg/h em bomba de infusão contínua.

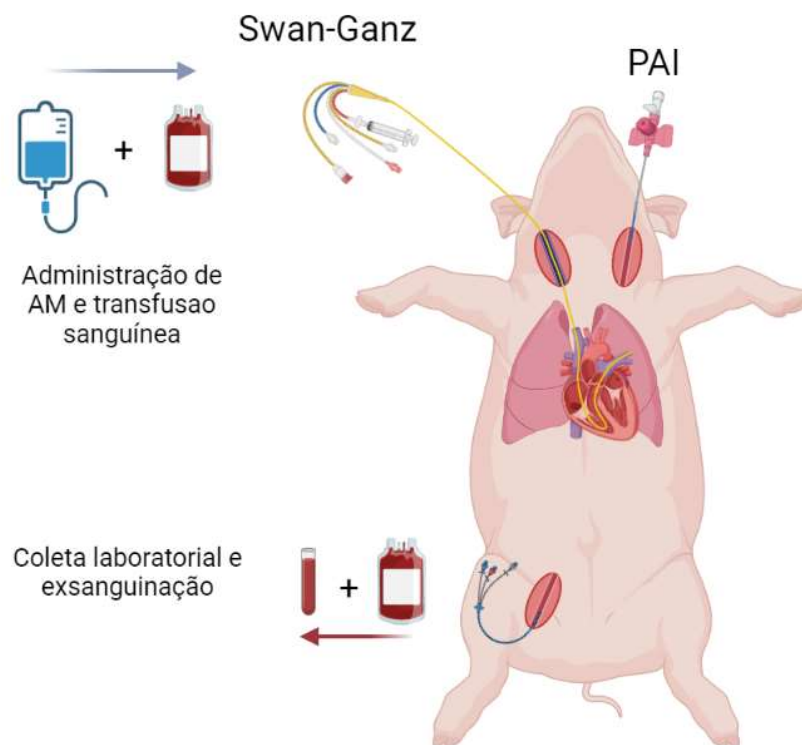
Após a indução anestésica, os animais foram intubados e submetidos à ventilação mecânica em modo limitado a pressão, ciclado a tempo, com frequência respiratória de 40 incursões por minuto, pressão inspiratória de 15 cmH₂O e pressão expiratória final de 6 cmH₂O, tempo inspiratório de 0,35 segundos e fluxo de 8 l/min. A temperatura retal do animal foi mantida entre 37-38,5°C, com aquecimento externo através de placa térmica elétrica.

Um cateter Swan-Ganz 774HF75 CCombo CCO/SvO₂ (Edwards Lifesciences, Irvine, California, Estados Unidos da América) foi locado no lúmen da artéria pulmonar por meio da veia jugular interna direita. A artéria carótida esquerda foi canulada para medida da pressão arterial média (PAM) e para a coleta de gasometria arterial. A pressão arterial média (PAM), a pressão arterial pulmonar (PAP), a pressão capilar pulmonar (PCP) e a pressão venosa central (PVC) foram registradas por meio do dispositivo MP System 100 A (BioPac System Inc., Goleta, California, Estados Unidos da América). O débito cardíaco (DC), índice cardíaco (IC), a resistência vascular sistêmica (RVS), o índice de resistência vascular sistêmica (IRVS), a resistência vascular pulmonar (RVP) e o índice de resistência vascular pulmonar (IRVP) foram registrados utilizando o sistema Vigilance (Edwards Lifesciences LLC). A artéria femoral direita recebeu um cateter para retirada do sangue e promoção do choque, bem como para a coleta de amostras laboratoriais (figura 7)

Após o procedimento de monitorização invasiva, foi concedido um período de estabilização de 20 minutos, ao final do qual a pressão registrada foi considerada a pressão basal do animal. Após este período, o animal foi exsanguinado através do cateter implantado na veia femoral até alcançar a PAM de 55mmHg. O sangue retirado foi armazenado em bolsas de coleta de sangue contendo o anticoagulante citrato-fosfato-destrose com capacidade de 500ml (J.P. Indústria Farmacêutica S.A, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil), mantidos sobre mesas agitadora (Ohaus Corporation, Parsippany, Nova Jersey, Estados Unidos da América) durante a coleta e até o momento da reinfusão. O peso médio das bolsas de sangue dos 30 animais foi de 645,04 gramas (desvio padrão = 185,3g) e o tempo médio para que os animais alcançassem a pressão preconizada foi de 14,75 minutos (desvio padrão = 5,29 minutos).

Uma vez alcançada a pressão de 55mmHg, o cronometro foi zerado ($t=0$). Medidas dos parâmetros hemodinâmicos de PAM, PAP, PVC, PCP, DC, IC, RVS, IRVS, RVP e IRVP foram feitas logo após a estabilização do animal (basal) e nos tempos 0, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 90.

Figura 7. Preparo animal para o experimento



Através da veia jugular interna direita foi introduzido um cateter de Swan-Ganz, cuja extremidade foi locada na arterial pulmonar. O cateter foi utilizado para medidas hemodinâmicas, bem como para a administração do azul de metileno (AM) e da retransfusão sanguínea. A artéria carótida esquerda foi canulada para a coleta de gasometria arterial e monitorização da pressão arterial invasiva (PAI). E a veia femoral direita foi utilizada para a retirada de sangue e coleta de amostras laboratoriais venosas.

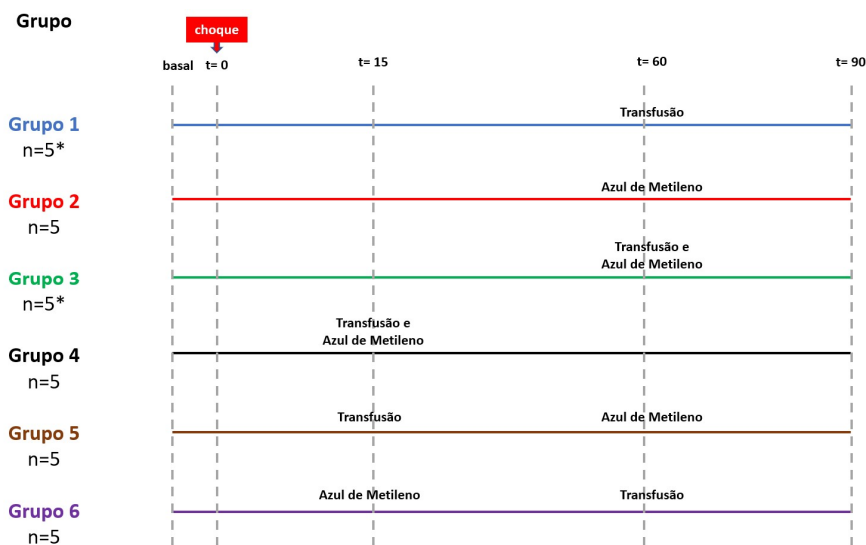
Amostras laboratoriais para avaliação bioquímica, gasométrica arterial e dos níveis de MDA e nitrato foram coletadas antes da promoção do choque (basal), e nos tempos 0, 15, 30 e 90 minutos. A depender do grupo experimental, a reinfusão do volume total de sangue utilizado na promoção do choque, também referido como transfusão sanguínea (TS), a administração do azul de metileno (AM) ou ambos foram feitos pela via central do cateter de Swan-Ganz. Após o experimento, os animais foram sacrificados por exsanguinação ainda sob sedação profunda.

4.2 Desenho do estudo

Os animais (n=30) foram aleatoriamente alocados em 6 grupos experimentais (figura 8), da seguinte forma:

- Grupo 1 (60TS): retransfusão sanguínea (TS) aos 60 minutos;
- Grupo 2 (60AM): infusão de azul de metileno (AM) aos 60 minutos;
- Grupo 3 (60AM + TS): infusão de AM concomitantemente a TS aos 60 minutos;
- Grupo 4 (15AM + TS): infusão de AM concomitantemente a TS aos 15 minutos;
- Grupo 5 (15TS + 60AM): TS aos 15 minutos e infusão de AM aos 60 minutos;
- Grupo 6 (15AM + 60TS): infusão de AM aos 15 minutos e transfusão sanguínea aos 60 minutos.

Figura 8. Cronologia dos diferentes grupos experimentais.



Representação das intervenções entre os seis grupos experimentais; t (tempo em minutos). *os grupos experimentais continham inicialmente 5 animais, porém um animal do grupo 1 e um animal do grupo 3 sofreram parada cardiorrespiratória durante o experimento e foram excluídos dos respectivos grupos, assim, grupos 1 e 3 (n final = 4).

4.3 Infusão de azul de metileno

O azul de metileno (1%) foi preparado por meio de diluição de 10mg da substância em pó em 1ml de água estéril. Uma dose em bolus de 2mg/kg foi administrada por via endovenosa nos animais selecionados para recebê-la, conforme o protocolo experimental.

4.4 Análise laboratorial

As amostras de sangue foram colhidas e seringas de gasometria contendo heparina de lítio com cálcio balanceado em proporção de 50 UI de heparina por ml de sangue (Neolab, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil) e submetidas a dosagens de hemoglobina (Hb), hematócrito (Ht), sódio (Na), potássio (K), lactato e glicose; bem como análise gasométrica incluindo pH, pressão parcial do oxigênio arterial (pO_2), pressão parcial do gás carbônico arterial (pCO_2), excesso de base (BE) e bicarbonato (HCO_3) foram realizadas. As dosagens foram feitas por meio do equipamento Gem Premier 3000 (Instrumentation Laboratory Co., Bedford, Massachusetts, Estados Unidos da América) previamente calibrado e equipados com cartuchos iQM 150 GEM Premier (iQM Instrumentation Laboratory Co., Bedford, Massachusetts, Estados Unidos da América).

4.5 Dosagem plasmática do nitrato/nitrito (NOx)

Após a coleta sanguínea, as amostras foram submetidas a preservação do Nox, para isso, elas receberam heparina, na proporção de 1ml de sangue para 5 μ l de 1000UI/ml (5IU) de heparina e foram centrifugadas (5.000 x g, 10 minutos). A seguir, o plasma foi separado e imerso em nitrogênio líquido e armazenado a -70°C.

No dia da análise, o plasma foi desproteíno utilizando etanol 95% a 4°C por 30 minutos e centrifugado (10.000 x g, 5 minutos) a 4°C. A determinação da concentração de NOx foi feita pelo método da quimiluminescência NO/ozônio, utilizando o aparelho Sievers NO Analyzer (Sievers 280i NOA, Sievers, Boulder, Columbia, Estado Unidos da América). Um volume de 5 μ l do sobrenadante foi aspirado e injetado na câmara de reação contendo o agente redutor (VCl_3 – cloreto de vanádio - 0,8% em HCl – ácido clorídrico - 1N), convertendo o NOx em NO, que reage com o ozônio, emitindo luz, que é detectada e gera uma corrente elétrica que é registrada pelo aparelho, correspondendo à concentração do NOx (53-55).

4.6 Malondialdeído

O malondialdeído (MDA) constitui-se um dos produtos finais derivados da peroxidação de ácidos graxos e é um dos marcadores do estresse oxidativo. A determinação da concentração do MDA foi realizada por espectrofotometria pela técnica do ácido tiobarbitúrico (TBA), na qual o MDA reage com o TBA formando um composto colorido.

Para isso, amostras de sangue foram coletadas em tubos EDTA k3 (Cralplast, Cotia, São Paulo, Brasil) e conservadas em gelo para posterior centrifugação a 4°C (900 x g, 20 minutos). Uma amostra de 50µL do plasma sobrenadante foi transferida para um tubo de ensaio e recebeu 750µL de solução de ácido fosfórico (H₃PO₄) 0,44mol/L e 250µL de solução de ácido tiobarbitúrico 42mmol/L. A seguir os tubos de ensaio foram colocados em um banho de água a 100°C por 60 minutos, seguido por banho de água fria a 0°C. Antes da espectrofotometria, 0,5mL de cada amostra foi transferido para micro tubos contendo 0,5mL de solução de metanol-NaOH e então centrifugadas (9500 x g, 5 minutos) para sedimentação das proteínas plasmáticas. Um volume de 50 µL do sobrenadante foi submetido a espectrofotometria a 532 nm em um leitor de microplacas Versamax (Molecular Devices, San Jose, California, Estados Unidos da América). A concentração de MDA são calculadas utilizando uma curva de calibração preparada com 1,1,3,3-tetramotoxipropano (TEP) em concentrações de 0 a 100 µM (56, 57).

4.7 Análise estatística

Foram utilizados os testes de análise estatística não paramétrico de Kruskal-Wallis e o teste pareado de Wilcoxon corrigido pela escala de Bonferroni. Para essa finalidade foi empregado o programa de computador Prisma 5.0, GraphPad Software Inc., (San Diego, California, Estados Unidos da América). Foi considerada significância estatística quando o valor de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

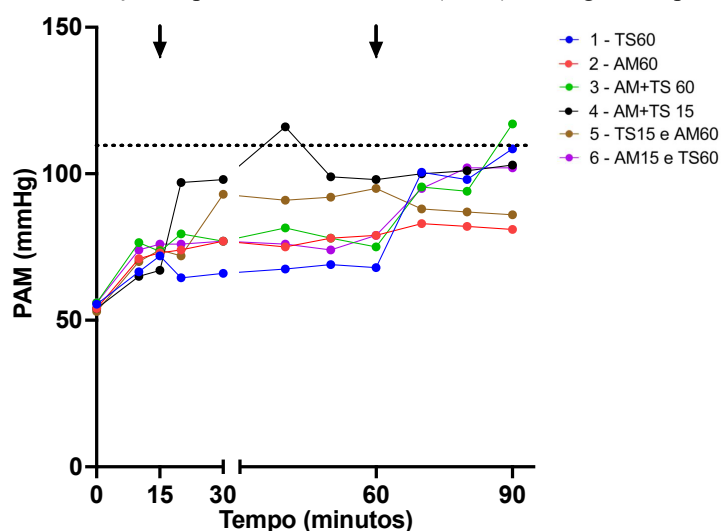
Durante o experimento, um animal do grupo 1 (60 TS) e um animal do grupo 3 (60AM + TS) apresentaram descompensação hemodinâmica seguida de parada cardiorrespiratória e óbito antes da intervenção programada para os 60 minutos. Por esse motivo, os animais foram excluídos da análise em seus respectivos grupos.

A reversão do estado de choque foi considerada quando a pressão arterial média (PAM) do animal alcançou 90% da PAM basal. Para as demais variáveis hemodinâmicas, variações foram consideradas quando os valores variaram +/- 10% de seus valores basais.

5.1 Pressão arterial média (PAM)

A figura 9 apresenta a evolução das medianas da PAM ao longo do experimento. Exceto pelo grupo 2, que permaneceu em choque ao longo de todo o experimento, os demais grupos sofreram reversão do estado de choque. Os valores basais de PAM dos diferentes grupos experimentais estão representados na tabela 2 (Apêndice A) e a média de todos os grupos representada pela linha pontilhada na figura 9.

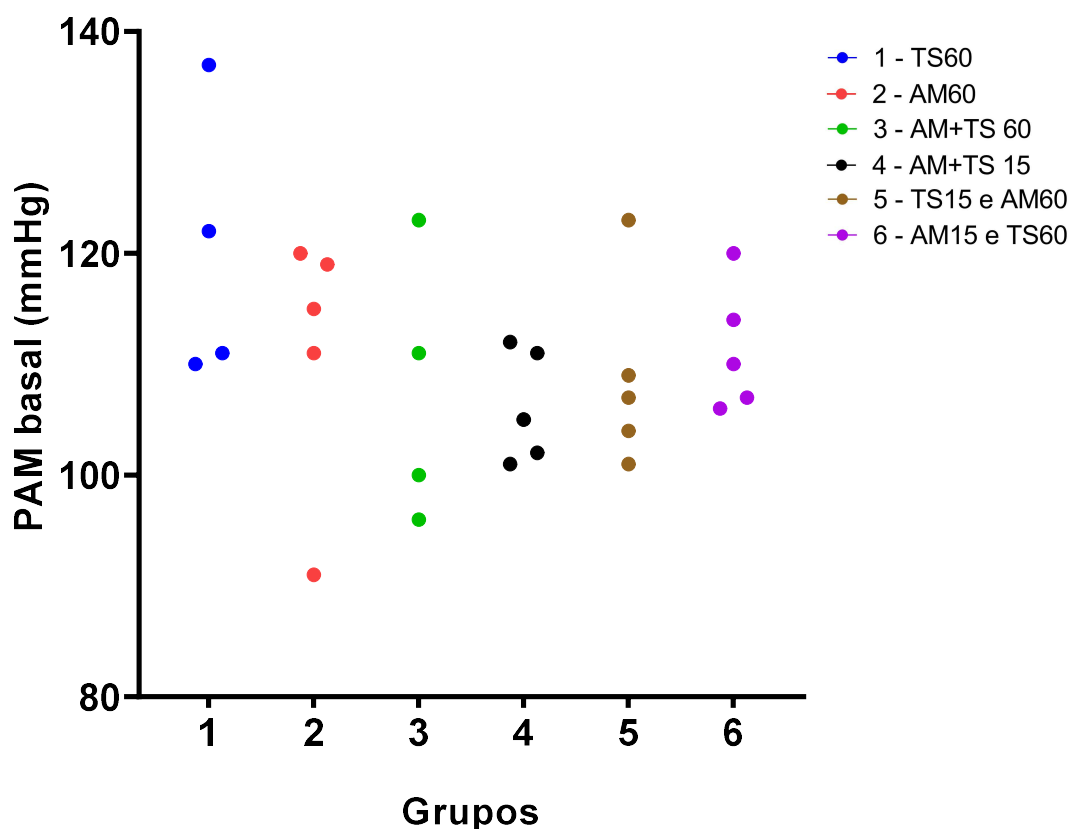
Figura 9. Evolução da pressão arterial média (PAM) ao longo do experimento.



Evolução temporal das medianas da pressão arterial média (PAM) ao longo do experimento entre os grupos experimentais. Após a monitorização invasiva foi concedido um intervalo de 20 minutos para a estabilização dos animais, após o qual os animais foram exsanguinados até alcançarem a pressão arterial média (PAM) de 55mmHg (tempo = 0). Exceto pelo grupo 2, que recebeu apenas azul de metileno e permaneceu em choque, todos os demais grupos tiveram o estado de choque revertido. As setas indicam o momento de intervenção (15 e 60 minutos) nos grupos que receberam transfusão sanguínea e/ou azul de metileno. A linha tracejada representa o valor da média dos valores basais da PAM dos grupos, que foi igual a 110,64 mmHg. Azul (Grupo 1 – 60TS), vermelho (grupo 2 – 60 AM), verde (grupo 3 – 60AM + TS); preto (grupo 4 – 15AM + TS); marrom (grupo 5 – 15TS + 60AM) e violeta (Grupo 6 – 15AM + 60TS).

Antes de avaliar as respostas da PAM de cada grupo experimental, suas pressões arteriais médias basais, ou seja, antes da promoção do choque, foram comparadas para avaliar se os animais foram distribuídos de forma aleatória dentro dos seis grupos experimentais. Não há diferença estatística entre os grupos, ou seja, a alocação aleatória dos animais entre os grupos foi adequada. As informações estão representadas na figura 10.

Figura 10. Valores da pressão arterial média (PAM) basal dos animais dos grupos experimentais.

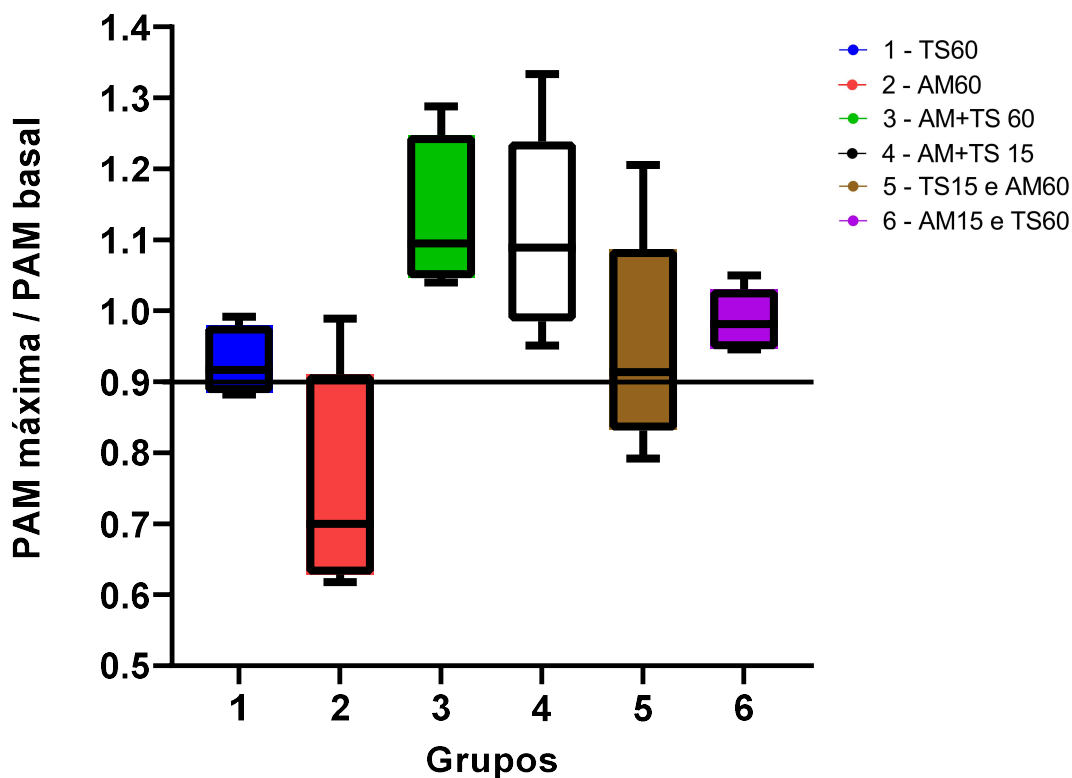


Não houve diferença estatística entre as pressões médias basais dos diferentes grupos experimentais. Azul (Grupo 1 – 60TS), vermelho (grupo 2 – 60 AM), verde (grupo 3 – 60AM + TS); preto (grupo 4 – 15AM + TS); marrom (grupo 5 – 15TS + 60AM) e violeta (Grupo 6 – 15AM + 60TS). AM (azul de metileno), TS (transfusão sanguínea). Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis = 4.573, com $p > 0.45$.

A reversão do choque foi considerada quando os animais alcançassem 90% da PAM basal, sendo assim, foi realizada uma relação entre a PAM máxima durante o experimento e a PAM basal, permitindo a comparação entre os diferentes grupos experimentais. Ao longo do experimento, exceto pelo grupo 2, que recebeu apenas AM, todos os outros grupos apresentaram reversão do choque, ou seja, apresentaram um

aumento da PAM > 90% em relação a PAM basal. Essas informações estão representadas na figura 11.

Figura 11. Relação entre a pressão arterial média (PAM) máxima alcançada e a PAM basal entre os grupos experimentais.



A reversão do choque foi considerada quando, após a indução do choque, o animal atingiu >90% de sua pressão arterial média basal. A infusão de MB concomitante à transfusão de sangue leva a valores de relação da PAM máxima/basal mais altos em comparação com a transfusão de sangue isolada ou em tempos separados do azul de metileno. O azul de metileno sozinho não levou à reversão do choque. Azul (Grupo 1 – 60TS), vermelho (grupo 2 – 60 AM), verde (grupo 3 – 60AM + TS); preto (grupo 4 – 15AM + TS); marrom (grupo 5 – 15TS + 60AM) e violeta (Grupo 6 – 15AM + 60TS). AM (azul de metileno), TS (transfusão sanguínea). Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis = 15,914, com $p = 0,007094 < 0,01$.

Com o objetivo de avaliar possíveis diferenças estatísticas entre as respostas pressóricas de cada grupo, as medianas das relações entre as PAM máxima e basal de cada grupos foram submetidas ao teste pareado de Wilcoxon (tabela 1). Não houve diferença estatística entre os grupos 1 e 5 e entre os grupos 3 e 4. Todas as demais combinações de duplas foram diferentes entre si. Conforme representado na figura 12, os grupos 3 e 4 correspondem aos dois grupos com maiores níveis pressóricos e, no protocolo experimental foram os grupos que receberam o AM concomitantemente com a transfusão sanguínea.

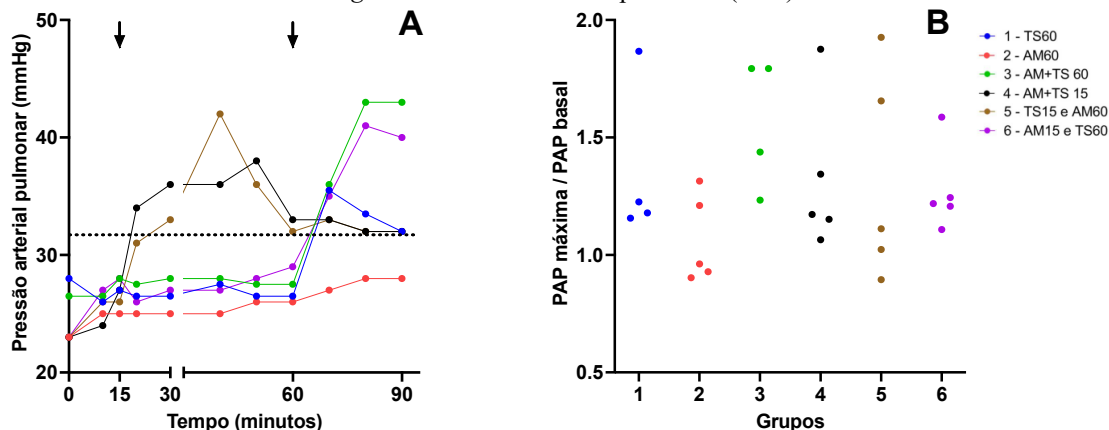
Tabela 1. Avaliação estatística pareada das respostas das relações entre a pressão arterial média máxima e a pressão arterial média basal entre os seis grupos experimentais. Teste pareado de Wilcoxon, valor de p corrigido pela escala de Bonferroni e nível de significância de 5%. Fator de Bonferroni $C(6,2) = 15$. * = ausência de diferença significativa entre o par.

Pares de grupos	Significância estatística
1-2	0,009333333
1-3	0,001904667
1-4	0,002116667
1-5	0,06032*
1-6	0,007326667
2-3	0,001058
2-4	0,001058
2-5	0,010053333
2-6	0,003955333
3-4	0,06032*
3-5	0,007406667
3-6	0,002436667
4-5	0,010053333
4-6	0,009253333
5-6	0,009253333

5.2 Pressão arterial pulmonar (PAP)

A figura 12-A apresenta a evolução da PAP durante o experimento. Os valores basais de PAP dos diferentes grupos experimentais estão representados na tabela 2 (Apêndice A) e a média de todos os grupos representada pela linha pontilhada na figura 12. Os valores basais de PAP partem de um valor em torno de 30mmHg, o que é considerado um valor aumentado de PAP. Com isso, não foi possível avaliar a ocorrência de hipertensão pulmonar, caracterizada pelo valor da PAP > 25mmHg. Como os animais partiram de um valor de PAP basal elevado, os valores de PAP máxima de cada animal foi dividido pelo valor de suas PAP basais, criando uma relação para ser comparada entre os grupos. Os valores das medianas da relação PAP máxima e PAP basal de cada grupo não mostrou diferença estatística significativa entre os grupos experimentais. Os resultados estão representados na figura 12-B.

Figura 12. Pressão arterial pulmonar (PAP)

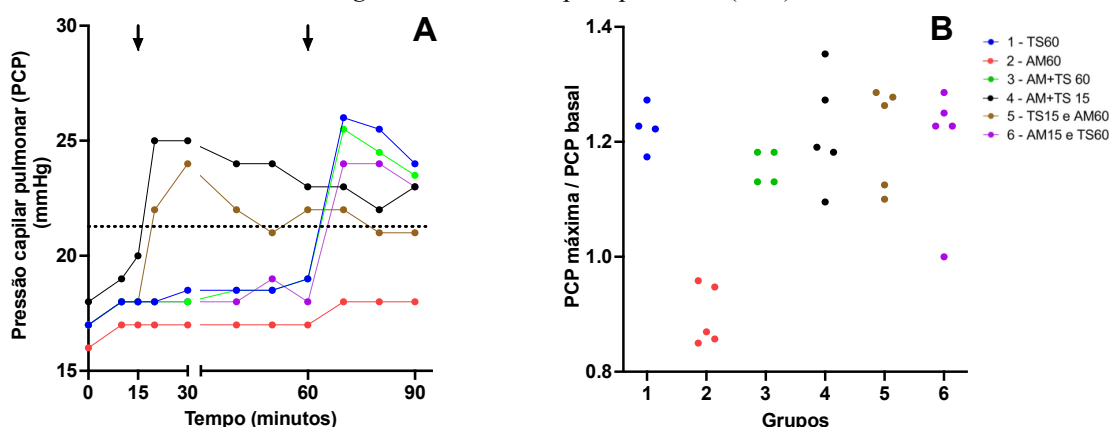


A. Evolução temporal das medianas da pressão arterial pulmonar (PAP) durante o experimento. As setas marcam o tempo de intervenção em grupos que receberam TS (transfusão de sangue) ou AM (azul de metileno). A linha tracejada representa o valor da média dos valores basais da PAP dos grupos, que foi igual a 31,75 mmHg. B. Relação entre a PAP máxima durante o experimento e seus valores de base entre os animais de cada grupo experimental. Não há diferença estatística entre os grupos. Azul (Grupo 1 – 60TS), vermelho (grupo 2 – 60 AM), verde (grupo 3 – 60AM + TS); preto (grupo 4 – 15AM + TS); marrom (grupo 5 – 15TS + 60AM) e violeta (Grupo 6 – 15AM + 60TS).

5.3 Pressão capilar pulmonar (PCP)

Com exceção do grupo 2, que permaneceu com baixos níveis de PCP, todos os demais grupos apresentaram aumento da PCP após a transfusão sanguínea. Os dados estão representados na figura 13. Os valores basais de PCP dos diferentes grupos experimentais estão representados na tabela 2 (Apêndice A) e a média de todos os grupos representada pela linha pontilhada na figura 13.

Figura 13. Pressão capilar pulmonar (PCP)

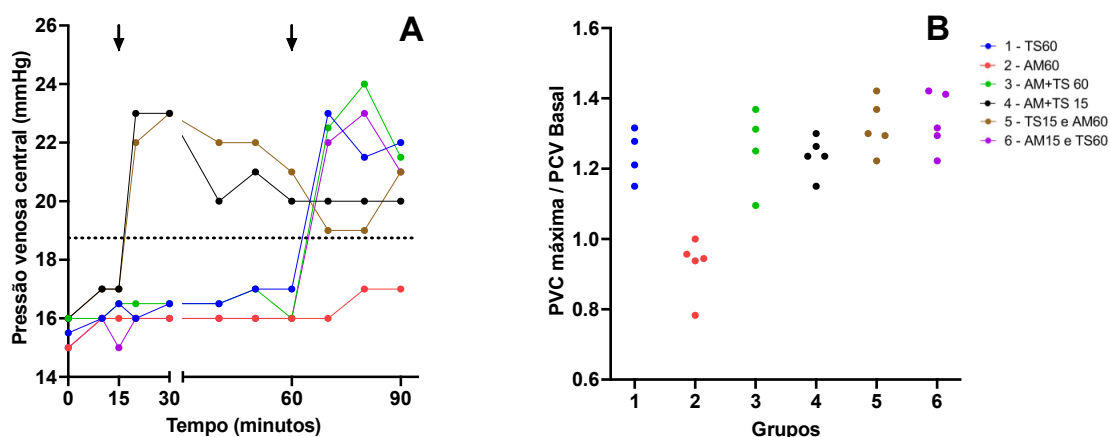


A. Evolução temporal das medianas da pressão capilar pulmonar (PCP) durante o experimento. As setas marcam o tempo de intervenção em grupos que receberam TS (transfusão de sangue) ou AM (azul de metileno). A linha tracejada representa o valor da média dos valores basais da PCP dos grupos, que foi igual a 21,28 mmHg. B. Relação entre a PCP máxima durante o experimento e seu valor de base entre os animais de cada grupo experimental. O grupo 2 apresenta valores de PCP mais baixos em comparação aos outros grupos. Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis = 13,57, com $p = 0,0186 < 0,05$. Azul (Grupo 1 – 60TS), vermelho (grupo 2 – 60 AM), verde (grupo 3 – 60AM + TS); preto (grupo 4 – 15AM + TS); marrom (grupo 5 – 15TS + 60AM) e violeta (Grupo 6 – 15AM + 60TS).

5.4 Pressão venosa central (PVC)

Aumento da pressão venosa central foi observado em todos os animais que receberam reposição sanguínea, permanecendo baixa no grupo 2, que recebeu apenas a infusão de AM. As informações estão representadas na figura 14. Os valores basais de PVC dos diferentes grupos experimentais estão representados na tabela 2 (Apêndice A) e a média de todos os grupos representada pela linha pontilhada na figura 14.

Figura 14. Pressão venosa central (PVC)

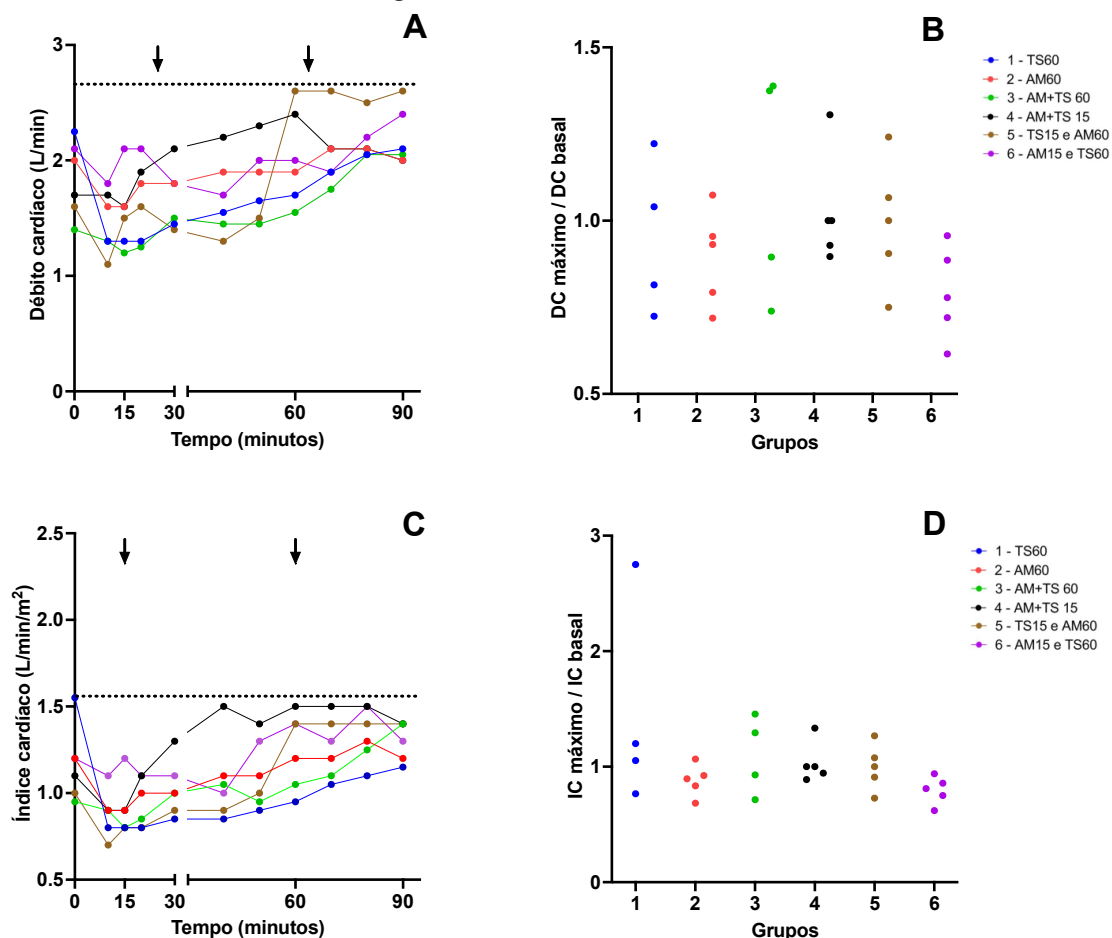


A. Evolução temporal das medianas da pressão venosa central (PVC) durante o experimento. As setas marcam o tempo de intervenção em grupos que receberam TS (transfusão de sangue) ou AM (azul de metileno). A linha tracejada representa o valor da média dos valores basais da PVC dos grupos, que foi igual a 18,75 mmHg. B. Relação entre a PVC máxima durante o experimento e seu valor de base entre os animais de cada grupo experimental. O grupo 2 apresenta valores de CVP inferiores aos dos outros grupos. Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis = 15,22, com $p = 0,0094 < 0,01$. Azul (Grupo 1 – 60TS), vermelho (grupo 2 – 60 AM), verde (grupo 3 – 60AM + TS); preto (grupo 4 – 15AM + TS); marrom (grupo 5 – 15TS + 60AM) e violeta (Grupo 6 – 15AM + 60TS).

5.5 Débito cardíaco (DC) e Índice cardíaco (IC)

Não houve variações no débito cardíaco e índice cardíaco entre os grupos experimentais. Os resultados estão representados na figura 15. Os valores basais de DC e IC dos diferentes grupos experimentais estão representados na tabela 2 (Apêndice A) e a média de todos os grupos representada pela linha pontilhada nas figuras 15-A e 15-C, respectivamente.

Figura 15. Débito e Índice cardíaco



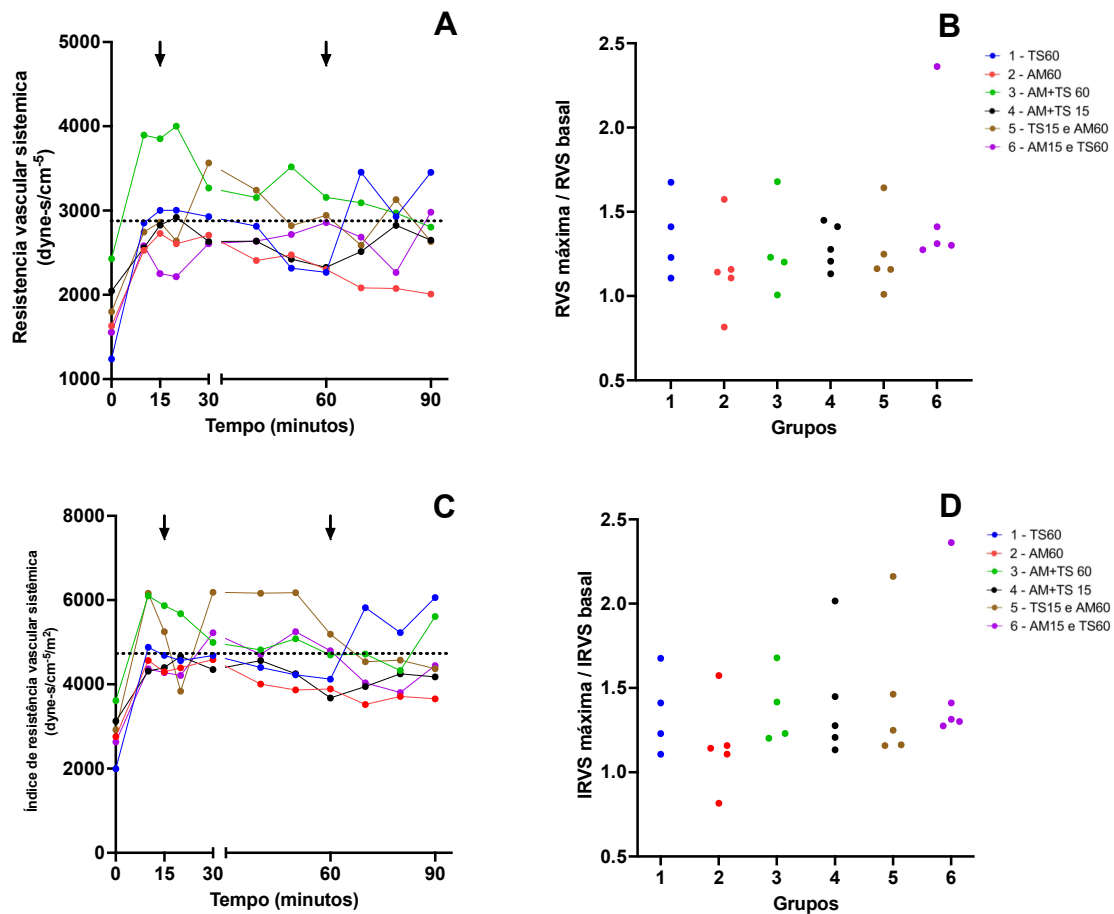
A. Evolução temporal das medianas de débito cardíaco (DC) durante o experimento. As setas marcam o tempo de intervenção em grupos que receberam TS (transfusão de sangue) ou AM (azul de metileno). A linha tracejada representa o valor da média dos valores basais de DC dos grupos, que foi igual a 2,65 L/min. B. Relação entre o DC máximo durante o experimento e seu valor basal entre os animais de cada grupo experimental. Não há diferença estatística entre os grupos. C. Evolução temporal das medianas de Índice Cardíaco (IC) durante o experimento. As setas marcam o tempo de intervenção nos grupos que receberam BT (transfusão de sangue) ou MB (azul de metileno). A linha tracejada representa o valor da média dos valores basais da IC dos grupos, que foi igual a 1,55 L/min/m². D. Relação entre o IC máximo durante o experimento e seu valor basal entre os animais de cada grupo experimental. Não há diferença estatística entre os grupos. Azul (Grupo 1 – 60TS), vermelho (grupo 2 – 60 AM), verde (grupo 3 – 60AM + TS); preto (grupo 4 – 15AM + TS); marrom (grupo 5 – 15TS + 60AM) e violeta (Grupo 6 – 15AM + 60TS).

5.6 Resistências vasculares

A avaliação da resistência vascular sistêmica, índice de resistência vascular sistêmica, resistência vascular pulmonar e índice de resistência vascular pulmonar não apresentou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Os dados estão representados nas figuras 16 e 17, respectivamente. Os valores basais das resistências vasculares sistêmicas e pulmonares e dos índices de resistências vasculares sistêmicas e

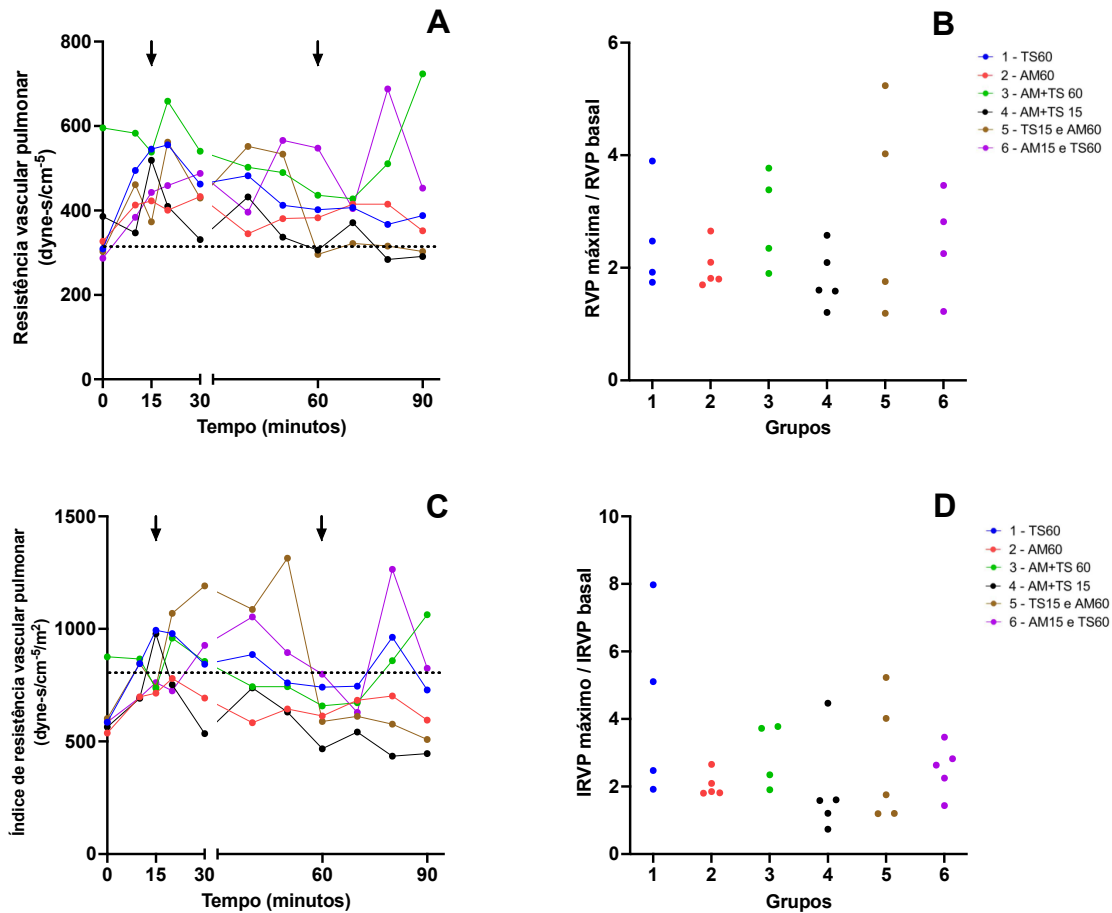
pulmonares estão representados na tabela 2 (Apêndice A) e a média de todos os grupos representada pela linha pontilhada nas figuras 16-A, 16-C, 17-A e 17-C, respectivamente.

Figura 16. Resistência vascular sistêmica e índice de resistência vascular sistêmica.



A. Evolução temporal das medianas da Resistência Vascular Sistêmica (RVS) durante o experimento. As setas marcam o tempo de intervenção em grupos que receberam TS (transfusão sanguínea) ou AM (azul de metileno). A linha tracejada representa o valor da média dos valores basais da RVS dos grupos, que foi igual a 2868,28 dyne-s/cm⁵. B. Relação entre os valores máximos de Resistência Vascular Sistêmica (RVS) durante o experimento e seu valor basal entre os animais de cada grupo experimental. Não há diferença estatística entre os grupos. C. Evolução temporal das medianas de Índice de Resistência Vascular Sistêmica (SVRI) durante o experimento. As setas marcam o tempo de intervenção nos grupos que receberam TS ou AM. A linha tracejada representa o valor da média dos valores basais do IRVS dos grupos, que foi igual 4744,39 dyne-s/cm⁵/m². Relação entre o máximo Índice de Resistência Vascular Sistêmica (SVRI) durante o experimento e seu valor basal entre os animais de cada grupo experimental. Não há diferença estatística entre os grupos. Azul (Grupo 1 – 60TS), vermelho (grupo 2 – 60 AM), verde (grupo 3 – 60AM + TS); preto (grupo 4 – 15AM + TS); marrom (grupo 5 – 15TS + 60AM) e violeta (Grupo 6 – 15AM + 60TS).

Figura 17. Resistência vascular pulmonar e índice de resistência vascular pulmonar.



A. Evolução temporal das medianas da Resistência Vascular Pulmonar (RVP) durante o experimento. As setas marcam o tempo de intervenção em grupos que receberam TS (transfusão sanguínea) ou AM (azul de metileno). A linha tracejada representa o valor da média dos valores basais da RVP dos grupos, que foi igual a 315,92 dyne-s/cm⁵. B. Relação entre a Resistência Vascular Pulmonar Máxima (RVP) durante o experimento e seu valor basal entre os animais de cada grupo experimental. Não há diferença estatística entre os grupos. A linha tracejada representa o valor da média dos valores basais do IRVS dos grupos, que foi igual a 804,53 dyne-s/cm⁵/m². C. Evolução temporal das medianas da Índice de Resistência Vascular Pulmonar (PVRI) durante o experimento. As setas marcam o tempo de intervenção nos grupos que receberam TS ou AM. D. Relação entre os valores máximos do Índice de Resistência Vascular Pulmonar (PVRI) durante o experimento e seu valor basal entre os animais de cada grupo experimental. Não há diferença estatística entre os grupos. Azul (Grupo 1 – 60TS), vermelho (grupo 2 – 60 AM), verde (grupo 3 – 60AM + TS); preto (grupo 4 – 15AM + TS); marrom (grupo 5 – 15TS + 60AM) e violeta (Grupo 6 – 15AM + 60TS).

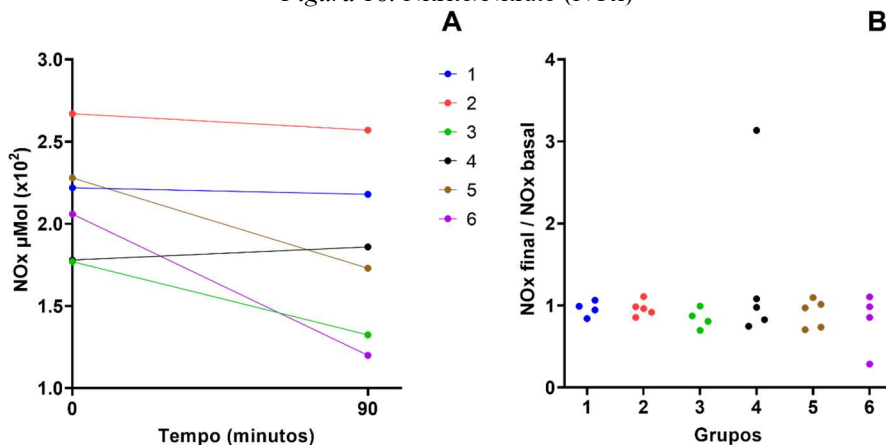
5.7 Gasometria arterial, hemoglobina, hematócrito e análises bioquímicas

A comparação dos valores finais de gasometria, hemoglobina, hematócrito e análises bioquímicas (níveis de sódio, potássio, glicose e lactato) não revelaram diferenças estatísticas entre os grupos experimentais. Os gráficos estão apresentados na secção Apêndices (figuras 20-30).

5.8 Nitrito/Nitrato (NOx)

Não houve diferenças significativas nos níveis de nitrato entre os grupos. Os resultados estão representados na figura 18.

Figura 18. Nitrito/Nitrato (NOx)

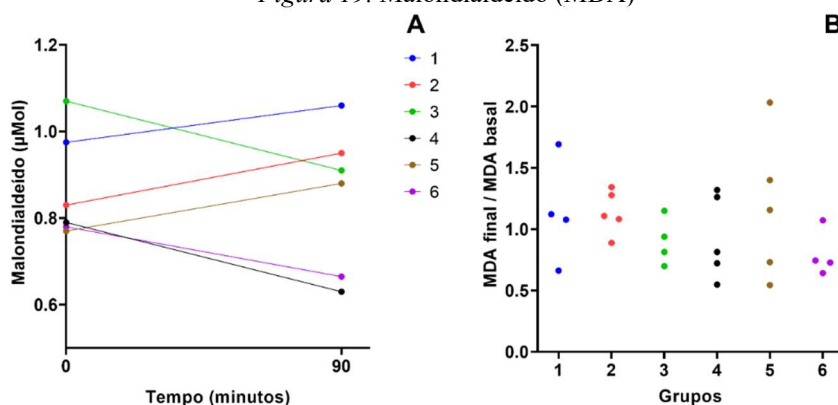


A. Valores das dosagens iniciais e finais de Nitrato durante o experimento. B. Relação entre a dosagem final de Nitrato e sua dosagem basal entre animais de cada grupo experimental. Não há diferença estatística entre os grupos. Azul (Grupo 1 – 60TS), vermelho (grupo 2 – 60 AM), verde (grupo 3 – 60AM + TS); preto (grupo 4 – 15AM + TS); marrom (grupo 5 – 15TS + 60AM) e violeta (Grupo 6 – 15AM + 60TS). AM (azul de metileno), TS (transfusão sanguínea).

5.9 Malondialdeído

Não foram observadas diferenças significativas nas variações de malondialdeído (MDA) entre os grupos experimentais. Os resultados estão representados na figura 19.

Figura 19. Malondialdeído (MDA)



A. Dosagens de Malondialdeído (MDA) inicial e final durante o experimento. B. Relação entre a dosagem final de MDA e sua dosagem inicial entre animais de cada grupo experimental. Não há diferença estatística entre os grupos. Azul (Grupo 1 – 60TS), vermelho (grupo 2 – 60 AM), verde (grupo 3 – 60AM + TS); preto (grupo 4 – 15AM + TS); marrom (grupo 5 – 15TS + 60AM) e violeta (Grupo 6 – 15AM + 60TS). AM (azul de metileno), TS (transfusão sanguínea).

6 DISCUSSÃO

Os principais achados do presente trabalho foram: 1) o uso do azul de metileno nos primeiros 60 minutos após o choque, concomitantemente à transfusão sanguínea, levou à reversão do choque, alcançando valores pressóricos maiores do que a reposição sanguínea somente, ou do que o uso de AM em momentos diferentes da reposição sanguínea; 2) o uso do AM sozinho não teve qualquer efeito sobre a pressão arterial, ou seja, seu efeito depende da associação com a reposição volêmica. 3) no cenário estudado, a utilização do AM não foi associada a nenhum efeito adverso, reforçando a segurança da droga.

O presente estudo é o primeiro a avaliar o uso precoce, ou seja, até 60 minutos após o choque instalado, do azul de metileno para tratamento do choque hemorrágico em modelos de pressão fixa em porcos.

Existem três modelos experimentais de choque hemorrágico: hemorragia de volume fixo, hemorragia de pressão fixa e hemorragia descontrolada. Nos modelos de hemorragia de volume fixo uma porcentagem da volemia é removida ao longo de um período determinado pelo examinador. Sua vantagem é o estudo de respostas fisiológicas e mecanismos compensatórios naturais após a perda de um determinado volume de sangue. Por outro lado, é mais difícil de padronizar e reproduzir uma vez que a hipotensão não é adequadamente definida (58).

O modelo de hemorragia de pressão fixa, inicialmente descrito por Penfield e posteriormente modificado por Wiggers, consiste na instalação de cateteres sob anestesia por meio dos quais o sangue é retirado ou reinfundido, a fim de manter a pressão preconizada para o estudo. A vantagem deste método é o maior controle da hipotensão, sendo, portanto, mais padronizável e mais reprodutível, o que permite estudar a patogênese do choque e avaliar diversos parâmetros a uma determinada pressão. Apesar disso, tem como limitações não refletir a vida real, uma vez que o choque é mantido sob pressão constante e pode sofrer os efeitos da anestesia e da heparinização dos cateteres, afetando os resultados significativamente (58).

O modelo de hemorragia descontrolada consiste na indução do choque por meio da simulação de um trauma vascular e, apesar de apresentar maior fidelidade com o trauma real, é mais difícil de ser reproduzido e comparado. Sua maior utilidade é nos testes pré-clínicos de terapias (58).

O uso de modelos animais suínos apresenta a vantagem de compartilhar similaridades com os humanos em relação aos mecanismos de coagulação às repostas hemodinâmicas e cardiovasculares. Porém, sua utilização encontra limitações relacionados a questões éticas, às diferenças genéticas em relação aos humanos, ao elevado custo e ao difícil manejo de animais deste porte (58).

A necessidade do estudo de variáveis fisiológicas e a necessidade de comparação e padronização dos animais submetidos ao choque, levaram à opção pelo modelo de hemorragia de pressão fixa no presente trabalho. O objetivo de investigar respostas mais próximas às apresentadas por humanos motivou a utilização de modelos suínos, apesar das limitações anteriormente expostas.

Alguns trabalhos já avaliaram o uso do AM no contexto dos choques séptico e distributivo em pós-operatório de cirurgia cardíaca e novos trabalhos estão abordando outras modalidades de choque. O primeiro estudo experimental a avaliar o uso do AM no choque hemorrágico foi realizado por Jeroukhimov (15) utilizando um modelo de hemorragia descontrolada em ratos. O segundo foi realizado por Ghiassi (16), que avaliou o uso de AM em modelo choque refratário por hemorragia de pressão fixa em cães. Ambos os trabalhos foram concordantes no efeito do AM no aumento da pressão arterial, quando associado a reposição volêmica e apresentaram efeitos adicionais na redução dos danos da lesão de isquemia reperfusão (15, 16).

Os achados do presente trabalho referentes à pressão arterial corroboraram com os achados dos estudos precedentes, principalmente aqueles reportados por Ghiassi (16), que observou a maior resposta pressórica no uso concomitante do AM com a reposição volêmica. Além disso, os resultados encontrados reforçam o papel do AM em estudos de outras modalidades de choque como o séptico, anafilático e vasoplégico, reforçando seu papel como adjuvante no aumento da pressão arterial (59). A ausência de resposta pressórica no grupo que recebeu apenas o AM reforça a ideia de que seu uso isolado, ou seja, sem a reposição volêmica, não afeta a pressão arterial. Logo, a droga não pode ser considerada um vasopressor, mas sim um inibidor da vasodilatação, o que é explicado pelo seu mecanismo de ação sobre a hiporreatividade vascular ao inibir a produção do GMPc por bloqueio da guanilato ciclase (59).

Uma das possíveis vantagens do uso precoce do AM no tratamento do choque hemorrágico é o incremento pressórico requerendo menores volumes de soluções cristalóides e hemoderivados, que, em grandes quantidades, podem contribuir para a piora dos distúrbios de coagulação, acidose, hipotermia e agravamento da inflamação.

Atualmente estratégias de fluidoterapia mais restritivas em condições classicamente tratadas com grandes quantidades de soluções, como no trauma (incluindo grandes queimados) e na pancreatite, estão em discussão devido à associação da sobrecarga volêmica com piores desfechos. Neste caso, o incremento pressórico proporcionado pelo uso concomitante do AM, como visto neste trabalho, poderia contribuir para um menor volume infundido, com redução dos efeitos indesejáveis (60-62).

Em vítimas de trauma em que há necessidade do uso de inotrópicos, o AM pode ainda auxiliar na redução de suas doses e evitar os seus efeitos deletérios sobre o organismo. Além disso, a depender do mecanismo de trauma, a medicação também pode, em teoria, mostrar-se útil na redução de lesões pulmonares, neurológicas e de isquemia-reperusão (14).

O conceito do controle de danos aplicado ao trauma visa por meio cirúrgico controlar a hemorragia e a contaminação, possibilitando o mais rápido possível o encaminhamento do paciente para continuidade de medidas de ressuscitação em regime de terapia intensiva, antes da programação da correção definitiva em segundo tempo. A utilização do AM precocemente pode reduzir o estresse oxidativo e facilitar o desmame de vasopressores, a exemplo da experiência de Volpon, que utilizou o AM em um paciente politraumatizado conjuntamente à cirurgia de controle de danos, obtendo resultado final favorável (17).

A facilidade posológica do AM e seu baixo custo poderia facilitar sobremaneira o atendimento a vítimas de trauma, pois pode ser facilmente administrado associado a reposição volêmica ainda na cena ou durante o atendimento pré-hospitalar. Caso estudos futuros confirmem os achados experimentais, a droga pode conferir vantagens na ressuscitação volêmica quando há: demora para realizar o resgate da vítima; sangramentos ocultos; ou dificuldade para realizar o tratamento definitivo, como no caso de áreas remotas, guerras ou catástrofes, ocasiões em que a evacuação da vítima é priorizada em relação à reanimação.

Um dos efeitos adversos associados a altas doses do AM é a hipertensão pulmonar, que decorre da vasoconstrição pulmonar, com piora das trocas gasosas e queda da saturação de oxigênio. Dos 10 trabalhos que avaliaram seu uso em humanos, cinco apresentaram esse efeito e na maioria dos casos estava relacionado a doses mais altas da droga (11). No presente trabalho, surpreendentemente todos os animais partiram de valores basais aumentados de PAP. Entretanto, todos os grupos experimentais apresentaram comportamento semelhante em relação a PAP, não havendo tendência de

um grupo para o aumento da PAP. Adicionalmente, não foram observadas quedas na saturação de oxigênio, que frequentemente acompanham o aumento da PAP. Sendo assim, no cenário avaliado, não houve evidência de que a droga eleva a pressão arterial pulmonar, reforçando a segurança do seu uso.

A ausência de resposta em parâmetros da pressão capilar pulmonar e da pressão venosa central no grupo que recebeu apenas AM reflete a manutenção do estado de choque pela ausência de reposição volêmica.

A ausência de diferenças estatisticamente significativas entre os grupos na avaliação do débito cardíaco, índice cardíaco, resistências vasculares sistêmica e pulmonar, bem como seus valores indexados podem ser explicados pelo relativamente curto período de observação, com respostas compensatórias predominando antes do seu esgotamento e alcance da refratariedade.

Para os níveis de ácidos-base no sangue arterial, eletrólitos, hemoglobina, hematócrito e lactato, nenhum padrão de resposta foi associado com os grupos experimentais.

A dosagem de nitrato, que é um método indireto para medir o NO, não mostrou diferenças estatísticas entre os grupos experimentais. Experimentos anteriores relataram um padrão de resposta similar quando o MB era usado em modelos de choque anafilático (13). Em relação ao MDA, não houve diferenças estatisticamente significativas nos níveis de MDA entre os grupos. Um dos possíveis motivos para essa observação é que a técnica do ácido tiobarbitúrico, apesar de ser simples e consagrada, tem sido criticada por conta de sua baixa especificidade (56). Além disso, os resultados finais de NO e MDA podem ter sofrido a influência do relativamente curto período de observação. Novos estudos com técnicas mais acuradas e um tempo de observação maior poderiam avaliar melhor o padrão de resposta dessas variáveis.

Os dados deste estudo e de estudos anteriores chamam a atenção para uma possível mudança de paradigma no tratamento do choque hemorrágico. Apesar disso, os dados originários do presente trabalho não são suficientes para recomendar o tratamento do choque hemorrágico com AM em humanos. Novos protocolos experimentais devem ser direcionados para avaliar a segurança e a eficácia do AM na reversão do choque hemorrágico em humanos.

Possíveis limitações deste estudo incluem: o modelo de choque experimental utilizado, que, sendo isobárico, não reflete a realidade do trauma; a influência dos anestésicos nas respostas fisiológicas dos animais; e o modelo animal porcino que, como

citado anteriormente, apesar de certa similaridade com os seres humanos, também guardam diferenças, que podem interferir na extrapolação dos achados para os humanos. Outras limitações importantes referem-se à metodologia que, devido ao limitado número de animais e ao relativamente baixo tempo de observação utilizado, podem interferir na avaliação dos resultados encontrados. Estudos futuros utilizando o AM devem buscar novos protocolos contornando estas limitações.

7 CONCLUSÃO

O uso de azul de metileno (AM) concomitante à transfusão de sangue permitiu a reversão do choque hemorrágico com níveis de pressão arterial mais altos em comparação com a transfusão de sangue isolada ou a combinação de AM e transfusão de sangue separadamente. Não houve diferença na reversão do choque com a combinação de AM e transfusão de sangue em 15 ou 60 minutos e o tratamento provou ser uma estratégia potencialmente segura. Estas descobertas reforçam o potencial uso clínico do AM como estratégia adjuvante na fase inicial de reanimação do choque hemorrágico.

REFERENCIAS*

1. World Health Organization. (2021). Injuries and violence. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/injuries-and-violence>
2. Spahn, D. R., Bouillon, B., Cerny, V., Duranteau, J., Filipescu, D., Hunt, B. J., ... & Rossaint, R. (2019). The European guideline on management of major bleeding and coagulopathy following trauma. *Critical care*, 23(1), 1-74.
3. Heckbert, S. R., Vedder, N. B., Hoffman, W., Winn, R. K., Hudson, L. D., Jurkovich, G. J., ... & Maier, R. V. (1998). Outcome after hemorrhagic shock in trauma patients. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, 45(3), 545-549.
4. Sailhamer, E. A., Li, Y., Smith, E. J., Shuja, F., Shults, C., Liu, B., ... & Alam, H. B. (2008). Acetylation: a novel method for modulation of the immune response following trauma/hemorrhage and inflammatory second hit in animals and humans. *Surgery*, 144(2), 204-216.
5. Shoemaker, W. C., Peitzman, A. B., Bellamy, R., Bellomo, R., Bruttig, S. P., Capone, A., ... & Wiklund, L. (1996). Resuscitation from severe hemorrhage. *Critical care medicine*, 24(2), 12S-23S.
6. Birch, A. A., & Boyce, W. H. (1976). Hypertension and decreased renal blood flow following methylene blue injection. *Anesthesia & Analgesia*, 55(5), 674-676.
7. Gruetter, C. A., Kadowitz, P. J., & Ignarro, L. J. (1981). Methylene blue inhibits coronary arterial relaxation and guanylate cyclase activation by nitroglycerin, sodium nitrite, and amyl nitrite. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 59(2), 150-156.
8. Gruetter, C. A., Gruetter, D. Y., Lyon, J. E., Kadowitz, P. J., & Ignarro, L. J. (1981). Relationship between cyclic guanosine 3': 5'-monophosphate formation and relaxation of coronary arterial smooth muscle by glyceryl trinitrate, nitroprusside, nitrite and nitric oxide: effects of methylene blue and methemoglobin. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 219(1), 181-186.
9. Schneider, F., Lutun, P. H., Hasselmann, M., Stoclet, J. C., & Tempe, J. D. (1992). Methylene blue increases systemic vascular resistance in human septic shock. *Intensive care medicine*, 18(5), 309-311.
10. Kwok, E. S., & Howes, D. (2006). Use of methylene blue in sepsis: a systematic review. *Journal of intensive care medicine*, 21(6), 359-363.
11. Saha, B. K., & Burns, S. L. (2020). The story of nitric oxide, sepsis and methylene blue: a comprehensive pathophysiologic review. *The American Journal of the Medical Sciences*, 360(4), 329-337.
12. Levin, R. L., Degrange, M. A., Bruno, G. F., Del Mazo, C. D., Taborda, D. J., Griotti, J. J., & Bouillon, F. J. (2004). Methylene blue reduces mortality and morbidity in vasoplegic patients after cardiac surgery. *The Annals of thoracic surgery*, 77(2), 496-499.
13. Perdhana, F., Kloping, N. A., Witarto, A. P., Nugraha, D., Yogiswara, N., Luke, K., ... & Rehatta, N. M. (2021). Methylene blue for vasoplegic syndrome in cardiopulmonary

- bypass surgery: A systematic review and meta-analysis. *Asian Cardiovascular and Thoracic Annals*, 29(8), 717-728.
14. Baldo, C. F., Silva, L. M., Arcencio, L., Albuquerque, A. A., Celotto, A. C., Basile-Filho, A., & Evora, P. R. (2018). Why methylene blue have to be always present in the stocking of emergency antidotes. *Current Drug Targets*, 19(13), 1550-1559.
 15. Jeroukhimov, I., Weinbroum, A., Ben-Avraham, R., Abu-Abid, S., Michowitz, M., & Kluger, Y. (2001). Effect of methylene blue on resuscitation after haemorrhagic shock. *European Journal of Surgery*, 167(10), 742-747.
 16. Ghiassi, S., Sun, Y. S., Kim, V. B., Scott, C. M., Nifong, L. W., Rotondo, M. F., & Chitwood Jr, W. R. (2004). Methylene blue enhancement of resuscitation after refractory hemorrhagic shock. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, 57(3), 515-521.
 17. Volpon, L. C., Evora, P. R. B., Teixeira, G. D., Godinho, M., Scarpelini, S., Carmona, F., & Carlotti, A. P. D. C. P. (2018). Methylene blue for refractory shock in polytraumatized patient: a case report. *The Journal of Emergency Medicine*, 55(4), 553-558.
 18. Cecconi, M., De Backer, D., Antonelli, M., Beale, R., Bakker, J., Hofer, C., ... & Rhodes, A. (2014). Consensus on circulatory shock and hemodynamic monitoring. Task force of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive care medicine*, 40(12), 1795-1815.
 19. Standl, T., Annecke, T., Cascorbi, I., Heller, A. R., Sabashnikov, A., & Teske, W. (2018). The nomenclature, definition and distinction of types of shock. *Deutsches Ärzteblatt International*, 115(45), 757.
 20. Schiller, A. M., Howard, J. T., & Convertino, V. A. (2017). The physiology of blood loss and shock: new insights from a human laboratory model of hemorrhage. *Experimental Biology and Medicine*, 242(8), 874-883.
 21. Gaieski, D. F., & Mikkelsen, M. E. (2022). Definition, classification, etiology, and pathophysiology of shock in adults. *UpToDate*. <https://www.uptodate.com/contents/definition-classification-etiology-and-pathophysiology-of-shock-in-adults> .
 22. Trauma Trunkey, D. (1983). Accidental and intentional injuries account for more years of life lost in the US than cancer and heart disease. Among the prescribed remedies are improved preventive efforts, speedier surgery and further research. *Sci Am*, 249(2), 28-35.
 23. Maerz, L. L., Davis, K. A., & Rosenbaum, S. H. (2009). Trauma. *International anesthesiology clinics*, 47(1), 25-36.
 24. Cowley, R. A. (1976). Resuscitation and stabilization of major multiple trauma patients in a trauma center environment. *Clinical Medicine*, 83(1), 16-22.
 25. Rogers, F. B., Rittenhouse, K. J., & Gross, B. W. (2015). The golden hour in trauma: dogma or medical folklore?. *Injury*, 46(4), 525-527.
 26. Gunst, M., Ghaemmaghani, V., Gruszecki, A., Urban, J., Frankel, H., & Shafi, S. (2010, October). Changing epidemiology of trauma deaths leads to a bimodal distribution.

In *Baylor University Medical Center Proceedings* (Vol. 23, No. 4, pp. 349-354). Taylor & Francis.

27. Kauvar, D. S., Lefering, R., & Wade, C. E. (2006). Impact of hemorrhage on trauma outcome: an overview of epidemiology, clinical presentations, and therapeutic considerations. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, 60(6), S3-S11.
28. Franklin, G. A., Boaz, P. W., Spain, D. A., Lukan, J. K., Carrillo, E. H., & Richardson, J. D. (2000). Prehospital hypotension as a valid indicator of trauma team activation. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, 48(6), 1034-1039.
29. Aptekman, B., Tarashansky, M., Sotman, A., Khuri, W., Ben-Abraham, R., Dolkart, O., & Weinbroum, A. A. (2010). Effects of methylene blue and volatile anesthetics on survival in a murine hemorrhage resuscitation model. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, 69(6), 1433-1441.
30. Pallister, I. (2005). Current concepts of the inflammatory response after major trauma: an update. *Injury*, 36(1), 227-229.
31. Abraham, E., & Chang, Y. H. (1984). Effects of hemorrhage on inflammatory response. *Archives of Surgery*, 119(10), 1154-1157.
32. Gulati, A. (2016). Vascular endothelium and hypovolemic shock. *Current vascular pharmacology*, 14(2), 187-195.
33. American College of Chest Physicians, & Society of Critical Care Medicine Consensus Conference Committee. (1992). American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit. Care Med*, 20, 864-874.
34. Godinho, M., Padim, P., Evora, P. R. B., & Scarpelini, S. (2015). " Curbing Inflammation" e hemorragia por trauma: uma revisão. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*, 42, 273-278.
35. Cannon, J. W. (2018). Hemorrhagic shock. *New England Journal of Medicine*, 378(4), 370-379.
36. Levy, B., Fritz, C., Tahon, E., Jacquot, A., Auchet, T., & Kimmoun, A. (2018). Vasoplegia treatments: the past, the present, and the future. *Critical care*, 22(1), 1-11.
37. Lawrence, T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009; 1 (6): a001651.
38. Moncada, S. R. S. J., Gryglewski, R. J., Bunting, S., & Vane, J. R. (1976). An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature*, 263(5579), 663-665.
39. Tibballs, J. (1993). The role of nitric oxide (formerly endothelium-derived relaxing factor-EDRF) in vasodilatation and vasodilator therapy. *Anaesthesia and intensive care*, 21(6), 759-773.

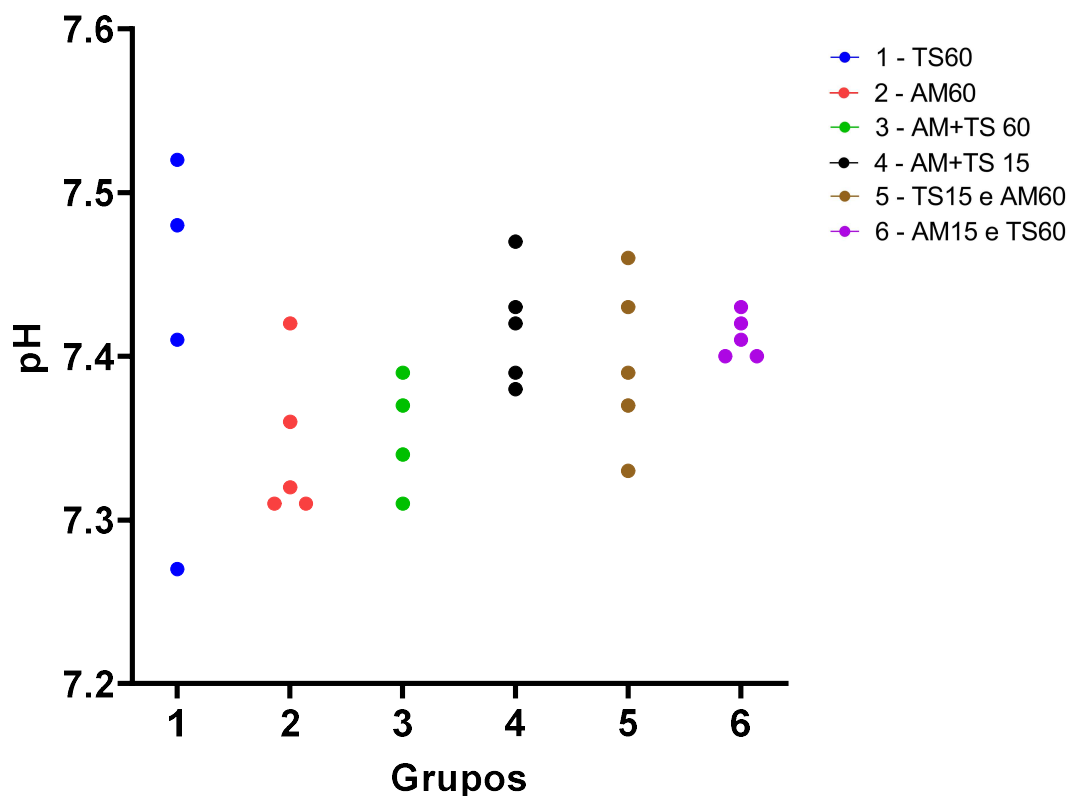
40. Luksha, L., Agewall, S., & Kublickiene, K. (2009). Endothelium-derived hyperpolarizing factor in vascular physiology and cardiovascular disease. *Atherosclerosis*, 202(2), 330-344.
41. Moncada, S., & Higgs, E. A. (2006). Nitric oxide and the vascular endothelium. *The vascular endothelium I*, 213-254.
42. Kirkebøen, K. A., & Strand, Ø. A. (1999). The role of nitric oxide in sepsis—an overview. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, 43(3), 275-288.
43. Kimmoun, A., Ducrocq, N., & Levy, B. (2013). Mechanisms of vascular hyporesponsiveness in septic shock. *Current vascular pharmacology*, 11(2), 139-149.
44. Barbosa Evora, P. R., Celotto, A. C., Sumarelli Albuquerque, A. A., & Martinez Évora, P. (2021). Endothelial Dysfunction in Hemorrhagic Shock. In *Vasoplegic Endothelial Dysfunction* (pp. 35-40). Springer, Cham.
45. Ferreira, E. L., (2011). Índigo Natural – O Azul de Origem Vegetal. <https://textileindustry.ning.com/profiles/blogs/indigo-natural-o-azul-de?overrideMobileRedirect=1>.
46. PubChem. Methylene Blue 2022 [Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>
47. Oliveira, F. C. S., Cabral, G. M., Eler, J. F. C, Pimentel, S. J., Peixoto, V. R., Paranhos, W. J. & Saliba, W. A. (2019). Methylene blue for therapeutic purposes. *Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research*. 27 (2), 66-70.
48. Schirmer, R. H., Adler, H., Pickhardt, M., & Mandelkow, E. (2011). Lest we forget you—methylene blue.... *Neurobiology of aging*, 32(12), 2325-e7.
49. Mehaffey, J. H., Johnston, L. E., Hawkins, R. B., Charles, E. J., Yarboro, L., Kern, J. A., ... & Ghanta, R. K. (2017). Methylene blue for vasoplegic syndrome after cardiac operation: early administration improves survival. *The Annals of thoracic surgery*, 104(1), 36-41.
50. Ginimuge, P. R., & Jyothi, S. (2010). Methylene blue: revisited. *Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology*, 26(4), 517-520.
51. Gruetter, C. A., Barry, B. K., McNamara, D. B., Gruetter, D. Y., Kadowitz, P. J., & Ignarro, L. (1979). Relaxation of bovine coronary artery and activation of coronary arterial guanylate cyclase by nitric oxide, nitroprusside and a carcinogenic nitrosoamine. *Journal of cyclic nucleotide research*, 5(3), 211-224.
52. Paciullo, C. A., Horner, D. M., Hatton, K. W., & Flynn, J. D. (2010). Methylene blue for the treatment of septic shock. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 30(7), 702-715.
53. Archer, S. (1993). Measurement of nitric oxide in biological models. *The FASEB journal*, 7(2), 349-360.

54. Dweik, R. A., Laskowski, D., Abu-Soud, H. M., Kaneko, F., Hutte, R., Stuehr, D. J., & Erzurum, S. C. (1998). Nitric oxide synthesis in the lung. Regulation by oxygen through a kinetic mechanism. *The Journal of clinical investigation*, 101(3), 660.
55. Feelisch, M., Rassaf, T., Mnaimneh, S., Singh, N., Bryan, N. S., Jour'd'Heuil, D., & Kelm, M. (2002). Concomitant S-, N-, and heme-nitrosylation in biological tissues and fluids: implications for the fate of NO in vivo. *The FASEB Journal*, 16(13), 1775-1785.
56. Lapenna, D., Ciofani, G., Pierdomenico, S. D., Giamberardino, M. A., & Cucurullo, F. (2001). Reaction conditions affecting the relationship between thiobarbituric acid reactivity and lipid peroxides in human plasma. *Free Radical Biology and Medicine*, 31(3), 331-335.
57. Wong, S. H., Knight, J. A., Hopfer, S. M., Zaharia, O., Leach Jr, C. N., & Sunderman Jr, F. W. (1987). Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct. *Clinical chemistry*, 33(2), 214-220.
58. Fülöp, A., Turóczi, Z., Garbaisz, D., Harsányi, L., & Szijártó, A. (2013). Experimental models of hemorrhagic shock: a review. *European Surgical Research*, 50(2), 57-70.
59. Lo, J. C., Darracq, M. A., & Clark, R. F. (2014). A review of methylene blue treatment for cardiovascular collapse. *The Journal of emergency medicine*, 46(5), 670-679.
60. Farina, J. A., Celotto, A. C., da Silva, M. F., & Evora, P. R. B. (2012). Guanylate cyclase inhibition by methylene blue as an option in the treatment of vasoplegia after a severe burn. A medical hypothesis. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*, 18(5), HY13.
61. Farina, J. A., Rosique, M. J., & Rosique, R. G. (2013). Curbing inflammation in burn patients. *International journal of inflammation*, 2013.
62. Meirelles Jr, R. F., Ceneviva, R., Viaro, F., Baldo, C. F., & Evora, P. R. B. (2008). Methylene blue improves hemodynamic shock but increases lipoperoxidation in severe acute pancreatitis pig model. *Acta Cirúrgica Brasileira*, 23, 8-16.

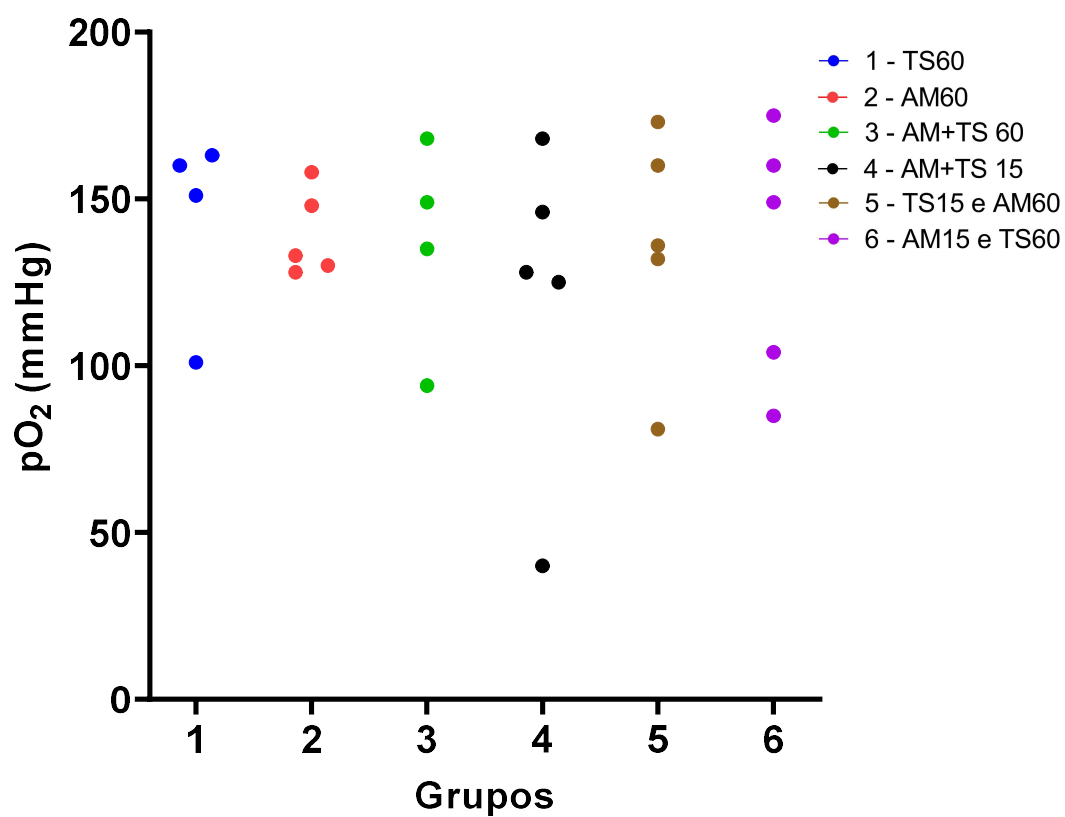
APÊNDICE A – FIGURAS COMPLEMENTARES

Figuras representando os valores finais das variáveis: pH, pO₂, pCO₂, Excesso de Bases (BE), Bicarbonato, Glicose, Lactato, Hemoglobina, Hematócrito, Sódio e Potássio dos animais dos diferentes grupos experimentais. Não houve diferença estatística entre os grupos experimentais.

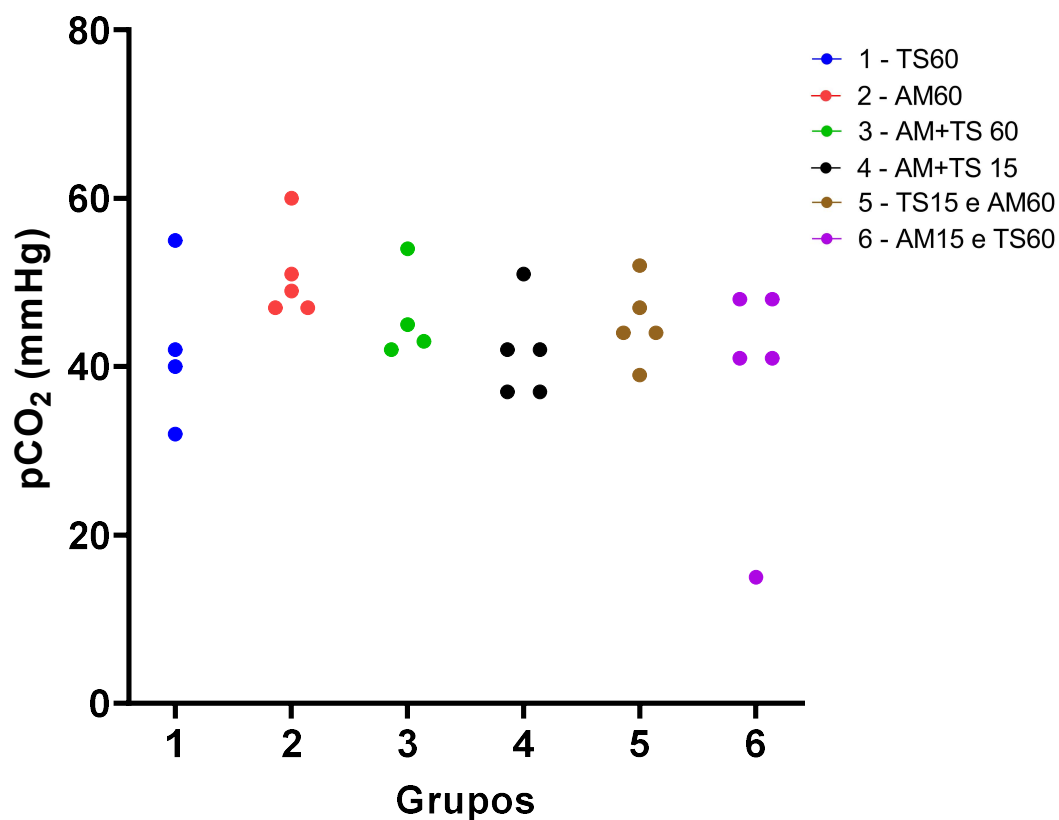
Figura 20. Ph.



Valores finais do pH dos animais de cada grupo experimental. Não há diferença estatística entre os grupos. Azul (Grupo 1 – 60TS), vermelho (grupo 2 – 60 AM), verde (grupo 3 – 60AM + TS); preto (grupo 4 – 15AM + TS); marrom (grupo 5 – 15TS + 60AM) e violeta (Grupo 6 – 15AM + 60TS). AM (azul de metileno), TS (transfusão sanguínea).

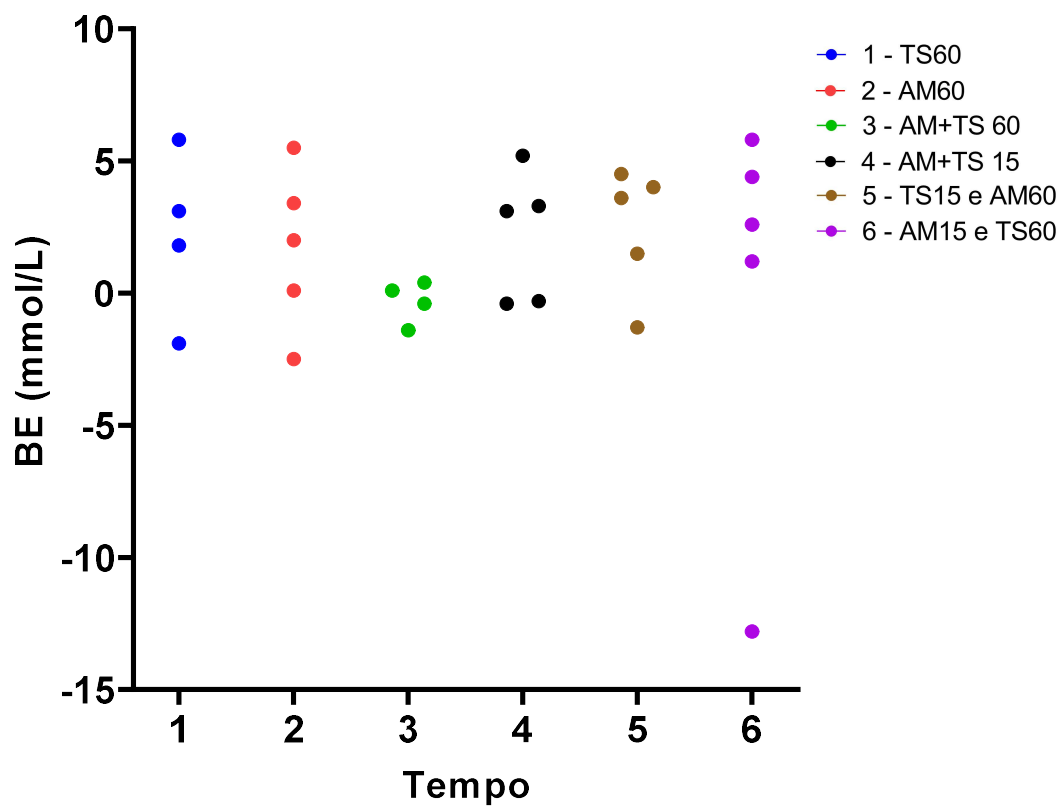
Figura 21. pO₂.

Valores finais do pO₂ dos animais de cada grupo experimental. Não há diferença estatística entre os grupos. Azul (Grupo 1 – 60TS), vermelho (grupo 2 – 60 AM), verde (grupo 3 – 60AM + TS); preto (grupo 4 – 15AM + TS); marrom (grupo 5 – 15TS + 60AM) e violeta (Grupo 6 – 15AM + 60TS). AM (azul de metileno), TS (transfusão sanguínea).

Figura 223. pCO₂.

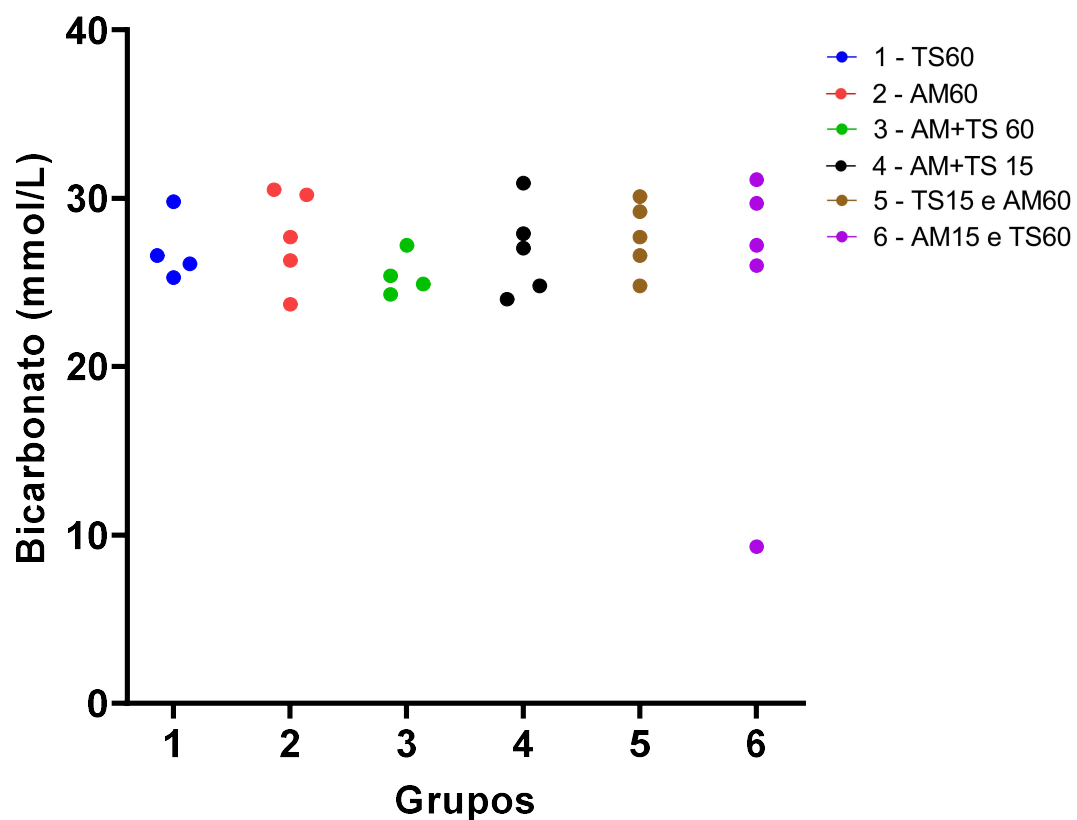
Valores finais do pCO₂ dos animais de cada grupo experimental. Não há diferença estatística entre os grupos. Azul (Grupo 1 – 60TS), vermelho (grupo 2 – 60 AM), verde (grupo 3 – 60AM + TS); preto (grupo 4 – 15AM + TS); marrom (grupo 5 – 15TS + 60AM) e violeta (Grupo 6 – 15AM + 60TS). AM (azul de metileno), TS (transfusão sanguínea).

Figura 23. Excesso de bases (BE).



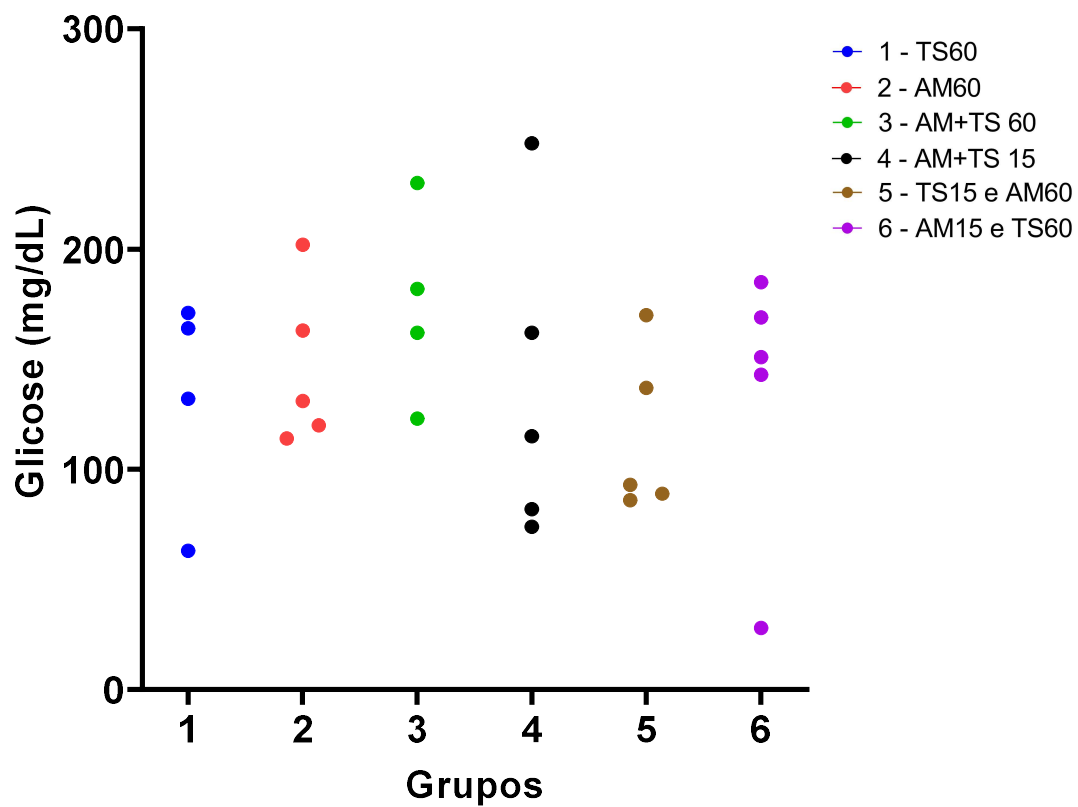
Valores finais do Excesso de bases (BE) dos animais de cada grupo experimental. Não há diferença estatística entre os grupos. Azul (Grupo 1 – 60TS), vermelho (grupo 2 – 60 AM), verde (grupo 3 – 60AM + TS); preto (grupo 4 – 15AM + TS); marrom (grupo 5 – 15TS + 60AM) e violeta (Grupo 6 – 15AM + 60TS). AM (azul de metileno), TS (transfusão sanguínea).

Figura 24. Bicarbonato.



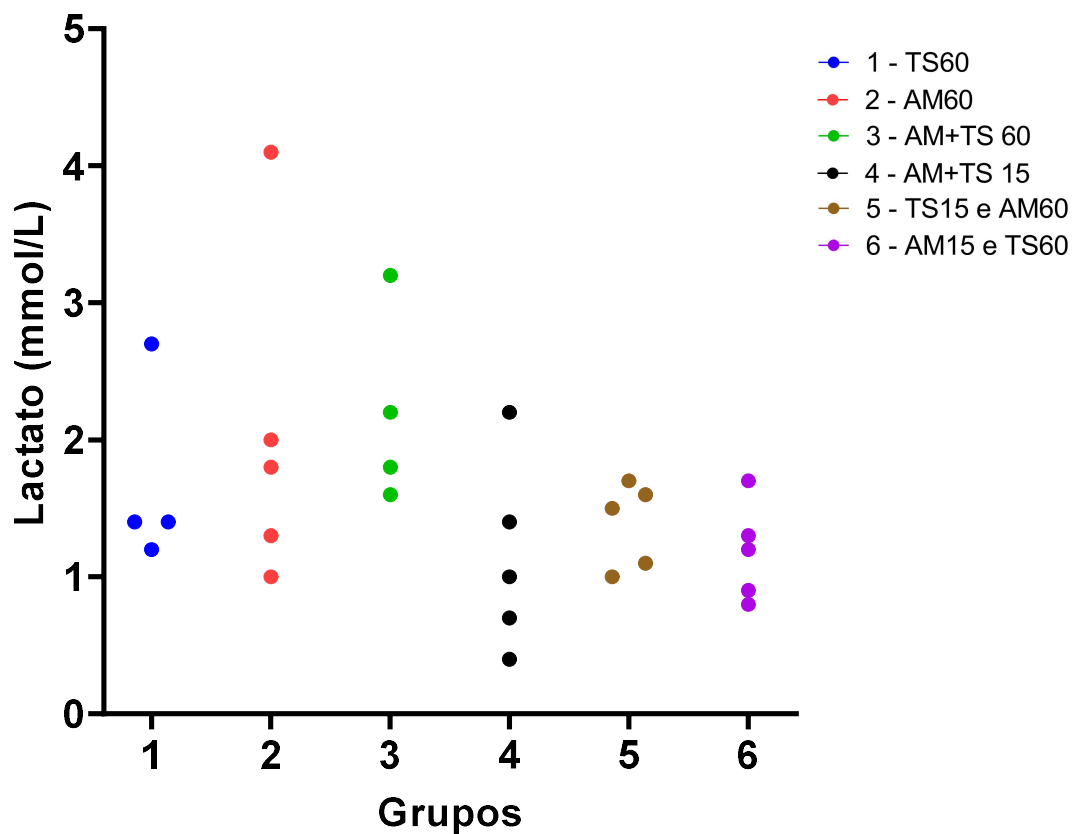
Valores finais de bicarbonato dos animais de cada grupo experimental. Não há diferença estatística entre os grupos. Azul (Grupo 1 – 60TS), vermelho (grupo 2 – 60 AM), verde (grupo 3 – 60AM + TS); preto (grupo 4 – 15AM + TS); marrom (grupo 5 – 15TS + 60AM) e violeta (Grupo 6 – 15AM + 60TS). AM (azul de metileno), TS (transfusão sanguínea).

Figura 25. Glicose.



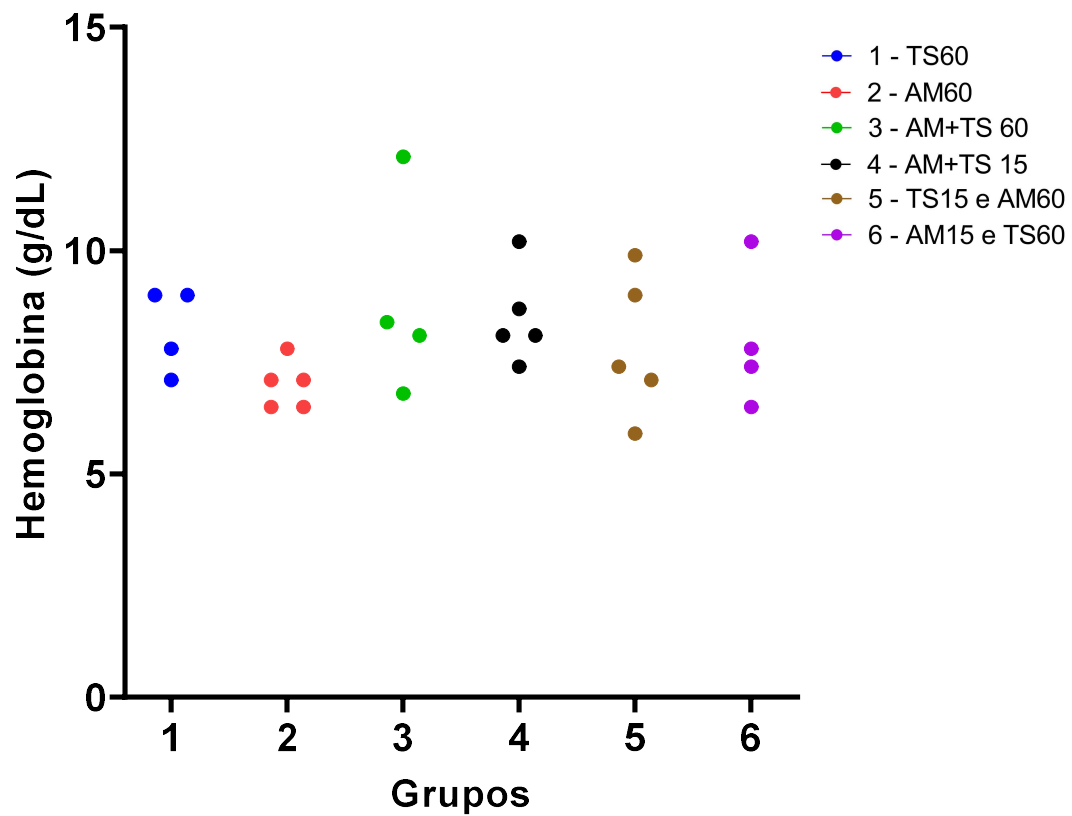
Valores finais de glicose dos animais de cada grupo experimental. Não há diferença estatística entre os grupos. Azul (Grupo 1 – 60TS), vermelho (grupo 2 – 60 AM), verde (grupo 3 – 60AM + TS); preto (grupo 4 – 15AM + TS); marrom (grupo 5 – 15TS + 60AM) e violeta (Grupo 6 – 15AM + 60TS). AM (azul de metileno), TS (transfusão sanguínea).

Figura 264. Lactato.



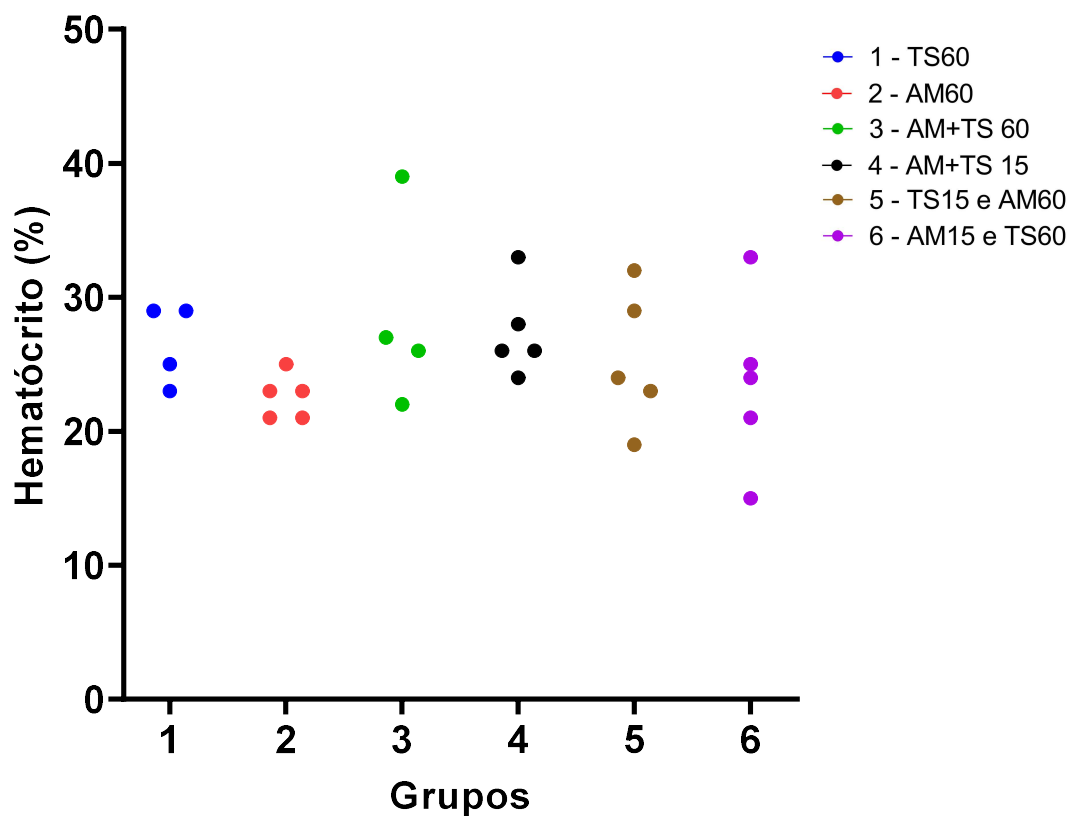
Valores finais de lactato dos animais de cada grupo experimental. Não há diferença estatística entre os grupos. Azul (Grupo 1 – 60TS), vermelho (grupo 2 – 60 AM), verde (grupo 3 – 60AM + TS); preto (grupo 4 – 15AM + TS); marrom (grupo 5 – 15TS + 60AM) e violeta (Grupo 6 – 15AM + 60TS). AM (azul de metileno), TS (transfusão sanguínea).

Figura 275. Hemoglobina.



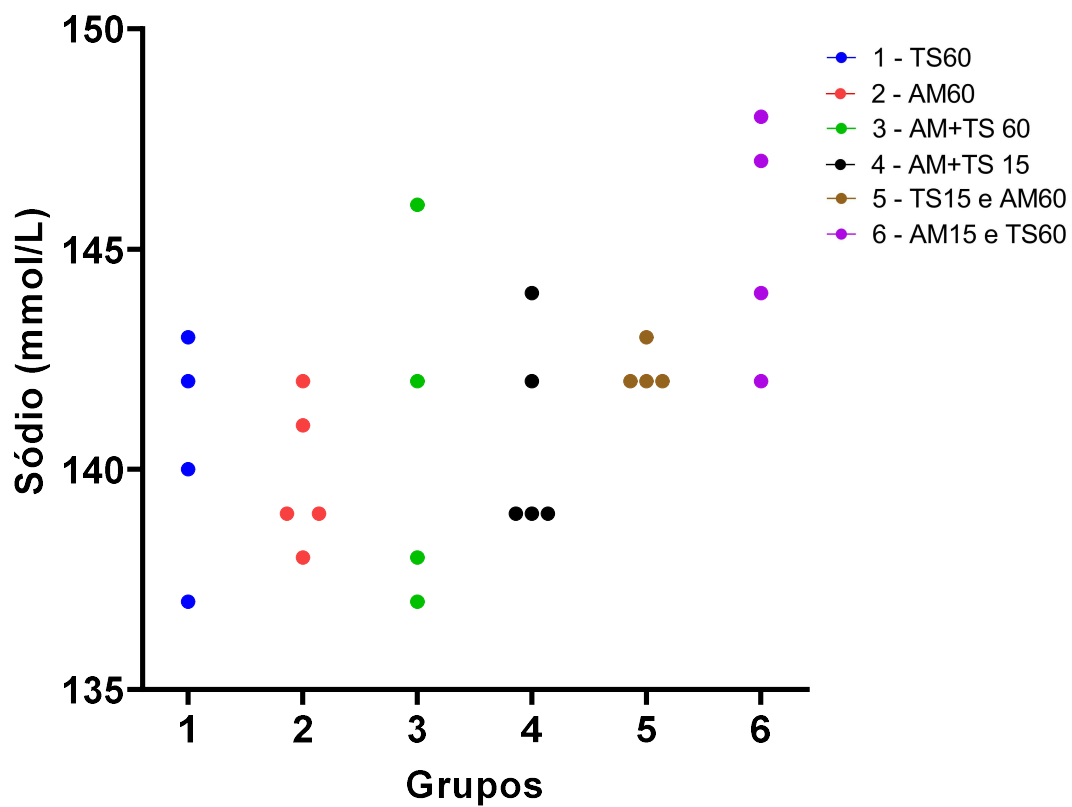
Valores finais de hemoglobina dos animais de cada grupo experimental. Não há diferença estatística entre os grupos. Azul (Grupo 1 – 60TS), vermelho (grupo 2 – 60 AM), verde (grupo 3 – 60AM + TS); preto (grupo 4 – 15AM + TS); marrom (grupo 5 – 15TS + 60AM) e violeta (Grupo 6 – 15AM + 60TS). AM (azul de metileno), TS (transfusão sanguínea).

Figura 28. Hematócrito.



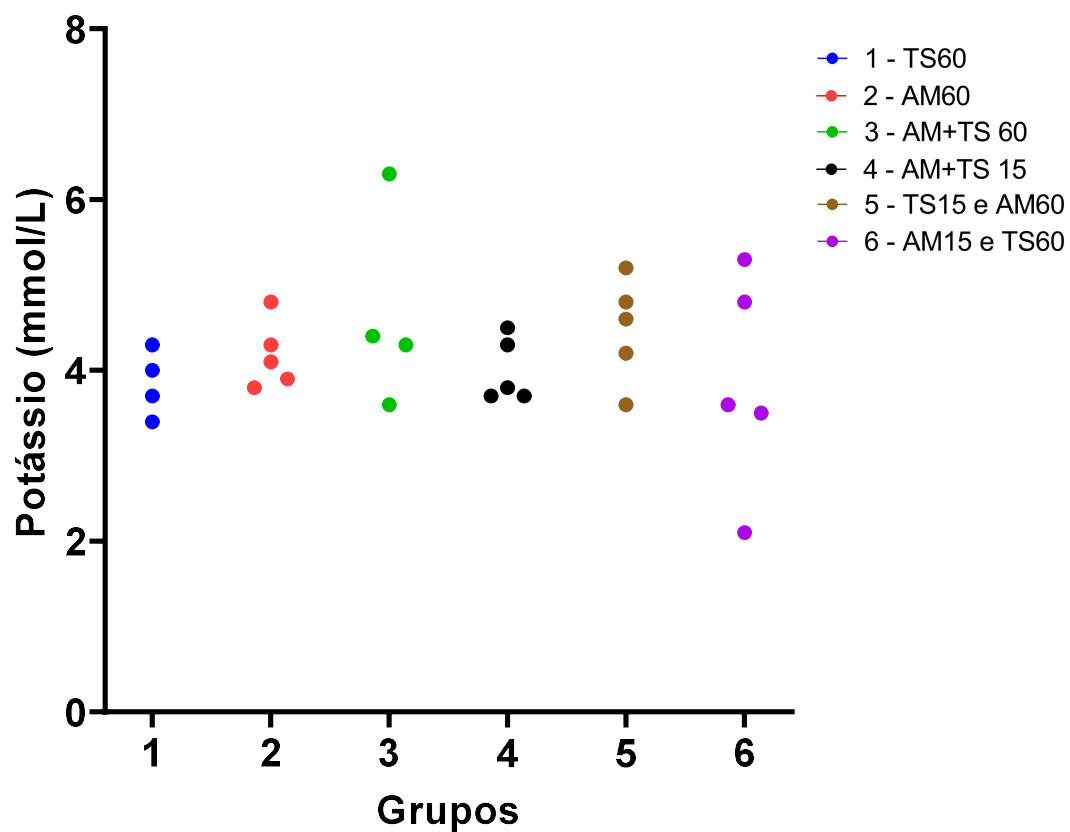
Valores finais de hematócrito dos animais de cada grupo experimental. Não há diferença estatística entre os grupos. Azul (Grupo 1 – 60TS), vermelho (grupo 2 – 60 AM), verde (grupo 3 – 60AM + TS); preto (grupo 4 – 15AM + TS); marrom (grupo 5 – 15TS + 60AM) e violeta (Grupo 6 – 15AM + 60TS). AM (azul de metileno), TS (transfusão sanguínea).

Figura 29. Sódio.



Valores finais de sódio dos animais de cada grupo experimental. Não há diferença estatística entre os grupos. Azul (Grupo 1 – 60TS), vermelho (grupo 2 – 60 AM), verde (grupo 3 – 60AM + TS); preto (grupo 4 – 15AM + TS); marrom (grupo 5 – 15TS + 60AM) e violeta (Grupo 6 – 15AM + 60TS). AM (azul de metileno), TS (transfusão sanguínea).

Figura 30. Potássio.



Valores finais de potássio dos animais de cada grupo experimental. Não há diferença estatística entre os grupos. Azul (Grupo 1 – 60TS), vermelho (grupo 2 – 60 AM), verde (grupo 3 – 60AM + TS); preto (grupo 4 – 15AM + TS); marrom (grupo 5 – 15TS + 60AM) e violeta (Grupo 6 – 15AM + 60TS). AM (azul de metileno), TS (transfusão sanguínea).

Tabela com os valores basais das variáveis hemodinâmicas em cada grupo experimental.

Tabela 2. Valores basais das variáveis hemodinâmicas de cada grupo experimental.

	Grupo 1 TS60	Grupo 2 AM60	Grupo 3 AM + TS 60	Grupo 4 AM + TS 15	Grupo 5 TS15 e AM60	Grupo 6 AM15 e TS60
Pressão arterial média basal (mmHg)	116,5	115	105,5	105	107	110
Pressão arterial pulmonar basal (mmHg)	30,5	31	29,5	32	29	32
Pressão capilar pulmonar basal (mmHg)	22	21	22,5	21	20	22
Pressão venosa central basal (mmHg)	19	18	19,5	19	19	18
Debito cardíaco basal (L/min)	2,7	2,9	2,1	2,8	2,6	3,5
Índice cardíaco basal (L/min/m ²)	1,6	1,8	1,4	1,8	1,3	2,1
Resistência vascular sistêmica basal (dyne-s/cm-5)	2786	2589	3550,5	2421	2898	2103
Índice de resistência vascular sistêmica basal (dyne-s/cm-5/m ²)	4888	4142	5144,5	4061	5507	3994
Resistência vascular pulmonar basal (dyne-s/cm-5)	281	249	287,5	403	229,5	261
Índice de resistência vascular pulmonar basal (dyne-s/cm-5/m ²)	449,5	422	427,5	617	482	532

TS: transfusão sanguínea; AM: azul de metileno; mmHg: milímetros de mercúrio; L: litros; min: minutos; cm: centímetros; s: segundos.

APÊNDICE B – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO.

Shock: Injury, Inflammation, and Sepsis: Laboratory and Clinical Approaches

METHYLENE BLUE COMBINED TO BLOOD TRANSFUSION INCREASES BLOOD PRESSURES LEVELS IN EXPERIMENTAL ACUTE SEVERE BLEEDING IN PIGS
--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	METHYLENE BLUE COMBINED TO BLOOD TRANSFUSION INCREASES BLOOD PRESSURES LEVELS IN EXPERIMENTAL ACUTE SEVERE BLEEDING IN PIGS
Article Type:	Basic Science Aspects (Animal Subjects)
Corresponding Author:	André Lupp, MD, MSc BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Andre Lupp, MD, Msc
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	André Lupp, MD, Msc André Lupp, MD, MSc Agnes Afrodite S. Albuquerque, PhD Marelaine Prandi, PhD Jessyca M. Barbosa, PhD Maria Cecília Jordani, PhD Walter Vilella de Andrade Vicente, MD, PhD Paulo Roberto B. Evora, MD, PhD.
Order of Authors Secondary Information:	

APÊNDICE C – ARTIGO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO**Title page****Title: METHYLENE BLUE COMBINED TO BLOOD TRANSFUSION
INCREASES BLOOD PRESSURES LEVELS IN EXPERIMENTAL
ACUTE SEVERE BLEEDING IN PIGS****Short title: Methylene blue as an adjuvant to treat hemorrhagic shock**

Authors: André Lupp, MD, MSc¹; Agnes Afrodite S. Albuquerque¹, PhD;
Marelaine Prandi¹, PhD; Jessyca M. Barbosa¹ PhD; Maria Cecília Jordani¹, PhD; Walter
Vilella de Andrade Vicente¹ MD, PhD; Paulo Roberto B. Evora¹, MD, PhD.

Affiliations

¹Department of Surgery and Anatomy, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto,
Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

This study was conducted in the Department of Surgery and Anatomy, Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo,
Brazil.

Financial support: Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital
das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
(FAEPA-HC/FMRP-USP) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
(FAPESP).

No conflict of interest.

Correspondence Address:

André Lupp

<https://orcid.org/0000-0002-6624-4492>

Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - 9º andar

Ribeirão Preto - SP

Zip Code: 14048-900

E-mail: andre.lupp@alumni.usp.br

Word count: 3659

Author List:

Andre Lupp, MD (andre.lupp@alumni.usp.br)*

ORCID: 0000-0002-6624-4492

No conflicts of interests

Agnes Afrodite S. Albuquerque, PhD (agnes@fmrp.usp.br)

ORCID: 0000-0003-3929-298X

No conflicts of interests

Marelaine Prandi, PhD (maprandig@gmail.com)

ORCID: 0000-0002-4885-0536

No conflicts of interests

Jessyca M. Barbosa PhD (jeh_michelon@hotmail.com)

ORCID: 0000-0002-3876-604X

No conflicts of interests

Maria Cecília Jordani, PhD (mceciliajordani@gmail.com)

ORCID: 0000-0001-5647-203X

No conflicts of interests

Walter Vilella de Andrade Vicente MD, PhD (wvvicent@fmrp.usp.br)

ORCID: 0000-0003-2334-9718

No conflicts of interests

Paulo Roberto B. Evora, MD, PhD (prbevora@gmail.com)

ORCID: 0000-0001-9631-946X

No conflicts of interests

Author contributions statement

AL: 1. Made a substantial contribution to the concept or design of the article or the acquisition, analysis, or interpretation of data for the article; 2. Drafted the article or revised it critically for important intellectual content; 3. Approved the version to be published; 4. agreed to be accountable for all aspects of the work, ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work were investigated and resolved appropriately.

AASA: 1. Made a substantial contribution to the concept or design of the article or the acquisition, analysis, or interpretation of data for the article; 2. Drafted the article or revised it critically for important intellectual content; 3. Approved the version to be published; 4. agreed to be accountable for all aspects of the work, ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work were investigated and resolved appropriately.

MP: 1. Made a substantial contribution to the concept or design of the article or the acquisition, analysis, or interpretation of data for the article; 2. Drafted the article or revised it critically for important intellectual content; 3. Approved the version to be published; 4. agreed to be accountable for all aspects of the work, ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work were investigated and resolved appropriately.

JMB: 1. Made a substantial contribution to the concept or design of the article or the acquisition, analysis, or interpretation of data for the article; 2. Drafted the article or revised it critically for important intellectual content; 3. Approved the version to be published; 4. agreed to be accountable for all aspects of the work, ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work were investigated and resolved appropriately.

MCJ: 1. Made a substantial contribution to the concept or design of the article or the acquisition, analysis, or interpretation of data for the article; 2. Drafted the article or revised it critically for important intellectual content; 3. Approved the version to be published; 4. agreed to be accountable for all aspects of the work, ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work were investigated and resolved appropriately.

WVAV: 1. Drafted or revised the article critically for important intellectual content; 2. Approved the version to be published; 3. agreed to be accountable for all aspects of the work, ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work were investigated and resolved appropriately.

PRBE: 1. Made a substantial contribution to the concept or design of the article or the acquisition, analysis, or interpretation of data for the article; 2. Drafted the article or revised it critically for important intellectual content; 3. Approved the version to be published; 4. agreed to be accountable for all aspects of the work, ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work were investigated and resolved appropriately.

Data access statement:

All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

ABSTRACT

(194 WORDS)

Objective. Early hemorrhagic shock treatment is fundamental to prevent organ dysfunction and death. This study aimed to investigate methylene blue (MB) as a rescue therapy in an experimental pig model of hemorrhagic shock. **Methods.** Animals (n=30) were randomly assigned to one of six groups after hemorrhagic shock induction: Group 1 (60 BT: blood retransfusion (BT) after 60 min), Group 2 (60MB: MB infusion after 60 min), Group 3 (60MB+BT: MB and BT after 60 min), Group 4 (15MB+BT: MB and BT after 15 min), Group 5 (15BT + 60MB: BT after 15 min and MB infusion after 60 min), and Group 6 (15MB + 60BT: MB infusion after 15 min and BT after 60 min). Hemodynamic and blood gas parameters were recorded. **Results.** The highest values of maximum Median Arterial Pressure (MAP)/basal MAP ratio were achieved by groups that received MB concomitant with BT at the 15th and 60th minutes, that is, groups 3 (60MB+BT) and 4 (15MB+BT), and there was no statistical difference between them. **Conclusion.** Using MB concomitant with BT allowed the reversal of hemorrhagic shock with higher median arterial pressure levels than BT alone or a combination of MB and BT alone.

Keywords: Methylene blue, circulatory shock, hemorrhagic shock, bleeding

INTRODUCTION

Hemorrhagic shock is associated with 30-40% of deaths in trauma victims. The search for strategies that prevent multiple organ dysfunction and death even before hemostasis and drugs that aid in treating hemorrhagic shock are significant challenges (1).

Despite significant efforts to improve outcomes in the treatment of severe hemorrhage, experimental studies are still needed to propose new treatment strategies in recent years. Therefore, animal experiments are required to investigate the pathophysiology of hemorrhagic shock and identify new therapeutic approaches (2).

In an experimental model of refractory hemorrhagic shock in rabbits, the best hemodynamic response was achieved by volume resuscitation and its association with pharmacological inhibition of Nitric Oxide (NO) synthesis, suggesting that the NO pathway may be a strategy for treating this type of shock. The formation of NO and peroxide nitrate soon after the onset of hemorrhage, preceding the expression of inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS), expressed only in later phases after prolonged periods of shock (3). This observation raises the hypothesis that blocking NO early when endothelial constitutive NO synthase (ecNOS) still produces NO could lead to an adjuvant effect in reversing hemorrhagic shock.

According to guidelines for treating hemorrhagic shock, an early approach is mandatory (4). Although blocking the guanosine monophosphate/nitric oxide (GMP/NO) pathway is theoretically justifiable, few experimental studies or clinical trials have evaluated its use in the treatment of hemorrhagic shock. To date, no experimental study has evaluated early blockade of NO production in this type of shock. The present study aimed to evaluate whether the administration of methylene blue (MB) within the first hour of hemorrhagic shock in pigs is safe and effective in reversing the shock state.

METHODS

Male Daland pigs (22-26 kg) were purchased from a specialized breeder. The animal procedures and experimental protocols used in this study were approved by the

Ethics Committee on Animal Experimentation (CETEA) of the Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) under protocol number 23/2015.

Animal preparation and hemodynamic parameters

The animals received preanesthetic medication with an intramuscular injection of xylazine (2 mg/kg) combined with ketamine (20 mg/kg) in the quadriceps muscle of one hind limb. After anesthetic induction, anesthesia was maintained intravenously (right jugular vein, central Swan-Ganz catheter) with midazolam 0.5 mg/kg/h and fentanyl 3mcg/kg/h in continuous infusion.

A 744HF75 Swan-Ganz CCombo CCO/SvO₂ catheter (Edwards Lifesciences, CA, USA) was inserted into the lumen of the pulmonary artery through the right jugular vein. The left carotid artery was catheterized to record the mean arterial pressure (MAP). The mean arterial pressure (MAP), pulmonary arterial pressure (PAP), pulmonary capillary pressure (PCP), and central venous pressure (CVP) were recorded using an MP System 100 A device (BioPac System Inc., CA, USA). Cardiac output (CO), systemic vascular resistance (SVR), and pulmonary vascular resistance (PVR) were recorded using a Vigilance System (Edwards Life Sciences, LLC). An arterial catheter was inserted into the right femoral artery for blood withdrawal to promote shock and laboratory sample collection.

After instrumentation, hemodynamic stabilization (basal value) was allowed for 20 min. After this period, animals were exsanguinated until they reached a mean arterial pressure of 55 mmHg, and blood was collected and stored in blood bags until the time of retransfusion. When the animals reached the target pressure, the chronometer was started (time, 0 min). Hemodynamic parameters were measured before the shock (basal) and at 0, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, and 90 min, and laboratory measurements were collected before the shock and at 0, 15, 30, and 90 min. The amount of blood previously extracted, methylene blue or both, was administered at 15 min, 60 min, or both, depending on the group. After the experiments, the animals were euthanized by exsanguination and, still under deep sedation.

Study design

The animals (n = 30) were randomized and allocated to six groups after the induction of hemorrhagic shock. Group 1 (60 BT: blood retransfusion after 60 min), Group 2 (60MB: MB infusion after 60 min), Group 3 (60MB + BT: MB and blood transfusion after 60 min), Group 4 (15MB + BT: MB and blood transfusion after 15 min), Group 5 (15 BT + 60MB: blood transfusion after 15 min and MB infusion after 60 min), and Group 6 (15MB + 60BT: MB infusion after 15 min and blood transfusion after 60 min). Table 1 shows the distribution of animals in the experimental groups.

Table 1. Distribution of the animals among the experimental groups. BT (blood transfusion), MB (Methylene blue).

Experimental Groups	Intervention
Group 1 N=5*	BT at 60 minutes
Group 2 N=5	MB at 60 minutes
Group 3 N=5*	MB + BT at 60 minutes
Group 4 N=5	MB + BT at 15 minutes
Group 5 N=5	BT at 15 minutes and MB at 60 minutes
Group 6 N=5	MB at 15 minutes and BT at 60 minutes

* One animal from group 1 and one from group 3 had hemodynamic worsening and cardiac arrest before the intervention at 60th minutes and were excluded from the experiment (N=4).

Methylene Blue Administration

Methylene blue (MB) (1%) was prepared by mixing 10 mg MB powder with 1 ml of sterile water. A bolus dose of (methylene blue (MB; 3 mg/kg) was administered intravenously.

Biochemical control

Biochemical controls included serial measurements of arterial and venous blood gases, hemoglobin (HB), hematocrit (Ht), lactate, glycemia, urea, and creatinine, which were analyzed using a Gem Premier 3000 (Instrumentation Laboratory Co., Bedford, Massachusetts, United States).

Plasma Nitrite and Nitrate (NO_x)

Nitric oxide plasma concentrations of its stable end products, nitrite (NO₂⁻) and nitrate (NO₃⁻), are known as NO_x. After sampling, 1 ml of blood received 5 μl of heparin (1000UI/ml). Samples were centrifuged for 10 min at 5,000 rotations per minute (rpm), and the plasma was immediately separated, immersed in liquid nitrogen, and stored at -70°C. Plasma deproteinization was performed with ethanol 95% at 4 °C for 30 min and centrifuged at 10,000 rpm for 5 min. The resulting supernatant was subjected to NO/ozone chemiluminescence using a NOAnalyzer 280i (Sievers, Boulder, CO, USA). This concentration was then adjusted by a factor calculated from the quotient of the measured NO_x and the expected concentrations of sodium nitrate (5, 10, 25, 50, and 100 mM), yielding a standard curve. The values are expressed in micrometres.

Malondialdehyde

The malondialdehyde (MDA) is the final product of fatty acid peroxidation and is an indirect marker of oxidative stress. MDA concentration was measured spectrophotometrically using the thiobarbituric acid technique. Blood samples were maintained on ice for further centrifugation at 4 °C and 900 rpm for 20 minutes. A 50 μL sample of the supernatant plasma received 750 μL of phosphoric acid (0,44 mol/L) and 250 μL of thiobarbituric acid (42 mmol/L). Test tubes containing the resultant solution were maintained in a bath at 100 °C for 60 min, followed by a cold bath at 0 °C. A volume of 0.5 ml of this solution was mixed with a methanol-NaOH solution (0.5 mL) and centrifuged at 9500 rpm for 5 min. A 50 μL of the supernatant was submitted to spectrophotometry at 532 nm (Versamax; Molecular Devices, San Jose, California, United States). A standard curve of 1,1,3,3-tetramethoxypropane was used to calculate the MDA concentration.

Statistical analysis

The Kruskal-Wallis nonparametric statistical test and Wilcoxon two-tailed tests corrected using the Bonferroni scale were used for statistical analysis (Prism 5.0, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Statistical significance was set at $P < 0.05$.

RESULTS

During the experiment, one animal from group 1 (60 BT) and one from group 3 (60MB + BT) presented hemodynamic worsening and consequent cardiorespiratory arrest before the programmed 60th-minute intervention. Therefore, they were excluded from the analysis in their respective groups.

Reversal of the shock state was considered when the mean arterial pressure (MAP) reached 90% of the baseline MAP before exsanguination. For the measurements of central venous pressure, cardiac output, cardiac index, systemic and pulmonary vascular resistance, and systemic and pulmonary vascular resistance indices, variations throughout the experiment were considered, with values varying $\pm 10\%$ from the baseline value before the induction of shock.

Mean arterial pressure (MAP)

There was no statistical difference between the baseline MAP of all experimental groups, confirming that the animals were adequately distributed among the six experimental groups through randomization. These data are shown in figure 1.

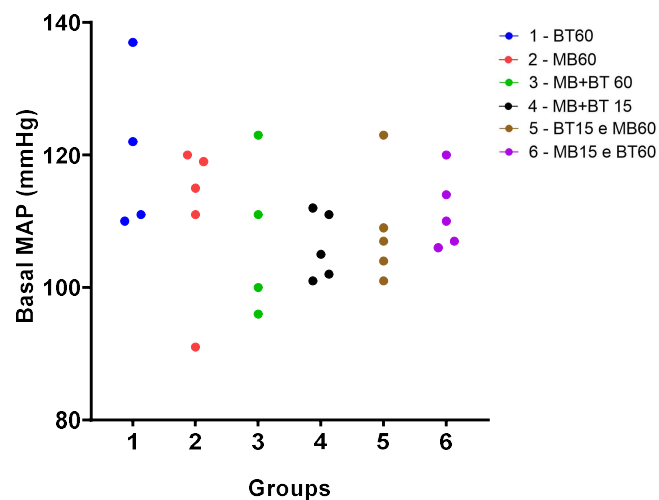


Figure 1. Baseline mean arterial pressure (MAP) of each animal in the different experimental groups. There was no statistical difference between the baseline MAP of the experimental groups. Blue (Group 1 - 60BT), red (Group 2 - 60MB), green (Group 3 - 60MB + BT); black (Group 4 - 15MB + BT); brown (Group 5 - 15BT + 60MB) and violet (Group 6 - 15MB + 60BT). **Kruskal-Wallis Nonparametric Statistic = 4.573, with $p > 0.45$.**

During the experiment, except for group 2, which received only MB, all other groups showed a shocking reversal, characterized by an MAP > 90% relative to the baseline MAP. These data are shown in figure 2.

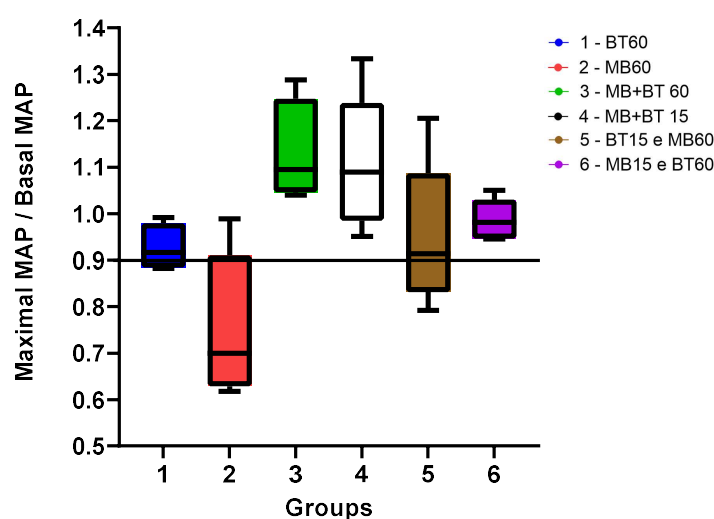


Figure 2. The ratio of maximum achieved pressure to baseline pressure between the experimental groups. Reversal of shock was considered when, after shock induction, the animal reached >90% of its baseline pressure. The infusion of MB concomitant to blood transfusion leads to a tendency to higher blood pressure levels compared to blood transfusion alone or separate from the use of MB. MB alone did not lead to the reversal of shock. Group 1 (60BT); Group 2 (60MB); Group 3 (60MB + BT); Group 4 (15MB + BT); Group 5 (15BT + 60MB), and Group 6 (15MB + 60BT). **Kruskal-Wallis Nonparametric Statistic = 15.914, with $p = 0.007094 < 0.01$**

The highest maximum MAP/basal MAP ratios were achieved in Groups 3, 4, and 6. A comparison among the six groups showed no statistical differences between Groups 3 and 4. However, Groups 3 and 6, and Groups 4 and 6 differed significantly. As for Groups 1 and 5, which also reverted from shock, their blood pressure values were borderline and did not present a statistical difference between them. The highest blood pressure responses were associated with the concomitant use of MB and blood transfusion, as evidenced by the responses of groups 3 and 4. Paired statistical evaluations of the groups are presented in Table 2.

Table 2 - Paired statistical evaluation of the blood pressure responses among the six experimental groups

Paired groups	Statistical significance
1-2	0,009333333
1-3	0,001904667
1-4	0,002116667
1-5	0,06032*
1-6	0,007326667
2-3	0,001058
2-4	0,001058
2-5	0,010053333
2-6	0,003955333
3-4	0,06032*
3-5	0,007406667
3-6	0,002436667
4-5	0,010053333
4-6	0,009253333
5-6	0,009253333

Wilcoxon two-tailed tests with p-values corrected by Bonferroni scale and overall significance level of 5%. Bonferroni factor $C(6,2) = 15$.

Pulmonary arterial pressure (PAP)

Figure 3-A shows the evolution of pulmonary arterial pressure throughout the experiment. The relationship between the highest PAP value and the baseline value is shown in figure 3-B. There was no statistical difference in the increase in PAP concerning the baseline values between the groups; the results are shown in figure 3.

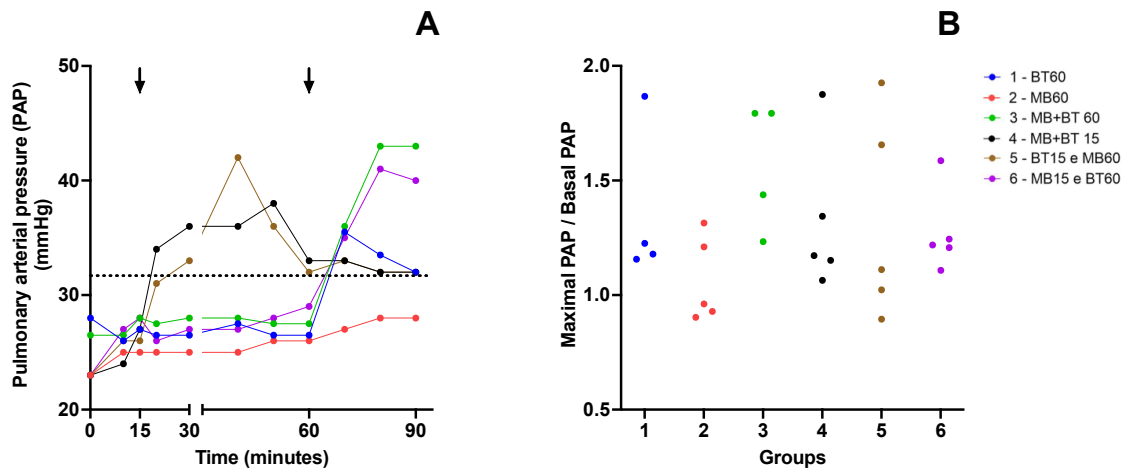


Figure 3. A. Time course of the median of pulmonary arterial pressure (PAP) values during the experiment. Arrows mark the intervention time in groups that received BT (blood transfusion) or MB (methylene blue). The dotted line represents the mean baseline values of PAP before the shock. B. Relationship between the maximal PAP during the experiment and its baseline values among animals of each experimental group. There is no statistical difference between the groups. Blue (Group 1 - 60BT), red (Group 2 - 60MB), green (Group 3 - 60MB + BT); black (Group 4 - 15MB + BT); brown (Group 5 - 15BT + 60MB) and violet (Group 6 - 15MB + 60BT).

Pulmonary capillary pressure (PCP)

Except for group 2 (60MB), the other groups similarly showed an increase in pulmonary capillary pressure (PCP) related to blood transfusion. The results are shown in figure 4.

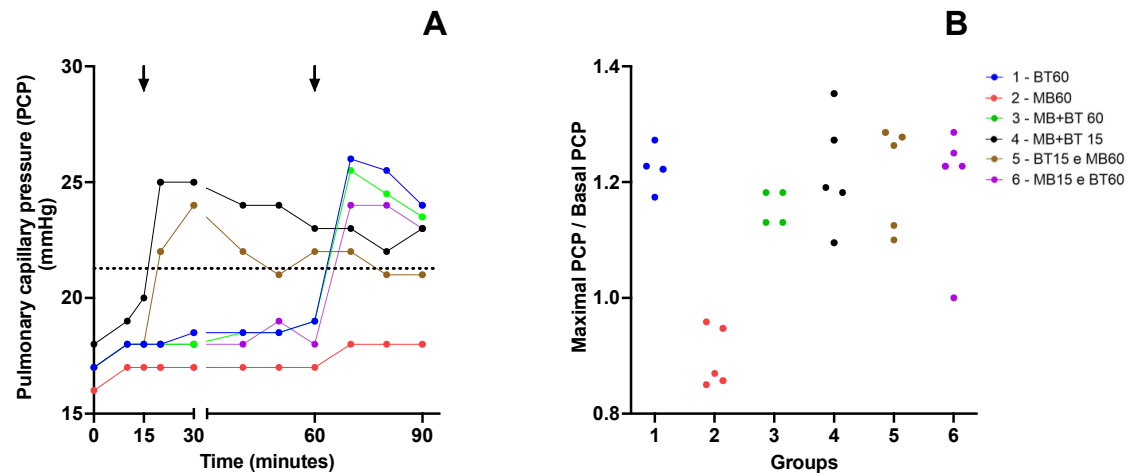


Figure 4. Time course of the median of pulmonary capillary pressure (PCP) values during the experiment. Arrows mark the intervention time in groups that received BT (blood transfusion) or MB (methylene blue). The dotted line represents the mean baseline values of PCP before the shock. B. Relationship between the maximal PCP during the experiment and its baseline value among animals of each experimental group. Group 2 presents lower PCP values compared to the other groups. Kruskal-Wallis Nonparametric Statistic = 13,57, with $p = 0.0186 < 0,05$. Blue (Group 1 - 60BT), red (Group 2 - 60MB), green (Group 3 - 60MB + BT); black (Group 4 - 15MB + BT); brown (Group 5 - 15BT + 60MB) and violet (Group 6 - 15MB + 60BT).

Central Venous Pressure (CVP)

Increased central venous pressure occurred in all groups, except in the group that received only MB (group 2). The results are shown in figure 5.

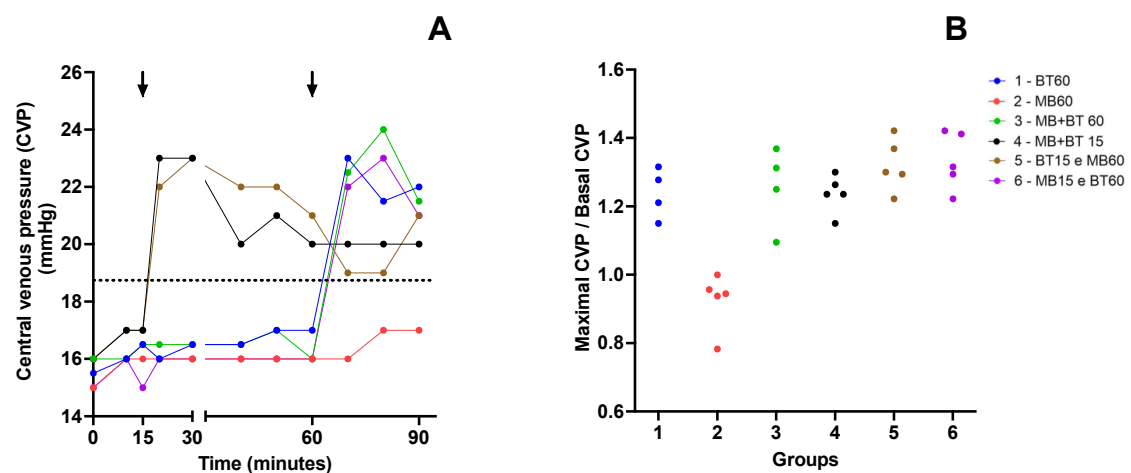


Figure 5. A. Time course of the median of central venous pressure (CVP) values during the experiment. Arrows mark the intervention time in groups that received BT (blood transfusion) or MB (methylene blue). The dotted line represents the mean baseline values of CVP before the shock. B. Relationship between the maximal CVP during the experiment and its baseline value among animals of each experimental group. Group 2 presents lower CVP values than the other groups. Kruskal-Wallis Nonparametric Statistic = 15,22, with $p = 0.0094 < 0,01$. Blue (Group 1 - 60BT), red (Group 2 - 60MB), green (Group 3 - 60MB + BT); black (Group 4 - 15MB + BT); brown (Group 5 - 15BT + 60MB) and violet (Group 6 - 15MB + 60BT).

Cardiac output (CO) and Cardiac index (CI)

There were no variations in cardiac output or cardiac index between the experimental groups. The results are shown in figure 6.

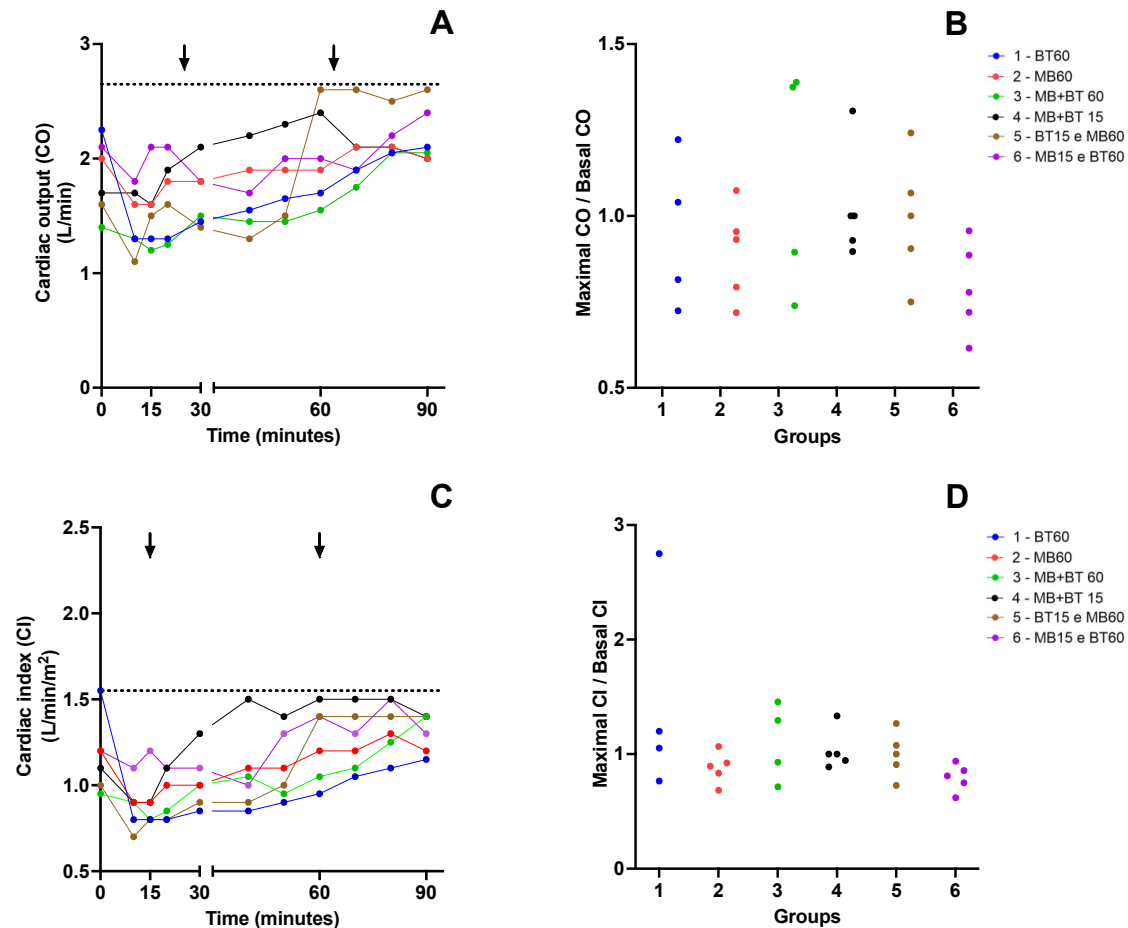


Figure 6. A. Time course of the median of Cardiac Output (CO) values during the experiment. Arrows mark the intervention time in groups that received BT (blood transfusion) or MB (methylene blue). The dotted line represent de mean baseline values of CO before the shock. B. Relationship between the maximal CO during the experiment and its baseline value among animals of each experimental group. There is no statistical difference between the groups. C. Time course of the median of Cardiac Index (CI) values during the experiment. Arrows mark the intervention time in groups that received BT (blood transfusion) or MB (methylene blue). The dotted line represent de mean baseline values of CI before the shock. D. Relationship between the maximal CI during the experiment and its baseline value among animals of each experimental group. There is no statistical difference between the groups. Blue (Group 1 - 60BT), red (Group 2 - 60MB), green (Group 3 - 60MB + BT); black (Group 4 - 15MB + BT); brown (Group 5 - 15BT + 60MB) and violet (Group 6 - 15MB + 60BT)

Vascular resistances

The Evaluation of systemic vascular resistance, systemic vascular resistance index, pulmonary vascular resistance, and pulmonary vascular resistance index did not

differ significantly between the groups. The data are presented in figures 7 and 8, respectively.

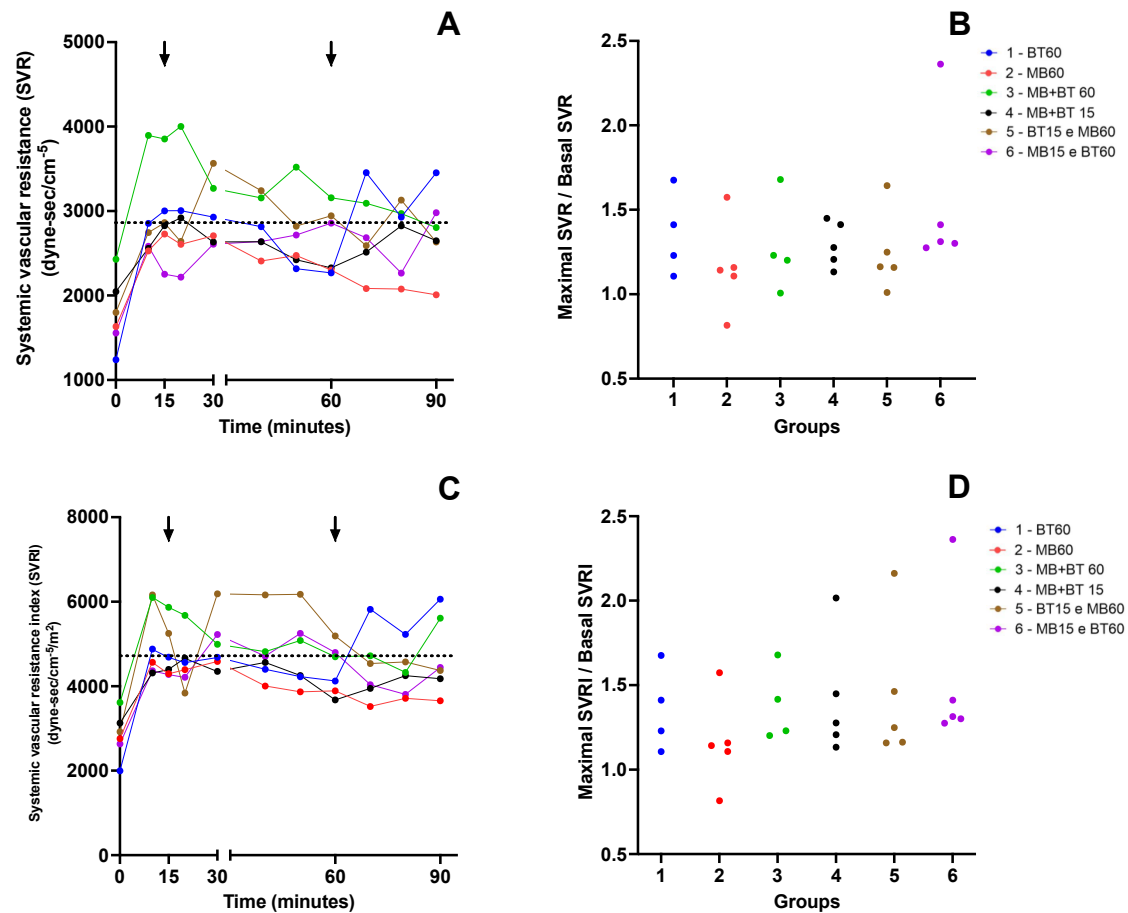


Figure 7. A. Time course of the median of Systemic Vascular Resistance (SVR) values during the experiment. Arrows mark the intervention time in groups that received BT (blood transfusion) or MB (methylene blue). The dotted line represent de mean baseline values of SVR before the shock. B. Relationship between the maximal Systemic Vascular Resistance (SVR) during the experiment and its baseline value among animals of each experimental group. There is no statistical difference between the groups. C. Time course of the median of Systemic Vascular Resistance Index (SVRI) values during the experiment. Arrows mark the intervention time in groups that received BT (blood transfusion) or MB (methylene blue). The dotted line represent de mean baseline values of SVRI before the shock. D. Relationship between the maximal Systemic Vascular Resistance Index (SVRI) during the experiment and its baseline value among animals of each experimental group. There is no statistical difference between the groups. Blue (Group 1 - 60BT), red (Group 2 - 60MB), green (Group 3 - 60MB + BT); black (Group 4 - 15MB + BT); brown (Group 5 - 15BT + 60MB) and violet (Group 6 - 15MB + 60BT).

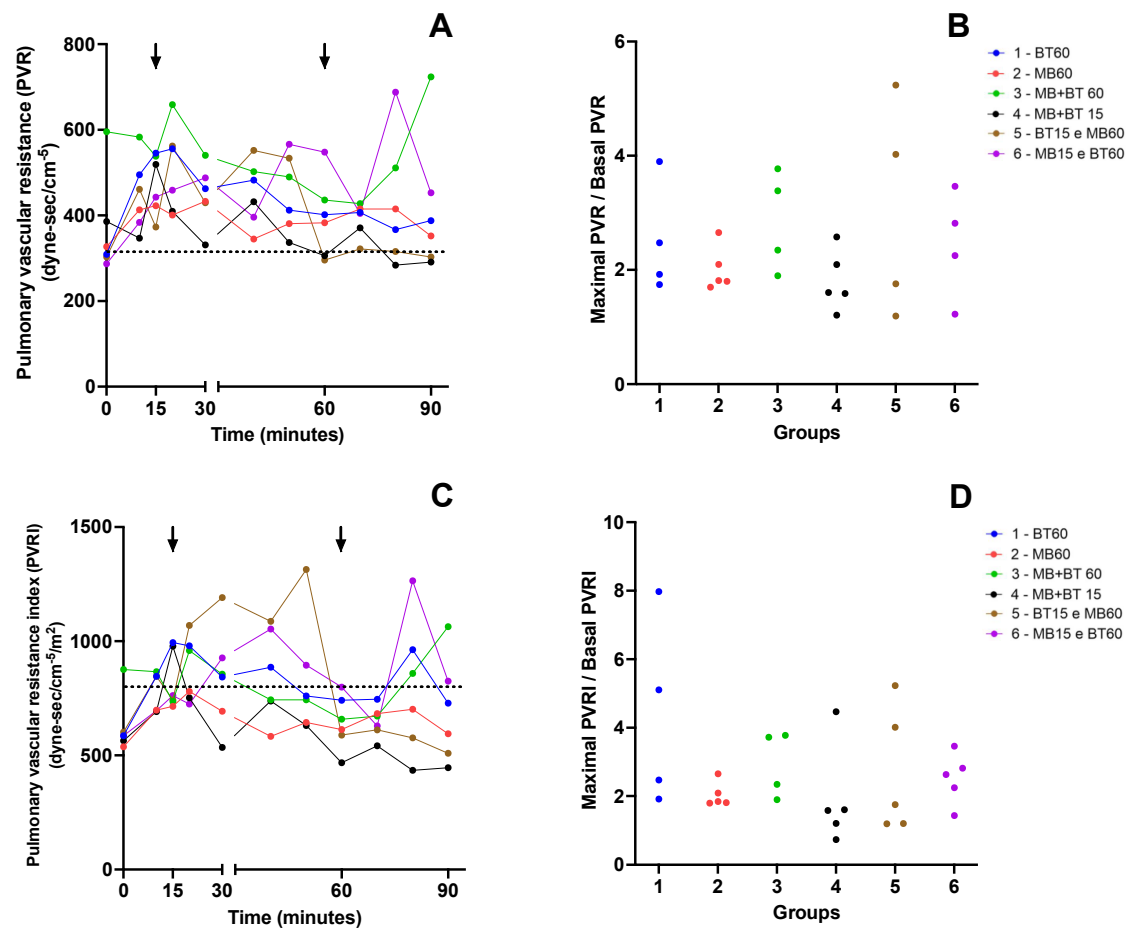


Figure 8. A. Time course of the median of Pulmonary Vascular Resistance (PVR) values during the experiment. Arrows mark the intervention time in groups that received BT (blood transfusion) or MB (methylene blue). The dotted line represent de mean baseline values of PVR before the shock. B. Relationship between the maximal Pulmonary Vascular Resistance (PVR) during the experiment and its baseline value among animals of each experimental group. There is no statistical difference between the groups. C. Time course of the median of Pulmonary Vascular Resistance Index (PVRI) values during the experiment. Arrows mark the intervention time in groups that received BT (blood transfusion) or MB (methylene blue). The dotted line represent de mean baseline values of PVRI before the shock. D. Relationship between the maximal Pulmonary Vascular Resistance Index (PVRI) during the experiment and its baseline value among animals of each experimental group. There is no statistical difference between the groups. Blue (Group 1 - 60BT), red (Group 2 - 60MB), green (Group 3 - 60MB + BT); black (Group 4 - 15MB + BT); brown (Group 5 - 15BT + 60MB) and violet (Group 6 - 15MB + 60BT).

Arterial blood acid-base, hemoglobin, hematocrit, and biochemical analyzes

Arterial blood acid-base, hemoglobin, hematocrit, and biochemical analyzes (sodium, potassium, glucose, and lactate levels) revealed no statistical differences between the experimental groups.

Nitrate

There were no significant differences in nitrate levels between the groups. The results are shown in figure 9.

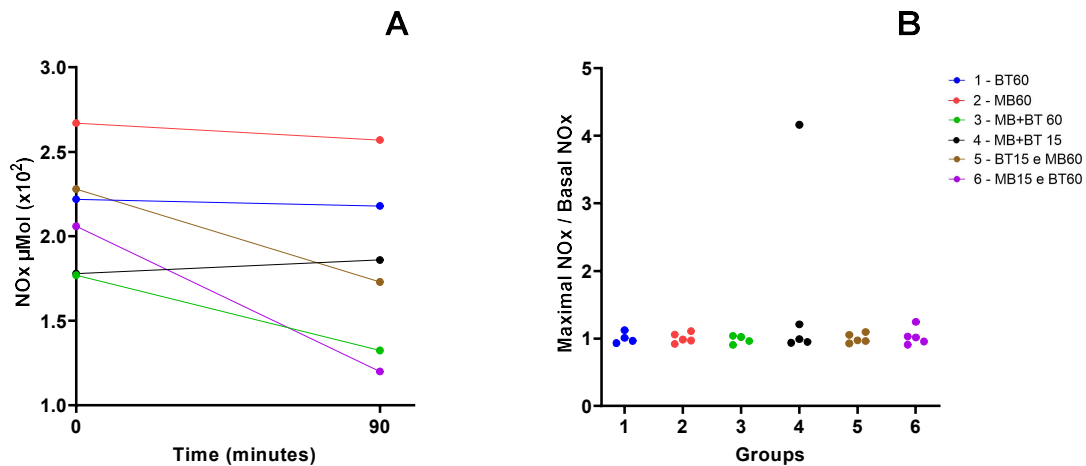


Figure 9. **A.** Initial and final Nitrate dosages values during the experiment. **B.** Relationship between the final dosage of Nitrate and its initial dosage among animals of each experimental group. There is no statistical difference between the groups. Blue (Group 1 - 60BT), red (Group 2 - 60MB), green (Group 3 - 60MB + BT); black (Group 4 - 15MB + BT); brown (Group 5 - 15BT + 60MB) and violet (Group 6 - 15MB + 60BT).

Malondialdehyde

No significant differences in malondialdehyde (MDA) variations were observed between experimental groups. The results are shown in figure 10.

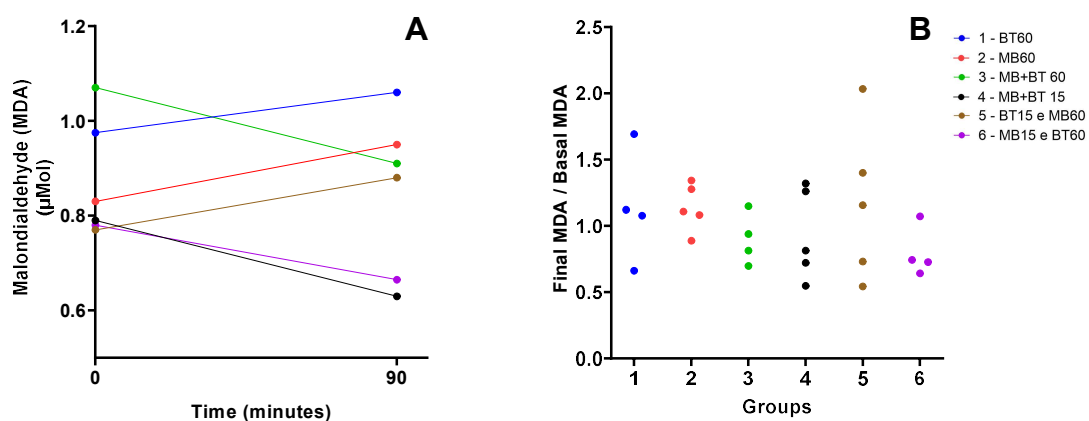


Figure 10. Initial and final Malondialdehyde (MDA) dosages during the experiment. **B.** Relationship between the final dosage of MDA and its initial dosage among animals of each experimental group. There is no statistical difference between the groups. Blue (Group 1 - 60BT), red (Group 2 - 60MB), green (Group 3 - 60MB + BT); black (Group 4 - 15MB + BT); brown (Group 5 - 15BT + 60MB) and violet (Group 6 - 15MB + 60BT).

DISCUSSION

This is the first study to evaluate the early use of methylene blue in the treatment of hemorrhagic shock in a fixed-pressure pig model. In 2001, Jeroukhimov compared prehospital hypotensive resuscitation protocols with volume resuscitation in a fixed-volume hemorrhage rat model, and evaluated the use of MB as an inhibitor of free radical formation. They concluded that MB could reduce the deleterious effects of volume resuscitation with electrolyte solutions alone and of ischemia and reperfusion injury (5). Ghiassi et al. evaluated the use of MB after the onset of refractory hemorrhagic shock in dogs and observed improvements in the clinical laboratory parameters of animals that received MB in combination with Lactated Ringer's solution (6).

There are three experimental models of hemorrhagic shock: fixed-volume, fixed-pressure, and uncontrolled hemorrhage. In the fixed-volume hemorrhage models, the percentage of blood volume removed over a period was determined by the examiner. Its advantage is the study of physiological responses and natural compensatory mechanisms after losing a limited volume of blood. However, it is more difficult to standardize and reproduce because hypotension is not adequately defined (7).

The fixed pressure hemorrhage model, initially described by Penfield and later adopted by Widger, withdraws blood to maintain the recommended pressure (8,9). The advantage of this method is the greater control of hypotension by monitoring blood pressure; thus, it is more standardized and reproducible. Despite this, it has the limitation of not reflecting real life because shock is maintained under constant pressure and may suffer from the effects of anesthesia and heparinization of the catheters used for blood withdrawal, significantly affecting experimental results (10).

The main conclusion of the present study was that the use of MB concomitant with blood transfusion allowed the recovery of blood pressure levels, reaching higher levels than the use of blood replacement alone or the use of MB at different from blood transfusion. It was also observed that the isolated use of MB did not have any effect on blood pressure; that is, its effect on pressure recovery depended on its association with volume, corroborating the observation of Ghiassi (6) that the combination of MB with a volume-limited Ringer's lactate solution improved hemodynamic stability and reduced ischemic damage in resuscitation models of hemorrhagic shock in dogs.

These findings are consistent with those of several previous studies that evaluated the use of MB in refractory septic, anaphylactic, and vasoplegic shock treatments, and showed its role as an adjuvant in restoring blood pressure (11). MB reverses vascular hyporeactivity by inhibiting cyclic guanosine monophosphate (cGMP) production. cGMP is a cellular signaling agent involved in smooth muscle relaxation, resulting in a decrease in peripheral vascular resistance (6). Thus, MB inhibits peripheral vascular relaxation, acts as a vasoplegic inhibitor, and cannot be considered a vasopressor, as observed in the present study, owing to the lack of pressure response to the use of the drug without its association with volume replacement.

One known adverse effect of MB is pulmonary hypertension, which occurs because of pulmonary vasoconstriction, resulting in decreased gas exchange and low oxygen saturation (12). Regarding pulmonary arterial pressure, although all experimental animals presented high basal levels of pulmonary arterial pressure (PAP) values, all groups presented a similar pattern of PAP behavior. In the present study, there was no evidence that MB elevated the pulmonary pressure.

For arterial blood acid-base, electrolyte, hemoglobin, hematocrit, and lactate levels, no response pattern was associated with the experimental groups. The nitrate dosage, which is an indirect method for measuring NO, showed no statistical difference between the experimental groups. Previous studies have reported a similar response pattern when MB was used in anaphylactic shock models (13). There were no statistically significant differences in MDA levels between the groups. The lack of change in NO and MDA levels may be related to the short observation period. Further studies with longer observation times are needed to evaluate changes in their levels.

The data found in this study reinforce the adjuvant role of MB in the reversal of hemorrhagic shock. Knowledge of MB's safety of MB and its mechanisms of action in reversing shock extrapolated from other shock modalities can open space for investigating its effects associated with other volume expanders, such as crystalloids. One example of its possible benefits is treating major burns in which the MB may have an important role, which may include reducing vascular permeability, the amount of blood loss, and the quantity of vasoactive amines for maintaining pressure, as well as favoring coagulation and protecting microcirculation (14,15).

The data from this and previous studies call attention to a possible paradigm shift. Further experimental studies should be conducted to evaluate whether early use can prevent refractoriness in late stages of shock. Further studies should be conducted using clinical protocols.

Study limitation. Possible limitations of this study include the experimental shock model used, which, being isobaric, does not reflect reality; animal research is still shifting from the use of unrealistic pressure-controlled, volume-controlled hemorrhagic shock models, or uncontrolled hemorrhagic shock outcome models. However, animal outcome models of combined trauma and shock are required and a significant challenge is to find a clinically realistic long-term method in humans. In addition, there are limiting factors, such as anesthesia, which can interfere with physiological responses, and the small number of animals used.

In conclusion, using MB concomitant with blood transfusion allowed the reversal of hemorrhagic shock with higher arterial pressure levels compared to blood transfusion alone or the combination of MB and blood transfusion separately. There was no difference in shock reversal with the combination of MB and blood transfusion at 15 or 60 minutes, and the treatment proved to be a potentially safe strategy. These findings reinforce the potential clinical use of MB as an adjuvant strategy in the early resuscitation phase of hemorrhagic shock.

REFERENCES

1. Volpon, L. C., Evora, P. R. B., Teixeira, G. D., Godinho, M., Scarpelini, S., Carmona, F., & Carlotti, A. P. D. C. P. (2018). Methylene blue for refractory shock in polytraumatized patient: a case report. *The Journal of Emergency Medicine*, 55(4), 553-558.
2. Aptekman, B., Tarashansky, M., Sotman, A., Khuri, W., Ben-Abraham, R., Dolkart, O., & Weinbroum, A. A. (2010). Effects of methylene blue and volatile anesthetics on survival in a murine hemorrhage resuscitation model. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, 69(6), 1433-1441.
3. Zhu, H. D., Yu, C. H., Wang, H. L., Wang, Z., & Yu, X. Z. (2008). Effects of methylene blue on refractory hemorrhagic shock. *Zhongguo yi xue ke xue Yuan xue bao. Acta Academiae Medicinae Sinicae*, 30(2), 136-139.

4. Rossaint, R., Bouillon, B., Cerny, V., Coats, T. J., Duranteau, J., Fernández-Mondéjar, E., ... & Spahn, D. R. (2016). The European guideline on management of major bleeding and coagulopathy following trauma. *Critical care*, 20(1), 1-55.
5. Jeroukhimov, I., Weinbroum, A., Ben-Avraham, R., Abu-Abid, S., Michowitz, M., & Kluger, Y. (2001). Effect of methylene blue on resuscitation after haemorrhagic shock. *European Journal of Surgery*, 167(10), 742-747.
6. Ghiassi, S., Sun, Y. S., Kim, V. B., Scott, C. M., Nifong, L. W., Rotondo, M. F., & Chitwood Jr, W. R. (2004). Methylene blue enhancement of resuscitation after refractory hemorrhagic shock. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, 57(3), 515-521.
7. Shaylor, R., Gavish, L., Yaniv, G., Wagnert-Avraham, L., Gertz, S. D., Weissman, C., ... & Eisenkraft, A. (2020). Early maladaptive cardiovascular responses are associated with mortality in a porcine model of hemorrhagic shock. *Shock*, 53(4), 485-492.
8. Penfield, W. G. (1919). The treatment of severe and progressive hemorrhage by intravenous injections. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 48(1), 121-132.
9. Wiggers, C. J. (1942). The present status of the shock problem. *Physiological Reviews*, 22(1), 74-123.
10. András, F., Zsolt, T., Dávid, G., László, H., & Attila, S. (2013). Experimental Models of Hemorrhagic Shock: A Review.
11. Puntillo, F., Giglio, M., Pasqualucci, A., Brienza, N., Paladini, A., & Varrassi, G. (2020). Vasopressor-sparing action of methylene blue in severe sepsis and shock: a narrative review. *Advances in Therapy*, 37(9), 3692-3706.
12. Leyh, R. G., Kofidis, T., Strüber, M., Fischer, S., Knobloch, K., Wachsmann, B., ... & Haverich, A. (2003). Methylene blue: the drug of choice for catecholamine-refractory vasoplegia after cardiopulmonary bypass. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, 125(6), 1426-1431.
13. Albuquerque, A. A. S., Margarido, E. A., Menardi, A. C., Scorzoni Filho, A., Celotto, A. C., Rodrigues, A. J., ... & Evora, P. R. B. (2016). Methylene blue to treat protamine-induced anaphylaxis reactions. An experimental study in pigs. *Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery*, 31, 226-231.
14. Farina, J. A., Celotto, A. C., da Silva, M. F., & Evora, P. R. B. (2012). Guanylate cyclase inhibition by methylene blue as an option in the treatment of vasoplegia after a severe burn. A medical hypothesis. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*, 18(5), HY13.
15. Saffle, J. R. (2007). The phenomenon of "fluid creep" in acute burn resuscitation. *Journal of Burn Care & Research*, 28(3), 382-395.

APÊNDICE D – AVERIGUAÇÃO DE PLAGIARISMO (TURNITIN)



Recibo digital

Esse recibo confirma que o seu documento foi recebido por **Turnitin**. Abaixo você encontrará a informação do recibo referente ao seu envio.

A primeira página do seu documento está exibida abaixo.

Autor do material:	Andre Lupp Mota
Título do Trabalho:	Autochecagem
Título do envio:	Azul de metileno como adjuvante na ressuscitação volêmica ...
Nome do arquivo:	Final_da_tese_texto_MEXENDO_5.docx
Tamanho de arquivo:	18.71M
Contagem de páginas:	88
Contagem de palavras:	19,087
Contagem de caracteres:	104,379
Data de envio:	23-jan-2023 10:22PM (UTC-0300)
Identificação do Envio:	1681922233



Direitos Autorais Turnitin 2023. Todos os direitos reservados.