

**ELSON ALBERTO FERNANDES DE ARAÚJO FILHO**

**Efeito do bloqueio do receptor AT1 no desfecho cardiovascular após parada  
cardiorrespiratória: estudo experimental em ratos**

**São Paulo**

**2023**

**ELSON ALBERTO FERNANDES DE ARAÚJO FILHO**

**Efeito do bloqueio do receptor AT1 no desfecho cardiovascular após parada  
cardiorrespiratória: estudo experimental em ratos**

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

Programa de Anestesiologia, Ciências Cirúrgicas e Medicina  
Perioperatória

Área de concentração: Anestesia e Analgesia

Orientadora: Profa. Dra. Maria José Carvalho Carmona

**São Paulo**

**2023**

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

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

©reprodução autorizada pelo autor

Araújo Filho, Elson Alberto Fernandes de  
Efeito do bloqueio do receptor AT1 no desfecho  
cardiovascular após parada cardiorrespiratória :  
estudo experimental em ratos / Elson Alberto  
Fernandes de Araújo Filho. -- São Paulo, 2023.  
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo.  
Programa de Anestesiologia, Ciências Cirúrgicas  
e Medicina Perioperatória. Área de Concentração:  
Anestesia e Analgesia.  
Orientadora: Maria Jose Carvalho Carmona.

Descritores: 1.Parada cardíaca 2.Reanimação  
cardiopulmonar 3.Modelos animais 4.Candesartan

USP/FM/DBD-256/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Araújo Filho EAF. Efeito do bloqueio do receptor AT1 no desfecho cardiovascular após parada cardiorrespiratória: estudo experimental em ratos [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

Aprovado em: \_\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais pela luta sempre dispensada para a minha formação, valores humanos que sempre me nortearam e incentivo ao estudo a despeito das dificuldades.

Agradeço à minha orientadora Profa. Dra. Maria José Carmona, pela paciência, ensinamentos e dedicação, fundamentais para a construção do trabalho.

Ao Dr. Matheus Vane, a quem desde a residência posso contar com o apoio incondicional e crença no projeto. Além da amizade, tenho grande admiração pelo profissional e ser humano que é.

À Dra. Denise Otsuko, pela orientação, generosidade e esforço conjunto, sempre persistente e confiante durante todo o processo de construção do trabalho.

À Dra. Débora Rothstein, pela orientação, conselhos e conhecimento também aplicados no nosso trabalho.

Ao Gilberto Nascimento, um profissional generoso, amigo que também foi fundamental ao processo da tese.

Agradecimento eterno a todos integrantes da Disciplina de Anestesiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, que fazem da Anestesiologia brasileira um grande centro de formação em ensino e pesquisa, um orgulho para nosso país.

Agradeço a Deus pois sem Ele nada seria possível.

## RESUMO

Araújo Filho EAF. Efeito do bloqueio do receptor AT1 no desfecho cardiovascular após parada cardiorrespiratória: estudo experimental em ratos [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

**INTRODUÇÃO:** recentemente, o uso de antagonistas dos receptores de angiotensina II tipo AT1 (ATI) mostrou-se benéfico em situações de isquemia/reperusão (I/R) focal. Porém, em situações de I/R global, como na parada cardiorrespiratória (PCR), pouco se sabe sobre o bloqueio desses receptores. **OBJETIVO:** avaliar o uso de bloqueadores de receptores AT1 da angiotensina II após a PCR. **MÉTODOS:** após a aprovação do comitê de ética, ratos foram alocados em quatro grupos: grupo sham (GS) - animais submetidos a intervenções cirúrgicas, sem PCR; grupo controle (GC) - animais submetidos à PCR, seguida por manobras de ressuscitação cardiopulmonar (RCP); grupo AT1 (GAT1) animais submetidos aos procedimentos descritos para o GC, acrescido 0,2 mg/kg de candesartan intravenoso no início da RCP; Grupo Veículo (GV): animais igualmente induzidos à PCR, sendo administrado 0,2 mL/kg de dimetilsulfóxido (DMSO) a 99%, no início da RCP. Analisou-se taxa de retorno à circulação espontânea, sobrevida, variáveis hemodinâmicas, histopatologia e marcadores de lesão tecidual. **RESULTADOS:** o GAT1, em relação o grupo controle, apresentou maior taxa de retorno da circulação espontânea (RCE), (62,5% vs. 42,1%, IC: 0,016-0,793;  $p < 0,0001$ ) e de sobrevida (100% vs. 62,5%, IC: 0,014-0,034;  $p = 0,027$ ). Esses animais também tiveram menos arritmia após 10 minutos de RCE, (10% vs. 62,5%, IC: 0,001-0,043;  $p = 0,000$ ). A análise histopatológica demonstrou menor escore de lesão neuronal e cardíaca no GAT1 em relação GC ( $p = 0,025$  e  $p = 0,021$ , respectivamente). Os grupos não apresentaram diferenças quanto ao tempo de PCR, números de doses de adrenalina ou números de desfibrilações. **CONCLUSÃO:** o bloqueio do receptor AT1 da angiotensina II foi eficaz para proteção contra lesão neuronal e miocárdica após PCR com maiores taxas de RCE e sobrevida.

**Palavras-chave:** Parada cardíaca. Reanimação cardiopulmonar. Modelos animais. Candesartan.

## ABSTRACT

Araújo Filho EAF. Effect of AT1 receptor blockade on cardiovascular outcome after cardiorespiratory arrest: experimental study in rats [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2023.

**INTRODUCCION:** recently, the use of angiotensin II receptor type AT1 (ATI) antagonists has shown to be beneficial in situations of focal ischemia/reperfusion (I/R). However, in situations of global I/R, such as cardiorespiratory arrest (CA), little is known about the blockade of these receptors. **OBJECTIVE:** to evaluate the use of angiotensin II AT1 receptor blockers after CA. **METHODS** After ethics committee approval, rats were allocated into four groups: sham group (SG) - animals submitted to surgical interventions, without CA; control group (CG) - animals submitted to CA, followed by cardiopulmonary resuscitation (CPR) maneuvers; group AT1 (GAT1) animals submitted to the procedures described for the CG, plus 0.2 mg/kg of intravenous candesartan at the beginning of CPR; Vehicle Group (VG): animals equally induced to CA, being administered 0.2 mL/kg of 99% dimethylsulfoxide (DMSO) at the beginning of CPR. The rate of return to spontaneous circulation, survival, hemodynamic variables, histopathology, and markers of tissue injury were analyzed. **RESULTS:** the GAT1, compared to the control group, had a higher rate of return of spontaneous circulation (ROSC), (62.5% vs. 42.1%, CI: 0.016-0.793;  $p < 0.0001$ ) and survival (100 % vs 62.5%, CI: 0.014-0.034;  $p = 0.027$ ). These animals also had less arrhythmia after 10 minutes of ROSC, (10% vs. 62.5%, CI: 0.001-0.043;  $p = 0.000$ ). The histopathological analysis showed a lower score of neuronal and cardiac injury in the GAT1 compared to the CG ( $p = 0.025$  and  $p = 0.021$ , respectively). The groups did not show differences regarding CRP time, number of adrenaline doses or number of defibrillations. **CONCLUSION:** angiotensin II AT1 receptor blockade was effective for protection against neuronal and myocardial injury after CA with higher ROSC and survival rates.

**Keywords:** Heart arrest. Cardiopulmonary resuscitation. Animals models. Candesartan.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ang-II	-	Angiotensina II
ARA	-	Antagonista do receptor da angiotensina
AT1	-	Receptor da angiotensina II tipo AT1
AT2	-	Receptor da angiotensina II tipo AT2
ATP	-	Trifosfato de adenosina
Bax	-	<i>Bcl-2 associated protein X</i>
Bcl-2	-	<i>B-cell lymphoma protein 2</i>
Be	-	Excesso de bases
Bic	-	Bicarbonato
bpm	-	Batimentos cardíacos por minuto
CAM	-	Concentração alveolar mínima
CEUA-USP	-	Comissão de ética no uso de animais - Universidade de São Paulo
DNA	-	Ácido desoxirribonucléico
DP	-	Desvio padrão
ECA	-	Enzima conversora da angiotensina
EDTA	-	Anticoagulante edetato cálcio dissódio
EEG	-	Eletroencefalograma
EROs	-	Espécies reativas de oxigênio
EUA	-	Estados Unidos da América
FC	-	Frequência cardíaca
FV	-	Fibrilação ventricular
GAT1	-	Grupo antagonista do receptor da angiotensina AT1
GC	-	Grupo controle
GS	-	Grupo sham
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	Superóxido de hidrogênio
Hb	-	Hemoglobina
Ht	-	Hematócrito
I/R	-	Isquemia e reperfusão
IECA	-	Inibidor da enzima conversora da angiotensina
Ipm	-	Incrussões por minuto
IV	-	Intravenoso
JNK	-	c-jun-n-terminal



K	- Potássio
KOH	- Hidróxido de potássio
LOD	- Lesão de órgão à distância
mA	- Miliampere
mEq/kg	- Miliequivalente por quilograma
mmHg	- Milímetros de mercúrio
MPT	- Poro de transição da permeabilidade mitocondrial
mRNA	- RNA mensageiro
NADPH	- Nicotinamida-adenina-dinucleotideo-fosfato-hidrogênio
p	- Significância estatística
PaCO <sub>2</sub>	- Pressão arterial de dióxido de carbono
PAD	- Pressão arterial diastólica
PAM	- Pressão arterial sistêmica média
PaO <sub>2</sub>	- Pressão arterial de oxigênio
PAS	- Pressão arterial sistólica
PBS	- Tampão fosfato salínico
PCR	- Parada cardiorrespiratória
PMN	- Polimorfonucleares
RCE	- Retorno da circulação espontânea
RCP	- Ressucitação cardiopulmonar
RE	- Retículo endoplasmático
RNA	- Ácido ribonucleico
SRA	- Sistema renina angiotensina
TV	- Taquicardia ventricular
TVNS	- Taquicardia supraventricular não sustentada
UI	- Unidades internacionais
USP	- Universidade de São Paulo
X <sup>2</sup>	- Qui-quadrado
XO	- Xantina oxidase
DMSO	- Dimetilsulfóxido
pH	- Potencial hidrogeniônico

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Animal preparado para indução da parada cardiorrespiratória, após instrumentação cirúrgica.....	30
Figura 2 - A) curva pressórica do ventrículo direito; B) eletrocardiografia durante a alocação do cateter.....	31
Figura 3 - A) curva de pressão arterial; B) eletrocardiograma durante a indução da fibrilação ventricular.....	32
Figura 4 - A) equipamento para compressão torácica; B) posicionamento do animal sob o equipamento .....	32
Figura 5 - Fluxograma do experimento .....	33
Figura 6 - Distribuição dos ratos nos grupos de estudo e distribuição conforme sobrevida após ressuscitação cardiopulmonar .....	38
Figura 7 - Microscopia óptica de tecido cerebral, corada com hematoxilina e eosina, aumento 40 vezes, seta preta indica neurônio vermelho .....	46
Figura 8 - Micrografias representativas do tecido miocárdico corado com hematoxilina e eosina (10 campos quantificados/animal).....	48

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características basais de todos os animais.....	39
Tabela 2 - Quantificações das intervenções durante RCP .....	40
Tabela 3 - Medianas e interquartis das variáveis hemodinâmicas dos animais que completaram o estudo .....	41
Tabela 4 - Valores das concentrações anestésicas dos animais que sobreviveram até completarem o protocolo do estudo.....	43
Tabela 5 - Medidas descritivas das gasometrias no conjunto de animais que completaram o protocolo do estudo.....	44
Tabela 6 - Mediana de marcação de túnel em cada grupo, com mínimo e máximo de células apoptóticas .....	46

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Curva de Kaplan-Meier de sobrevivência cumulativa. Demonstra diferença estatisticamente significante entre os GAT1 e GC ( $p < 0,05$ ) .....	40
Gráfico 2 - Medianas das pressões arteriais médias em animais que sobreviveram durante todo o período de observação ( $p = 0,014$ ) .....	42
Gráfico 3 - Comportamento da frequência cardíaca entre os grupos de animais que sobreviveram até o final das 4 horas de observação ( $p = 0,234$ ) .....	43
Gráfico 4 - Medidas séricas da troponina I (cTnI) após quatro horas de observação dos animais que tiveram critério de RCE ( $p = 0,006$ ) .....	45
Gráfico 5 - Escore de lesão neuronal, após quatro horas de observação dos animais que tiveram critério de RCE ( $p = 0,025$ ) .....	47
Gráfico 6 - Escore de lesão miocárdica, após quatro horas de observação dos animais que tiveram critério de RCE ( $p = 0,021$ ) .....	48

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>16</b>
2.1	OBJETIVO PRIMÁRIO .....	17
2.2	OBJETIVOS SECUNDÁRIOS .....	17
<b>3</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>18</b>
3.1	INCIDÊNCIA DE PCR.....	19
3.2	LESÃO DE ISQUEMIA-REPERFUSÃO PÓS PARADA CARDÍACA .....	20
3.3	O SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA NA I/R .....	24
3.4	MODELOS EXPERIMENTAIS DE ISQUEMIA/REPERFUSÃO GLOBAL .....	26
<b>4</b>	<b>MÉTODOS.....</b>	<b>28</b>
4.1	ANIMAIS E GRUPOS .....	29
4.2	PROCEDIMENTOS DE INSTRUMENTAÇÃO PARA MONITORIZAÇÃO.....	30
4.3	INDUÇÃO DA PCR .....	31
4.4	AVALIAÇÃO DOS DESFECHOS .....	33
4.4.1	<i>Avaliação hemodinâmica.....</i>	<i>33</i>
4.4.2	<i>Avaliação gasométrica .....</i>	<i>34</i>
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	36
<b>5</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>37</b>
5.1	PARÂMETROS FISIOLÓGICOS BASAIS .....	39
5.2	PARÂMETROS HEMODINÂMICOS .....	40
5.2.1	<i>Pressões arteriais ao longo do estudo.....</i>	<i>42</i>
5.2.2	<i>Frequência cardíaca ao longo do tempo.....</i>	<i>42</i>
5.3	COMPORTAMENTO DA CONCENTRAÇÃO ANESTÉSICA APÓS RCE.....	43
5.4	DADOS LABORATORIAIS.....	44
5.5	TUNEL .....	46
5.6	MICROSCOPIA ÓPTICA CEREBRAL .....	46
5.7	MICROSCOPIA ÓPTICA CARDÍACA .....	47
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>49</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>55</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>57</b>
	<b>ANEXO.....</b>	<b>63</b>

# **1 INTRODUÇÃO**

A parada cardiorrespiratória (PCR) é um evento crítico, relacionada a alta incidência de desfechos fatais, que pode ser reversível quando instituídas as manobras de reanimação cardiopulmonar precocemente<sup>1</sup>. No cenário perioperatório, a PCR é o evento adverso de maior gravidade, e mesmo que prontamente assistida, tem alta taxa de mortalidade, variando de 35% imediatamente ao evento, até cerca de 70% após um ano deste<sup>2</sup>. Estudos demonstram que as PCRs intra-hospitalares têm maior taxa de sobrevida, em torno de 15%, quando comparada às PCRs em ambiente extra-hospitalares, com taxa de sobrevida de 2% a 5%<sup>3,4</sup>.

Atualmente, nos Estados Unidos da América (EUA), ocorrem cerca de 350.000 mortes por PCR extra-hospitalar ao ano, e apesar dos avanços nos protocolos de reanimação e nos cuidados intensivos, ainda é um grande desafio para a medicina a redução da taxa de mortalidade em consequência deste evento. Além do fato de que quando há sobrevida, esta tende a ser acompanhada por graves sequelas neurológicas, que por muitas vezes, tornam estes indivíduos incapacitados a uma vida produtiva. Por esta razão, diversos estudos têm focado em métodos para atenuar a lesão induzida pela isquemia e reperfusão (I/R) pós-PCR<sup>5-7</sup>.

Alguns estudos abordam a utilização de drogas que promovem redução de radicais livres, seja por pré-condicionamento à hipóxia ou ação anti-inflamatória. Desta forma, tais autores promoveram variadas intervenções direcionadas à redução dos danos pós-PCR, como o uso de estatinas, opioides, anestésicos inalatórios, além de outros fármacos<sup>8-10</sup>.

O sistema renina angiotensina (SRA), por meio do seu principal efector, a angiotensina II (Ang-II), tem sido relacionado à ação fundamental de mediador do estresse oxidativo, além de induzir disfunção endotelial e ativar vias pró-inflamatórias<sup>11</sup>. Estudos recentes demonstram que o uso de inibidores do SRA pode reduzir a lesão tecidual em situações nas quais a I/R está presente<sup>11-14</sup>. Atribui-se aos antagonistas dos receptores de angiotensina (ARA), o papel de diminuir áreas de necrose tanto em modelos de I/R miocárdica<sup>12,14</sup>, quanto cerebral<sup>15</sup>. Sugere-se que quando utilizado um ARA específico para o receptor da angiotensina II, tipo 1 (AT1), a Ang-II mantém seu efeito sobre receptores do tipo 2 (AT2), que por sua vez vem sendo relacionado a diversas funções benéficas em modelos de I/R neuronal, como neuroproteção, diminuição do estresse oxidativo e menor edema após um evento isquêmico<sup>11,12</sup>.

Entretanto, esses estudos têm avaliado o bloqueio do SRA em situações de I/R focadas em um órgão isolado, geralmente em isquemias cerebrais focais ou miocárdicas. Devido aos menores limiares isquêmicos de alguns órgãos e à maior quantidade de tecido isquemiado durante a PCR, a lesão por I/R torna-se muito mais agressiva e com maior potencial de lesão durante a reperfusão.

Poucos estudos correlacionaram o uso de bloqueadores do SRA à isquemia de múltiplos órgãos como ocorre na PCR. Além do fato que durante este evento, a quantidade de tecidos isquêmicos é maior, tornando as repercussões da lesão de I/R ainda mais agressivas. Pouco se sabe sobre como o SRA se comporta nesta situação e se o seu bloqueio é benéfico. Portanto, para avaliar se o bloqueio dos receptores da angiotensina II tem papel de proteção contra a lesão de I/R, foi realizado um estudo experimental em ratos, submetendo estes animais à PCR induzida por fibrilação ventricular, pelo disparo de uma corrente elétrica no endocárdio dos mesmos, simulando um modelo de lesão por I/R global, sendo que em um dos grupos foi realizado o bloqueio do SRA, por meio da administração do candasertan, no início das manobras de reanimação cardiopulmonar, comparando seus efeitos em relação ao grupo controle e ao grupo veículo.



## **2 OBJETIVOS**

## 2.1 OBJETIVO PRIMÁRIO

Avaliar se o bloqueio do SRA por meio do candesartan confere proteção tecidual frente à lesão de isquemia-reperfusão, a partir do antagonismo imediato dos receptores AT1.

## 2.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

a) Avaliar se o bloqueio do receptor AT1 repercute em aumento das taxas de retorno da circulação espontânea (RCE) e redução da mortalidade.

b) Identificar possíveis mecanismos de proteção à lesão de I/R em modelo experimental de isquemia global, promovidos pelo bloqueio dos receptores da angiotensina II.

c) Avaliar o efeito do antagonismo dos receptores da angiotensina II sobre as lesões cerebrais, miocárdicas; repercussões sobre o estresse oxidativo e alterações eletroquímicas.

## **3 REVISÃO DA LITERATURA**

### 3.1 INCIDÊNCIA DE PCR

A literatura apresenta grande variabilidade de incidência de PCR, que a mortalidade pode estar associada ao ambiente em que ocorreu o evento, duração e causa da PCR, entre outros fatores. Estima-se que fora do ambiente hospitalar ocorram nove casos de PCRs para cada 10.000 habitantes<sup>7</sup>, enquanto no ambiente hospitalar há a estimativa de 1 a 5 casos de PCRs para cada 1.000 internações<sup>3</sup>. No período perioperatório, alguns estudos apontam uma ampla variação desta incidência, de 1 a 44 casos de PCRs para cada 10 mil procedimentos, com alta mortalidade após 30 dias, podendo atingir até 70% dos casos<sup>15-18</sup>. A mortalidade e morbidade tardias são devido a consequências neurológicas pós-anóxicas, com 10% a 40% dos sobreviventes apresentando importante dano cerebral permanente<sup>1-4</sup>. Em contraste, a morte prematura é muitas vezes devido à instabilidade hemodinâmica persistente que leva à falência de múltiplos órgãos.

Em 2015, Koga *et al.*<sup>19</sup> publicaram uma metanálise, com 11,9 milhões de pacientes, demonstrando uma incidência de 6,2 PCRs para cada 10.000 anestésias em países desenvolvidos e a relação 19,9 PCRs para cada 10.000 anestésias em países em desenvolvimento. Este mesmo estudo, demonstrou queda acentuada da incidência ao longo do tempo, inicialmente nos países desenvolvidos, diante a obtenção de recursos tecnológicos e a aplicação de protocolos de segurança no ambiente cirúrgico. A grande variação da incidência da mortalidade no período perioperatório corresponde, dentre outras variáveis, ao estado físico dos pacientes, ao tipo de cirurgia e à disponibilidade de recursos humanos e materiais.

Segundo Braz *et al.*<sup>20</sup>, no Brasil, nota-se uma queda importante no número de PCRs intraoperatórias após a introdução da resolução nº 1363/93 do Conselho Federal de Medicina, a qual obrigava monitorização da pressão arterial, uso de estetoscópio precordial, presença de desfibriladores e drogas de resgate dentro do centro cirúrgico. Havia uma incidência de 39 PCRs para cada 10.000 procedimentos cirúrgicos na década de oitenta. Com o emprego das melhorias citadas, houve queda desta incidência para cerca de 13/10.000 cirurgias na década de noventa. Os autores, em 2006, publicaram um estudo retrospectivo realizado em um hospital de atendimento terciário, durante o período de 4 anos (janeiro de 1996 a dezembro de 2004), descrevendo a ocorrência de 186 PCRs em 53.718 anestésias, ou seja, uma incidência de 34,6/10.000 anestésias. Computando-se somente as paradas cardíacas causadas pela anestesia, obteve-se incidência de 3,35/10.000 anestésias.

Em 2006, o Conselho Federal de Medicina<sup>21</sup>, publicou a resolução CFM n° 1802/2006, que ampliava os cuidados ao paciente quanto à monitorização hemodinâmica e ao risco de hipertermia maligna, além da necessidade de avaliação pré-anestésica e aplicação do termo de consentimento anestésico. Estas modificações contribuíram para o aumento da segurança das anestésias no Brasil e consequente redução da incidência de PCR no país. Entretanto, não há uma série histórica brasileira que descreva a incidência de PCR intraoperatória após vigência da resolução publicada em 2006<sup>20,21</sup>.

A *American Heart Association*, assim como outras sociedades médicas destinadas a tratar do tema, têm desenvolvido ativamente protocolos para reduzir a mortalidade e as sequelas neurológicas consequentes da PCR. No entanto, mesmo com a evolução tecnológica e a otimização dos protocolos de RCP, as taxas de mortalidade e morbidade permanecem elevadas. Logo, faz-se necessário o estudo aprofundado sobre o tema, e a busca por estratégias ou intervenções que possam reduzir as repercussões negativas deste evento<sup>22</sup>.

### 3.2 LESÃO DE ISQUEMIA-REPERFUSÃO PÓS PARADA CARDÍACA

A lesão de I/R é definida como aumento do dano celular e morte diante o retorno do fluxo sanguíneo para os tecidos isquêmicos. No entanto, a própria reperfusão paradoxalmente causa mais danos, comprometendo a função e viabilidade do tecido. Tais lesões ocorrem em diversos órgãos tais como: coração, pulmão, rim, intestino, músculo esquelético e cérebro. Este é um processo multifatorial que resulta em extensa destruição celular<sup>23</sup>.

O processo de isquemia provoca mudança no metabolismo celular, determinando a predominância do metabolismo anaeróbico e acúmulo de íons de hidrogênio, com consequente redução do pH intracelular. Em resposta a estas alterações, o sistema tampão, por meio do seu trocador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , excreta íons de hidrogênio em excesso, o que produz um grande influxo de íons de sódio para o meio intracelular<sup>23</sup>. A isquemia também esgota o ATP celular que inativa as ATPases (por exemplo,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase), reduz o efluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  ativo e limita a recaptção de cálcio pelo retículo endoplasmático (RE), resultando em acúmulo de cálcio intracelular. Neste processo, o poro de transição da permeabilidade mitocondrial (MPT) permanece aberto, o que dissipa o potencial de membrana mitocondrial, reduzindo ainda mais a produção de ATP.

No coração, essas alterações celulares são acompanhadas pela ativação de proteases intracelulares, como as calpaínas, que danificam as miofibrilas e produzem contratura exacerbada e necrose. Portanto, o grau de lesão tecidual varia proporcionalmente com a redução do suprimento sanguíneo e com a duração do período de isquemia<sup>24</sup>.

A reperfusão imediata restaura a oferta oxigênio e substratos necessários para a geração aeróbia de ATP, possibilitando a normalização do pH extracelular eliminando o H<sup>+</sup> acumulado. Porém a própria reperfusão parece ter consequências prejudiciais ao acelerar o desenvolvimento de necrose tecidual<sup>25</sup>. Os mecanismos subjacentes à lesão de reperfusão são complexos, multifatoriais e envolvem: 1) geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) que são alimentadas pela reintrodução de oxigênio molecular quando o fluxo sanguíneo é restabelecido; 2) sobrecarga de cálcio; 3) abertura dos poros MPT; 4) disfunção endotelial; 5) aparecimento de um fenótipo pró-trombogênico e 6) respostas inflamatórias pronunciadas<sup>26</sup>. A fase de reperfusão é muito dinâmica e a morte celular pode continuar por até 3 dias após o início da reperfusão<sup>27</sup>. Assim, a compreensão dos mecanismos envolvidos pode levar ao desenvolvimento de novas intervenções terapêuticas que resultem em redução da extensão da lesão induzida por I/R, bem como estender o tempo que um tecido pode ser submetido à isquemia antes que a lesão irreversível aconteça.

A síndrome pós-ressuscitação, caracterizada por lesão cerebral anóxica, lesão de I/R sistêmica e disfunção miocárdica pós-ressuscitação, é causa de grande morbimortalidade em pacientes vítimas de PCR<sup>28</sup>. Em especial, a disfunção miocárdica pós-ressuscitação, que é um fenômeno bem reconhecido, caracterizado por aumentos nas pressões de enchimento ventricular e queda no débito cardíaco no período pós ressuscitação. Sugere-se que na disfunção miocárdica pós-ressuscitação haja um importante componente de atordoamento miocárdico e a recuperação se faz, em modelos animais, em até 48 horas<sup>28,29</sup>. A intensidade da disfunção miocárdica pós-ressuscitação varia conforme o tempo para recuperação da circulação espontânea, quantidade de adrenalina administrada e número de desfibrilações realizadas<sup>28,29</sup>.

Estudos experimentais suportam o conceito de que a instabilidade hemodinâmica pós-ressuscitação está relacionada à disfunção miocárdica aguda, caracterizada por disfunção contrátil, capacidade de trabalho diminuída e disfunção diastólica variável que se reverte várias horas ou dias após a ressuscitação<sup>25</sup>. Histologicamente, no coração, os mastócitos e fibroblastos induzem o desenvolvimento de fibrose. O papel preciso destes primeiros não é claro, mas os fibroblastos se transdiferenciam e proliferam como miofibroblastos, secretam colágeno e outras proteínas da matriz, o que gera fibrose e comprometimento da função cardíaca<sup>23</sup>.

O cérebro é o órgão mais sensível à isquemia e danos irreversíveis são detectados com cerca de 20 minutos de interrupção do suprimento sanguíneo<sup>23</sup>. Tal susceptibilidade advém do fato de que o cérebro é responsável por 20%-25% do consumo total de oxigênio corporal,

constituindo a maior atividade metabólica por unidade de peso em relação aos demais órgãos. Tal necessidade metabólica está associada à demanda exclusiva de glicose como substrato energético, porém há baixos níveis deste substrato ou glicogênio armazenados neste tecido<sup>28</sup>. O cérebro tem níveis significativamente mais baixos de atividades antioxidantes protetoras - superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e heme oxigenase-1 - do que outros órgãos. Além de apresentar níveis mais baixos de citocromo C oxidase, o que resulta em menor produção de ATP e maior liberação de superóxido da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial. O cérebro tem altos níveis de ácidos graxos poli-insaturados que são altamente suscetíveis a danos oxidativos e a I/R pode provocar a liberação de alguns neurotransmissores, como o glutamato e a dopamina que após a alteração das vias de sinalização pós-receptora desses neurotransmissores, resultam em sobrecarga de cálcio neuronal e subsequente citotoxicidade<sup>28,29</sup>.

Como dito anteriormente, a lesão de I/R não é restrita ao tecido específico submetido à isquemia inicial. Ou seja, uma consequência frequentemente induzida pela reperfusão após isquemia tecidual localizada é a lesão de outros órgãos, a chamada lesão de órgão distante ou remoto (LOD), que pode acometer quaisquer tecidos, cuja expressão final é a síndrome de disfunção de múltiplos órgãos. Em relação a este dano, os pulmões são especialmente vulneráveis, uma vez que são os primeiros leitos capilares expostos ao sangue isquemiado, e de fato, como é observado geralmente, um dos primeiros sintomas clínicos que precedem a falência de múltiplos órgãos é a disfunção respiratória<sup>23</sup>.

A xantina oxidase (XO), que gera superóxido e peróxido de hidrogênio, foi implicada como um fator importante da ROI no fígado, pulmão e músculo cardíaco após a I/R intestinal. O mecanismo para efeitos sistêmicos mediados pela XO não é claro, mas pode envolver a geração de grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio EROs pela enzima circulante, associação próxima de XO com a superfície da célula endotelial e consequentes altas concentrações locais de EROs ou liberação induzida por oxidante derivada de XO de fatores quimiotáticos o que pode promover o recrutamento de polimorfonucleares (PMN) para órgãos distantes da lesão inicial. Assim, como no órgão primário sujeito a I/R, os leucócitos inflamatórios desempenham um papel importante na lesão de órgãos remotos. Um evento chave parece ser a ativação ou PMN em um leito vascular pós-isquêmico, seguido pelo recrutamento dos PMNs ativados para tecidos remotos. Isso envolve não apenas a ativação de PMN, mas também a ativação de células endoteliais em tecidos distantes, caracterizada por aumento da expressão de superfície de moléculas de adesão endotelial<sup>30</sup>.

Diversos estudos propuseram estratégias para melhorar a sobrevivência e morbidade dos pacientes que sofreram uma PCR e foram reanimados com sucesso. Entre estas estratégias, pode-se destacar a hipotermia terapêutica. Após a publicação de estudos clínicos randomizados em 2002<sup>31</sup>, essa terapia passou a fazer parte dos cuidados pós-PCR de importantes sociedades médicas sobre ressuscitação cardiopulmonar<sup>31-34</sup>, compondo um conjunto de medidas que possui como foco a melhora do desfecho neurológico e redução da mortalidade. O efeito protetor dessa medida ainda não está claro, mas a redução no consumo cerebral de oxigênio, do consumo de oxigênio em áreas de baixo fluxo, a supressão de radicais livres, proteção da fluidez de membranas lipoprotéicas, redução da acidose intracelular e inibição da biossíntese, liberação e recaptação de neurotransmissores excitatórios, estão entre os mecanismos propostos<sup>31</sup>. Evidências de qualidade moderada apontam para uma melhora do prognóstico neurológico em pacientes que foram submetidos à hipotermia terapêutica, principalmente em relação ao grupo de pacientes no qual não foi estabelecido nenhum critério de controle de temperatura<sup>34</sup>.

Pesquisas com utilização de drogas que promovem redução de radicais livres, pré-condicionamento à hipóxia e ação anti-inflamatória foram desenvolvidas em diversas linhas direcionadas à redução do dano pós-PCR, como o uso de estatinas, opioides, anestésicos inalatórios, além de outros fármacos<sup>5,8-10</sup>. Atualmente, há uma crescente busca para a escolha do tratamento ideal durante a fase pós-ressuscitação. Alguns elementos-chave para o tratamento já foram descritos, por exemplo: manter a saturação periférica de oxigênio do paciente acima de 94%, a PaCO<sub>2</sub> em 35 mmHg-45 mmHg, e também manter a pressão arterial com o auxílio de vasopressores, fluidos intravenosos, ou até mesmo aparelhos que dão suporte circulatório mecânico; monitorização contínua com eletroencefalograma (EEG) para controlar possíveis convulsões; evitar a hipoglicemia e, recentemente, alguns estudos têm sugerido o uso de esteroides<sup>2</sup>.



### 3.3 O SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA NA I/R

O SRA desempenha um papel importante na regulação da pressão arterial. Há um reconhecimento crescente da existência de um SRA endógeno ou parácrino no coração. Todos os componentes do SRA-RNA mensageiro de angiotensinogênio e renina, enzima de conversão de angiotensina I em angiotensina II (Ang II) - anteriormente foram detectados no coração e parecem estar funcionalmente integrados<sup>11-14</sup>. A Ang II cardíaca pode estar envolvida na regulação do fluxo sanguíneo coronariano, na modulação da neurotransmissão simpática e na contratilidade cardíaca, na estimulação da hiperplasia e hipertrofia e na manutenção da estrutura e reparo cardiovascular. A angiotensina II interage com dois subtipos farmacologicamente distintos de receptores da superfície celular, os receptores Ang II tipo 1 e tipo 2. O papel dos receptores do tipo 2 ainda é desconhecido; no entanto, os receptores do tipo 1 mediam os principais efeitos cardiovasculares da Ang II<sup>33</sup>.

Um papel significativo do SRA na patogênese da lesão de isquemia-reperfusão do miocárdio foi postulado por causa do efeito cardioprotetor observado com inibidores da enzima de conversão da angiotensina. Em vários estudos experimentais, a administração de Ang II causou necrose de miócitos cardíacos ou induziu infarto do miocárdio<sup>33,35-40</sup>.

O SRA é uma cascata de peptídeos bem conhecida pelo seu papel na regulação da pressão arterial e na homeostase de sódio e fluidos<sup>33,38,39</sup>. A Ang-II é o principal efetor deste sistema, causando uma ação integrada com o coração, vasos sanguíneos e rins. É gerada a partir da secreção de renina pelo aparelho justaglomerular, a qual irá clivar o angiotensinogênio liberado pelo fígado, formando a angiotensina I (Ang-I). Esta, por sua vez, é hidrolisada pela enzima conversora de angiotensina (ECA), formando a Ang-II<sup>38</sup>.

Além de seus importantes efeitos na homeostase do sistema cardiovascular, a Ang-II também possui alguns efeitos deletérios. Ela é mediadora do estresse oxidativo, sendo capaz de induzir a disfunção endotelial e ativar vias pró-inflamatórias no músculo liso<sup>33,38,39</sup>. Espécies reativas de oxigênio formadas durante a isquemia, dentre as quais pode-se citar os superóxidos, o peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila, também são responsáveis por parte da lesão por I/R. Tais compostos são altamente reativos com outras moléculas da célula, como as proteínas, o DNA e lipídios, acarretando dano cromossômico e peroxidação lipídica, que levam a uma disfunção da membrana plasmática, além de provocar disfunção e inativação enzimática<sup>30</sup>. Promovem ainda ativação da cinase c-jun-n-terminal (JNK) e caspases em decorrência do estresse oxidativo, acarretando apoptose e aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial, com consequente depleção de ATP<sup>34</sup>. EROs vasculares são produzidas pelo endotélio, adventícia e células da musculatura lisa vascular, sendo geradas

principalmente pela NADPH oxidase<sup>33</sup>. A Ang-II é um potente estimulador da NADPH oxidase vascular, induzindo sua ativação e aumento na expressão de suas subunidades<sup>33</sup>.

Estudos recentes demonstram que o uso de inibidores do SRA pode ser benéfico em situações na qual a I/R está presente<sup>33,35-40</sup>. Em pesquisas envolvendo o rim, o bloqueio de receptores AT1 esteve relacionado à recuperação mais rápida da lesão renal<sup>12</sup>. Já quando foi avaliada a I/R miocárdica, principalmente após o infarto, bloqueadores do SRA parecem estar envolvidos em uma recuperação mais rápida da função cardíaca, além de melhorarem a função sistólica no pós-evento<sup>39</sup>.

A disfunção miocárdica após um período isquêmico com reperfusão leva a um aumento da expressão de receptores AT1, sendo que antagonistas ou bloqueadores do mRNA para estes receptores são capazes de atenuar a lesão miocárdica. Estes estudos mostram que a expressão de AT1 está envolvida no desfecho de eventos miocárdicos isquêmicos<sup>38</sup>.

Quanto ao tecido neuronal, há uma correlação entre os níveis de Ang-II e a gravidade da lesão isquêmica cerebral<sup>35-37</sup>. A redução dos níveis de Ang-II pode melhorar o desfecho neurológico e reduzir a lesão cerebral em modelos animais de isquemia focal, sugerindo que esta tenha um papel importante como mediadora da lesão isquêmica naquele órgão. Como a maior parte das ações fisiológicas da Ang-II têm sido atribuídas à sua atuação sobre os receptores AT1<sup>35</sup>, a inibição destes foi relacionada à redução da área de infarto e do edema cerebral, bem como à melhora da função motora em ratos<sup>36</sup>. Embora o mecanismo desse efeito neuroprotetor ainda não esteja completamente elucidado, foi demonstrado que o tratamento sistêmico prolongado com antagonistas dos receptores AT1 antes da isquemia cerebral exerce efeito benéfico na morfologia de vasos sanguíneos em ratos hipertensos, normaliza a autorregulação cerebrovascular, inibe a penetração de células inflamatórias no parênquima cerebral e promove a angiogênese<sup>35-37,40</sup>.

O candesartan cilexetil é um pró-fármaco adequado para o uso oral, sendo rapidamente convertido ao fármaco ativo candesartan, por hidrólise de éster durante a absorção no trato gastrointestinal. Esta droga apresenta um mecanismo de ação semelhante ao de outras drogas dessa classe, incluindo a losartana e a irbesartana, e tem mais de 1.000 vezes mais afinidade pelo receptor AT1 do que pelos outros receptores de angiotensina. Conforme demonstrado em modelos animais, esta droga se liga e se dissocia lentamente de seus sítios de ligação e age como um antagonismo intenso na presença de angiotensina II. Essas características diferem daquelas do losartana em que a afinidade de ligação e o antagonismo competitivo do receptor da angiotensina II não são tão fortes quanto o candesartan cilexetil. Os efeitos da candesartan são duradouros e é improvável que sejam reduzidos na presença de angiotensina II endógena<sup>41</sup>.

### 3.4 MODELOS EXPERIMENTAIS DE ISQUEMIA/REPERFUSÃO GLOBAL

Os modelos animais são amplamente utilizados para estudos experimentais, que visam propor novas hipóteses clínicas ou intervenções, que seriam antiéticas ou lesivas ao ser humano. Portanto, são essenciais para a evolução da pesquisa biomédica. Estes estudos permitem a fidedignidade da descrição metodológica e reprodutibilidade em estudos clínicos em humanos, além da possibilidade de alta validade interna, quando são respeitados os determinantes como randomização e cegamento da amostra.

A baixa taxa de sucesso de RCE e o potencial de morbidade deste evento, apesar das manobras de RCP amplamente estratificadas, leva à necessidade do desenvolvimento de modelos experimentais para melhor compreensão da fisiopatologia e o desenvolvimento de intervenções que venham a contribuir para uma melhora da taxa de sobrevivência e redução dos danos promovidos pela PCR e da lesão de isquemia e reperfusão. Porém, o conhecimento sobre PCR é advindo de modelos animais heterogêneos e de metodologias fracamente descritas, em sua maioria<sup>42</sup>.

O uso de animais pequenos, como os ratos, é mais econômico em relação aos animais maiores, o que leva à utilização destes por muitos pesquisadores<sup>42-44</sup>. Alguns estudos mostram que as mudanças hemodinâmicas, assim como as mudanças eletrolíticas e ácido-básicas dos ratos, durante a PCR e RCP, são semelhantes aos dos animais maiores, comparáveis às alterações observadas nos seres humanos<sup>42</sup>.

Há diversos modelos de indução de PCR descritos na literatura, porém a maioria destes não mimetizam adequadamente a PCR em humanos<sup>44</sup>. Modelos como promovido por asfixia podem simular uma frequente causa de PCR, hipóxia, que correspondendo a 45% as paradas por causa anestésica<sup>45</sup>. Porém a dificuldade de prever o momento da PCR e a baixa reprodutibilidade, torna esse método pouco favorável à utilização em estudos. O modelo por injeção de KCl tem desvantagens, pois cursa com mudanças importantes dos eletrólitos promovendo dificuldade para realização de estudos relacionados a estratégias para redução da lesão cerebral e do miocárdio. O modelo que induz a FV, por uma corrente elétrica alternada aplicado ao endocárdio do ventrículo direito, é amplamente utilizado na literatura<sup>42-47</sup>. Infelizmente, esse procedimento é um tanto complicado porque é um método invasivo e possivelmente produz algumas complicações pertinentes durante a operação. Além disso, pode produzir lesão térmica do endocárdio no local do eletrodo.

Em 1988, Von Planta *et al.*<sup>46</sup> desenvolveram um modelo que promovia FV por aplicação de corrente elétrica alternada de 10 mA, aplicada no endocárdio do ventrículo direito, continuada por 3 minutos. A taxa de recuperação da circulação espontânea foi de 57%. Este modelo causava lesão térmica importante, o que pode ter contribuído para baixa taxa de RCE, além de dificultar a análise morfológica do órgão lesado, o que impossibilita a realização de estudos que visem observar tal aspecto diante determinada intervenção.

Dave *et al.*<sup>47</sup> desenvolveram um modelo baseado no protótipo de von Planta *et al.*<sup>46</sup>, com modificações que objetivavam reduzir a lesão térmica. Para tal, introduziu um eletrodo por meio da veia jugular interna até o endocárdio do átrio direito, confirmado por fluoroscopia, reduziu a corrente para 3 mA a 5 mA e manteve o estímulo por 30 segundos, em que não foi observada lesão térmica no endocárdio e houve uma taxa de RCE de 75%.

O grupo do laboratório em que foi realizado este trabalho, publicou um modelo semelhante ao descrito acima. Porém, a identificação do local de inserção do eletrodo no endocárdio era baseada na curva de pressão do ventrículo direito observada no monitor de pressão contínua. Para a realização das compressões torácicas foi desenvolvido um dispositivo descrito na mesma publicação<sup>48</sup>.

## **4 MÉTODOS**

Foi realizado um estudo experimental, com ratos, ambientados no Laboratório de Investigação Médica de Anestesiologia (LIM-08), na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, aprovado pela Comissão de Ética no Uso de animais da Universidade de São Paulo (CEUA-USP), protocolo número: 034/16 (Anexo A).

#### 4.1 ANIMAIS E GRUPOS

Foram utilizados ratos machos da raça Wistar, isogênicos, com peso entre 380 gramas e 470 gramas, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Estes animais foram acondicionados em gaiolas de plástico (dois animais por gaiola), mantidos em ambiente climatizado a 22 °C, com ciclos alternados de 12 horas (claro e escuro), água e ração *ad libitum*.

Foram compostos quatro grupos para execução do estudo. Após serem anestesiados e submetidos a instrumentação cirúrgica, os ratos eram alocados em utilizando software de randomização (randomizer.org), foi gerada uma ordem de números e grupos. Após terem sido anestesiados e submetidos a instrumentação cirúrgica, foi sorteado o envelope numerado, contendo o grupo do animal.

**Grupo Sham (SH):** animais anestesiados e submetidos a procedimentos de instrumentação cirúrgica para monitorização hemodinâmica, porém sem indução da fibrilação ventricular (FV).

**Grupo Controle (GC):** os animais submetidos a PCR com 6 minutos de anóxia, seguido por RCP. No início da RCP, foi administrado 20 mcg/kg de adrenalina e 0,5 mL de solução salina 0,9%.

**Grupo veículo (GV):** animais submetidos a PCR com 6 minutos de anóxia, seguido por RCP. No início da RCP, em conjunto com a adrenalina (20 mcg/kg), foi administrado 0,2mL/kg de dimetilsulfóxido (DMSO) a 99%.

**Grupo AT1 (GAT1):** os animais submetidos a PCR com 6 minutos de anóxia, seguido por RCP. No início da RCP, em conjunto com a adrenalina (20 mcg/kg), foi administrada uma dose intravenosa do metabólito do candesartan cilexetil, o ativo candesartan (CAS 139481-59-7), diluído em DMSO (99%) a 0,1%, na dose de 0,2 mg/kg.

#### 4.2 PROCEDIMENTOS DE INSTRUMENTAÇÃO PARA MONITORIZAÇÃO

A anestesia geral com isoflurano (1 CAM) era realizada previamente a todos os procedimentos de instrumentação cirúrgica. Para tanto, os animais eram acondicionados em caixas para indução inalatória até a perda da consciência. Uma vez inconscientes, era realizado a monitorização eletrocardiográfica, utilizando elétrodos. A seguir, a intubação orotraqueal era realizada utilizando um cateter venoso flexível número 16 G (B. Braun, Alemanha). Após a intubação orotraqueal, os animais foram conectados à ventilação mecânica com volume corrente de 8 mL/kg e frequência de 60 incursões por minuto (ipm). Em sequência, era realizada tricotomia da região dorsal, cervical e torácica anterior. O termômetro retal era utilizado para ajuste da temperatura corporal em torno de  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , com auxílio de uma fonte térmica e controle da temperatura ambiente.

Após antissepsia, foi realizada uma incisão em região cervical e localizada a veia jugular externa direita. Após o isolamento, a mesma foi ligada e parcialmente seccionada para a inserção de um cateter venoso. Este cateter foi preenchido com solução salina a 0,9% e heparina (50 U/mL) e utilizado para a infusão de drogas e fluidos, além de permitir a inserção de um condutor para a indução da PCR (Figura 1).

**Figura 1 - Animal preparado para indução da parada cardiorrespiratória, após instrumentação cirúrgica**

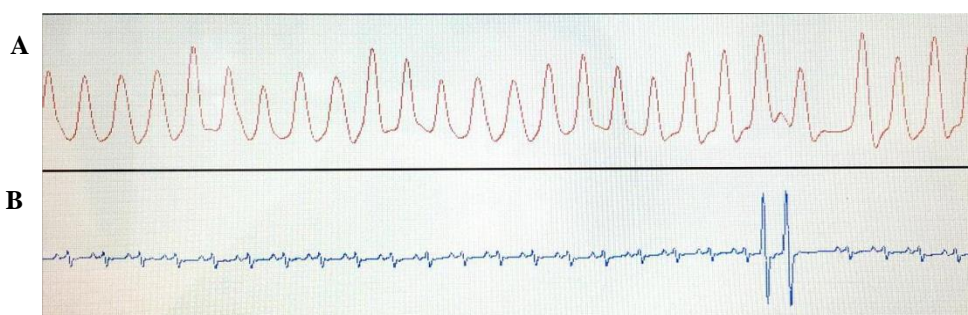


Após, a região inguinal foi incisada, sendo localizada a artéria femoral comum direita. Uma vez dissecada, a mesma foi ligada e um outro cateter PE10 foi inserido. Este cateter serviu para a coleta de exames e aferição contínua da pressão arterial de modo invasivo. Esta cânula foi conectada a um transdutor de pressão ligado a um sistema de aquisição de dados (MP-100, BIOPAC, EUA). A análise eletrocardiográfica foi feita utilizando um módulo específico para eletrocardiograma acoplado ao mesmo sistema de aquisição de dados.

#### 4.3 INDUÇÃO DA PCR

Para a indução da PCR, foi inserido o cateter mono lúmen 3 Fr, pela jugular até o ventrículo direito, guiado pela curva pressórica (Figura 2).

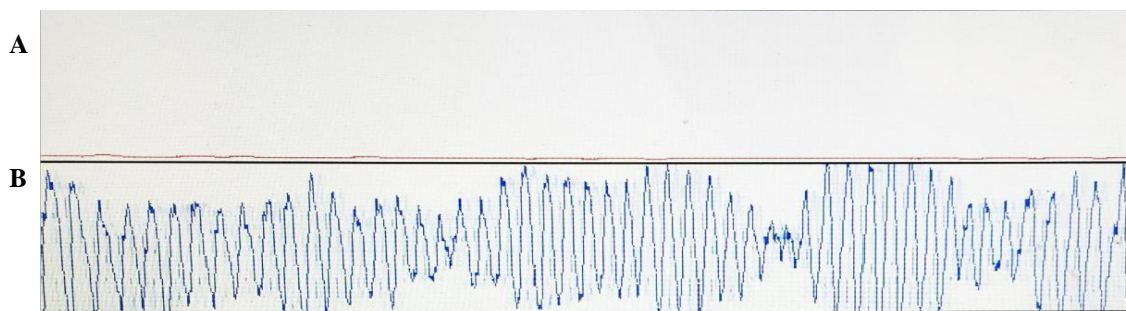
**Figura 2 - A) curva pressórica do ventrículo direito; B) eletrocardiografia durante a alocação do cateter**



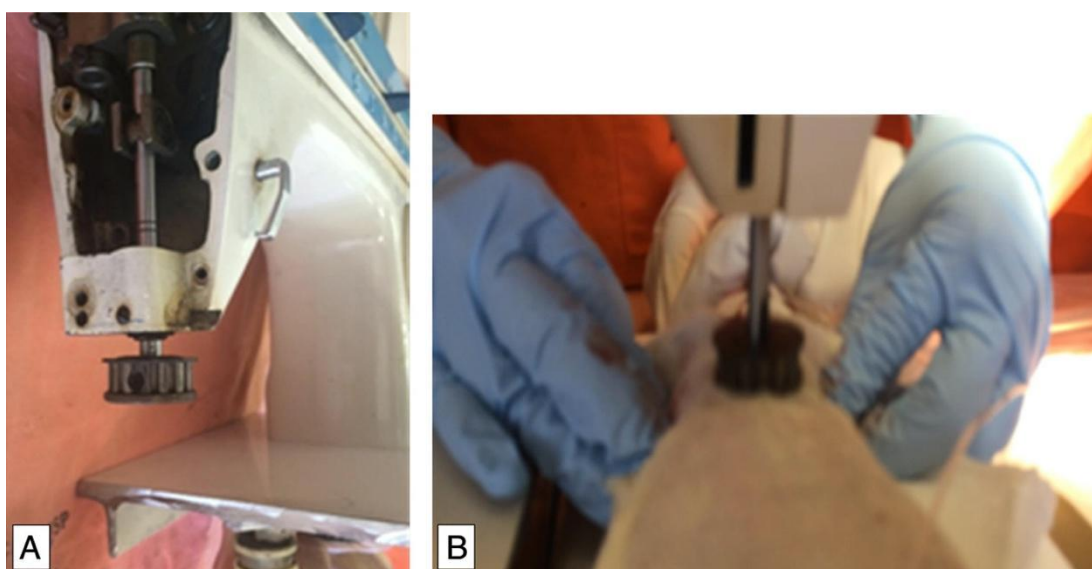
Por conseguinte, a alocação do cateter no ventrículo direito, um condutor elétrico era inserido até o endocárdio, e então aplicada uma descarga elétrica de 1mA (60 Hz). Este estímulo elétrico era mantido por um período de 3 minutos, cessando também a ventilação mecânica, mantendo o animal e apneia. A apresentação da fibrilação ventricular (FV) no eletrocardiograma e a ausência de pulsações arteriais no gráfico da pressão arterial invasiva, asseguravam a indução da PCR (Figura 3). Após 3 minutos, a descarga elétrica era interrompida, o condutor elétrico retirado e o cateter venoso retraído 1 cm e fixado. Os animais eram mantidos por mais 3 minutos em PCR. Ao completar 6 minutos do início da indução da FV, iniciavam-se as manobras de reanimação cardiopulmonar. As compressões torácicas externas eram realizadas por um compressor automático a uma frequência de 200 compressões por minuto e profundidade de 1,5 cm (Figura 4)<sup>48</sup>. Conjuntamente com o início das compressões, a ventilação foi restabelecida com frequência inicial de 25 ipm e administrada uma dose de adrenalina (20 mcg/kg), e 1 mEq/Kg de bicarbonato de sódio.



**Figura 3 - A) curva de pressão arterial; B) eletrocardiograma durante a indução da fibrilação ventricular**



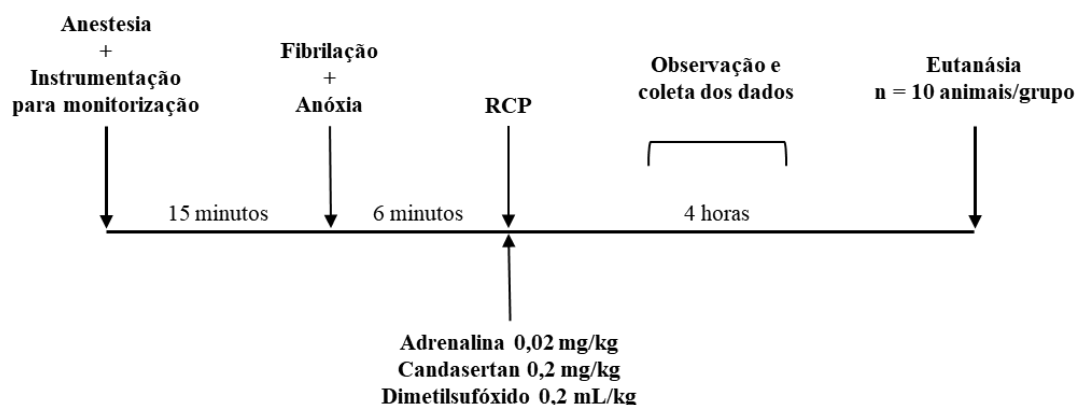
**Figura 4 - A) equipamento para compressão torácica; B) posicionamento do animal sob o equipamento**



O ritmo cardíaco foi checado a cada 3 minutos. Se a FV estivesse presente, era realizada uma desfibrilação com 7 J e, se houvesse a manutenção da FV após a primeira desfibrilação, nova carga era aplicada imediatamente. Após a desfibrilação, a RCP era retomada por mais 3 minutos, em conjunto com nova dose de adrenalina. Após esse período, nova checagem de ritmo era realizada e, caso houvesse pulsações arteriais, era considerado RCE. A manutenção da pressão arterial média acima de 25 mmHg por 10 minutos foi considerada como RCE sustentada e contabilizado para a mortalidade do estudo. Caso não houvesse pulsações na segunda checagem, se ainda em FV, nova desfibrilação com 7 J era aplicada, as compressões torácicas eram retomadas, somada a nova dose de adrenalina. A partir de então, novas desfibrilações e checagens de ritmo eram realizadas a cada 2 minutos. A adrenalina era administrada a cada três minutos. Caso chegasse a 20 minutos de RCP, os esforços eram cessados.

Caso houvesse RCE sustentada e estabilidade hemodinâmica, os animais eram observados por 4 horas. Neste período eram anotados os dados vitais a cada 10 minutos (Figura 5).

**Figura 5 - Fluxograma do experimento**



RCP: ressuscitação cardiopulmonar.

Nos casos que os animais permaneceram estáveis durante as 4 horas após RCP, foram coletadas amostras de sangue (5 mL, acondicionado em um tubo roxo) para dosagem de troponina ao término do período. Estes animais foram sacrificados por sobredose de anestésico inalatório (isoflurano 6%). Após a eutanásia foram coletados coração, cérebro, rins e pulmão para processamento, sendo armazenados parte em formol e parte congelados a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . As amostras de sangue foram mantidas congeladas em freezer  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , separadas em plasma e soro.

#### 4.4 AVALIAÇÃO DOS DESFECHOS

##### 4.4.1 Avaliação hemodinâmica

A pressão arterial foi registrada de forma contínua desde o início da instrumentação cirúrgica, após a indução anestésica, até o sacrifício do animal, assim como a frequência cardíaca e ritmo cardíaco, sendo anotados em ficha de controle os parâmetros a cada 10 minutos, desde o RCE até o final do experimento. A pressão arterial diastólica foi observada durante a RCP, visando analisar a qualidade das manobras de ressuscitação cardiopulmonar.

Quanto à análise de arritmias cardíacas, foram anotados os ritmos cardíacos registrados na cardioscopia a cada 10 minutos, e classificados como arritmias de acordo com os critérios eletrocardiográficos em taquiarritmia, bradiarritmia, arritmia ventricular ou arritmia atrial, definidos de acordo com os critérios da diretriz da convenção de Lambeth<sup>11</sup>.

#### 4.4.2 Avaliação gasométrica

Foram coletadas amostras sanguíneas (1 mL em seringa heparinizada), nos tempos: antes da indução da PCR; após o retorno da circulação espontânea; após 4 horas de observação. Foram analisados os valores do pH, pO<sub>2</sub>, pCO<sub>2</sub>, lactato sérico, eletrólitos séricos (sódio, potássio, cloro e cálcio), hemoglobina e hematócrito. As amostras sanguíneas foram alocadas em tubos específicos para coleta. O exame de cada amostra foi realizado em um analisador de pH e gases sanguíneos (ABL800 Flex, Radiometer). Este aparelho também aferiu os valores do lactato e dos eletrólitos citados acima.

##### 4.4.3.1 Histologia

Após o sacrifício dos animais, o cérebro e o coração foram retirados e imediatamente fixados em paraformaldeído 4% em tampão fosfato pH 7,0 por 24 horas. Após esta etapa foram desidratados em gradiente alcoólico (70° a 100°), diafanizados em xilol e emblocados em parafina. Dos blocos contendo os fragmentos foram obtidos cortes de 5µm em micrótomo para a realização de estudos morfológicos e morfométricos. Uma vez desparafinados em xilol, as amostras foram hidratadas em gradiente alcoólico (100° a 70°) e água, corados durante 2 minutos pela Hematoxilina de Harris. Os cortes foram, então, lavados em água corrente e contracorados com eosina durante 15 minutos; a seguir, foram lavados em água corrente, desidratados em gradiente alcoólico (95° e 100°), diafanizados em xilol e montados com lamínula e entelamina para análise microscópica.

Foi, então, avaliada a morfometria tecidual por meio do percentual de células inflamatórias (número de células inflamatórias/área do parênquima). O estudo foi realizado com auxílio do programa de análises de imagens digitais Image Pro-Plus (Media Cybernetics, EUA) acoplado a um microscópio de luz Nikon Opitphot. Em cada corte histológico foram obtidas imagens digitais de 10 campos aleatórios percorrendo toda a extensão do tecido representada, pelo programa Image Pro-Plus com auxílio do microscópio de luz com aumento de 400 vezes (objetiva 40 x e ocular 10 x). Para a análise, foi utilizada a ferramenta do programa de marcação e cálculo da área ocupada pelo parênquima.

O patologista responsável pela análise era cego quanto ao grupo do animal contido na lâmina. A avaliação histopatológica tanto cerebral, quanto miocárdica, foi pontuada com base na porcentagem de lesão por quantificação manual, de cada fotomicrografia: 1= (< 30%); pontuação 2 = (31%-60%); pontuação 3 = (> 60%)<sup>49</sup>.

#### 4.4.3.2 Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated (dUTP) *Nick End Labeling* (TUNEL)

Para a análise de lesão celular e apoptose foi utilizado o Kit para marcação do *Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated (dUTP) Nick End Labeling*, também denominado de marcação de Tunel.

Cortes do tecido de 4 µm a 5 µm de espessura foram colocados em lâminas silanizadas (Sigma Chemical Co.; St. Louis, Missouri, EUA) em suporte adequado. O processo de desparanifinização foi feito ao colocar as lâminas em xilol quente, em estufa a 60° C-65 °C, durante 10 minutos e passadas rapidamente em três banhos de xilol frio. Para hidratação dos cortes as lâminas foram colocadas em dois banhos de álcool absoluto, um banho de álcool 95° e um banho de álcool 70°. Em seguida, foram lavadas em água corrente, água destilada e em tampão fosfato salino pH 7,4 (*Phosphate buffered saline* - PBS).

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

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

#### 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O cálculo amostral foi obtido a partir do valor da troponina após a parada cardíaca em estudos prévios<sup>42,47,50</sup>. Nove animais por grupo foram necessários para uma diferença de 15% entre os grupos, com um erro tipo 1 ( $\alpha$ ) de 0,05 e um poder de 0,80 para um teste bicaudal. Entretanto, prevendo perdas, estimou-se 10 animais por grupo. Como o modelo atual de PCR apresenta uma mortalidade de 50% dos animais, foi sugerida a disponibilidade de 64 animais para a realização do estudo. Porém, houve falhas no preparo de nove animais e a mortalidade foi maior do que a estimada após a indução da PCR, sendo então necessário o número de 93 animais para alcançar a composição proposta de dez animais por grupo (GC, GV e GAT1) e quatro animais do grupo sham.

Inicialmente, foram obtidas as medidas descritivas para cada uma das variáveis de interesse da base de dados - valores de mínimo e máximo, média e desvio padrão. Vale salientar que tais medidas descritivas foram obtidas discriminando os dados de acordo com os tempos de estudo (pós e final) e de acordo com os grupos.

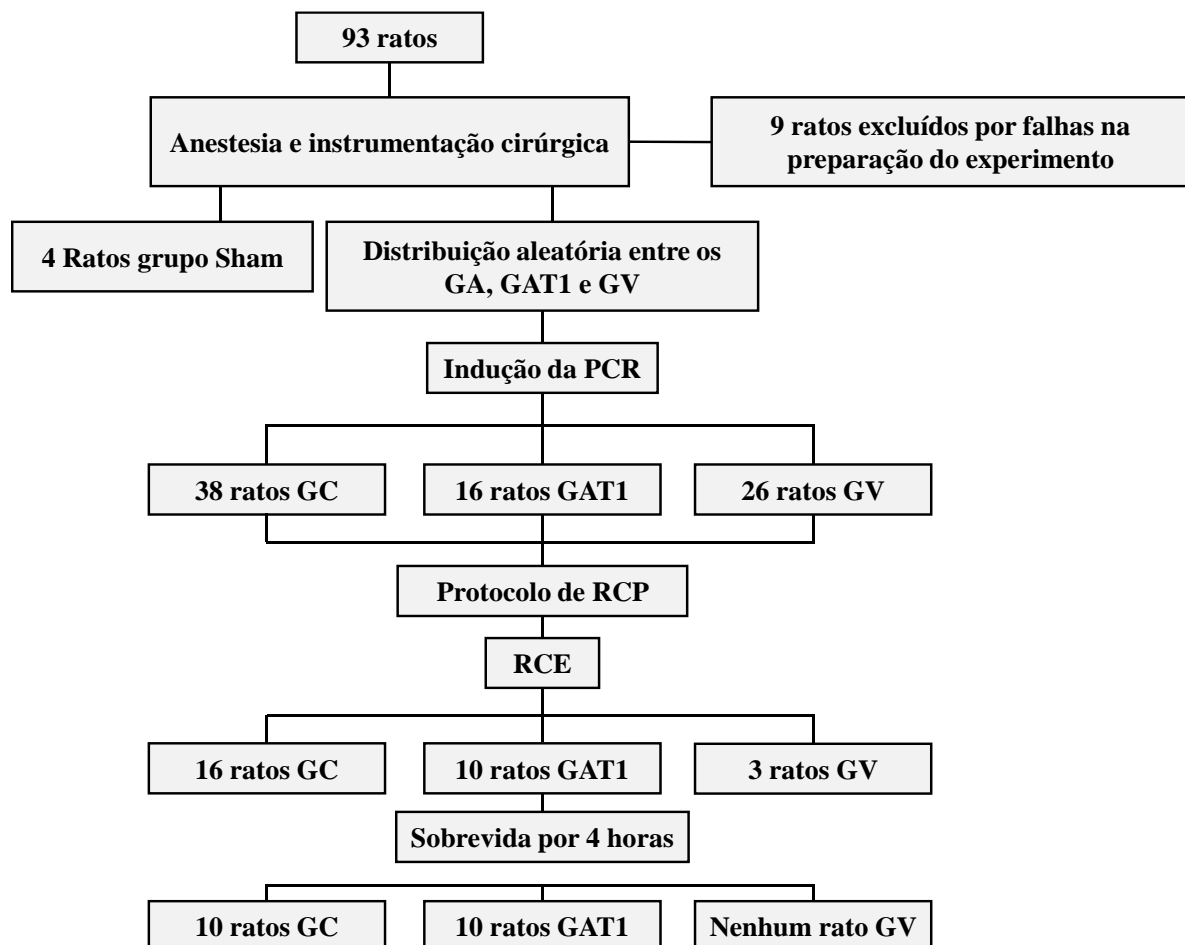
Todas as variáveis contínuas são apresentadas como média  $\pm$  DP após confirmação da normalidade da distribuição pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Os dados foram analisados por análise de variância de 1 via (ANOVA de uma via) ou ANOVA de duas vias, quando apropriado, seguida de testes post-hoc de Tukey para comparações entre vários grupos. Os dados que falharam no teste de normalidade de distribuição foram analisados pelo Kruskal-Wallis. A significância estatística foi assumida em  $p < 0,05$ . As análises estatísticas foram realizadas no SPSS versão 23.0 para Windows (SPSS, Chicago, IL, EUA).

## **5 RESULTADOS**

O estudo foi realizado com um total de 93 ratos para composição de quatro grupos, contendo cada: 10 ratos nos grupos intervenção, controle e veículo; e quatro ratos no grupo sham. Desse total, nove animais foram desclassificados, cinco por falhas técnicas na preparação do experimento e quatro por falha na indução da PCR. Sendo assim, 84 ratos foram inicialmente anestesiados, submetidos a instrumentação cirúrgica e então randomizados.

Durante a realização do estudo, foi observada uma elevada mortalidade dos animais alocados no grupo veículo. Entre os 26 animais utilizados para a composição deste grupo, apenas três tiveram critérios de RCE e nenhum destes completou o período de observação de 4 horas, estipulado para coleta do material para análise laboratorial, correspondendo a uma taxa de mortalidade após PCR de 88,4%, e de 100% durante o período de observação. Logo, esse grupo foi excluído da análise comparativa entre os demais grupos. A Figura 6 demonstra o fluxo de distribuição conforme sobrevida após ressuscitação cardiopulmonar.

**Figura 6 - Distribuição dos ratos nos grupos de estudo e distribuição conforme sobrevida após ressuscitação cardiopulmonar**



GC: grupo controle; GAT1: grupo candasertan; GV: grupo veículo; RCP: ressuscitação cardiopulmonar; RCE: Retorno da circulação espontânea.

## 5.1 PARÂMETROS FISIOLÓGICOS BASAIS

O peso médio dos animais, com seu respectivo desvio padrão, foi de 379,5 g  $\pm$  47,4 g no GC, 409,7  $\pm$  28,7g no GAT1, e 465,4  $\pm$  38,5 no GS. Não houve diferenças significativas nos parâmetros fisiológicos e hemodinâmicos entre os três grupos, conforme descrito na Tabela 1.

**Tabela 1 - Características basais de todos os animais**

Variáveis	GS (n = 4)	GC (n = 38)	GAT1 (n = 16)	p
Peso (g)	465,4 $\pm$ 38,5	379,5 $\pm$ 47,4	409,7 $\pm$ 28,7	0,084
Temperatura (°C)	35,7 $\pm$ 0,17	35,5 $\pm$ 0,8	35,5 $\pm$ 0,94	0,985
Frequência cardíaca (bpm)	199,5 $\pm$ 51,3	193,6 $\pm$ 15,6	201,7 $\pm$ 43,8	0,942
PAM (mmHg)	76,2 $\pm$ 12	93,6 $\pm$ 14,8	96,2 $\pm$ 12,9	0,290
Tentativas de IOT	1,25 $\pm$ 0,5	2,7 $\pm$ 1,4	2,1 $\pm$ 1,19	0,087

Os dados são apresentados como média  $\pm$  DP. Todas as variáveis ANOVA de uma via,  $p > 0,05$ . GAT1: grupo candasertan; GC: grupo controle; GS: grupo sham; PAM: pressão arterial média; IOT: intubação orotraqueal.

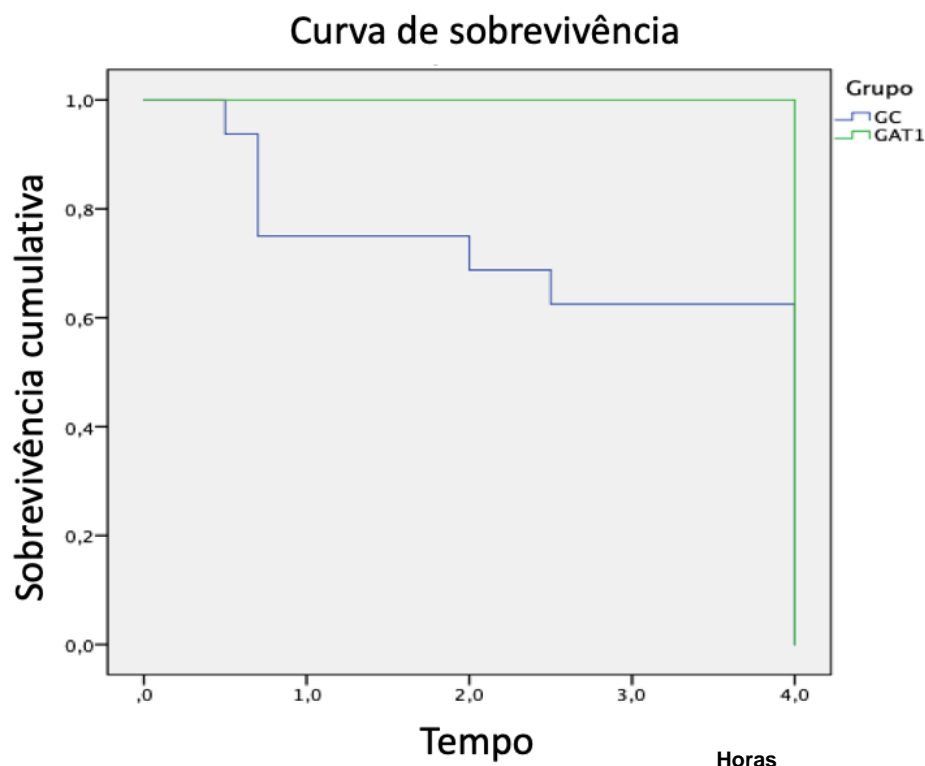
### 5.1.1 Reanimação cardiopulmonar e sobrevida

A fibrilação ventricular foi induzida com sucesso em 80 animais. O grupo candasertan apresentou taxa de RCE de 62,5% (10/16), superior ao grupo controle que teve uma taxa de 42,1% (16/38), demonstrando diferença estatisticamente significativa ( $X^2$ : 42,9; V de Cramer: 1,0,  $p = 0,00$ ). Cinco animais do grupo controle apresentaram ritmo não chocável após início das manobras de RCP, não sendo então submetidos a cardiodesfibrilação, enquanto três animais do GAT1 apresentaram ritmo não chocável ( $p = 0,94$ ).

Todos os animais do grupo candasertan que tiveram critérios de RCE, sobreviveram até o final do estudo, enquanto 10 (62,5%) entre os 16 animais do grupo controle sobreviveram até o final do período estabelecido (Gráfico 1), ( $X^2$ : 4,87, V de Cramer: 0,487,  $p = 0,027$ ).



**Gráfico 1 - Curva de Kaplan-Meier de sobrevivência cumulativa. Demonstra diferença estatisticamente significante entre os GAT1 e GC ( $p < 0,05$ )**



Não houve diferença estatisticamente significante entre as médias e medianas do tempo de PCR, número de doses de adrenalina ou número de desfibrilações (Tabela 2).

**Tabela 2 - Quantificações das intervenções durante RCP**

	GAT1 média/mediana/DP	GC média/mediana/DP	p
Tempo de PCR	405"/180"/362,9"	324"/180"/278,8"	0,658
Doses de adrenalina	2/1,5/1,36	1,5/1/0,7	0,233
Número de desfibrilações	1,25/1,0/1,6	0,9/1,0/0,87	0,498

GAT1: Grupo candesartan; GC: grupo controle; p: significância estatística – teste de Mann-Whitney. Unidade de medida de média e mediana em segundos.

## 5.2 PARÂMETROS HEMODINÂMICOS

Foram analisados os dados da pressão arterial e frequência cardíaca de cada animal entre os grupos nos momentos principais (Tabela 3).

**Tabela 3 - Medianas e interquartis das variáveis hemodinâmicas dos animais que completaram o estudo**

Parâmetro	Grupo	Tempo							
		Basal	Pós-RCE	T10	T30	T60	T120	T180	T240
PAM (mmHg)	GC	96 (63-110)	54 (13-160)	97 (68-116)	78 (57-110)	68 (47-93)	87 (50-108)	78 (40-120)	91 (40-100)
	GAT1	93 (76-115)	73 (30-140)	59 (35-125)	65 (45-88)	51 (36-75)	72 (45-94)	69 (52-99)	71 (40-96)
	GS	71 (68-94)	-	70 (65-124)	72 (67-96)	82 (68-123)	79 (66-102)	80 (68-103)	75 (66-90)
	p	0,083	-	0,021	0,169	0,003	0,124	0,300	0,269
FC (bpm)	GC	188 (179-228)	262 (170-300)	200 (165-294)	188 (167-247)	187 (101-280)	200 (165-260)	183 (167-229)	179 (168-230)
	GAT1	183 (167-290)	200 (188-285)	183 (164-292)	173 (170-245)	178 (169-216)	183 (173-284)	189 (169-280)	191 (168-268)
	GS	179 (164-275)	-	236 (170-275)	230 (167-275)	241 (171-310)	214 (114-295)	190 (165-298)	217 (170-292)
	p	0,665	-	0,832	0,037	0,043	0,072	0,667	0,283

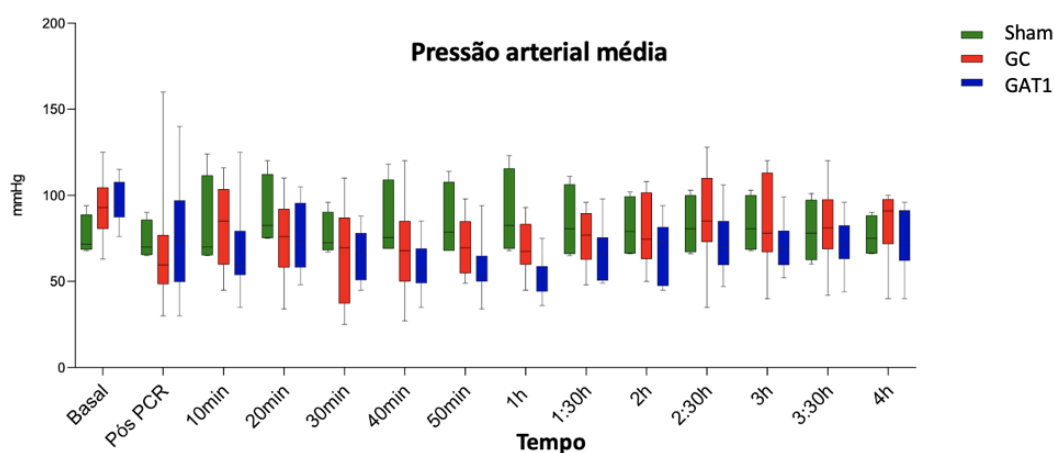
Mediana e interquartis (25-75), da pressão arterial média e frequência cardíaca de cada grupo de animais que sobreviveram até o final do estudo; bpm (batimentos por minuto).

PAM: Pressão arterial média; FC; frequência cardíaca; GC: grupo controle, GAT1: grupo medicado com antagonista da angiotensina, RCE: retorno da circulação espontânea. p: significância estatística - teste de Kruskal-Wallis.

### 5.2.1 Pressões arteriais ao longo do estudo

Ao analisar as variáveis hemodinâmicas dos animais que sobreviveram durante as quatro horas, comparando-se momentos iguais entre os grupos, notou-se diferenças estatisticamente significativas que se iniciaram no tempo 40 minutos, evidenciando uma níveis tensionais mais baixos do GAT1. Este grupo apresentou menor mediana da pressão arterial média ao longo do tempo em relação ao GC e GS, sendo que esta diferença estatisticamente significativa ( $U: 3795$ ;  $p = 0,041$ ) (Gráfico 2).

**Gráfico 2 - Medianas das pressões arteriais médias em animais que sobreviveram durante todo o período de observação ( $p = 0,014$ )**

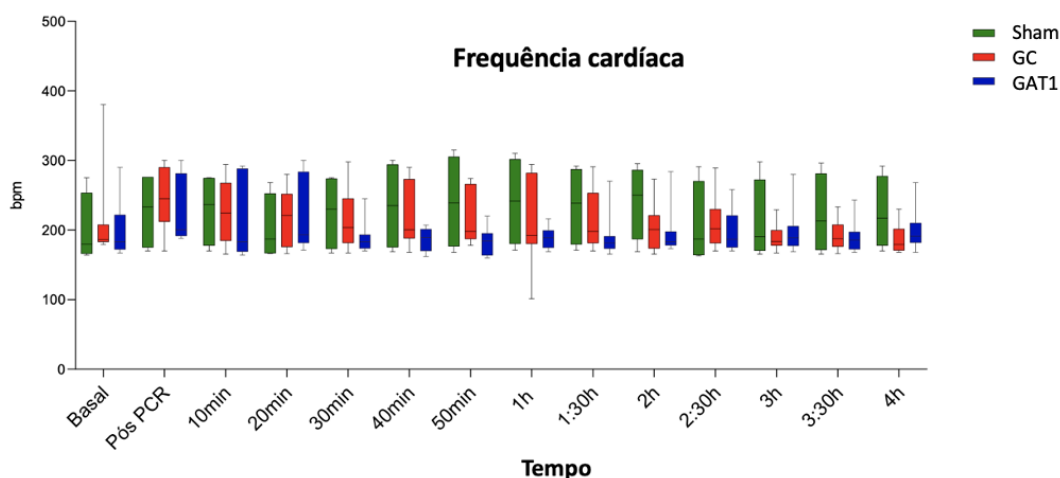


Curvas das medianas das pressões arteriais médias dos grupos GC, GAT1 e Sham, referente ao conjunto de animais que tiveram critério de RCE - teste de Kruskal-Wallis.

### 5.2.2 Frequência cardíaca ao longo do tempo

Os valores da FC não apresentaram diferença estatística entre os grupos imediatamente após a RCE ( $U: 609$ ,  $p = 0,773$ ). No entanto o GAT1 apresentou uma tendência de valores das frequências cardíacas inferiores aos demais grupos durante o período de observação, mesmo que não evidenciando uma diferença estatisticamente significativa. Ao analisar comparativamente esta variável, momento a momento, nota-se que o GAT1 apresenta medianas da FC menores do que o GC e GS, porém com significância estatística apenas do momento 30 minutos ao momento 50 minutos ( $p = 0,037$ ;  $0,045$ ;  $0,044$ ). Também não houve diferenças com relevância estatística entre os grupos quando analisados os valores das medianas das frequências cardíacas, entre os grupos, ao longo do tempo ( $U: 5556$ ;  $p = 0,234$ ), o Gráfico 3 demonstra a semelhança das aferições.

**Gráfico 3 - Comportamento da frequência cardíaca entre os grupos de animais que sobreviveram até o final das 4 horas de observação (p = 0,234)**



Curvas das medianas das frequências cardíacas dos grupos GC, GAT1 e Sham, referente ao conjunto de animais que sobreviveram por 4 horas. p: significância estatística - teste de Kruskal-Wallis.

### 5.3 COMPORTAMENTO DA CONCENTRAÇÃO ANESTÉSICA APÓS RCE

Nota-se que após o retorno da circulação espontânea dos animais submetidos a PCR, os valores das CAMs foram inferiores em relação ao grupo sham em todos os momentos da aferição, representando diferença estatística. No entanto, não houve diferença entre os GAT1 e GC, como demonstra a Tabela 4.

**Tabela 4 - Valores das concentrações anestésicas dos animais que sobreviveram até completarem o protocolo do estudo**

Tempo	GAT1 (n = 10)	GC (n = 10)	GS (n = 4)	P
Basal	0 (0-1,0)	0,5 (0-0,8)	1,5 (0,75-2)	0,016
Pós-RCE	0 (0-0)	0 (0-0,5)	2 (0,75-2)	<0,001
10 min	0 (0-0,5)	0,15(0-0,50)	2 (0,75-2)	0,004
20 min	0,27 (0-0,5)	0,4 (0-0,7)	1,5 (0,6-2)	0,005
30 min	0,3 (0-0,5)	0,3 (0,3-0,7)	1,5 (0,6-2)	0,005
40 min	0,3 (0-0,5)	0,5 (0,3-1,0)	1,5 (0,6-2,0)	0,003
50 min	0,3 (0-0,5)	0,5 (0,3-1,0)	1,5 (0,6-2,0)	0,002
1 hora	0,4 (0-0,5)	0,5 (0,2-1,0)	1,5 (0,6-1,5)	0,004
1h 30 min	0,5 (0-0,6)	0,5 (0,25-1,0)	1,5 (0,7-1,5)	0,005
2 horas	0,27 (0-0,6)	0,5 (0,25-1,1)	1,5 (0,7-1,5)	0,004
2h 30 min	0,45 (0-0,6)	0,5 (0,25-1,1)	1,5 (0,7-1,5)	0,006
3 horas	0,37 (0-0,5)	0,5 (0,25-1,1)	1,5 (0,7-1,5)	0,004
3 h 30 min	0,45 (0-0,5)	0,5 (0,25-1,1)	1,5 (0,7-1,5)	0,004
4 horas	0,45 (0-0,6)	0,5 (0,3-1,1)	1,5 (0,7-1,5)	0,003

Mediana, mínimo e máximo, da CAM de cada grupo de animais que sobreviveram até completar o protocolo; CAM (concentração anestésica mínima). GC: grupo controle, GAT1: grupo antagonista do receptor da angiotensina 1, RCE: retorno da circulação espontânea. p: significância estatística - teste de Kruskal-Wallis.

## 5.4 DADOS LABORATORIAIS

Os dados das amostras sanguíneas basais não apresentaram nenhuma anormalidade que necessitasse descarte de algum animal do estudo. Comprovou-se também a oxigenação adequada, com saturação de oxigênio e pressão arterial de O<sub>2</sub> normais (Tabela 5).

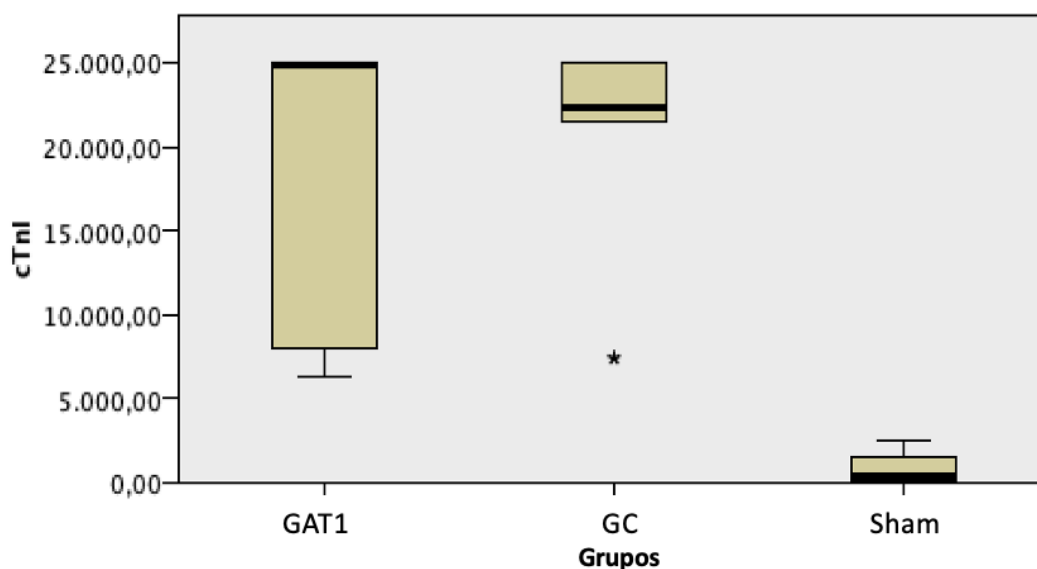
**Tabela 5 - Medidas descritivas das gasometrias no conjunto de animais que completaram o protocolo do estudo**

Variável	Tempo	GAT1	GC	GS	p
N	Basal	16	38	4	
	10min RCE	10	16	-	
	4h RCE	10	10	4	
Temperatura (°C)	Basal	35,5±0,9	35,5±0,8	35,7±0,2	0,985
	10min RCE	35,1±1,3	34,7±1,02	35,6±0,3	0,690
	4h RCE	35,8±0,9	36,5±0,4	36,1±0,2	0,084
pH	Basal	7,41±0,04	7,42±0,06	7,36±0,07	0,725
	10min RCE	7,170±0,103	7,060±0,186	-	0,032
	4h RCE	7,358±0,101	7,268±0,220	7,310±0,070	0,726
pCO <sub>2</sub> (mmHg)	Basal	29,4±4,4	32,6±4,0	34,4±10,2	0,093
	10min RCE	45,4±8,5	43,9±45,7	-	0,930
	4h RCE	33,7±11,4	32,6±16,0	47,8±11,6	0,153
pO <sub>2</sub> (mmHg)	Basal	275,5±44,9	218,5±92,6	330,2±22,6	0,242
	10min RCE	182,4±81,8	201,2±100,3	-	0,630
	4h RCE	273,0±107,9	325,7±62,2	271,5±27,3	0,285
Na (mmol/L)	Basal	139,5±3,81	138,6±4,4	144,5±2,1	0,453
	10min RCE	143,3±8,5	139,3±7,7	-	0,100
	4h RCE	144,4±3,6	141,0±5,9	145,0±3,4	0,138
K (mmol/L)	Basal	3,6±0,4	4,1±0,6	4,0±0,3	0,130
	10min RCE	3,1±0,5	3,6±3,4	-	0,045
	4h RCE	3,9±0,6	4,6±1,2	4,7±0,7	0,180
Cl (mmol/L)	Basal	110,1±4,3	111,1±2,9	110,1±2,3	0,631
	10min RCE	110,6±4,1	109,4±4,4	-	0,413
	4h RCE	113,6±3,6	113,5±7,38	108,2±7,1	0,372
Ca (mmol/L)	Basal	0,80±0,19	0,91±0,18	0,86±0,21	0,216
	10min RCE	0,75±0,18	0,89±0,19	-	0,037
	4h RCE	0,71±0,08	0,89±0,22	0,97±0,34	0,112
Glicose (mg/dL)	Basal	260,0±65,1	295,5±75,5	314,0±85,6	0,346
	10min RCE	393,0±73,6	441,2±106,8	-	0,109
	4h RCE	233±88	234±80	230±139	0,832
Lactato (mmol/L)	Basal	3,15±1,10	2,79±0,95	2,50±0,81	0,320
	10min RCE	7,79±3,87	10,64±5,93	-	0,257
	4h RCE	2,93±1,60	5,78±3,89	2,92±1,73	0,341
Hb (g/dL)	Basal	16,1±1,31	16,7±0,92	16,1±2,35	0,356
	10min RCE	15,8±1,26	16,6±1,53	-	0,215
	4h RCE	16,9±1,34	17,4±2,05	15,85±1,83	0,350
Ht (%)	Basal	49,2±3,97	49,2±5,85	46,3±4,04	0,235
	10min RCE	48,6±3,8	51,3±5,3	-	0,206
	4h RCE	51,9±4,0	53,1±6,1	45,8±3,2	0,037
BE (mmol/L)	Basal	-2,63±1,5	-4,11±1,6	-2,87±1,2	0,406
	10min RCE	-10,6±4,9	-14,9±8,0	-	0,048
	4h RCE	-5,9±5,3	-9,1±10,4	-2,5±3,7	0,342
Bic (mmol/L)	Basal	19,6±1,6	21,3±1,5	21,6±2,3	0,056
	10min RCE	16,6±3,7	13,5±6,3	-	0,037
	4h RCE	18,7±4,8	16,7±8,2	23,2±3,7	0,180

Medidas descritivas das gasometrias arteriais no período basal, pós retorno da circulação espontânea, ao final do estudo. p: significância estatística - teste de Kruskal-Wallis.

Os valores das troponinas foram avaliados 4 horas após a ressuscitação dos animais cujas médias do GC foi de  $18265 \pm 8725$  pg/mL enquanto do GAT1 foi de  $18027 \pm 8658$  pg/mL, o que não representou diferença estatisticamente significante. Porém, foram marcadamente elevadas em comparação com o grupo sham ( $824 \pm 1149$  pg/mL), como observado no Gráfico 4.

**Gráfico 4 - Medidas séricas da troponina I (cTnI) após quatro horas de observação dos animais que tiveram critério de RCE ( $p = 0,006$ )**



GAT1: grupo antagonista do receptor da angiotensina 1, GC: grupo controle, Sham: grupo de animais não submetidos a PCR, RCE: retorno da circulação espontânea. p: significância estatística – teste de Kruskal-Wallis.

Os dados do conjunto de animais que tiveram critério de RCE, vistos na Tabela 5, demonstram que a acidose metabólica foi comum em ambos os grupos submetidos a PCR, porém o GAT1 apresentou uma mediana de pH maior em relação ao grupo controle e (GAT1: 7,183; GC: 7,101,  $U: 432$ ,  $p = 0,032$ ), o mesmo efeito foi observado em relação ao valor da mediana do potássio (3,1; 3,35;  $U: 456$   $p = 0,045$ ), da mediana do excesso de bases (-9,75; -12,1;  $U: 434$   $p = 0,048$ ), e da mediana do bicarbonato (17,4; 15,95,  $U: 509$ ,  $p = 0,037$ ).

Ao se analisar os dados da gasometria arterial ao final do protocolo do estudo, nota-se que há uma semelhança entre as variáveis e compensação da acidose, com uma tendência à normalidade ao longo do tempo. Apenas o hematócrito do grupo sham foi mais baixo que os demais grupos. A mediana do lactato, excesso de bases e bicarbonato não apresentaram diferença estatística entre os grupos (Tabela 5).

## 5.5 TUNEL

Foram analisadas as lâminas dos cérebros e corações daqueles ratos que sobreviveram por quatro horas de observação após RCE. Os dados foram apresentados em mediana por grupo conforme a Tabela 6. Observa-se medianas semelhantes quanto ao número de células apoptóticas em ambos os grupos, tanto da avaliação do cérebro, quanto do coração. O grupo sham não apresentou sinais de lesão celular.

**Tabela 6 - Mediana de marcação de túnel em cada grupo, com mínimo e máximo de células apoptóticas**

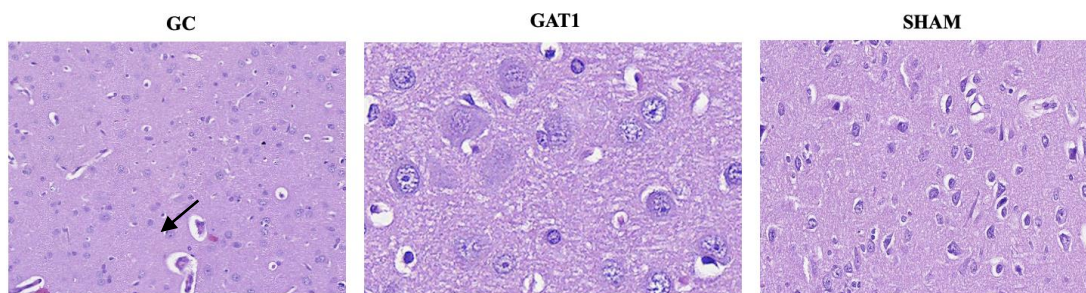
Grupo	TUNEL cérebro	TUNEL coração
GC	3,0 (0-4,7)	2,35 (0-11,76)
GAT1	3,0 (8-8,23)	2,3 (0-4,7)
GS	0	0
p	0,107	0,08

Mediana, com mínimo e máximo, do número de células apoptóticas de cada grupo de animais que sobreviveram por 4 horas de observação após RCE; GC: grupo controle, GAT1: grupo medicado com antagonista da angiotensina; GS: grupo sham; p: significância estatística - teste de Kruskal-Wallis.

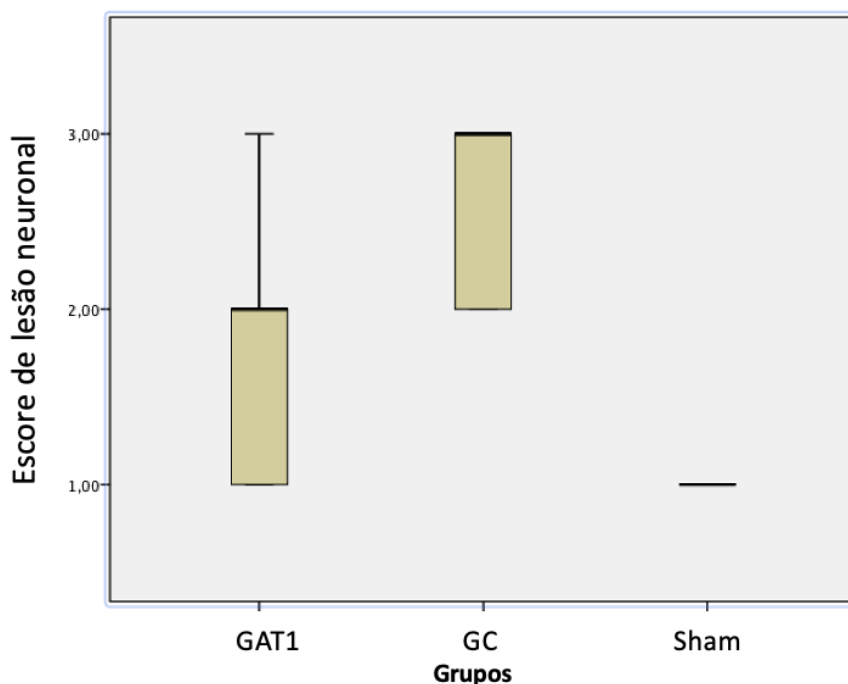
## 5.6 MICROSCOPIA ÓPTICA CEREBRAL

A amostra apontou um número maior de neurônios vermelhos e sinais de necrose no GC, em relação ao GAT1 ( $p = 0,025$ , V de Cramer 0,539) (Figura 7). O grupo sham não apresentou sinais de lesão neuronal. O Gráfico 5 demonstra a distribuição do escore de lesão neuronal entre os grupos.

**Figura 7 - Microscopia óptica de tecido cerebral, corada com hematoxilina e eosina, aumento 40 vezes, seta preta indica neurônio vermelho**



**Gráfico 5 - Escore de lesão neuronal, após quatro horas de observação dos animais que tiveram critério de RCE ( $p = 0,025$ )**



GAT1: grupo antagonista do receptor da angiotensina 1; RCE: retorno da circulação espontânea; p: significância estatística - teste  $X^2$ .

### 5.7 MICROSCOPIA ÓPTICA CARDÍACA

A avaliação microscópica mostrou que as células miocárdicas estavam dispostas ordenadamente com núcleos intactos no grupo Sham. No grupo GC, o arranjo das células miocárdicas foi irregular e um grande número de células imunes se agregou. Em comparação com o grupo GAT1, menos células miocárdicas foram organizadas desordenadamente e infiltrações de células inflamatórias foram menores neste último grupo. Comparado com o grupo Sham, o escore de dano miocárdico aumentou significativamente no GC. Além disso, o escore de dano miocárdico diminuiu significativamente no grupo GAT1 em comparação com o grupo GC como demonstrado na Figura 8 e no Gráfico 6.



Figura 8 - Micrografias representativas do tecido miocárdico corado com hematoxilina e eosina (10 campos quantificados/animal)

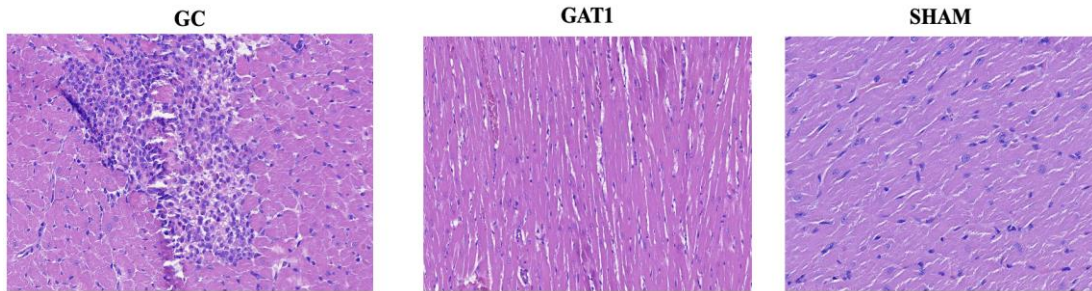
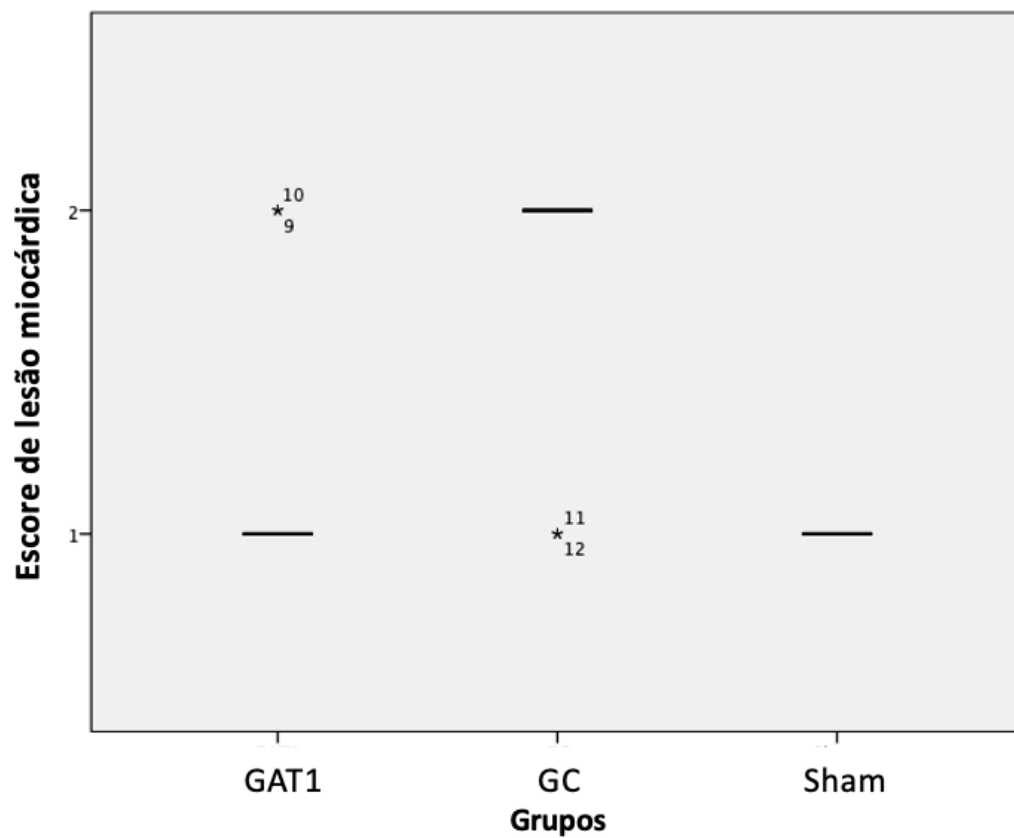


Gráfico 6 - Escore de lesão miocárdica, após quatro horas de observação dos animais que tiveram critério de RCE ( $p = 0,021$ )



GAT1: grupo antagonista do receptor da angiotensina 1; GC: grupo controle; RCE: retorno da circulação espontânea; p: significância estatística - teste  $X^2$ . \* Animais discrepantes.

## **6 DISCUSSÃO**

Este estudo demonstrou que o bloqueio do receptor AT1 da Angiotensina II proporciona maior taxa de RCE e sobrevida em ratos submetidos à PCR. Os resultados indicaram que o candasertan quando administrado durante as manobras de RCP, melhorou a função cardíaca, proporcionando aumento nas taxas de RCE e sobrevivência. Além destes, a administração desta droga tem papel na prevenção da lesão miocárdica e neuronal. Esses efeitos devem-se, provavelmente, à inibição do estresse oxidativo e da inflamação que ocorrem em resposta a situações de I/R.

Este foi o primeiro estudo a avaliar o efeito do bloqueio do receptor AT1 durante a PCR como adjuvante ao suporte avançado de vida. Estudos experimentais prévios, avaliaram o papel do bloqueio deste receptor sob a lesão de I/R focal, submetendo os animais a um regime de terapia medicamentosa previamente ao evento da PCR, ou por modelos que utilizaram o coração do animal isolado seguindo técnica de Langendorf<sup>33,35-39,51</sup>. Além disso, a maioria desses estudos não utiliza a angiotensina no perfusato, impedindo qualquer conclusão sobre os efeitos da inibição do receptor desta enzima, uma vez que o sistema renina-angiotensina está intimamente relacionado com o agravamento da lesão de reperfusão, a adição de angiotensina no perfusato é necessária para que se obtenha um bom modelo para a investigação de abordagens farmacológicas que possam realmente melhorar a função cardíaca após a isquemia-reperfusão<sup>35,51</sup>.

Os estudos que avaliam a lesão por I/R aplicaram diferentes protocolos com variações na duração da isquemia e no grau do distúrbio metabólico, o que torna difícil comparar a gravidade dos protocolos e conseqüentemente aplicabilidade dos seus resultados. Técnicas distintas quanto à indução da PCR, seja por asfixia ou indução da FV, também influenciam nos resultados e na validade externa dos estudos.

Os principais ritmos cardíacos, atrelados à morte súbita no ambiente extra hospitalar, são a fibrilação ventricular as taquicardias ventriculares<sup>52</sup>. O desenvolvimento de modelos experimentais que visem reproduzir tal cenário, permite-nos estudar melhor tal patologia e aplicar intervenções que visem promover a redução de resposta I/R, promovida pela ressuscitação pós PCR. Este estudo utilizou um modelo experimental cuja taxa de RCE foi acima de 50% em ambos os grupos, demonstrando compatibilidade com os resultados observados em modelos que também utilizaram a fibrilação ventricular, promovida pela aplicação de uma corrente elétrica no miocárdio, como mecanismo para indução da PCR<sup>48</sup>.

Há também, uma variabilidade na metodologia empregada entre os diferentes estudos, referente ao tempo de PCR para início da reanimação cardiopulmonar, que varia de dois a oito minutos, sendo que este intervalo influencia na taxa de RCE, variando de 50% a 100%. Foi

escolhido o tempo de 6 minutos, pois foi demonstrado por alguns autores que este tempo promove importante acometimento neuronal e cardiovascular, além de proporcionar uma lesão orgânica importante com aumento dos valores de lactato e redução do pH durante os momentos iniciais de reperfusão do experimento, porém compatíveis com algum grau de recuperação, correspondendo a uma certa equivalência ao ocorrido em seres humanos<sup>42,47,50,53</sup>.

Quanto ao critério de RCE, foi utilizado o protocolo descrito por Lamoureux *et al.*<sup>51</sup> e outros trabalhos que consideram metodologia semelhante<sup>33,35-39</sup>, que consideram a PAM acima de 25 mmHg, sustentada por mais de 10 minutos como RCE. Outros autores como Dave *et al.*<sup>47</sup> descrevem níveis em torno de 60 mmHg para definir RCE, no entanto este último trabalho estudou a indução da fibrilação ventricular como modelo para isquêmica cerebral. Tais variabilidades influenciam nos resultados dos achados. Porém, como visa-se um grau de lesão tecidual importante para avaliar se há de fato proteção pelo antagonismo do receptor da angiotensina II, optou-se pelo nível de PAM mais baixo, compatível com RCE, conforme a literatura.

Este estudo demonstrou redução de arritmias cardíacas, estatisticamente relevante. Como não houve diferenças no tempo de RCP, no número de desfibrilações ou doses de adrenalina entre os grupos, a ação do candasertan não parece contribuir para a reversão do ritmo cardíaco FV ou TV, no momento da RCP, porém como a incidência de arritmias cardíacas uma hora após RCE, foi maior no grupo controle, esta droga parece contribuir para redução de novos gatilhos arritmogênicos, devido ao bloqueio dos receptores AT1 da Angiotensina II, contribuindo inclusive para a diferença observada na sobrevivência destes animais favorecendo o GAT1, tal mecanismo já foi demonstrado por outros estudos citados anteriormente<sup>12,14</sup>.

Quanto às variáveis hemodinâmicas, o GAT1 apresentou níveis tensionais inferiores ao GC e GS, seja na análise com todos os animais que tiveram critérios de RCE, ou apenas entre os animais que completaram o protocolo do estudo. Tal fato deve-se ao efeito hipotensor do antagonismo da angiotensina II, mesmo que a dose administrada tenha sido descrita como não hipotensora<sup>13</sup>. Quanto à frequência cardíaca, não foi observada uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos ao longo do tempo, apenas em momentos pontuais. Estudos experimentais prévios apontam que a modulação do reflexo barorreceptor pela angiotensina II circulante é mediada pelos receptores AT1 no núcleo do trato solitário (NTS), e o antagonismo destes receptores leva a redução da frequência cardíaca<sup>54</sup>. Como o candasertan ultrapassa a barreira hematoencefálica, o antagonismo desses receptores no NTS, pode ter contribuído para tendência de frequências cardíacas inferiores observadas no GAT1, porém sem significância estatística quando analisada ao longo do tempo.

A CAM foi inferior nos GAT1 e GC em relação ao grupo sham, este achado deve-se ao fato da CAM ter sido titulada para que os animais permanecessem imóveis, sem reflexo à dor e com estabilidade hemodinâmica. Logo, o grupo que não sofreu a PCR, pela estabilidade hemodinâmica, necessitava de CAMs mais elevadas para manter a imobilidade ao estímulo algico.

Quanto à análise metabólica relacionada à I/R, ao se comparar o conjunto de animais que tiveram critério de RCE, o GAT1 apresentou menor nível de acidose e menor consumo de base do que o GC, sugerindo que a combinação adrenalina e candasertan pode proteger o tecido miocárdico e melhorar o metabolismo energético pós RCE. A melhor taxa de sobrevivência favorável ao GAT1, também corrobora com esta hipótese.

A disfunção miocárdica associada à síndrome pós PCR é caracterizada por intenso comprometimento do miocárdio, manifesta por hipocinesia global, afetando assim, a taxa de sucesso da ressuscitação<sup>54</sup>. Os mecanismos moleculares propostos para a disfunção miocárdica pós-ressuscitação, envolvem: a lesão de I/R resulta em uma grande quantidade de radicais livres de oxigênio que danificam as membranas celulares e induzem a necrose e apoptose dos miócitos, e um acúmulo intracelular de  $\text{Na}^+$  causada pela sobrecarga citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$  pela ação da enzima trocadora de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , presente na membrana do sarcolema. Foi demonstrado que limitar a entrada de  $\text{Na}^+$  no sarcolema durante a ressuscitação da fibrilação ventricular evita o acúmulo de excesso de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial e atenua a lesão do miocárdio<sup>55</sup>.

O aumento do nível da angiotensina II após o bloqueio do receptor AT1 pode ativar os receptores AT2, além do fato que a bradicinina também pode contribuir para o efeito do bloqueio do receptor AT1. A ativação do receptor AT2, por sua vez, resulta na formação de cinina local, que pode estar envolvida na melhora da função cardíaca, efeito cardioprotetor e antirremodelamento do antagonista AT1. No entanto, parece que além dos receptores AT2, os receptores AT1 também estão envolvidos na formação de cinina local e seu bloqueio pelo candasertan reduz a geração de óxido nítrico e a ativação de cinina local induzida pela angiotensina I, II, III e angiotensina (1-7)<sup>10,17,24</sup>. Além disso, mesmo se houver formação de cinina durante o antagonismo da AT1, ao contrário do que ocorre com os IECA, cuja degradação da cinina é inibida, esta pode ser destruída rapidamente por enzimas metabólicas, explicando a única supressão parcial do efeito benéfico do antagonista da AT1 sobre a função cardíaca em ratos com infarto do miocárdio experimental por um antagonista da bradicinina B2<sup>5</sup>. Ainda é necessário maiores esclarecimentos sobre o papel da cinina neste processo.

Há um reconhecimento crescente da existência de um SRA endógeno ou parácrino no coração. Todos os componentes do SRA – RNA mensageiro de angiotensinogênio e renina, enzima de conversão de angiotensina I em angiotensina II (Ang II) – anteriormente foram detectados no coração e parecem estar funcionalmente integrados<sup>12,15</sup>. A Ang II cardíaca pode estar envolvida na regulação do fluxo sanguíneo coronariano, na modulação da neurotransmissão simpática, na contratilidade cardíaca, na estimulação da hiperplasia e hipertrofia celular, além da manutenção da estrutura e reparo cardiovascular. A angiotensina II interage com dois subtipos farmacologicamente distintos de receptores da superfície celular, os receptores Ang II tipo 1 e tipo 2, sendo que receptores do tipo 1 mediam os principais efeitos cardiovasculares da Ang II<sup>56</sup>. Tais mecanismos podem ter sido responsáveis pela diferença estatisticamente significativa de menor escore de lesão miocárdica no GAT1.

Os achados encontrados na histopatologia cerebral, apontam o candasertan como neuroprotetor da lesão isquêmica promovida pela PCR. Tal fato, deve-se ao bloqueio da angiotensina II que é o principal efector/ligante do sistema renina angiotensina intrínseco do cérebro, é um neuropeptídeo produzido principalmente por células gliais no sistema nervoso central. A hiperativação do AT1R cerebral é responsável pelos efeitos prejudiciais associados ao SRA, pois promove vasoconstrição, reduz o FSC, aumenta o estresse oxidativo e a vulnerabilidade à isquemia, além de promover inflamação vascular e tecidual e exacerbar a neurodegeneração<sup>57</sup>. A estimulação de AT2 neutraliza esses mecanismos. Portanto, o bloqueio seletivo dos receptores AT1 com BRAs pode oferecer proteção superior do que diminuir simultaneamente as atividades dos receptores AT1 e AT2, como os inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECAs)<sup>58</sup>.

Este estudo tem como principais limitações a ausência de um grupo que tenha sido administrado apenas o candasertan durante as manobras de ressuscitação, porém a literatura documenta que o uso da adrenalina como fator preponderante para aumento da RCE em ratos<sup>49</sup>. Outro fator importante a ser relatado como limitação do estudo, foi a taxa de RCE ter sido inferior ao modelo experimental adotado<sup>48</sup>, necessitando de um número maior de animais para alcançar o número 10 animais por grupo intervenção e controle, como apontado no desenho do estudo. Um aspecto relevante é referente ao número pequeno da amostra, que mesmo tendo sido baseado no cálculo amostral, pode ter contribuído para redução do poder estatístico do estudo e conseqüentemente, não ter demonstrado diferenças que poderiam ser estatisticamente significativas se o número de animais contidos na amostra tivesse sido maior.

Os resultados deste estudo apontam para o papel protetor do antagonismo do receptor AT 1 da angiotensina 2 na lesão por I/R. Apesar de ser um estudo experimental, há uma boa correlação entre a fisiologia animal e a do ser humano, levando a perspectivas quanto ao uso de medicações que antagonizem os receptores da angiotensina durante a instituição de protocolos de reanimação cardiopulmonar, especialmente nas paradas assistidas, como no período perioperatório em que há um tempo de intervenção menor em relação às PCRs extra-hospitalares.

## **7 CONCLUSÕES**



Este estudo demonstrou que o bloqueio do receptor AT1 da Angiotensina II durante as manobras de RCP, proporciona maior taxa de RCE e maior sobrevida em ratos submetidos a PCR por indução da fibrilação ventricular. Foi observado também que o bloqueio deste receptor possui efeito atenuante da lesão neuronal e miocárdica, o que pode ser decorrente do aumento do nível da angiotensina II após o bloqueio seletivo do receptor AT1, resultando em ativação dos receptores AT2, o que leva à formação de cinina local. Tais mecanismos podem ser os responsáveis pela menor lesão tecidual miocárdica e neuronal observadas no grupo de animais que foram randomizados para o do candasertan.

## **REFERÊNCIAS\***

---

\* De acordo com Estilo Vancouver.

1. Yan S, Gan Y, Jiang N, Wang R, Chen Y, Luo Z, Zong Q, Chen S, Lv C. The global survival rate among adult out-of-hospital cardiac arrest patients who received cardiopulmonary resuscitation: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care*. 2020;24(1):61.
2. Vane MF, Carmona MJC, Pereira SM, Kern KB, Timerman S, Perez G, Vane LA, Otsuki DA, Auler JOC Jr. Predictors and their prognostic value for no ROSC and mortality after a non-cardiac surgery intraoperative cardiac arrest: a retrospective cohort study. *Sci Rep*. 2019;9(1):14975.
3. Schneider AP 2nd, Nelson DJ, Brown DD. In-hospital cardiopulmonary resuscitation: a 30-year review. *J Am Board Fam Pract*. 1993;6(2):91-101.
4. Girardi LN, Barie PS. Improved survival after intraoperative cardiac arrest in noncardiac surgical patients. *Arch Surg*. 1995;130(1):15-8.
5. Patil KD, Halperin HR, Becker LB. Cardiac arrest: resuscitation and reperfusion. *Circ Res*. 2015;116(12):2041-9.
6. Gräsner JT, Lefering R, Koster RW, Masterson S, Böttiger BW, Herlitz J, Wnent J, Tjelmeland IB, Ortiz FR, Maurer H, Baubin M, Mols P, Hadžibegović I, Ioannides M, Škulec R, Wissenberg M, Salo A, Hubert H, Nikolaou NI, Lóczi G, Svavarsdóttir H, Semeraro F, Wright PJ, Clarens C, Pijls R, Cebula G, Correia VG, Cimpoesu D, Raffay V, Trenkler S, Markota A, Strömsöe A, Burkart R, Perkins GD, Bossaert LL; EuReCa ONE Collaborators. EuReCa ONE-27 Nations, ONE Europe, ONE Registry: A prospective one month analysis of out-of-hospital cardiac arrest outcomes in 27 countries in Europe. *Resuscitation*. 2016;105:188-95.
7. Gräsner JT, Wnent J, Herlitz J, Perkins GD, Lefering R, Tjelmeland I, Koster RW, Masterson S, Rossell-Ortiz F, Maurer H, Böttiger BW, Moertl M, Mols P, Alihodžić H, Hadžibegović I, Ioannides M, Truhlář A, Wissenberg M, Salo A, Escutnaire J, Nikolaou N, Nagy E, Jonsson BS, Wright P, Semeraro F, Clarens C, Beesems S, Cebula G, Correia VH, Cimpoesu D, Raffay V, Trenkler S, Markota A, Strömsöe A, Burkart R, Booth S, Bossaert L. Survival after out-of-hospital cardiac arrest in Europe - Results of the EuReCa TWO study. *Resuscitation*. 2020;148:218-26.
8. Kato R, Foëx P. Fentanyl reduces infarction but not stunning via delta-opioid receptors and protein kinase C in rats. *Br J Anaesth*. 2000;84(5):608-14.
9. Landoni G, Bignami E, Oliviero F, Zangrillo A. Halogenated anaesthetics and cardiac protection in cardiac and non-cardiac anaesthesia. *Ann Card Anaesth*. 2009;12(1):4-9.
10. Qiu Y, Wu Y, Meng M, Luo M, Zhao H, Sun H, Gao S. Rosuvastatin improves myocardial and neurological outcomes after asphyxial cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation in rats. *Biomed Pharmacother*. 2017;87:503-8.
11. Ferreira AJ, Santos RA, Almeida AP. Angiotensin-(1-7): cardioprotective effect in myocardial ischemia/reperfusion. *Hypertension*. 2001;38(3 Pt 2):665-8.
12. Kontogiannis J, Burns KD. Role of AT1 angiotensin II receptors in renal ischemic injury. *Am J Physiol*. 1998;274(1):F79-90.

13. Dzau VJ. Theodore Cooper Lecture: Tissue angiotensin and pathobiology of vascular disease: a unifying hypothesis. *Hypertension*. 2001;37(4):1047-52.
14. Hoyer A, Kempfert J, Pritzwald-Stegmann P, Mohr FW, Dhein S. Acute hemodynamic effects of angiotensin- converting enzyme inhibition after prolonged cardiac arrest with Bretschneider's solution. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2014;387(12):1221-9.
15. Kazaure HS, Roman SA, Rosenthal RA, Sosa JA. Cardiac arrest among surgical patients: an analysis of incidence, patient characteristics, and outcomes in ACS-NSQIP. *JAMA Surg*. 2013;148(1):14-21.
16. Chopra V, Bovill JG, Spierdijk J. Accidents, near accidents and complications during anaesthesia. A retrospective analysis of a 10-year period in a teaching hospital. *Anaesthesia*. 1990;45(1):3-6.
17. Olsson GL, Hallén B. Cardiac arrest during anaesthesia. A computer-aided study in 250,543 anaesthetics. *Acta Anaesthesiol Scand*. 1988;32(8):653-64.
18. Kawashima Y, Takahashi S, Suzuki M, Morita K, Irita K, Iwao Y, Seo N, Tsuzaki K, Dohi S, Kobayashi T, Goto Y, Suzuki G, Fujii A, Suzuki H, Yokoyama K, Kugimiya T. Anesthesia-related mortality and morbidity over a 5-year period in 2,363,038 patients in Japan. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2003;47(7):809-17.
19. Koga FA, Dib RE, Wakasugui W, Roça CT, Corrente JE, Braz MG, Braz JRC, Braz LG. Anesthesia-Related and Perioperative Cardiac Arrest in Low- and High-Income Countries: A Systematic Review With Meta-Regression and Proportional Meta-Analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2015;94(36):e1465.
20. Braz LG, Módolo NS, do Nascimento P Jr, Bruschi BA, Castiglia YM, Ganem EM, de Carvalho LR, Braz JR. Perioperative cardiac arrest: a study of 53,718 anaesthetics over 9 yr from a Brazilian teaching hospital. *Br J Anaesth*. 2006;96(5):569-75.
21. Conselho Federal de Medicina. *Resolução CFM nº 1.802/2006. Dispõe sobre a prática do ato anestésico* [internet]. 2006 [citado em 2022 ago. 29]. Disponível em: [http://coeso.com.br/wp-content/uploads/2018/06/Resolucao\\_CFM\\_n\\_1802\\_\\_de\\_2006.pdf](http://coeso.com.br/wp-content/uploads/2018/06/Resolucao_CFM_n_1802__de_2006.pdf).
22. Jacobs I, Nadkarni V, Bahr J, Berg RA, Billi JE, Bossaert L, Cassan P, Coovadia A, D'Este K, Finn J, Halperin H, Handley A, Herlitz J, Hickey R, Idris A, Kloeck W, Larkin GL, Mancini ME, Mason P, Mears G, Monsieurs K, Montgomery W, Morley P, Nichol G, Nolan J, Okada K, Perlman J, Shuster M, Steen PA, Sterz F, Tibballs J, Timerman S, Truitt T, Zideman D; International Liaison Committee on Resuscitation; American Heart Association; European Resuscitation Council; Australian Resuscitation Council; New Zealand Resuscitation Council; Heart and Stroke Foundation of Canada; InterAmerican Heart Foundation; Resuscitation Councils of Southern Africa; ILCOR Task Force on Cardiac Arrest and Cardiopulmonary Resuscitation Outcomes. Cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation outcome reports: update and simplification of the Utstein templates for resuscitation registries: a statement for healthcare professionals from a task force of the International Liaison Committee on Resuscitation (American Heart Association, European Resuscitation Council, Australian Resuscitation Council, New Zealand Resuscitation Council, Heart and Stroke Foundation of Canada, InterAmerican Heart Foundation, Resuscitation Councils of Southern Africa). *Circulation*. 2004;110(21):3385-97.

23. Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2012;298:229-317.
24. Li J, Culman J, Hörtnagl H, Zhao Y, Gerova N, Timm M, Blume A, Zimmermann M, Seidel K, Dirnagl U, Unger T. Angiotensin AT2 receptor protects against cerebral ischemia-induced neuronal injury. *FASEB J.* 2005;19(6):617-9.
25. Jennings RB, Sommers HM, Smyth GA, Flack HA, Linn H. Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Arch Pathol.* 1960;70:68-78.
26. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med.* 2007;357(11):1121-35.
27. Zhao ZQ, Nakamura M, Wang NP, Velez DA, Hewan-Lowe KO, Guyton RA, Vinten-Johansen J. Dynamic progression of contractile and endothelial dysfunction and infarct extension in the late phase of reperfusion. *J Surg Res.* 2000;94(2):133-44.
28. Adibhatla RM, Hatcher JF. Lipid oxidation and peroxidation in CNS health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal.* 2010;12(1):125-69..
29. Lee HL, Chen CL, Yeh ST, Zweier JL, Chen YR. Biphasic modulation of the mitochondrial electron transport chain in myocardial ischemia and reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2012;302(7):H1410-22.
30. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol.* 2000;190(3):255-66.
31. Hypothermia after Cardiac Arrest Study Group. Mild therapeutic hypothermia to improve the neurologic outcome after cardiac arrest. *N Engl J Med.* 2002;346(8):549-56.
32. Bernard SA, Gray TW, Buist MD, Jones BM, Silvester W, Gutteridge G, Smith K. Treatment of comatose survivors of out-of-hospital cardiac arrest with induced hypothermia. *N Engl J Med.* 2002;346(8):557-63.
33. Ozer MK, Sahna E, Birincioglu M, Acet A. Effects of captopril and losartan on myocardial ischemia-reperfusion induced arrhythmias and necrosis in rats. *Pharmacol Res.* 2002;45(4):257-63.
34. Callaway CW, Soar J, Aibiki M, Böttiger BW, Brooks SC, Deakin CD, Donnino MW, Drajer S, Kloeck W, Morley PT, Morrison LJ, Neumar RW, Nicholson TC, Nolan JP, Okada K, O'Neil BJ, Paiva EF, Parr MJ, Wang TL, Witt J; Advanced Life Support Chapter Collaborators. Part 4: Advanced Life Support: 2015 International Consensus on Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care Science With Treatment Recommendations. *Circulation.* 2015;132(16 Suppl 1):S84-145.
35. Culman J, Blume A, Gohlke P, Unger T. The renin-angiotensin system in the brain: possible therapeutic implications for AT(1)-receptor blockers. *J Hum Hypertens.* 2002;16(Suppl 3):S64-70.

36. Sugawara T, Kinouchi H, Oda M, Shoji H, Omae T, Mizoi K. Candesartan reduces superoxide production after global cerebral ischemia. *Neuroreport*. 2005;16(4):325-8.
37. Liu H, Kitazato KT, Uno M, Yagi K, Kanematsu Y, Tamura T, Tada Y, Kinouchi T, Nagahiro S. Protective mechanisms of the angiotensin II type 1 receptor blocker candesartan against cerebral ischemia: in-vivo and in-vitro studies. *J Hypertens*. 2008;26(7):1435-45.
38. Parlakpınar H, Ozer MK, Acet A. Effects of captopril and angiotensin II receptor blockers (AT1, AT2) on myocardial ischemia-reperfusion induced infarct size. *Cytokine*. 2011;56(3):688-94.
39. Panahpour H, Nekooeian AA, Dehghani GA. Blockade of Central Angiotensin II AT1 Receptor Protects the Brain from Ischemia/Reperfusion Injury in Normotensive Rats. *Iran J Med Sci*. 2014;39(6):536-42.
40. Min LJ, Mogi M, Tsukuda K, Jing F, Ohshima K, Nakaoka H, Kan-No H, Wang XL, Chisaka T, Bai HY, Iwanami J, Horiuchi M. Direct stimulation of angiotensin II type 2 receptor initiated after stroke ameliorates ischemic brain damage. *Am J Hypertens*. 2014;27(8):1036-44.
41. Stoukides CA, McVoy HJ, Kaul AF. Candesartan cilexetil: an angiotensin II receptor blocker. *Ann Pharmacother*. 1999;33(12):1287-98.
42. Lin JY, Liao XX, Li H, Wei HY, Liu R, Hu CL, Huang GQ, Dai G, Li X. Model of cardiac arrest in rats by transcutaneous electrical epicardium stimulation. *Resuscitation*. 2010;81(9):1197-204.
43. Chen MH, Liu TW, Xie L, Song FQ, He T, Zeng ZY, Mo SR. A simpler cardiac arrest model in rats. *Am J Emerg Med*. 2007a;25(6):623-30.
44. Fabian-Jessing BK, Vallentin MF, Secher N, Hansen FB, Dezfulian C, Granfeldt A, Andersen LW. Animal models of cardiac arrest: A systematic review of bias and reporting. *Resuscitation*. 2018;125:16-21.
45. Nunnally ME, O'Connor MF, Kordylewski H, Westlake B, Dutton RP. The incidence and risk factors for perioperative cardiac arrest observed in the national anesthesia clinical outcomes registry. *Anesth Analg*. 2015;120(2):364-70.
46. von Planta I, Weil MH, von Planta M, Bisera J, Bruno S, Gazmuri RJ, Rackow EC. Cardiopulmonary resuscitation in the rat. *J Appl Physiol (1985)*. 1988;65(6):2641-7.
47. Dave KR, Della-Morte D, Saul I, Prado R, Perez-Pinzon MA. Ventricular fibrillation-induced cardiac arrest in the rat as a model of global cerebral ischemia. *Transl Stroke Res*. 2013;4(5):571-8.
48. Vane MF, Carmona MJC, Otsuki DA, Maia DRR, Vane LF, Vane LA, Araújo Filho EAF, Xavier M, Auler Junior JOC. Modelo animal de parada cardíaca: um dispositivo simples para a compressão torácica em pequenos animais. *Rev Bras Anesthesiol*. 2017;67(4):440-441.

49. Nellgård B, Wieloch T. Postischemic blockade of AMPA but not NMDA receptors mitigates neuronal damage in the rat brain following transient severe cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1992;12(1):2-11.
50. Kern KB, Hilwig RW, Rhee KH, Berg RA. Myocardial dysfunction after resuscitation from cardiac arrest: an example of global myocardial stunning. *J Am Coll Cardiol.* 1996;28(1):232-40.
51. Lamoureux L, Radhakrishnan J, Gazmuri RJ. A Rat Model of Ventricular Fibrillation and Resuscitation by Conventional Closed-chest Technique. *J Vis Exp.* 2015;(98):52413.
52. Soar J, Callaway CW, Aibiki M, Böttiger BW, Brooks SC, Deakin CD, Donnino MW, Drajer S, Kloeck W, Morley PT, Morrison LJ, Neumar RW, Nicholson TC, Nolan JP, Okada K, O'Neil BJ, Paiva EF, Parr MJ, Wang TL, Witt J; Advanced Life Support Chapter Collaborators. Part 4: Advanced life support: 2015 International Consensus on Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care Science with Treatment Recommendations. *Resuscitation.* 2015;95:e71-120.
53. Chen MH, Liu TW, Xie L, Song FQ, He T, Zeng ZY, Mo SR. Ventricular fibrillation induced by transoesophageal cardiac pacing: a new model of cardiac arrest in rats. *Resuscitation.* 2007b;74(3):546-51.
54. Tan PS, Killinger S, Horiuchi J, Dampney RA. Baroreceptor reflex modulation by circulating angiotensin II is mediated by AT1 receptors in the nucleus tractus solitarius. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007;293(6):R2267-78.
55. Laurent I, Monchi M, Chiche JD, Joly LM, Spaulding C, Bourgeois B, Cariou A, Rozenberg A, Carli P, Weber S, Dhainaut JF. Reversible myocardial dysfunction in survivors of out-of-hospital cardiac arrest. *J Am Coll Cardiol.* 2002;40(12):2110-6.
56. Walker MJ, Curtis MJ, Hearse DJ, Campbell RW, Janse MJ, Yellon DM, et al. The Lambeth Conventions: guidelines for the study of arrhythmias in ischaemia infarction, and reperfusion. *Cardiovasc Res.* 1988;22(7):447-55.
57. Saavedra JM. Evidence to Consider Angiotensin II Receptor Blockers for the Treatment of Early Alzheimer's Disease. *Cell Mol Neurobiol.* 2016;36(2):259-79.
58. Hajjar I, Okafor M, McDaniel D, Obideen M, Dee E, Shokouhi M, Quyyumi AA, Levey A, Goldstein F. Effects of Candesartan vs Lisinopril on Neurocognitive Function in Older Adults With Executive Mild Cognitive Impairment: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Netw Open.* 2020;3(8):e2012252.

**ANEXO**



## Anexo A - Aprovação do Comitê de Ética



### COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

A CEUA da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 25.02.19, **APROVOU o documento** abaixo mencionado para o protocolo de pesquisa nº **034/16** intitulado “**AVALIAÇÃO DO EFEITO PÓS-CONDICIONANTE DO CAPTOPRIL, LOSARTANA E ASSOCIAÇÃO EM RATOS SUBMETIDOS À PARADA CARDIORESPIRATÓRIA**” apresentado pelo Departamento de Cirurgia.

- Prorrogação de prazo para **dezembro/2019**
- Substituição de pesquisador responsável, de José Otávio Costa Auler Junior, para **Maria José Carvalho Carmona**
- Substituição de pesquisador executante, de Débora Rothstein Ramos, para **Elson Alberto Fernandes de Araújo Filho**

Pesquisador Responsável: **Maria José Carvalho Carmona**

CEUA-FMUSP, 25 de Fevereiro de 2019

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