

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

ESTUDO DE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO NA SÍNDROME PÓS-
PARADA CARDIORRESPIRATÓRIA

Dissertação de Mestrado

Tássia Machado Medeiros

Porto Alegre, maio de 2013.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

ESTUDO DE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO NA SÍNDROME PÓS-
PARADA CARDIORRESPIRATÓRIA

Dissertação submetida ao programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS como um dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Aluna: Tássia Machado Medeiros
Orientadora: Dra. Mara Silveira Benfato

Porto Alegre, maio de 2013.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Estresse Oxidativo, do Departamento de Biofísica da UFRGS em colaboração com o Hospital Nossa Senhora da Conceição - Grupo Hospitalar Conceição (HNSC-GHC). Teve apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais pelo exemplo que com força de vontade e perseverança, sonhos podem se tornar realidade, e principalmente, por abdicarem de muitas vontades e sonhos para que os meus virassem realidade;

Aos meus irmãos por toda a força e companheirismo;

A minha Orientadora pela oportunidade, ensinamentos e, principalmente, pela paciência;

Aos meus colegas de laboratório, pela assistência, mesmo quando não tinham mais tempo e nem paciência;

Aos Professores do mestrado, por tudo que ensinaram e por acreditarem no nosso esforço;

Aos meus amigos da vida, por me incentivarem quando as forças pareciam não existir mais;

Enfim, a todos aqueles que amo e que acreditam em mim por me fazerem uma pessoa melhor e mais feliz.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	6
RESUMO	8
ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO.....	10
1.1 SÍNDROME PÓS-PARADA CARDIO RESPIRATÓRIA	10
1.2 PROCESSO DE ISQUEMIA E REPERFUSÃO	15
1.3 ESTRESSE OXIDATIVO	18
1.4 MONITORIZAÇÃO CLÍNICA	23
2. OJETIVOS	26
2.1 OBJETIVO GERAL	26
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
3. MÉTODOS E RESULTADOS	26
3.1 ARTIGO CIENTÍFICO	27
4. DISCUSSÃO.....	49
5. CONCLUSÃO.....	60
6. PERSPECTIVAS	62
7. REFERÊNCIAS	63
APENDICE 1	72
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	72
APENDICE 2	75
Formulário de dados dos pacientes.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS

AMP – Monofosfato de Adenosina

ATP – Trifosfato de Adenosina

CAT – catalase

CuZnSOD – superóxido dismutase citoplasmática

EC-SOD – superóxido dismutase extracelular

eNOS – óxido nítrico sintase endotelial

ERN – Espécies Reativas de Nitrogênio

ERO – Espécies Reativas de Oxigênio

GPx – glutathione peroxidase

GR – glutathione reductase

GSH – Glutathione Reduzida

GSSG – Glutathione Oxidada

GsT – glutathione S-transferase

Hb – Hemoglobina

iNOS – óxido nítrico sintase induzível

MDA – Malondialdeído

MnSOD – superóxido dismutase mitocondrial

NADPH – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Reduzido

nNOS – óxido nítrico sintase neuronal

NOSs – óxido nítrico sintases

pCO₂ – Pressão de Gás Carbônico

PCR – Parada Cardiorrespiratória

pO₂ – Pressão de Oxigênio

Prx – peroxiredoxinas

RCE – Retorno da Circulação Espontânea

RL – Radicais Livres

SOD – superóxido dismutase

SPCR – Síndrome Pós-parada Cardiorrespiratória

UTI – Unidade de Terapia Intensiva

Vitamina C – Ácido Ascórbico

Vitamina E – Tocoferol

XDH – xantina desidrogenase

XO – xantina oxidase

RESUMO

A Parada Cardiorrespiratória (PCR) é caracterizada pela parada abrupta da ventilação e circulação espontâneas. A Síndrome Pós-parada Cardiorrespiratória (SPCR) surge após a PCR, destacando-se por acarretar disfunção do miocárdio, lesão cerebral, resposta sistêmica inflamatória devido à isquemia/reperfusão, possuindo importante causa de mortalidade em todo o mundo. O processo de isquemia/reperfusão gerado pela PCR contribui para o dano tecidual, em parte pela geração de espécies reativas. A formação de espécies reativas pode tanto gerar dano direto em biomoléculas como lipídeos, DNA e proteínas quanto alterar a composição celular de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, componentes de diferentes vias celulares como apoptose e necrose e ativar inflamação. O objetivo do estudo (observacional, coorte prospectivo) foi analisar, em humanos, o perfil do processo de estresse oxidativo na SPCR acompanhando os pacientes durante as diferentes fases da síndrome. Foi coletado sangue total de 30 pacientes pós-PCR 6, 12, 36 e 72 horas após a ressuscitação bem sucedida, os quais se encontravam internados na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) do Hospital Nossa Senhora da Conceição – Grupo Hospitalar Conceição (HNSC-GHC) de Porto Alegre (entre maio de 2011 a novembro de 2012). Excluíram-se pacientes menores de 18 anos, vítimas de trauma, pós-operatório imediato (<7 dias), gestantes e pacientes terminais. O dano em biomoléculas foi analisado através da dosagem de grupos carbonil (proteínas), malondialdeído (MDA) (lipídeos) e nitritos/nitratos, além da dosagem da proteína S100B como um marcador de dano neuronal; os antioxidantes enzimáticos através da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), glutatona S-transferase (GsT) e consumo de H₂O₂; antioxidantes não-enzimáticos através da concentração de glutatona (total (tGSH), reduzida (GSH) e oxidada (GSSG)) e vitamina C. Além disso, dados clínicos e bioquímicos foram fornecidos pelo hospital, como pH, glicose, lactato, hemoglobina, hematócrito, proteína-C reativa e eletrólitos. Dos 30 pacientes, 60% eram homens e apenas 18 sobreviveram durante todo o período de coleta (72h pós-PCR). A análise estatística foi realizada através do teste *The Generalized Estimation Equations* (GEE). Os pacientes apresentaram em três dos quatro momentos de coleta médias correspondentes à acidose e lactato com valores superiores aos considerados normais em todos os momentos. Os níveis de hemoglobina diminuíram significativamente do primeiro dia para o último. Os níveis de proteína-C reativa aumentaram significativamente do primeiro dia para o último e os valores médios de todos os momentos foram altos comparados com valores normais. Os níveis de nitritos/nitratos em eritrócitos encontraram-se significativamente mais elevados no último momento do que no penúltimo. Os níveis de tGSH, GSH e GSSG diminuíram significativamente do primeiro momento para o terceiro. Também foram realizadas análises desses parâmetros comparando homens e mulheres. A atividade de GsT teve aumento das 6 para 36 h pós-PCR. Mulheres apresentaram variações significativas nos níveis de glicose (relacionado a hiperglicemia), com o valor mais alto nas 72h pós-PCR. Homens tiveram variação nos níveis de GSSG, tendo seu menor valor 36h pós-PCR, bem como diminuição do consumo de H₂O₂ de 6h para 36h pós-PCR. Conclui-se que o estresse oxidativo não influencia no processo da SPCR somente nos momentos iniciais deste, mas continua sua influência ao longo de todas as fases. Além disso, homens e mulheres possuem resposta fisiológica diferente à SPCR. Enfatizando que este é o primeiro trabalho comparando as diferenças entre os sexos nesta síndrome em humanos com um número maior de parâmetros analisados.

Palavras chave: Síndrome pós-parada cardiorrespiratória, parada cardiorrespiratória, estresse oxidativo.

ABSTRACT

Cardiac arrest (CA) is characterized by the abrupt stop of spontaneous ventilation and circulation. The Post- Cardiac Arrest Syndrome (Post-CA Syndrome) arises after CA, distinguished by cause myocardial dysfunction, brain injury, systemic inflammatory response due to ischemia/reperfusion, having important cause of mortality worldwide. The process of ischemia/reperfusion generated by CA contributes to tissue injury, in part by generating reactive species. The formation of reactive species can generate both direct damage to biomolecules such as lipids, DNA and proteins and alter the cellular composition of enzymatic and non-enzymatic antioxidants, components of different cellular pathways such as apoptosis and necrosis and activate inflammation. The objective of the study (observational, prospective cohort study) was to analyze, in humans, the profile of the process of oxidative stress in SPCR accompanying patients during different stages of the syndrome. Whole blood of 30 patients post-CA 6, 12, 36 and 72 hours were collected after successful resuscitation, which were admitted to the Intensive Care Unit (ICU) of the Hospital Nossa Senhora da Conceição - Conceição Hospital Group (HNSC - GHC) of Porto Alegre (from May 2011 to November 2012). We excluded patients younger than 18 years, victims of trauma, immediate postoperative period (< 7 days), pregnant and terminally ill patients. The damage to biomolecules was examined through measurement of carbonyl groups (proteins), malondialdehyde (MDA) (lipids) and nitrites/nitrates, dosage of S100B protein as a marker of neuronal damage, through enzymatic activity of antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), glutathione S-transferase (GST) and consumption of H₂O₂; non-enzymatic antioxidants through the concentration of glutathione (total (tGSH) , reduced (GSH) and oxidized (GSSG)) and vitamin C. In addition, biochemical and clinical data were provided by the hospital, such as pH, glucose, lactate, hemoglobin, C-reactive protein and electrolytes. Of the 30 patients, 60 % were men and only 18 survived throughout the collection period (72h post- CA). Statistical analysis was performed using Generalized Estimation Equations test (GEE). Patients reported in three of four times average collection corresponding to acidosis and lactate values over that considered normal at all times. Hemoglobin decreased significantly from the first day to the last. The C-reactive protein increased significantly from the first day to the last, and the averages of all times were high compared with normal values. Nitrites/nitrates found in erythrocytes were significantly higher than the last time in the penultimate. tGSH, GSH and GSSG decreased significantly from the first moment to the third. We also did the analysis of these parameters comparing men and women. Women showed significant variations in glucose levels (hyperglycemia associated) with the highest value at 72h post-CA. GsT activity had decreased from 6 to 36 h post-CA. Men had a variation in the levels of GSSG, having its lowest value 36h post-CA as well as reducing the consumption of H₂O₂ 6h for 36h post-CA. We conclude that oxidative stress does not influence the process of SPCR only in the early moments of this, but his influence continues throughout all stages. In addition, men and women have different physiological response to Post-CA Syndrome. Emphasizing this is the first study to compare differences between genders in this syndrome in humans with a greater number of parameters analyzed.

Key words: Post cardiac arrest syndrome, cardiac arrest, oxidative stress.

1. INTRODUÇÃO

1.1 SÍNDROME PÓS-PARADA CARDIO RESPIRATÓRIA

A Parada Cadiorrespiratória (PCR) é caracterizada pela parada abrupta da ventilação e circulação sanguínea espontânea, confirmada pela cessação da pulsação e apnéia (hipóxia), acarretando em deficiência da oxigenação tecidual e perda da consciência (Sandroni *et al.*, 2007). Nos Estados Unidos, aproximadamente 155.000 pacientes/ano são assistidos nas emergências após a PCR, atingindo uma taxa de sobrevivência de 46% (Rea *et al.*, 2004). No Brasil, de acordo com registros de 2004, as estatísticas mostraram que de cada 100 pessoas apenas duas sobreviveram à morte súbita (Lobo, I *et al.*; 2004). O sucesso da reanimação do paciente inclui uma série de fatores como ocorrência de PCR testemunhada por alguém que possa prestar assistência ou convocar ajuda, tempo que o paciente permanece chocado, rapidez do atendimento médico e de desfibrilação, cuidados hospitalares pós-PCR, idade, sexo e demais comorbidades (Rea *et al.*, 2006).

Infelizmente, a maioria dos pacientes que conseguem ter sucesso na reanimação morrem antes de deixar o hospital (Peberdy *et al.*, 2003). A sobrevivência dos pacientes que sofrem a PCR dependerá do tempo que estes demoram em retornar a circulação espontânea (RCE – Retorno da Circulação Espontânea), sendo que entre 25% e 67% vão a óbito durante as primeiras 24 horas pós-RCE (Sandroni *et al.*, 2004). A sobrevivência após a alta do hospital tende a diminuir. Di Bari *e col.*, 2000, demonstraram que apenas 53% dos pacientes (média de idade de 70 anos) que receberam alta do hospital após terem sofrido PCR (17% da população geral do hospital) continuaram vivos após 5 anos.

Um dos últimos estudos referente à epidemiologia da PCR, *National Registry of Cardiopulmonary Resuscitation* (NRCPR), acompanhou 36.902 adultos (≥ 18 anos) e 880 crianças (< 18 anos) e mostrou uma taxa de mortalidade de 67 e 55%, respectivamente

(Nadkarni *et al.*, 2006). Em outro estudo realizado no Reino Unido, Nolan *e col.*, 2007 encontraram que 71,4% de 8.987 pacientes internados na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) após a PCR morreram antes de receberem alta do hospital. Ainda, dados da *Canadian Critical Research Network* mostraram uma taxa de mortalidade hospitalar de 65% em 1.483 pacientes internados na UTI depois da PCR (Keenan *et al.*, 2007). Existem evidências sugerindo que homens e mulheres apresentam diferenças nas taxas de incidência da PCR e mortalidade ocasionada por ela. Mulheres demonstram menor probabilidade de sofrer uma PCR, porém uma maior mortalidade após a ocorrência da mesma (Nolan *et al.*, 2008).

No início dos anos 1970, Dr. Vladimir Negovsky reconheceu que a patologia causada pelo processo de isquemia e reperfusão gerado a partir da PCR possui etiologia claramente definida e esta foi identificada como um processo fisiopatológico sendo denominado de estado pós-reanimação (Negovsky, 2012). Ele também afirmou que a fase mais complexa desse processo começa quando o paciente retorna a circulação espontânea após a PCR, por isso propôs-se o nome Síndrome Pós-parada Cardiorrespiratória (SPCR). O maior problema da PCR são os efeitos generalizados no corpo, após a hipóxia, os quais devem ser tratados. Estes efeitos resumem-se por distúrbios no sistema nervoso central, órgãos internos, alterações no metabolismo e na homeostase, sendo que estas mudanças podem ser irreversíveis (Negovsky, 2012). Atualmente, a etiologia e tratamento da PCR sofreram mudanças drásticas, mas infelizmente, o prognóstico dos pacientes continua praticamente o mesmo. Sendo assim, a SPCR é definida hoje em dia como o estado fisiopatológico pós-reanimação, o qual surge devido ao processo de isquemia-reperfusão generalizado, sendo caracterizada por uma combinação de processos fisiopatológicos pós-PCR, incluindo lesão cerebral, disfunção do miocárdio, resposta sistêmica a isquemia-reperfusão e a persistência da patologia que causou a PCR, incluindo-se doenças cardiovasculares, pulmonares e

tromboembólicas. Este estado pode ser agravado pela não correção da causa que provocou a PCR (Nolan *et al.*, 2008).

A SPCR pode ser dividida em fases as quais são definidas pelo tempo pós-reanimação: fase imediata, compreendendo os primeiros 20 minutos pós-reanimação; fase precoce, entre 20 minutos e 12 horas pós-reanimação, onde intervenções são mais eficazes; fase

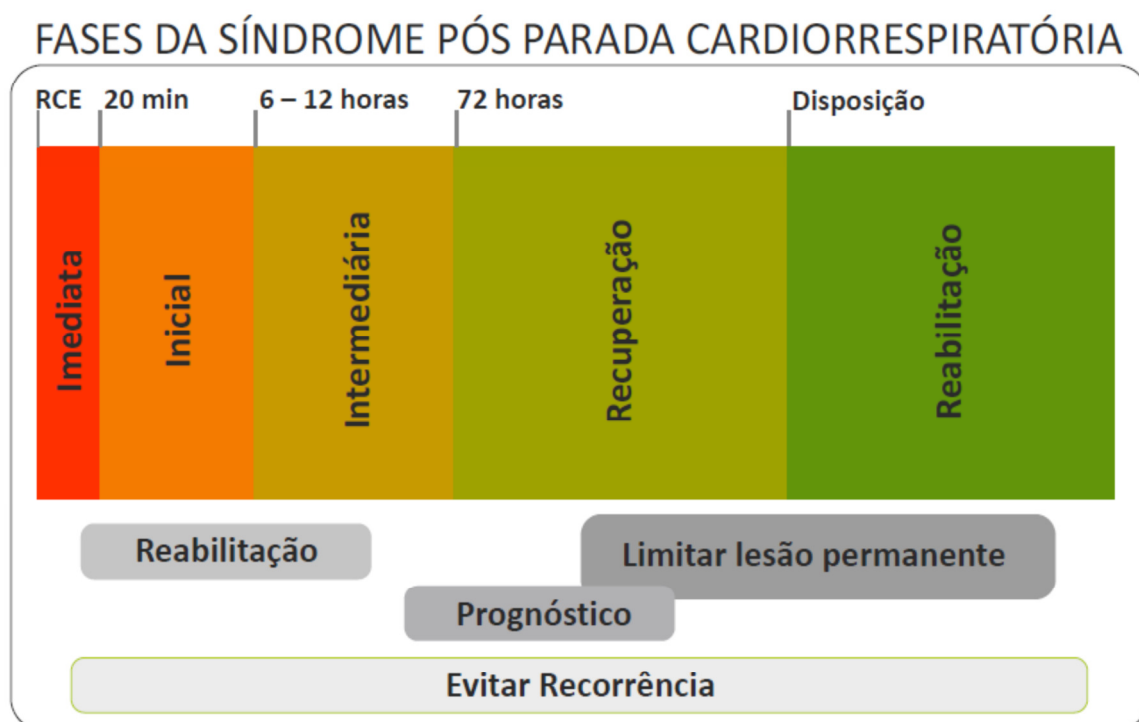


Figura 1. Fases da Síndrome Pós Parada Cardiorrespiratória. Traduzida e modificada de (Nolan *et al.*, 2008).

intermediária, entre 12 e 72 horas pós-reanimação, quando as vias de lesão ainda estão ativas e um tratamento mais agressivo geralmente é aplicado; e uma fase tardia, após 3 dias pós-RCE, quando o prognóstico torna-se confiável (Figura 1). Após a RCE o paciente é considerado tecnicamente vivo, mas muitos estudos demonstram que óbitos podem ocorrer em qualquer fase da SPCR. O desfecho clínico do paciente depende do tempo que este permanece em isquemia, sendo que quanto menor este tempo melhor o seu prognóstico (menor dano tecidual) (Nolan *et al.*, 2008).

Como mencionado anteriormente, a síndrome se desenvolve a partir dos danos causados, ou agravados, pelo processo de isquemia e reperfusão gerados pela PCR. A lesão cerebral é uma das principais causas de mortalidade e morbidade de pacientes com SPCR, sendo que 10 a 40% dos sobreviventes permanecem com danos cerebrais significativos (Safar, 1988). Sugere-se que isso aconteça devido à alta vulnerabilidade do tecido cerebral por possuir limitada tolerância a eventos de isquemia e reperfusão (Laver *et al.*, 2004). Os mecanismos que acarretam a lesão cerebral pela SPCR incluem excitotoxicidade, alteração na homeostase do cálcio, formação de radicais livres (RL), disfunção mitocondrial, ativação de proteases, alterações na expressão de genes e ativação de vias de sinalização relacionadas à morte celular (Neumar, 2000). Muitos desses mecanismos ocorrem depois de horas ou até dias pós-RCE.

A disfunção miocárdica pós-PCR também contribui para mortalidade dos indivíduos com SPCR, sendo que a instabilidade hemodinâmica leva a falha múltipla dos órgãos (Peberdy *et al.*, 2010). Esse evento é definido como a disfunção mecânica do miocárdio que persiste depois da reperfusão, apesar da ausência de danos irreversíveis e da restauração do fluxo coronariano normal ou quase normal (Bolli, 1998). Estudos pré-clínicos e clínicos indicam que esta disfunção é responsiva a terapia (Ruiz-Bailen *et al.*, 2005). As principais hipóteses para explicar esse evento são a perda da sensibilidade dos filamentos contráteis ao cálcio e a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) durante a reperfusão, sendo que uma hipótese não exclui a outra (Bolli e Marban, 1999).

A fisiopatologia da SPCR é geralmente complicada pelas patologias agudas persistentes que causam ou contribuem para a PCR. O diagnóstico e tratamento dessas patologias como a síndrome coronariana aguda, doenças pulmonares, hemorragia, septicemia e várias outras síndromes tóxicas podem ser complicadas pela ocorrência simultânea da SPCR (Nolan *et al.*, 2008). Um estudo demonstrou que aproximadamente 50% dos pacientes que

foram vítimas de PCR apresentavam infarto agudo do miocárdio (Bulut *et al.*, 2000). Doenças pulmonares como doença pulmonar obstrutiva crônica, asma e pneumonia podem levar a PCR, e essas doenças podem piorar após o retorno da circulação (Ornato *et al.*, 1985).

Os componentes individuais desta síndrome são potencialmente tratados, sendo que intervenções terapêuticas precoces podem melhorar potencialmente seu desfecho. Por exemplo, o uso terapêutico de hipotermia induzida tem, comprovadamente, melhorado a sobrevida dos pacientes vítimas de PCR (Bernard *et al.*, 2002). O uso da reperfusão controlada com o objetivo de minimizar os danos causados pela isquemia e reperfusão também tem melhorado o prognóstico desses pacientes (Beyersdorf, 2009). Os cuidados incluem desde a reanimação do paciente, controle da reperfusão e glicemia, até a correção da causa da PCR (Oddo, Schaller *et al.*, 2006).

1.2 PROCESSO DE ISQUEMIA E REPERFUSÃO

A PCR é o mais severo estado de choque isquêmico. Os mecanismos do processo de isquemia e reperfusão não são compreendidos completamente, mas incluem sobrecarga citosólica e mitocondrial de Ca^{2+} , liberação de ERO e resposta inflamatória aguda (Dirksen *et al.*, 2007).

A reanimação cardiopulmonar reverte somente parcialmente esse processo, causando o retorno do débito cardíaco e uma taxa de liberação de oxigênio, ambos menor do que o normal e necessário para os processos fisiológicos. Durante a reanimação, ocorre um aumento compensatório de oxigênio (O_2) sistêmico e formação excessiva de produtos do metabolismo oxidativo. O acúmulo de derivados desse metabolismo leva à ativação endotelial e a inflamação sistêmica, ambos os eventos precedentes a falha múltipla dos órgãos e morte (Karimova e Pinsky, 2001). A fase inicial de RCE está associada com uma explosão de produção de ERO, ocasionando dano. Estudos em animais indicam que a hiperoxemia nos primeiros 60 minutos após a RCE causa aumento de dano oxidativo, aumento da morte neuronal e piora na recuperação pós-PCR (Neumar, 2011). Pacientes expostos a hiperoxemia na UTI apresentam pior recuperação após a PCR (Neumar, 2011). Estes dados indicam que o dano reperfusional, juntamente com o aumento da entrega de O_2 nos tecidos durante as primeiras horas pós-PCR, está associado ao aumento na produção de espécies reativas, consequência do desequilíbrio celular gerado pelas rápidas alterações metabólicas durante o processo.

A isquemia é a lesão tecidual causada pela privação de O_2 , nutrientes e remoção de metabólitos devido à interrupção do fluxo sanguíneo. Está por trás de muitas doenças, incluindo infarto do miocárdio, tromboembolismo, angina, insuficiência vascular periférica, entre outros. O músculo esquelético é mais resistente à lesão isquêmica do que o tecido cerebral (Maxwell e Lip, 1997). Os tecidos respondem a isquemia de várias formas, incluindo

o aumento da taxa de consumo de glicólise, levando a produção de lactato e, portanto, a acidose, além do decréscimo nos níveis de trifosfato de adenosina (ATP). Isso acarreta um desequilíbrio do gradiente de íons intracelulares, e o monofosfato de adenosina (AMP) formado é degradado, aumentando os níveis de hipoxantina, xantina e íons cálcio intracelular. O cálcio causa a ativação de proteinases e fosfolipases intracelulares (produção de eicosanóides) e estimula a síntese de óxido nítrico (NO^{*}) (Halliwell B, 2007). Se o período de isquemia não é longo o suficiente para lesionar o tecido irreversivelmente, a reperfusão é benéfica para o tecido. A reoxigenação abrupta que ocorre durante a reperfusão causa a geração excessiva de RL, dificultando a recuperação do órgão exposto.

Os RL causam dano direto aos tecidos através da interação com proteínas, carboidratos, lipídeos e ácidos nucleicos, levando a reação inflamatória e demais danos (Halliwell & Gutteridge, 2007). Isto dificulta a recuperação dos órgãos expostos e pode levar a disfunção múltipla dos órgãos em pacientes vítimas da SPCR. Um exemplo disso é a lesão cerebral que ocorre no momento da reperfusão quando o fluxo sanguíneo é recuperado após a PCR. Também se verifica aumento intracelular de glutamato, um neurotransmissor excitatório liberado nos terminais pré-sinápticos, o qual ativa um complexo de canais iônicos que causam a entrada de cálcio do meio extracelular para o intracelular, levando ao acúmulo de radicais livres de oxigênio e a ativação de enzimas de degradação (Oku *et al.*, 1994).

Estudos experimentais têm sugerido que as espécies reativas possuem importante papel no dano causado por processos de isquemia e reperfusão, incluindo disfunção contrátil do miocárdio e arritmias, bem como lesão pulmonar e alterações no metabolismo celular (Bolli e Patel, 1988; Jurmann *et al.*, 1990; Bolli, 1998). A resposta sistêmica a isquemia e reperfusão, além dos danos cerebrais, cardíacos e pulmonares pode causar dano intestinal, permitindo que bactérias e endotoxinas entrem na circulação, causando sepse. Também ocorre a liberação de hormônios de estresse, como catecolaminas e cortisol, e ativação da inflamação

sistêmica (Halliwell & Gutteridge, 2007). Outra manifestação da lesão reperfusional inclui a disfunção microvascular. A reperfusão causa disfunção endotelial, a qual resulta em vasoconstrição, ativação plaquetária e de leucócitos, aumento da produção de oxidantes e de extravasamento de proteínas e fluídos (Verma *et al.*, 2002).

1.3 ESTRESSE OXIDATIVO

Sugere-se que episódios de isquemia e reperfusão possam estar relacionados a reações de oxido-redução de compostos que ocasionam aumento da produção de espécies reativas, especialmente radical ânions superóxido ($O_2^{\bullet-}$), sendo que essa produção excessiva possa ser uma das causas do dano tecidual sofrido por pacientes que sofrem de eventos isquêmicos (Figura 2). Por exemplo, o tecido cerebral é um alvo por várias razões, incluindo alta concentração de lipídeos com alta probabilidade de sofrer oxidação, alto consumo de O_2 e altos níveis de ferro que sob condições patológicas age como pró-oxidante, além de reação de oxidação de dopamina e glutamato (Allen e Bayraktutan, 2009).

De uma forma mais geral, este processo em sistemas biológicos é caracterizado pela condição na qual as células são expostas a níveis excessivos de O_2 e seus derivados químicos (ERO), tornando-se incapazes de conter os efeitos deletérios destas espécies reativas por seus antioxidantes. O aumento de espécies reativas, ou a redução de defesas antioxidantes, está envolvido no processo de peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e ácidos nucleicos. O estresse oxidativo participa do processo de envelhecimento e na patogênese de várias doenças como aterosclerose, câncer, doenças neurodegenerativas e choque. Por outro lado, é importante lembrar que, as espécies reativas são produtos normais do metabolismo oxidativo e possuem um papel essencial na manutenção da vida (Halliwell & Gutteridge, 2007). Diferentes processos metabólicos dos organismos aeróbios utilizam o O_2 em reações de oxidação e redução. Um importante exemplo é a cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, onde ocorre a formação de água (H_2O) a partir da aceção de elétrons pelo oxigênio. Durante este processo, ERO podem ser liberadas, dentre elas o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o radical hidroperoxila (HO_2^{\bullet}), o radical hidroxila (OH^{\bullet}), sendo este o mais reativo em sistemas biológicos, devido a sua facilidade em ligar-se a metais, outros radicais ou qualquer molécula biológica. A formação de ERO não

gera somente prejuízo, elas são muito importantes em processos biológicos como fagocitose, regulação do crescimento celular e sinalização intra e intercelular (Halliwell & Gutteridge, 2007).

Em adição as ERO, as espécies reativas de nitrogênio (ERN) também podem ser geradas em condições fisiológicas normais e patológicas. O NO^\bullet é gerado nos tecidos pelas enzimas óxido nítrico sintase (NOSs), incluindo óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), induzível (iNOS) e endotelial (eNOS), as quais metabolizam arginina-1 a citrulina-1. NO^\bullet regula a sinalização neuronal, pressão sanguínea, relaxamento do músculo liso e resposta imune. Também é solúvel em água e lipídeos, podendo ser rapidamente difundido através do citoplasma e membrana plasmática. Estresse por nitração é o nome que se dá ao aumento da produção de ERN que pode causar alteração da estrutura e função de proteínas. Durante o processo inflamatório as células do sistema imune também produzem NO^\bullet , o qual reage com $\text{O}_2^{\bullet-}$ para produzir o ânion peroxinitrito (ONOO^-), um potente agente oxidante que causa fragmentação do DNA e peroxidação lipídica (Allen e Bayraktutan, 2009).

É necessário um equilíbrio entre espécies reativas e antioxidantes e, por isso, os organismos desenvolveram, ao longo da evolução, mecanismos de defesas antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos. As principais defesas antioxidantes enzimáticas são a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutathione peroxidase (GPx) e as peroxiredoxinas. Já os antioxidantes não-enzimáticos incluem carotenóides, flavonóides, tocoferol (Vitamina E), ácido ascórbico (Vitamina C), ácido úrico, glutathione (GSH), entre outros (Halliwell & Gutteridge, 2007). O $\text{O}_2^{\bullet-}$ sofre dismutação pela ação da SOD, gerando H_2O_2 , o qual é um produto não-radicalar, menos reativo, através da reação $\text{O}_2^{\bullet-} + e^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$. Em mamíferos, existem três diferentes isoformas da SOD: a MnSOD (mitocondrial), a CuZnSOD (citoplasmática) e ainda a EC-SOD (uma CuZnSOD extracelular). A GPx age sobre H_2O_2 e outros peróxidos (LOOH). Ela utiliza a glutathione reduzida como substrato e

forma o dipeptídeo glutationa oxidada (GSSG) através da reação $\text{LOOH} + 2\text{GSH} \rightarrow \text{GSSG} + \text{H}_2\text{O} + \text{LOH}$. A GSSG é reduzida pela glutationa redutase (GR), retomando seu estado reduzido. Existem quatro formas conhecidas de GPx, sendo que a GPx-1 é uma forma citoplasmática da enzima e a única encontrada em eritrócitos (Arthur, 2000). A CAT, através de uma reação de dismutação, converte o H_2O_2 em H_2O através da reação $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ (Halliwell & Gutteridge, 2007). As peroxiredoxinas (Prx) contituem uma família de peroxidases que reduzem H_2O_2 , hidroperóxidos orgânicos e ONOO^- . Estas enzimas são amplamente distribuídas, estando presentes em bactérias, plantas, protozoa, leveduras, mamíferos e até em anaeróbios. Existem seis isoformas já identificadas em mamíferos, sendo que em eritrócitos é a terceira proteína mais abundante. Sua atividade catalítica depende de resíduos de cisteína altamente conservados os quais reagem com peróxidos formando ácido sulfênico (Rhee e Woo, 2011).

Além das enzimas com função de detoxificação de espécies reativas e com importantes papéis no processo de isquemia e reperfusão, também existem algumas enzimas relacionadas com a produção de mais radicais. O sistema NADPH-oxidase (“*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase*”) foi sugerido como fonte de radicais em eventos de isquemia e reperfusão por estar localizado na membrana celular de fagócitos como neutrófilos, células que se encontram associadas com esses eventos. Esta enzima é uma fonte importante de RL, consumindo rapidamente o O_2 formando $\text{O}_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 . A mitocôndria é outra fonte em potencial de ERO em eventos de isquemia-reperfusão devido à fuga de ERO da cadeia transportadora de elétrons, particularmente o $\text{O}_2^{\bullet-}$. A produção de $\text{O}_2^{\bullet-}$ é favorecida em situações de disfunção mitocondrial, como, quando a concentração de O_2 é aumentada ou a cadeia transportadora de elétrons encontra-se em um estado grandemente reduzido, por exemplo, em condições de isquemia (Watanabe, Hashimoto e Tagawa, 1985).

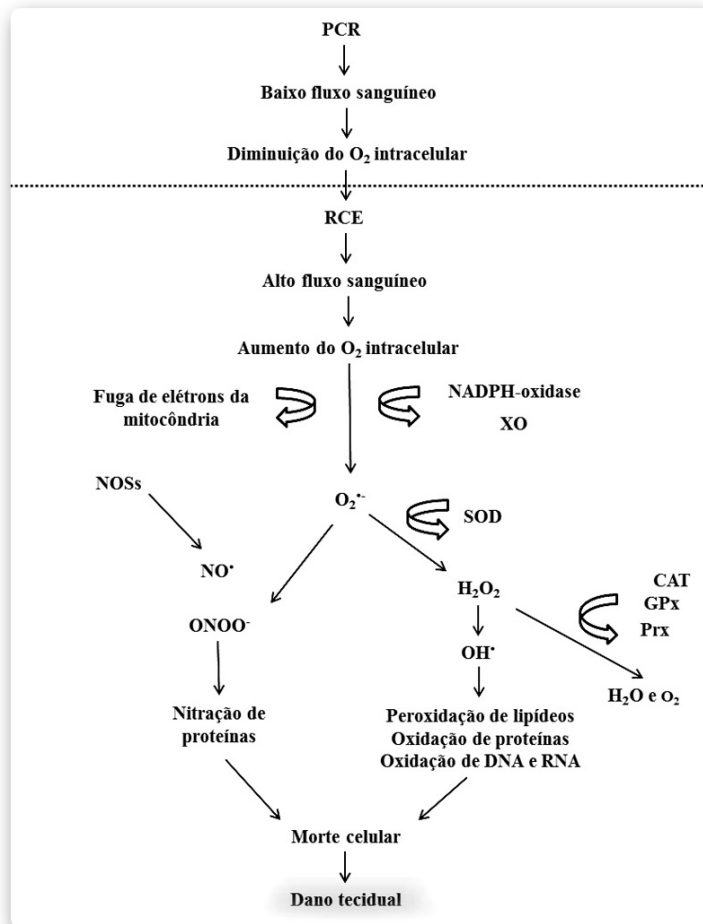


Figura 2. Esquema das principais vias de formação de espécies reativas durante o processo de isquemia/reperfusão na PCR. Explicações estão contidas no texto.

Além das enzimas já citadas, faz-se importante citar também a xantina desidrogenase (XDH)/oxidase (XO), pois são potencialmente consideradas como fonte de RL em eventos de isquemia-reperfusão. Esta enzima é sintetizada como XDH, forma mais abundante em tecidos saudáveis (90%), a qual transfere elétrons para o NAD^+ (nicotinamida adenina dinucleotídeo), oxidando a xantina ou hipoxantina em ácido úrico. Quando o tecido sofre dano (processos isquêmicos), algumas XDH são oxidadas em XO, a qual utiliza o O_2 como acceptor de elétrons em lugar do NAD^+ , gerando $\text{O}_2^{\bullet-}$. Além disso, como visto anteriormente, o consumo de ATP em tecidos hipóxicos causa o acúmulo de hipoxantina e xantina, que pode reagir com a XO gerando mais ERO. Somando-se a isso, o dano endotelial pode ocasionar a liberação de XDH que no plasma será rapidamente convertida em XO (Cuzzocrea *et al.*, 2001).

Dentre os antioxidantes não-enzimáticos destaca-se a GSH a qual é um oligopeptídeo endógeno, além de ser co-fator da GPx e glutiona S-transferase (GsT), também é o principal

composto não-enzimático antioxidante intracelular (Patterson e Rhoades, 1988). A GSH é um sequestrador de RL e xenobióticos, além de participar na regeneração dos antioxidantes ácido ascórbico e tocoferol. Sua ação como antioxidante não-enzimático está mais diretamente vinculada a sua ação sobre o H₂O₂ e peróxidos orgânicos (Monostori *et al.*, 2009). A GSH forma adutos com diferentes xenobióticos (clorofórmio, nitratos orgânicos, bromobenzeno, aflatoxina, DDT, naftaleno e paracetamol), reação esta que pode ocorrer espontaneamente ou catalizada pela família de enzimas GsT, através da reação $RX^{\bullet} + GSH \rightarrow RSG + HX$ (Halliwell & Gutteridge, 2007). Em eucariotos, existem diversas GsTs citoplasmáticas, bem como ligadas às membranas.

Alguns antioxidantes já foram utilizados como terapia em pacientes vítimas de PCR. A administração de SOD e CAT melhorou significativamente a função do miocárdio após a reperfusão (Koerner, Anderson e Dage, 1991). Quelantes de ferro e sequestradores de OH[•] também apresentaram este mesmo efeito (Bolli e Marban, 1999).

Além dessas enzimas e antioxidantes descritos aqui, existem muitos outros que podem estar envolvidos com a fisiopatologia da SPCR, os quais devem ser mais estudados para que seja possível compreender melhor os mecanismos relacionados com a SPCR e descobrir possíveis alvos de terapia e diagnóstico.

1.4 MONITORIZAÇÃO CLÍNICA

A PCR representa o mais severo estado de choque, durante o qual a entrega de oxigênio e substratos metabólicos é abruptamente interrompida e os metabólitos param de ser removidos (Nolan *et al.*, 2008). Portanto, é importante que se faça a monitorização hemodinâmica e dos níveis de marcadores fisiológicos para dirigir o tratamento e manter a estabilidade desses pacientes. Dentre as alterações relacionadas a esse processo destacam-se variações na entrega e utilização de O₂, na concentração de glicose e lactato, além da concentração de íons e marcadores inflamatórios.

A hiperglicemia é associada com uma recuperação não tão bem sucedida de pacientes que sofrem de choque isquêmico agudo (Jauch, 2011). Entre 20 e 40% dos pacientes não diabéticos admitidos com choque isquêmico encontram-se hiperglicêmicos (Baird *et al.*, 2003). Este distúrbio é comum em pacientes pós-PCR e é associado com mau prognóstico neurológico. Múltiplos mecanismos contribuem para este efeito, sugere-se que o tipo da oclusão do vaso, a presença de fluxo sanguíneo colateral e a ocorrência da reperfusão sejam relevantes e que a hiperglicemia talvez influencie no dano neuronal através da acentuada acidose tecidual e geração de lactato (Baird *et al.*, 2003). Hiperglicemia pode resultar em aumento do estresse oxidativo, especialmente quando combinada com isquemia-reperfusão. Somando-se aos mecanismos descritos anteriormente, existem alguns relacionados com o dano oxidativo, incluindo aumento de O₂^{-•}, o qual está envolvido no aumento da produção de produtos finais da glicação, aumento do metabolismo da glicose, ativação da proteína cinase C induzida por glicose e aumento do fluxo da via de hexosaminas. A exposição a altos níveis de glicose também já foi associada a aumento dos níveis de NO[•] e influencia sobre a atividade das NOSs. Além disso, durante a isquemia-reperfusão esse mecanismo pode aumentar na produção de ONOO⁻ (Bemeur, Ste-Marie e Montgomery, 2007). A medida da concentração de lactato também pode ser utilizada como marcador para se inferir sobre a entrega de

oxigênio nos tecidos e o consumo de energia nesses pacientes, sendo que processos isquêmicos podem levar a acidose (Kliegel *et al.*, 2004; Allen e Bayraktutan, 2009). Verificam-se altas concentrações de lactato logo depois da RCE em pacientes pós-PCR devido ao choque isquêmico. No entanto essa medida pode ser alta em pacientes que sofram febre convulsivante, atividade motora excessiva, insuficiência hepática e hipotermia (Kliegel *et al.*, 2004). O ambiente ácido gerado pelo acúmulo de ácido láctico pode promover um efeito pró-oxidante por aumentar a concentração de íons hidrogênio, aumentando a taxa de conversão de $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 e outras ERO (Allen e Bayraktutan, 2009).

Aproximadamente 3 horas pós-PCR as concentrações de várias citocinas, receptores solúveis e endotoxinas aumentam, e a magnitude dessas mudanças então associadas com a recuperação do paciente. Manifestações clínicas da resposta à isquemia e reperfusão incluem diminuição do volume intravascular, prejuízo da vasoregulação e entrega e utilização de O_2 , além de aumento da suscetibilidade a infecções (Nolan *et al.*, 2008).

Somando-se a saturação venosa de O_2 , a avaliação dos níveis de hemoglobina e hematócrito são determinantes para verificar a capacidade de transporte de oxigênio. Pacientes pós-PCR costumam apresentar níveis baixos de hemoglobina, o qual está associado com um mau prognóstico. Além disso, o processo inflamatório gerado pela SPCR pode levar a anemia (Nagao *et al.*, 2012).

Marcadores de dano em órgãos específicos também são utilizados para monitorar as condições do paciente. A falta de O_2 gerada pela PCR causa a ativação generalizada de vias imunológicas e de coagulação, aumentando o risco de infecções e falha múltipla dos órgãos (Nolan *et al.*, 2008), além de mudanças em medidas laboratoriais. Exemplos desses biomarcadores amplamente utilizados na prática clínica são creatinina para função renal e CK-MB para função cardíaca, e neste estudo, para função cerebral a proteína S100B. Esta última é um homodímero presente nas células da glia e de Schwann, a qual é uma proteína

ligada ao cálcio e que regula a diferenciação neuronal, crescimento e apoptose (Shinozaki *et al.*, 2009). Além disso, dados que podem ser obtidos facilmente através da gasometria, como pH, pressão de O₂ (pO₂) e gás carbônico (pCO₂), e concentração de íons (sódio, potássio, cloro e cálcio) já foram descritos como marcadores de desequilíbrio fisiológico na isquemia e reperfusão (Cho *et al.*, 2012).

Após as citações acima, podemos constatar que é necessário que mais estudos sejam realizados para elucidar os mecanismos relacionados ao estresse oxidativo que influenciam na evolução da SPCR. É importante contribuir para a evolução de terapias e a descoberta de novos marcadores de prognóstico e tratamento para pacientes que sobreviveram à PCR. Existem poucos estudos fazendo essa relação em humanos e, principalmente, abrangendo todas as fases da SPCR.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o perfil de medidas de estresse oxidativo durante a evolução da SPCR em, acompanhando pacientes pós-PCR, tratados em normotermia, desde a fase inicial (6h e 12h pós-PCR), passando pela fase intermediária (36h pós-PCR), até a fase de recuperação (72h pós-PCR) a fim de elucidar os mecanismos envolvidos. Comparar, também, as diferenças entre homens e mulheres, já que possuem comportamento diferente em diversas patologias.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Acompanhar os parâmetros citados abaixo ao longo da SPCR (6, 12, 36 e 72h pós-PCR) em pacientes pós-PCR internados na UTI do Hospital Nossa Senhora da Conceição - Grupo Hospitalar Conceição (HNSC-GHC) em Porto Alegre – RS, local onde existe uma padronização no tratamento.

Parâmetros Analisados:

- Verificar a atividade das enzimas antioxidantes SOD, GPx, GST e o consumo de H₂O₂ em eritrócitos;
- Medir os níveis dos antioxidantes glutathiona (eritrócitos) e vitamina C (soro);
- Quantificar o produto de dano oxidativo em proteínas através da carbonilação das mesmas em plasma, em lipídeos através da dosagem de malondialdeído (MDA) em soro;
- Medir indiretamente o NO[•] através da dosagem de nitritos e nitratos no plasma e em eritrócitos;
- Dosagem de um marcador de dano neuronal através da dosagem de S100B em soro;
- Analisar variáveis hemodinâmicas e marcadores fisiológicos (pH, hemoglobina, hematócrito, proteína-C reativa, glicose, lactato e eletrólitos) utilizados frequentemente na prática clínica da UTI.

3. MÉTODOS E RESULTADOS

3.1 ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo que será submetido à revista “*European Heart Journal*”.

POST-CARDIAC ARREST SYNDROME: GENDER DIFFERENCES THAT MAY
INFLUENCE THE PROGNOSIS

Tássia Machado Medeiros¹; Camile Saul Beling¹; Fernanda Schäfer Hackenhaar¹; Ana Carolina Almeida Silva¹; Fernanda Maciel Heemann¹; Cleber Verona^{1,2}; Maria Cristina Guerra⁴; Carlos Alberto Saraiva Gonçalves⁴; Vanessa Oliveira²; Diego Fontoura Mendes Ribeiro³; Mara Silveira Benfato^{1,#}

¹ Biophysics Department, Program of Cellular and Molecular Biology, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil; ² Department of Critical Care, *Grupo Hospital Conceição – Hospital Nossa Senhora da Conceição* Hospital, Brazil; ³ *Clínicas* Hospital of Porto Alegre, Brazil; ⁴ Program of Graduate in Biochemistry, Institute of Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Corresponding author: Mara Silveira Benfato, Departamento de Biofísica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, prédio 43422, room 204, Porto Alegre, RS, Brazil, 91501-970. Tel: (55-51) 33087603. Fax: (55-51) 33087003. Email mara.benfato@ufrgs.br

ABSTRACT

AIM

Post-cardiac arrest syndrome (post-CA syndrome) occurs after the CA and is a combination of organ dysfunction and systemic ischemia/reperfusion. Ischemia/reperfusion is responsible for the imbalance in redox homeostasis due to the high production of reactive species. We verified parameters of oxidative stress as oxidative stress in phases of post-CA syndrome, as well as the differences among gender.

METHODS AND RESULTS

An observational prospective cohort study was performed. Thirty patients who suffered CA were included, all treated at normothermia; of which 60% were men. Blood samples were collected four times: at 6, 12, 36, and 72 h-post CA. We analyzed parameters of oxidative stress as well as oxidative damage, enzymatic and non-enzymatic defenses. Also, biochemical parameters were analyzed such as inflammation (C-reactive protein) and brain damage (S100B protein). Acidosis (pH and lactate levels) and inflammation markers were affected. There was an increase in nitric oxide (NO[•]) level at stage 36 h to 72 h and a glutathione content decrease at stage 6 h to 36 h. There were also differences in glucose levels in women. Activities of glutathione S-transferase (GsT) at 6 to 36 h showed significant decrease. Just men showed reduced glutathione (GSSG) variations over time, first a decrease and after an increase, and the consumption of hydrogen peroxide (H₂O₂) was decreased at 36 h than 6 h. In women, NO[•] concentrations in erythrocytes was higher than in men in the period time analyzed.

CONCLUSIONS

The results indicate that the oxidative stress process acts not only in the initial phase of post-CA syndrome after the reperfusion phase, but in all phases of the syndrome. The oxidative stress process seemed unequal between men and women.

KEY WORDS

Cardiac arrest, oxidative stress, global ischemia, global reperfusion, normothermia, gender.

INTRODUCTION

Cardiac arrest (CA) is responsible for more than 350,000 sudden deaths annually in the USA and Europe.¹ The largest modern report of CA epidemiology published by the National Registry of cardiopulmonary resuscitation (CPR) stated that the in-hospital mortality rate was around 60%.² Moreover, differences between the rate of occurrence of PCR and post-PCR mortality in men and women has been reported.³

The Utstein-style definition of CA is the cessation of cardiac mechanical activity confirmed by the absence of a detectable pulse, unresponsiveness and apnea.⁴ The poor prognosis of these patients is attributed to post-cardiac arrest syndrome (post-CA syndrome), a combination of post-cardiac brain injury, circulatory dysfunction, and systemic ischemia/reperfusion response, and is often complicated by the persisting acute pathology that caused or contributed to the CA itself. Moreover, a women compared to men experienced CA.^{3, 5}

The physiological phases of post-CA syndrome could be defined in relation to time of care. The early post-CA phase could be defined as the period between 20 min and 6 – 12 h after CPR; the intermediate phase might be between 6 – 12 and 72 h.³

The mechanisms involved in this progress of post-CA syndrome remain poorly understood and the most accepted phenomenon is ischemia/reperfusion and its consequences, defined as a nonspecific acute activation of inflammatory dysfunction. Despite decades of intensive research, there is still no effective treatment for ischemia/reperfusion injury. The processes of ischemia/reperfusion are associated with the release of free radicals and acute inflammatory

response.⁶ The readmission of oxygen may contribute to reperfusion injury. These components create the potential for the free radical hypothesis.⁷

The excess of free radicals can result in oxidative stress and contribute to poor prognosis in post-CA syndrome. Ischemia/reperfusion processes can cause a cascade of events via different pathways that increase free radicals production. Some examples include the xanthine oxidase/dehydrogenase system that produces the superoxide radical ($O_2^{\bullet-}$), the NADPH oxidizing system located in phagocyte cell membranes which produces mainly hydrogen peroxide (H_2O_2), the mitochondrial electron transport chain dysfunction caused by a leak in partially reduced oxygen species, auto-oxidation of catecholamines, iron-related release free radical generation due to tissue disorganization after ischemic damage, and arachidonic acid degeneration products of content pathways intermediation in the generation of oxidizing species.⁷

Considering oxidative stress can be one of main processes involved in the evolution of post-CA syndrome due ischemic/reperfusion injury, this study examined the impact of CA and resuscitation on a panel of oxidative stress markers in blood, analyzing the oxidative stress profiles of patients who suffered CA. This study covered all phases of the syndrome, therefore, it may suggests a type of therapy or prognosis marker, and also make a link between gender differences. To our knowledge, there are no other studies which demonstrate these parameters along all of the post-CA syndrome phases, nether gender comparison.

METHODS

Patients

An observational prospective cohort study was conducted between May 2011 and October 2012. The project was approved by the institutional ethics committee, and all subjects or their relatives provided written informed consent to participate in the study. Patients referred CA

with returns of spontaneous circulation (ROSC) less than 20 min were screened in the Intensive Care Unit (ICU) and they were managed in the same way. The exclusion criteria were: an age younger than 18, trauma victims, postoperative (≤ 7 days), pregnant and terminally ill patients. A full medical history was taken from patients.

General ICU CA Support

The patients were submitted to standard care and evaluations, such as continuous electrocardiogram monitoring, oxygen saturation, temperature measurement, urine output measurement, blood glucose sampling, lactate measurement, electrolyte monitoring, complete blood count and blood sampling, as well as central venous access, urinary catheterization, invasive blood pressure measurement, mechanical ventilation, and disease-specific interventions in accordance with the patients' conditions. Drugs were administered in the ICU, according to every patient's needs, including lidocaine, amiodarone, adrenalin and atropine to control the CA; vasoactive drugs as noradrenalin and dopamine; sedative drugs were fentanyl and midazolam; bronchospasm was administered to control the aminophylline and hydrocortisone.

Laboratory Measurements

The collection of venous blood was performed 6, 12, 36, and 72 hours after the CA to follow the evolution of post-CA syndrome. Each time, approximately 10 mL samples were collected in three vials via central venous catheter, containing: one coagulation activator and two citrate tubes. Immediately after collection, the samples were centrifuged for 10 min, aliquoted into blood cells, plasma, serum, and leucocytes, stored in liquid nitrogen and after stored at -80°C . Hemolysates were prepared by lysing red blood cells with 2% ethanol (ratio 1:10) followed by centrifugation to obtain crude extract and frozen at -80°C . High-sensitive C-reactive

protein (CRP), hematocrit and hemoglobin were measured once a day, and the evaluation of arterial blood gas data, such as glucose, lactose, pH, pCO₂, pO₂, and electrolyte levels were performed at the same four moments of venous blood collection. These data were quantified in routine clinical analysis laboratory.

Markers of Oxidative and Neuronal Injury

Measurement of Carbonyl Levels in Plasma. Plasma was used to determine damage in protein through carbonyl groups.⁸ Plasma was centrifuged and incubated at 37° C for 90 min in 0.025 mL of either 2 mol/L chloridric acid (HCL) or 10 mmol/L 2,4-dinitrophenulhyzine (DNPH) in 2 mol/L HCL. 10% trichloroacetic acid was added to the samples and then centrifuged. The DNPH excess was removed with ethanol-ethyl acetate 1:1 and centrifuged. The proteins were dissolved in 6 mol/L guanidine hydrochloride and carbonyl content was quantified by spectrophotometer (370 nm). The molar absorption coefficient of hydrazone (21,000 M⁻¹ cm⁻¹) was used to calculate the carbonyl content.

Measurement of Plasma and Hemolysate Nitrite/Nitrate. The Griess reaction was employed. A standard curve was made using 1 mmol/L sodium nitrite (NaNO₂) diluted in 100 mmol/L phosphate buffer to standardize curve concentrations. The same quantity of samples and standard curve concentrations were added in the microplate followed by Griess reagent (0.02 g of naphthylenediamine dichloride, 0.2 g sulfanilamide, 500 µL of orthophosphoric acid, and 10 mL of MilliQ water) incubated during 10 min protected from light, and absorbance was read at 543 nm.^{9, 10}

Measurement of Serum Malondialdehyde (MDA). It can be measured through high-performance liquid chromatography (HPLC) in serum.¹¹ Serum samples were added to 0.1 mol/L perchloric acid, centrifuged, and used for HPLC analysis (LC-18 DB column) in a mobile phase composed of 30 mmol/L monobasic potassium phosphate-methanol (pH 3.6)

and flow rate of 1 mL/min monitored at 250 nm. Under these conditions, the retention time of MDA was around 5.0 min.

Measurement of S100B. S100B levels were determined by ELISA.¹² Samples were coated with anti-S100B monoclonal antibody (SH-B1, from Sigma) and briefly incubated for 2 hours on a microplate. Anti-S100 polyclonal antibody (from DAKO) was incubated for 30 min and then peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody was added for a further 30 min. The color reaction with o-phenylenediamine was measured at 492 nm. The standard S100B curve ranged from 0.002 to 1 ng/mL

Markers of Non-Enzymatic Antioxidants

Measurement of Total Glutathione (tGSH) and Its Redox State. Glutathione molecule (tGSH, reduced (GSH), and oxidized (GSSG)) was determined by the 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid (DTNB)-glutathione disulfide reductase recycling method. Hemolysates were centrifuged and the supernatant was pH-neutralized by adding of 2 mol/L KOH. This was centrifuged and the supernatant was added in the microplate to a mixture containing of 100 mmol/L phosphate buffer (pH 7.0), 4 mmol/L NADPH, and glutathione reductase solution (6 U/mL). After, the mix was incubated for 5 min at 37°C and DTNB reagent (5 mmol/L in phosphate buffer, pH 7.0) was added, and read at 412 nm after 2 min incubation at 37°C. To discriminate GSH from the GSSG form, N-ethylmaleimide (0.25 mmol/L was added to the samples.¹³

Measurement of Serum Vitamin C. The assay to measure Vitamin C levels was performed by HPLC simultaneously with the MDA assay.¹¹ Under these conditions, the retention time of Vitamin C was around 2.5 min.

Markers of Enzymatic Defenses

Superoxide Dismutase (SOD) Activity. The SOD activity was measured in erythrocyte haemolysates using RanSOD® (Randox) Kit. The assay principle is based on the reaction of xanthine-xanthine oxidase, to form a superoxide radical, which reacts with 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazolium chloride (I.N.T) to form a red formazan dye. We measured the inhibition degree of this reaction using a spectrophotometer.

Consumption of H₂O₂. The following was introduced into a quartz cuvette: 2.8 mL phosphate buffer 100 mmol/L, pH 7.4, 100 µL of 300 mmol/L H₂O₂. The reaction was started with the addition of haemolysates. The consumption of H₂O₂ was determined with a spectrophotometer, where we monitored the disappearance of H₂O₂ at 240 nm.¹³

Glutathione S-transferase (GsT) Activity. GsT activity was measured by the formation of S-(2,4-dinitrophenyl)-glutathione by GsT enzymatic activity through 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) and GSH conjugation.¹³ Briefly, hemolysates were centrifuged and in the cuvette potassium phosphate (pH 6.5), 10 mmol/L GSH was added to the sample, and 10 mmol/L CDNB (in 2 ethanol:3 water, at 37°C). Absorbance was determined at 340 nm. GsT activity was defined as the capacity of the enzyme to produce the conjugated ($\epsilon=9,600\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Data Normalization

All results were normalized against the total protein concentration (method of Bradford) using BSA as a standard.¹⁴ All assays were independently performed in triplicate.

Chemicals

All chemicals were purchased from Sigma Chemical (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA).

Statistical Analysis

A comparison of the variables over time (6, 12, 36, and 72h post-CA) was performed by the method of generalized estimating equations (GEE). Bonferroni pair wise was used to verify difference between times. Robust estimator and unstructured matrix were used and the variables were adjusted by age and gender. Normal variable distribution (carbonyl) was analyzed with linear link function and non-normal variables distribution with gamma and logarithmic links. The same test was performed comparing men and women. All analyses were performed at a 0.05 level of significance. A software package was used for all calculations (SPSS version 18.0.0, SPSS, Chicago, IL, USA).

RESULTS

Thirty patients were included in the study and just eighteen survived until the first 72 hours post-CA (Table 1). The average age of all subjects was 62.5 years and 60% were men. The main causes of CA in patients included in the study were cardiovascular diseases (such as acute myocardial infarction, ischemic stroke, and thromboembolism), infectious diseases and a cancer patient, totaling about 80% of the sample.

Table 1 shows the clinical and anthropometric characteristics of patients. The first patient temperature measurement was lower in comparison to measurement at the last moment (6 to 72 h post-CA). pH levels found were below normal, except in the second phase, and lactate levels were higher than normal at all times (less than 2.5 mmol/L). Furthermore, CRP was higher than normal at all times (less than 5 mg/L) and increased from the first to the second day. Hemoglobin levels (normal levels in men 13.5 – 18 g/dL and women 11.5 – 16.4 g/dL) decreased between the first and the fourth day, showing us an increased inflammatory process. The sodium levels also showed alterations between the first and last phases (normal level 135 to 145 mEq/L).

Table 2 shows markers of oxidative and neuronal damage (S100B) and antioxidant defenses. Indirect measurements of NO[•] concentrations in erythrocytes showed higher level at 72 h post-CA than 36 h post-CA. The glutathione content (tGSH, GSH, and GSSG) appeared lower at the third phase in comparison with the first. GsT activity was higher at 72 h than 36 h post-CA.

Differences in gas and metabolites parameters between genders are showed in Table 3, as well as oxidative stress and neurological damage markers in Table 4. Glucose in women at 72 h post-CA was higher than at other times (moderate values - 108 to 144 mg/dL)¹⁵ and also higher than the men at the same moment. In men, sodium levels were greater at 6 than 72 h post-CA. Women showed an increase of potassium during the second to last phase (normal levels 3.5 to 5.5 mEq/L), although the parameters are within physiological levels.

In Table 4, NO[•] concentrations in erythrocytes in women had higher levels than in men at 6 h post-CA. Men showed differences just in GSSG values but not in tGSH and GSH values. GSSG values were lower at 36 h post-CA phases than at any other period analyzed.

Consumption of H₂O₂ was less at 36 h than 6 h post-CA in men.

DISCUSSION

This study observed the impact of oxidative stress and metabolic features for a considerable period of time. Important differences in parameters were found, including differences between men and women. These changes were expected due to the large impact on normal physiological conditions by CA, as described before.

Considering that all patients were treated in normothermia, most part of them decreases within the first hours.¹⁶ In accordance, we showed that the patients of this study had lower temperature in the first hours following the event (Table 1). Temperatures above 37.8°C were indicative of a deleterious outcome and hypothermia has been used as treatment for CA.¹⁷

During ischemia, the products of anaerobic metabolism accumulate in tissues and metabolic acidosis develops. Patients who are resuscitated maintain metabolic acidosis for considerably longer.¹⁸ In addition, lactate concentrations are elevated early after ROSC because of total ischemia. Kliegel et al. showed that lactate levels higher than 2 mmol/L at 48 h post-CA is a predictor of a poor prognostic and unfavorable neurologic outcome.¹⁹ Our data showed that lactate levels were around 4.0 mmol/L and pH also showed acidosis. The acidic environment promotes a pro-oxidant effect by increasing hydrogen concentrations, enhancing the rate of conversion of $O_2^{\bullet-}$ to H_2O_2 .⁷

The role of hemoglobin in CA remains unclear. A study correlating the hemoglobin level and neurological outcome showed that higher hemoglobin levels were associated with a favorable short-term neurologic outcome.²⁰ However, inflammatory diseases lead to anemia of inflammation.²¹ Our study demonstrated lower hemoglobin levels in the last day than the first. This event can be explained by the fact that CRP, a secondary marker of inflammation, increases significantly from the first to the second day, although it is much higher than normal values. Inflammation can influence the release of iron stores, thereby decreasing iron availability.²² It is important to observe that these patients were undergoing a hemodilution process by saline infusion.

Initial ROSC is associated with a burst of reactive oxygen species (ROS) production, and it is theorized that this is a critical time when exacerbated oxidative cell injury occurs.²³ In contrast, the majority of studies analyzing animals or patients until 24 h or 48 h post-CA tend to make this association with the final stage of post-CA syndrome. A study using plasma of post-CA patients at 12, 24, 36, 48 and 72 h to induce toxicity in vein endothelial cells showed levels of intracellular $O_2^{\bullet-}$ with plasma collected at 12 h post-CA and the toxicity was most pronounced in the first 24 h post-CA than at subsequent times.²⁴

Patients who died soon after 6 h post-PCR (n=2) were S100B (a protein marker brain injury) values higher (mean 4.5 ng/mL) than the average at other times (mean: 0.53 ng/mL at 6 h post-CA, 0.36 ng/mL at 12 h post-CA, 0.47 ng/mL at 36 h post-CA, and 0.43 ng/mL at 72 h post-CA). Whereas the normal values are around 0.04 ng/mL,¹² our patients had values ten times higher than normal (Table 2). S100B is found in especially high concentrations in astroglial cells. These cells are structurally damaged and the blood-brain-barrier integrity is impaired, S100B is released quite rapidly into the cerebrospinal fluid and secondarily into the circulation.²⁵ The increase of S100B after acute ischemic stroke reaches its maximum 2-3 days after event; this is in agreement with our data. After hypoxic brain damage due to accidental CA, the S100B peak was reported to occur within 2-24 hours.²⁶

NO^\bullet is a potent vasodilator, and can be protective or deleterious depending on the cell type and the degree of ischemia. This molecule can react with $\text{O}_2^{\bullet-}$ to form peroxynitrite (ONOO^-), thereby preventing $\text{O}_2^{\bullet-}$ from reacting with other radicals or attacking cellular components. In excess, ONOO^- can describe an oxidant role, and circulatory shock, such as ischemia/reperfusion, is a perfect condition to enhance the production of ONOO^- .²⁷ ONOO^- has several mechanisms of toxicity in shock, one of these includes its ability to rapidly oxidize GSH.²⁷ This may be one of the causes that we found for the depletion of glutathione contents in erythrocytes (Table 2). A study that induced CA in dogs showed a 50% decline in GSH/GSSG on left ventricle in the first 25 min of ROSC.²⁸ The most relevant redox system inside cells used GSH/GSSG turnover to detoxify reactive species and xenobiotics, as GPx and GsT.²⁹ Erythrocytes contain all enzymes necessary for GSH biosynthesis and both GSSG and glutathione conjugates are actively exported outside of erythrocytes when their intracellular concentration is high and also to combat oxidative stress in plasma.³⁰ In erythrocytes, NO^\bullet and hemoglobin can interact. NO^\bullet rapidly reacts with oxyhemoglobin to

form nitrate and methemoglobin or desoxyhemoglobin to produce hemoglobin(II)NO.³¹ GsT has been proposed as a marker of acute mesenteric ischemia measured by an immunoassay.³² We also compared men and women due to limited studies on ischemic tolerance in female and males. Female and male sexes react differently to CA. The female sex is associated with lower incidences of CA,³³ although some studies found the female sex to be associated with a slight improvement in survival after CA.^{34,35} It is worth adding our observation that oxidative stress does not occur the same way in men as in women.³⁶ In vascular disease gender differences are documented. The why is unclear, but recent evidence suggests that oxidative stress may play a role in this difference.³⁷ Furthermore, estrogen may exert direct anti-oxidant effects by normally suppressing ROS production and testosterone oxidant effects,²⁹ but the greater part of women in this study are postmenopausal (greater than 50 and 55 years – Table 3).

A study similar to ours, but in dogs, compared differences at 24 h post-CA between sexes and did not find differences in physiological markers, except that plasma glucose levels in females were lower.³⁸ In our study, glucose levels showed changes in women (Table 3) and glucose levels were higher in women than men at the last phase. Hyperglycemia is common in post-CA patients and is associated with poor neurological outcome,³ and it is viable to attribute this to the formation of free radicals,³⁹ but no significant differences in damage markers were found in women. The study in dogs did not find differences in MDA and GSH levels.³⁸ Similarly, we also did not find differences in these parameters, but GSSG showed increases and decreases in levels over time in men (Table 4). GsT that exhibited difference of activity along time uses the turnover GSH/GSSG to detoxify the environment, as well as some enzymes represented consumption of H₂O₂.²⁹ However, we did not verify difference in SOD activity, the important enzyme that catalyzes the dismutation of O₂^{•-} to H₂O₂ and O₂.²⁹ These results can be an indication that the formation of H₂O₂ and detoxification of undesirable

substances may have a greater impact on the evolution of the post-CA syndrome than $O_2^{\bullet-}$. Another hypothesis to explain the changes in the activities of enzymes is that there is possibly an inactivation in erythrocytes. Peroxiredoxins are also inactivated during catalysis due to hiperoxidation of the cysteine residue in active sites and it is also able to detoxify $ONOO^-$,⁴² as well as catalase by hydroxyl radicals and $O_2^{\bullet-}$.^{43,44} In a proteomic cardiac study in ischemic myocardial in rats demonstrated important changes in proteins, including the GsT.⁴⁵

CONCLUSION

In this report, we demonstrate that changes in oxidative stress and metabolic profile do not happen only in initial phases, but also along all phases of post-CA syndrome. The poor prognosis of patients who develop post-CA syndrome occurs largely due to the higher production of reactive species during of ischemic/reperfusion process. The higher level of NO^{\bullet} and consumption of the main antioxidant molecule in erythrocytes may have a part in this pathological process. The differences between men and women found in this study constitute more evidence that the CA response is unequal between both genders.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Conflict of interest: none declared.

REFERENCES

1. Lloyd J. Heart Disease and Stroke Statistics-2009 Update: A Report From the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee (vol 119, pg e21, 2009). *Circulation* 2011;124:E424-E424.
2. Nadkarni VM, Larkin GL, Peberdy MA, Carey SM, Kaye W, Mancini ME, et al. First documented rhythm and clinical outcome from in-hospital cardiac arrest among

- children and adults. *Jama-Journal of the American Medical Association* 2006;295:50-57.
3. Nolan JP, Neumar RW, Adrie C, Aibiki M, Berg RA, Bottiger BW, et al. Post-cardiac arrest syndrome: Epidemiology, pathophysiology, treatment, and prognostication A Scientific Statement from the International Liaison Committee on Resuscitation; the American Heart Association Emergency Cardiovascular Care Committee; the Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia; the Council on Cardiopulmonary, Perioperative, and Critical Care; the Council on Clinical Cardiology; the Council on Stroke. *Resuscitation* 2008;79:350-379.
 4. Cummins RO, Chamberlain D, Hazinski MF, Nadkarni V, Kloeck W, Kramer E, et al. Recommended guidelines for reviewing, reporting, and conducting research on in-hospital resuscitation: The in-hospital "Utstein style". *Academic Emergency Medicine* 1997;4:603-627.
 5. Ornato JP, Peberdy MA, Tadler SC, Strobos NC. Factors associated with the occurrence of cardiac arrest during hospitalization for acute myocardial infarction in the second national registry of myocardial infarction in the US. *Resuscitation* 2001;48:117-123.
 6. Dirksen MT, Laarman GJ, Simoons ML, Duncker DJGM. Reperfusion injury in humans: A review of clinical trials on reperfusion injury inhibitory strategies. *Cardiovascular Research* 2007;74:343-355.
 7. Maxwell SRJ, Lip GYH. Reperfusion injury: A review of the pathophysiology, clinical manifestations and therapeutic options. *International Journal of Cardiology* 1997;58:95-117.
 8. Levine RL. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radical Biology and Medicine* 2002;32:790-796.
 9. Grisham MB, Johnson GG, Lancaster JR. Quantitation of nitrate and nitrite in extracellular fluids. *Nitric Oxide, Pt a - Sources and Detection of No; No Synthase* 1996;268:237-246.
 10. Bryan NS, Grisham MB. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. *Free Radical Biology and Medicine* 2007;43:645-657.
 11. Karatepe M. Simultaneous determination of ascorbic acid and free malondialdehyde in human serum by HPLC-UV. *Lc Gc North America* 2004:104-106.
 12. Leite MC, Galland F, Brolese G, Guerra MC, Bortolotto JW, Freitas R, et al. A simple, sensitive and widely applicable ELISA for S100B: Methodological features of the measurement of this glial protein. *Journal of Neuroscience Methods* 2008;169:93-99.
 13. Kondo T, Awada F. Experimental Protocols for Reactive Oxygen and Nitrogen Species. In: Taniguchi, N., Gutteridge, J.M.C. ed. Oxford: Oxford University Press; 2000:57-60.
 14. Bradford MM. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 1976;72:248-254.
 15. Oksanen T, Skrifvars MB, Varpula T, Kuitunen A, Pettila V, Nurmi J, et al. Strict versus moderate glucose control after resuscitation from ventricular fibrillation. *Intensive Care Medicine* 2007;33:2093-2100.
 16. Langhelle A, Tyvold SS, Lexow K, Hapnes SA, Sunde K, Steen PA. In-hospital factors associated with improved outcome after out-of-hospital cardiac arrest. A comparison between four regions in Norway. *Resuscitation* 2003;56:247-263.

17. Holzer M, Cerchiari E, Martens P, Roine R, Sterz F, Eisenburger P, et al. Mild therapeutic hypothermia to improve the neurologic outcome after cardiac arrest (vol 346, pg 549, 2002). *New England Journal of Medicine* 2002;346:1756-1756.
18. Negovsky VA. The second step in resuscitation-the treatment of the post-resuscitation disease (Reprinted from Resuscitation, vol 1, pg 1-7, 1972). *Resuscitation* 2012;83:1187-1190.
19. Kliegel A, Losert H, Sterz F, Holzer M, Zeiner A, Havel C, et al. Serial lactate determinations for prediction of outcome after cardiac arrest. *Medicine* 2004;83:274-279.
20. Nagao K, Kikushima K, Sakamoto T, Koseki K, Igarashi M, Ishimatsu S, et al. Relationship between the hemoglobin level at hospital arrival and post-cardiac arrest neurologic outcome. *American Journal of Emergency Medicine* 2012;30:770-774.
21. Handelman GJ, Levin NW. Iron and anemia in human biology: a review of mechanisms. *Heart Failure Reviews* 2008;13:393-404.
22. Gabay C. Mechanisms of disease - Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation (vol 340, pg 448, 1999). *New England Journal of Medicine* 1999;340:1376-1376.
23. Neumar RW. Optimal oxygenation during and after cardiopulmonary resuscitation. *Current Opinion in Critical Care* 2011;17:236-240.
24. Huet O, Dupic L, Batteux F, Matar C, Conti M, Chereau C, et al. Postresuscitation syndrome: Potential role of hydroxyl radical-induced endothelial cell damage. *Critical Care Medicine* 2011;39:1712-1720.
25. Haimoto H, Hosoda S, Kato K. Differential distribution of immunoreactive s100-alpha and s100-beta proteins in normal nonnervous human-tissues. *Laboratory Investigation* 1987;57:489-498.
26. Rothermundt M, Peters M, Prehn JHM, Arolt V. S100B in brain damage and neurodegeneration. *Microscopy Research and Technique* 2003;60:614-632.
27. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiological Reviews* 2007;87:315-424.
28. Sharma AB, Sun J, Howard LL, Williams AG, Jr., Mallet RT. Oxidative stress reversibly inactivates myocardial enzymes during cardiac arrest. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 2007;292:H198-H206.
29. Halliwell B GJ. Free Radicals in Biology and Medicine. 3rd. New York: Oxford University Press, 2007.
30. Giustarini D, Milzani A, Dalle-Donne I, Rossi R. Red blood cells as a physiological source of glutathione for extracellular fluids. *Blood Cells Molecules and Diseases* 2008;40:174-179.
31. Romero JC, Reckelhoff JF. Role of angiotensin and oxidative stress in essential hypertension. *Hypertension* 1999;34:943-949.
32. Delaney CP, O'Neill S, Manning F, Fitzpatrick JM, Gorey TF. Plasma concentrations of glutathione S-transferase isoenzyme are raised in patients with intestinal ischaemia. *British Journal of Surgery* 1999;86:1349-1353.
33. Wigginton JG, Pepe PE, Bedolla JP, DeTamble LA, Atkins JM. Sex-related differences in the presentation and outcome of out-of-hospital cardiopulmonary arrest: A multiyear, prospective, population-based study. *Critical Care Medicine* 2002;30:S131-S136.
34. Vukmir RB, Sodium Bicarbonate Study G. Prehospital cardiac arrest and the adverse effect of male gender, but not age, on outcome. *Journal of Womens Health* 2003;12:667-673.

35. Vukmir RB, Sodium Bicarbonate Study G. Prehospital cardiac arrest and the adverse effect of male gender on outcome. *Critical Care Medicine* 1999;27:A82-A82.
36. Malorni W, Campesi I, Straface E, Vella S, Franconi F. Redox features of the cell: A gender perspective. *Antioxidants & Redox Signaling* 2007;9:1779-1801.
37. Miller AA, De Silva TM, Jackman KA, Sobey CG. Effect of gender and sex hormones on vascular oxidative stress. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 2007;34:1037-1043.
38. Zwemer CF, Oconnor EM, Whitesall SE, Dalecy LG. Gender differences in 24-hour outcome following resuscitation after 9 minutes of cardiac arrest in dogs. *Critical Care Medicine* 1997;25:330-338.
39. Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: A review. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 2003;17:24-38.
40. Blum J, Fridovich I. Inactivation of glutathione-peroxidase by superoxide radical. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1985;240:500-508.
41. Low FM, Hampton MB, Winterbourn CC. Peroxiredoxin 2 and peroxide metabolism in the erythrocyte. *Antioxidants & Redox Signaling* 2008;10:1621-1629.
42. Yang KS, Kang SW, Woo HA, Hwang SC, Chae HZ, Kim K, et al. Inactivation of human peroxiredoxin I during catalysis as the result of the oxidation of the catalytic site cysteine to cysteine-sulfinic acid. *Journal of Biological Chemistry* 2002;277:38029-38036.
43. Pigeolet E, Corbisier P, Houbion A, Lambert D, Michiels C, Raes M, et al. Glutathione-peroxidase, superoxide-dismutase, and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free-radicals. *Mechanisms of Ageing and Development* 1990;51:283-297.
44. Lardinois OM, Mestdagh MM, Rouxhet PG. Reversible inhibition and irreversible inactivation of catalase in presence of hydrogen peroxide. *Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology* 1996;1295:222-238.
45. Li X, Arslan F, Ren Y, Adav SS, Poh KK, Sorokin V, et al. Metabolic Adaptation to a Disruption in Oxygen Supply during Myocardial Ischemia and Reperfusion Is Underpinned by Temporal and Quantitative Changes in the Cardiac Proteome. *Journal of Proteome Research* 2012;11:2331-2346.

Table 1. Baseline characteristics of all patients.

Characteristics	6 h post-CA (n = 30)	12 h post-CA (n = 28)	36 h post-CA (n = 23)	72 h post-CA (n = 18)
Age (years)	62.4 ± 3.3	62.9 ± 3.5	64.1 ± 4.2	65.8 ± 4.7
Male gender (%)	60	57.1	60.9	61.1
Cardiac Diseases (%)	33.3	35.7	34.8	61.1
Infection Diseases (%)	46.7	42.8	39.1	38.9
Temperature (°C)	35.2 ± 0.3 ^a	35.5 ± 0.3	35.8 ± 0.5	36.1 ± 0.1 ^a
Arterial gas parameters				
pH	7.31 ± 0.02 ^a	7.37 ± 0.02 ^{a,b}	7.30 ± 0.03 ^b	7.31 ± 0.03
pO ₂ (mmHg)	139.5 ± 14.7	111.1 ± 11.7	104.8 ± 6.4	99.5 ± 25.4
pCO ₂ (mmHg)	34.7 ± 1.9	32.8 ± 1.9	36.1 ± 1.9	34.9 ± 2.5
Biochemical results				
Hemoglobin (g/dL)		9.33 ± 0.51 ^a	8.52 ± 0.40	8.21 ± 0.37 ^a
Hematocrit (%)		27.94 ± 1.82	26.08 ± 1.16	25.54 ± 1.07
CRP (mg/L)		120.68 ± 23.59 ^a	176.84 ± 37.39 ^a	150.39 ± 46.82
Glucose (mg/dL)	144.9 ± 20.4	131.6 ± 22.9	126.4 ± 16.8	148.1 ± 35.1
Lactate (mmol/L)	4.40 ± 0.72	4.10 ± 0.93	3.96 ± 1.01	4.05 ± 0.76
Biochemical results				
Sodium (mEq/L)	136.8 ± 1.7 ^a	135.8 ± 1.6	133.5 ± 1.6	133.4 ± 2.0 ^a
Potassium (mEq/L)	3.65 ± 0.34	3.46 ± 0.25	3.57 ± 0.18	3.79 ± 0.28
Chlorine (mEq/L)	90.83 ± 11.41	109.51 ± 3.19	104.99 ± 4.69	103.44 ± 4.75
Calcium (mmol/L)	1.05 ± 0.02	1.05 ± 0.03	1.05 ± 0.04	1.02 ± 0.05

Data are given as mean ± SE unless otherwise noted. pO₂: oxygen pressure; pCO₂: gas carbonic pressure; CRP: C-reactive protein; % of patients included in cardiac and infection diseases and male gender were calculated with reference to the total number of individuals included in each time. CRP, hematocrit and hemoglobin were measured once per day. ^a denotes significant difference ($p \leq 0.05$) between: 6 and 72 h post-CA for temperature; 6 and 12 h post-CA for pH; first two times and 72 h post-CA for hemoglobin; first two times and 36 h post-CA for CRP; and 6 and 72 h post-CA for sodium. ^b denotes significant difference ($p \leq 0.05$) between: 12 and 36 h post-CA for pH. Normal reference values mentioned in the text are in accordance with those provided by the hospital.

Table 2. Blood biomarkers of oxidative stress and neuronal injury.

Biomarkers	6 h post-CA (n = 30)	12 h post-CA (n = 28)	36 h post-CA (n = 23)	72 h post-CA (n = 18)
Damage				
Carbonyl (nmol/mg prot.)	0.015 ± 0.0014	0.012 ± 0.0016	0.014 ± 0.0015	0.017 ± 0.0022
MDA (µg/L)	331.3 ± 90.1	247.8 ± 58.5	353.2 ± 101.4	713.2 ± 389.6
S100B (ng/mL)	0.53 ± 0.23	0.36 ± 0.16	0.47 ± 0.19	0.43 ± 0.19
Erythrocytes Nitrite/Nitrate (nmol/mg prot.)	350.79 ± 47.36	365.21 ± 53.71	313.46 ± 49.68 ^a	376.69 ± 63.04 ^a
Plasma Nitrite/Nitrate (pmol/mg prot.)	0.232 ± 0.050	0.241 ± 0.050	0.189 ± 0.040	0.165 ± 0.038
Non-Enzymatic Defenses				
tGSH (µmol/mg prot.)	1217.8 ± 132.1 ^a	1590.9 ± 461.2	932.6 ± 139.9 ^a	1063.9 ± 173.1
GSH (µmol/mg prot.)	1070.1 ± 113.0 ^a	1411.9 ± 430.0	821.3 ± 122.9 ^a	919.7 ± 150.5
GSSG (µmol/mg prot.)	148.3 ± 21.8 ^a	179.2 ± 33.8	112.8 ± 18.6 ^a	135.2 ± 23.8
Vitamin C (mg/L)	8.52 ± 3.03	9.35 ± 3.63	6.81 ± 2.31	4.59 ± 1.87
Enzymatic Defenses				
SOD (U/mg prot.)	2.63 ± 0.29	5.01 ± 2.63	2.19 ± 0.22	2.09 ± 0.27
Consumption of H ₂ O ₂ (U/mg prot.)	50.11 ± 4.58	52.58 ± 5.01	45.46 ± 6.07	44.82 ± 5.96
GsT (U/mg prot.)	27.51 ± 2.77 ^a	30.92 ± 5.63	19.16 ± 2.83 ^a	26.14 ± 3.52

Data are given as mean ± SE unless otherwise noted. MDA: Malondialdehyde; S100B: marker of neuronal damage; tGSH: total glutathione; GSH: reduced glutathione; GSSG: oxidized glutathione; SOD: superoxide dismutase activity; and GsT: glutathione S-transferase activity. ^a denotes significant difference ($p \leq 0.05$) between: 36 and 72 h post-CA for erythrocytes nitrite/nitrate; 6 and 36 h post-CA for tGSH, GSH, and GSSG; and 6 h and 36 h post-CA for GsT.

Table 3. Gas and metabolites parameters between men and women.

Characteristics	6 h post-CA		12 h post-CA		36 h post-CA		72 h post-CA	
	Men (n=18)	Women (n=12)	Men (n=16)	Women (n=12)	Men (n=14)	Women (n=9)	Men (n=11)	Women (n=7)
Age (years)	63.3 ± 4.5	61.2 ± 4.5	64.6 ± 4.5	61.3 ± 0.24	65.0 ± 4.8	63.1 ± 4.6	66.1 ± 5.8	65.6 ± 5.4
Arterial gas parameters								
pH	7.31 ± 0.02	7.32 ± 0.03	7.35 ± 0.03	7.40 ± 0.02	7.27 ± 0.04	7.32 ± 0.05	7.30 ± 0.03	7.34 ± 0.04
pO ₂ (mmHg)	114.4 ± 14.2	167.4 ± 28.1	120.8 ± 16.3	103.9 ± 15.6	108.7 ± 8.6	97.1 ± 8.3	94.9 ± 18.3	100.7 ± 30.6
pCO ₂ (mmHg)	35.2 ± 2.07	35.01 ± 3.37	34.02 ± 3.37	32.24 ± 2.36	38.69 ± 3.85	33.61 ± 1.35	39.12 ± 4.52	32.08 ± 2.91
Biochemical results								
Hemoglobin (g/dL) (same values to 6 and 12h)	8.53 ± 0.47	10.27 ± 0.88	-	-	8.11 ± 0.41	9.41 ± 0.69	8.23 ± 0.35	8.15 ± 1.33
Hematocrit (%) (same values to 6 and 12h)	25.03 ± 2.31	31.38 ± 2.54	-	-	25.43 ± 1.32	28.29 ± 1.87	27.48 ± 1.46	24.66 ± 3.67
CRP (mg/L) (same values to 6 and 12h)	105.8 ± 29.2	120.6 ± 23.2	-	-	178.1 ± 44.9	166.9 ± 34.4	160.2 ± 30.5	144.5 ± 16.8
Glucose (mg/dL)	141.5 ± 16.5	185.3 ± 28.8 ^a	122.9 ± 14.5	156.5 ± 14.9 ^b	134.1 ± 12.6	131.9 ± 12.2 ^c	111.4 ± 29.9 ^d	262.7 ± 23.3 ^{a,b,c,d}
Lactate (mmol/L)	4.38 ± 1.06	4.40 ± 1.19	4.40 ± 1.35	2.99 ± 0.91	4.46 ± 1.47	2.81 ± 0.85	4.71 ± 1.33	3.69 ± 0.99
Electrolytes								
Sodium (mEq/L)	135.1 ± 2.1 ^a	138.7 ± 1.93	134.2 ± 1.8	137.8 ± 1.4	133.5 ± 1.8	134.9 ± 2.5	130.3 ± 1.6 ^a	136.6 ± 2.9
Potassium (mEq /L)	3.42 ± 0.31	3.89 ± 0.71	3.47 ± 0.25	3.46 ± 0.57 ^a	3.75 ± 0.21	3.48 ± 0.38	3.34 ± 0.23	4.24 ± 0.57 ^a
Chlorine (mEq /L)	85.16 ± 4.15	96.67 ± 17.48	108.10 ± 3.40	111.69 ± 6.31	105.47 ± 3.74	103.94 ± 8.85	103.96 ± 4.24	104.23 ± 13.06
Calcium (mmol/L)	1.01 ± 0.03	1.08 ± 0.03	1.05 ± 0.05	1.04 ± 0.03	1.04 ± 0.07	1.05 ± 0.05	1.04 ± 0.06	1.00 ± 0.06

Data are given as mean ± SE unless otherwise noted. pO₂: oxygen pressure; pCO₂: gas carbonic pressure; CRP: C-reactive protein. To hemoglobin, hematocrit, and CRP the measurements were performed once a day. ^adenotes significant difference ($p \leq 0.05$) between: 6 and 72 h post-CA in women for glucose; 6 and 72 h post-CA in men for sodium; and 12 and 72 h post-CA in women for potassium. ^bdenotes significant difference ($p \leq 0.05$) between: 12 and 72 h post-CA in women for glucose. ^cdenotes significant difference ($p \leq 0.05$) between: 36 and 72 h post-CA in women for glucose. ^ddenotes significant difference ($p \leq 0.05$) between: men and women at 72 h post-CA for glucose. Normal reference values mentioned in the text are in accordance with those provided by the hospital.

Table 4. Blood biomarkers of oxidative stress and neuronal injury between men and women.

Biomarkers	6 h post-CA		12 h post-CA		36 h post-CA		72 h post-CA	
	Men (n=18)	Women (n=12)	Men (n=16)	Women (n=12)	Men (n=14)	Women (n=9)	Men (n=11)	Women (n=7)
Damage								
Carbonyl (nmol/mg prot.)	0.015 ± 0.002	0.015 ± 0.002	0.013 ± 0.003	0.012 ± 0.001	0.012 ± 0.002	0.016 ± 0.002	0.013 ± 0.002	0.021 ± 0.003
MDA (µg/L)	282.2 ± 200.5	486.5 ± 259.9	268.4 ± 153.6	327.0 ± 196.8	446.8 ± 218.8	343.3 ± 195.8	1193.5 ± 609.6	569.2 ± 239.0
S100B (ng/mL)	0.67 ± 0.42	0.42 ± 0.23	0.69 ± 0.42	0.20 ± 0.15	0.82 ± 0.44	0.29 ± 0.15	0.75 ± 0.43	0.26 ± 0.18
Erythrocytes Nitrite/Nitrate (nmol/mg prot.)	266.86 ± 51.86 ^a	459.30 ± 75.57 ^a	323.14 ± 69.78	430.30 ± 79.68	252.65 ± 67.21	410.07 ± 68.49	295.33 ± 85.01	473.07 ± 90.92
Plasma Nitrite/Nitrate (pmol/mg prot.)	0.239 ± 0.034	0.183 ± 0.033	0.228 ± 0.043	0.215 ± 0.052	0.143 ± 0.027	0.165 ± 0.291	0.181 ± 0.040	0.189 ± 0.048
Non-Enzymatic Defenses								
tGSH (µmol/mg prot.)	1123.6 ± 161.8	1330.1 ± 203.8	1204.3 ± 202.1	1064.9 ± 203.2	821.8 ± 158.5	1026.2 ± 183.7	1294.8 ± 283.3	894.2 ± 127.1
GSH (µmol/mg prot.)	972.5 ± 139.2	1177.1 ± 169.4	1034.4 ± 172.7	935.1 ± 182.2	722.3 ± 139.5	895.4 ± 158.9	1115.3 ± 247.8	782.9 ± 111.6
GSSG (µmol/mg prot.)	151.1 ± 25.2 ^b	152.9 ± 36.7	169.9 ± 129.7 ^c	129.7 ± 23.8	99.5 ± 21.8 ^{b,c,d}	130.8 ± 29.3	179.5 ± 37.5 ^d	111.3 ± 23.5
Vitamin C (mg/L)	6.66 ± 1.59	8.79 ± 3.59	6.76 ± 1.79	10.66 ± 4.92	7.01 ± 1.43	6.45 ± 1.14	6.87 ± 1.72	5.10 ± 2.29
Enzymatic Defenses								
SOD (U/mg prot.)	2.75 ± 0.33	2.23 ± 0.21	2.65 ± 0.25	2.08 ± 0.15	2.09 ± 0.14	2.34 ± 0.25	2.59 ± 0.21	2.09 ± 0.17
Consumption of H ₂ O ₂ (U/mg prot.)	50.91 ± 4.57 ^a	49.06 ± 8.19	49.56 ± 6.24	55.74 ± 8.63	38.23 ± 6.42 ^a	53.33 ± 10.19	48.74 ± 8.19	40.05 ± 7.12
GsT (U/mg prot.)	29.52 ± 6.18	20.54 ± 4.74	35.39 ± 8.55	21.42 ± 6.48	22.72 ± 4.98	10.67 ± 6.60	30.20 ± 8.44	16.18 ± 7.86

Data are given as mean ± SE unless otherwise noted. MDA: Malondialdehyde; S100B: marker of neuronal damage; tGSH: total glutathione; GSH: reduced glutathione; GSSG: oxidized glutathione; SOD: superoxide dismutase activity; and GsT: glutathione S-transferase activity. ^a denotes significant difference ($p \leq 0.05$) between: men and women at 6 h post-CA for erythrocytes nitrite/nitrate; 6 and 36 h post-CA in men for consumption of H₂O₂. ^b denotes significant difference ($p \leq 0.05$) between: 6 and 36 h post-CA in men for GSSG. ^c denotes significant difference ($p \leq 0.05$) between: 12 and 36 h post-CA in men for GSSG. ^d denotes significant difference ($p \leq 0.05$) between 36 and 72 h post-CA in men for GSSG.

4. DISCUSSÃO

A PCR tem por consequência uma gama de processos que geram o descontrole do funcionamento normal do corpo. Isto é evidenciado pela disfunção, já bem relatada, de múltiplos órgãos, sendo que os mais atingidos costumam ser o cérebro e o coração. Tem-se relacionado tais danos ao processo de isquemia/reperfusão causado pela PCR. Os mecanismos em nível celular desse processo não são ainda totalmente elucidados, mas atribui-se parte disso a grande produção de espécies reativas formadas durante a reperfusão e consequente dano causado pelo desequilíbrio entre defesas antioxidantes e aumento das espécies reativas.

Através de dosagens realizadas como rotina na prática clínica é possível verificar facilmente o desequilíbrio fisiológico que pacientes pós-PCR desenvolvem. Neste estudo, nós identificamos este desequilíbrio e também que houveram diferenças no comportamento de certos parâmetros entre homens e mulheres. Lembrando que o tratamento dos pacientes em estudo foi realizado em condições normais de temperatura, visto que os pacientes que sofreram da SPCR vinham sendo tratados nos últimos anos sob normotermia. Atualmente tem-se estudado a possibilidade do uso de hipotermia com avanços significativos na recuperação.

As principais causas de PCR nos pacientes incluídos no estudo foram doenças cardiovasculares (como infarto agudo do miocárdio, isquemia cerebral e tromboembolismo), doenças infecciosas e um paciente com câncer, totalizando cerca de 80% da amostra. Infelizmente, não foi possível ter acesso à etiologia da PCR no restante dos indivíduos. Uma dificuldade encontrada na realização do estudo, considerando que este é um estudo em humanos, foi a necessidade da ocorrência da PCR independente da causa associada. A utilização de modelos animais, como trabalhos já realizados em cachorros, porcos e ratos, facilita a análise de dados devido a padronização da causa da PCR (induzida por procedimentos invasivos) e a garantia de reprodutibilidade do estudo.

Devido à isquemia total do corpo durante a PCR e a pouca circulação do sangue durante o RCE vários fatores podem contribuir para a acidose nestes pacientes. A deficiência de oxigênio leva a utilização de rotas para o metabolismo anaeróbico e, portanto, a alta produção de ácido láctico. Juntamente com isso, durante o processo de isquemia, a função hepática é prejudicada reduzindo a eliminação de lactato e agravando a acidose (Teasdale e Jennett, 1974). Muitos estudos demonstraram que o conhecimento sobre os níveis de lactato pode ser uma ferramenta útil para prever o prognóstico de pacientes com choque circulatório (Bassetti *et al.*, 1996). São considerados níveis normais de lactato valores menores que 2,5 mmol/L. Nos pacientes incluídos neste estudo obtivemos médias altas em todos os momentos analisados (Tabela 1), porém não encontramos diferença entre os momentos pós-PCR. O acúmulo de ácido láctico pode ter sérias consequências, agravando-se no tecido cerebral devido a a depleção de energia sofrida por este tecido, já que possui um alto metabolismo oxidativo para a geração de energia. Somando-se a isso, o ambiente ácido é considerado como pró-oxidante por aumentar a concentração de H^+ , aumentando a taxa de conversão de $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 (Maxwell e Lip, 1997). Um estudo demonstrou que níveis de lactato maiores do que 2,0 mmol/L 48 h pós-PCR estão relacionados com um pior prognóstico neurológico (Kliegel *et al.*, 2004).

Outro metabólito descrito por influenciar o prognóstico dos pacientes pós-PCR é a glicose. Hiperglicemia é comum em pacientes pós-PCR e está associada a um mau prognóstico. Um estudo analisando os níveis de glicose em pacientes pós-PCR dividiu os mesmos em dois grupos: um com níveis mais baixos, entre 72 a 108 mg/dL e outro com níveis moderados, acima de 108 até 144 mg/dL. Porém, não demonstrou diferença na taxa de mortalidade (Oksanen *et al.*, 2007). A média das concentrações de glicose encontrada no presente estudo (Tabela 1) encontra-se com valores aproximados as concentrações do estudo

anterior, exceto pela média das mulheres no último momento, apresentando média superior aos valores considerados moderados (Tabela 3).

O desequilíbrio fisiológico causado pela PCR pode explicar a variação nos valores de sódio do primeiro tempo de coleta para o último (Tabela 1). Mas os valores encontram-se dentro da faixa de valores considerada normal (135 – 145 mEq/L). O uso de medicamentos que alteram a diurese e temperatura podem ser responsáveis por tais variações (Nolan *et al.*, 2008). Além do sódio, também foi encontrada variações nos níveis de potássio nas mulheres do segundo para o último momento (Tabela 3). Variações nesses valores podem estar relacionadas a doenças isquêmicas, como isquemia miocárdica (Maxwell e Lip, 1997).

Como citado anteriormente, um dos mecanismos envolvidos na SPCR é a resposta inflamatória aguda gerada pelo processo de isquemia/reperfusão, sendo que eventos chave nessa resposta são a produção de ERO, ativação do complemento, de neutrófilos e disfunção endotelial. Estes processos podem produzir danos irreversíveis aos tecidos (Dirksen *et al.*, 2007). Verificamos altos níveis de proteína-C reativa, com médias superiores a 120 mg/L, sendo que os níveis normais estão em torno de 1 mg/L. Demonstrou-se que aproximadamente 3 h pós-PCR as concentrações sanguíneas de várias citocinas, receptores solúveis e endotoxinas encontraram-se aumentadas, e a magnitude desta resposta foi associada ao prognóstico do paciente (Adrie *et al.*, 2002). Em 2009, um estudo analisando a resposta inflamatória em pacientes pós-PCR, encontrou que níveis plasmáticos de proteína-C reativa e interleucina 6 correlacionam-se com o estado clínico do paciente e também como preditor de sobrevivência (Samborska-Sablik, Sablik e Gaszynski, 2011). Os níveis de proteína-C reativa aumentam na circulação em resposta as citocinas inflamatórias como interleucina 6, interleucina 1 e TNF-alfa (Gabay, 1999).

A resposta inflamatória aguda pode levar a anemia de inflamação. Durante a inflamação, a liberação de ferro dos seus estoques é inibida, um mecanismo envolvido na

proteção do organismo contra infecções. Citocinas inflamatórias estão relacionadas com esse processo. A interleucina 6 possui um papel chave nesse processo, pois age no aumento da produção de hepcidina, um hormônio que age nas células da mucosa intestinal e inibe a absorção do ferro, e também de ferritina, responsável por estocar ferro no interior das células. Além da interleucina 6, outras citocinas também agem na ativação da hepcidina. A inflamação também causa a degradação de eritrócitos, e diminuição dos níveis de hemoglobina (Handelman e Levin, 2008). Níveis normais de hemoglobina podem ser difíceis de alcançar durante a anemia causada por inflamação, mesmo com uso de eritropoietina e suplementação com ferro (Handelman e Levin, 2008). A hemoglobina desempenha um importante papel na entrega de O₂ para as células e na restauração do débito de O₂ após processos isquêmicos (Nagao *et al.*, 2012). Sua concentração serve como um bom marcador de descompartimentalização de ferro e diminui em graves deficiência de ferro quando os estoques estão esgotados (Oldenburg *et al.*, 2001). Além da inflamação, a hipóxia, no nosso caso, gerada pela PCR, também pode influenciar nos níveis de hemoglobina induzindo a transcrição de fatores responsivos a concentrações de oxigênio (Webb, Coleman e Pugh, 2009). Neste estudo, demonstramos que houve uma diminuição da concentração de hemoglobina, a qual pode estar associada à progressão do processo inflamatório durante a SPCR, mas não houve diferenças nos valores de hematócrito (Tabela 1). Níveis maiores de hemoglobina no momento da chegada ao hospital foi associado com um prognóstico neurológico favorável em pacientes pós-PCR (Nagao *et al.*, 2012). Porém, devido ao alto uso de soro fisiológico nos pacientes internados no hospital, é importante citar que valores como hemoglobina e hematócrito podem sofrer influencia da hemodiluição. O uso do hematócrito e da hemoglobina como marcadores de volume sanguíneo permanece pouco claro, isso devido ao fato de que o endotélio, por possuir proteoglicanos e glicoproteínas em sua superfície, interage com os componentes do sangue (cargas diferentes) interferindo nesses valores, e a

integridade do endotélio pode estar debilitada em certas patologias (Jacob *et al.*, 2012). No entanto, um estudo em ratos indicou que hemodiluição aguda para um hematócrito correspondente a 25% pode causar atraso na recuperação da pressão arterial durante a reperfusão e atraso na recuperação neurológica após isquemia medular (Kim *et al.*, 2012).

Todos os parâmetros citados acima estão relacionados com o prognóstico neurológico durante a SPCR. O grande interesse no tecido cerebral está no fato de que dano neste é uma causa comum de mortalidade e morbidade de pacientes pós-PCR. Por este motivo, dosamos a S100B, um hemodímero (proteína ligada ao Ca^{2+}) presente nas células da glia e de Schwann o qual está envolvido tanto em funções intra quanto extracelulares, incluindo diferenciação, crescimento e apoptose (Donato, 2003). Seu aumento sorológico é positivamente correlacionado com várias formas de danos no sistema nervoso central, incluindo acidente vascular isquêmico, trauma e doenças neurodegenerativas como Alzheimer, esquizofrenia, depressão e esclerose amiotrófica (Rothermundt *et al.*, 2003). Ainda permanece controverso se sua liberação reflete um efeito neuroprotetor ou prejudicial à lesão cerebral (Van Eldik e Wainwright, 2003). Privação de glicose e oxigênio já foram relacionados com a liberação dessa proteína no sangue (Gerlach *et al.*, 2006). A hipóxia pode causar a morte celular e dano cerebral, e esta proteína é encontrada em concentrações maiores no sangue de pacientes que sofreram dano neste tecido (Van Eldik e Wainwright, 2003). Seus níveis sorológicos são sugeridos como um preditor precoce de prognóstico neurológico dentro de 24 h pós-PCR (Shinozaki *et al.*, 2009). Não encontramos diferença entre os momentos pós-PCR, sendo que esperávamos que estes valores diminuíssem com o tempo, já que o menor dano cerebral é associado com chances aumentadas de sobrevivência pós-PCR. No entanto, a S100B não é uma proteína específica do sistema nervoso central, uma vez que sua produção foi detectada em vários tecidos, como por exemplo, em adipócitos não cerebrais (Evidence for a wide extra-astrocytic distribution of S100B in human brain, Steiner, 2007). Já foi demonstrado que

ganho e perda de peso também podem influenciar nos níveis séricos de S100B. Um estudo em humanos, analisando pacientes com anorexia nervosa mostrou que os níveis nessa proteína no sangue diminuí em fase aguda de anorexia e pode ser normalizada após o ganho de peso (Serum levels of S100B are decreased in chronic starvation and normalize with weight gain, Kristian Holtkamp, 2008).

Como já citado anteriormente, os danos causados pelo processo de isquemia e reperfusão possuem alta relação com a formação de espécies reativas geradas durante este evento, e estas, por sua vez, podem levar a destruição e morte das células. Muitos marcadores bioquímicos já foram sugeridos para avaliar o dano por reperfusão, dentre eles inclui-se a glutatona, peróxidos lipídicos e antioxidantes. Nosso estudo demonstrou alterações nos níveis de glutatona (total, reduzida e oxidada), mas não nos níveis de MDA e vitamina C. A depleção de glutatona já foi descrita como consequência do processo isquêmico. Esperava-se que marcadores de dano oxidativo em lipídeos e proteínas tivessem valores superiores nos primeiros momentos, já que é sabido que a maior produção de ERO ocorre durante o estado de reperfusão, bem como consumo da vitamina C. A peroxidação lipídica já foi claramente demonstrada como sequela da reperfusão em animais e humanos (Dart e Sanders, 1988; Davies *et al.*, 1990). Diminuição de vitamina C também já foi verificada 2 dias depois da isquemia cerebral em humanos (Sharpe, Mulholland e Trinick, 1994).

A glutatona é o principal antioxidante intracelular, protegendo importantes estruturas contra a oxidação mesmo em ambiente aeróbico (Maxwell e Lip, 1997). Os níveis de GSH na célula refletem o equilíbrio dinâmico entre sua síntese e utilização. Nos eritrócitos o papel primário da GSH é manter a hemoglobina em sua forma nativa e em altas concentrações, devido a grande exposição dessa proteína às espécies reativas. Esta molécula possui importância também por funcionar como co-fator de enzimas como a GPx e GsT (Pandey e Rizvi, 2011). Os níveis de GSH dentro das células é altamente regulado entre taxa de síntese e

exportação desta via de transportadores de membrana (Ballatori *et al.*, 2005). O efluxo de GSH e GSSG precede apoptose induzida pelo estresse oxidativo em vários tipos celulares, dentre eles os eritrócitos (Pulaski *et al.*, 1996). Além disso, como o plasma é deficiente em redutases e coenzimas, como o NADPH, esse efluxo de GSH e GSSG provindo dos eritrócitos e outras células é de grande valia (Garibotto *et al.*, 2003). Eritrócitos são capazes de sintetizar GSH a partir de cisteína, glicina e ácido glutâmico, já que essas células contêm todas as enzimas necessárias para a biossíntese de GSH (Dass, Bermes e Holmes, 1992). Somando-se a este fato, ambas GSSG e moléculas conjugadas a glutathione também são ativamente exportados dos eritrócitos quando seus níveis intracelulares estão altos (Thom *et al.*, 1997).

Destacou-se no presente estudo a medida de nitritos/nitratos como medidas indiretas de NO[•] em eritrócitos por apresentar um aumento da fase intermediária da SPCR (36h pós-PCR) para a fase de recuperação (72h pós-PCR) e, além disso, apresentou valores significativamente superiores nas mulheres no primeiro momento de coleta. O NO[•] pode apresentar um papel protetor ou prejudicial, dependendo do ambiente em que se encontra. NO[•] é uma importante molécula cardioprotetora por possuir ação vasodilatadora, antioxidante, antiplaquetária e antineutrofílica. No entanto, esta molécula pode ser prejudicial se combinada com O₂^{•-} para formar ONOO⁻, o qual é rapidamente decomposto em espécies altamente reativas. Existe um controle crítico entre a concentração celular de O₂^{•-}, mas em condições patológicas, como no processo de isquemia/reperfusão, resulta na formação de ONOO⁻ (Halliwell & Gutteridge, 2007). NO[•] também pode ter ação inibitória sobre enzimas contendo metais de transição ou com radicais livres como intermediários no seu centro catalítico (Pacher, Beckman e Liaudet, 2007). Existem, pelo menos, quatro mecanismos pelos quais o peroxinitrito exerce sua toxicidade: peroxidação lipídica, depleção de antioxidantes, oxidação/nitração de proteínas (principalmente as mitocondriais) e indução de dano ao DNA (Pacher, Beckman e Liaudet, 2007). O efeito danoso do ONOO⁻ foi demonstrado em um estudo

que mostrou que esta molécula é produzida durante a isquemia no coração e que drogas que inibem sua formação ou antagonizam seus efeitos tóxicos protegem este tecido do dano causado pelo processo de isquemia/reperfusão (Yasmin, Strynadka e Schulz, 1997). Embora não tenha natureza radicalar, o ONOO^- é mais reativo do que NO^\bullet e $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Pacher, Beckman e Liaudet, 2007). O ONOO^- reage rapidamente com proteínas plasmáticas e compostos contendo grupos tióis, como a GSH, e também pode reagir com o centro catalítico contendo metais de transição, aminoácidos e ácidos nucleicos. Na reação com a GSH ocorre a formação de NO^\bullet , acarretando em um efeito protetor durante a isquemia (Kirshenbaum e Singal, 1993). GSH serve como um eficiente sequestrador endógeno de peroxinitrito e possui grande importância na defesa da célula contra essa molécula (Arteel, Briviba e Sies, 1999). Por este motivo, a susceptibilidade da célula a essa espécie reativa dependerá da quantidade de GSH intracelular. A depleção de GSH aumenta a toxicidade de ONOO^- e o dano tecidual durante choque circulatório. Durante este processo um dos maiores mecanismos de ação danosa do peroxinitrito é a habilidade de oxidar a GSH rapidamente (Pacher, Beckman e Liaudet, 2007). Talvez a diminuição dos níveis de glutathiona e o aumento dos níveis de NO^\bullet encontrados neste estudo durante a evolução da SPCR estejam relacionados de acordo com os mecanismos citados anteriormente. Um estudo recente analisando os níveis de nitrito/nitrato e nitrotirosina em paciente pós-PCR tratados com hipotermia (submetidos a 33°C por 24h) em diferentes momentos, desde o momento da admissão no hospital e posteriormente de 6 em 6h até completar 54h, demonstrou que os níveis dessas medidas indiretas de NO^\bullet foram maiores após as 24h de hipotermia, ou seja, durante a normotermia, e que apresentaram os níveis mais elevados nas últimas horas do acompanhamento (Krueger *et al.*, 2012), similar aos nossos resultados, sendo que, como já dito, no presente estudo o tratamento dos pacientes foi em condições de normotermia.

Como já citado, a formação de ERO e ERN aumenta durante a reperfusão (Simpson e Lucchesi, 1987; Downey, 1990). Era esperado, também, que as enzimas antioxidantes apresentassem alteração de sua atividade, já que grande quantidade de espécies reativas é formada. Apenas na atividade da GST houve variação, diminuindo sua atividade das 6 para as 36h pós-PCR. A expectativa de que alguma perturbação nos demais valores pudesse ocorrer se deve ao fato de que essa superprodução de espécies reativas poderia causar a inativação de sistemas de detoxificação e alterar o consumo de antioxidantes (Chan, 2001). Além disso, a atividade das enzimas poderia sofrer alterações devido a um aumento compensatório da expressão das mesmas (Goss *et al.*, 1997).

Pouco se sabe sobre a diferença da vulnerabilidade de homens e mulheres a processos isquêmicos. Geralmente ignora-se essa possibilidade usando homens em triagens clínicas e machos em estudos com animais. No entanto, diferenças entre taxa de ocorrência de PCR e mortalidade pós-PCR em homens e mulheres já foi relatada (Nolan *et al.*, 2008), e os resultados descritos deste trabalho podem indicar o motivo de tais achados, como por exemplo o maior nível de NO[•] nas mulheres.

Um estudo desenhado de forma similar ao nosso, comparou cachorros, machos e fêmeas, pós-PCR durante 24 horas, analisando parâmetros clínicos equivalentes aos nossos, mas para medidas de estresse oxidativo, apenas MDA e GSSG, sendo que não encontraram diferenças entre os grupos (Zwemer *et al.*, 1997).

No presente estudos os parâmetros bioquímicos que apresentaram diferença significativa entre os momentos dentro do mesmo grupo foram os níveis de sódio e potássio, entre os homens para o primeiro, e entre mulheres para o segundo, ambas as diferenças sem relevância clínica, já que os valores encontram-se dentro dos níveis sugeridos como normais. Além desses dois eletrólitos, a glicose apresentou variação nas mulheres, como citado anteriormente. Vários mecanismos tem sugerido a hiperglicemia como um importante fator

que contribui para a formação de radicais livres, sendo que a oxidação da molécula de glicose é uma importante fonte para a produção destes radicais. Além de gerar espécies reativas, a glicose pode também inativar enzimas por alterar sua estrutura e função promovendo a formação de radicais livres e bloqueando os efeitos proliferativos do NO[•] (Maritim, Sanders e Watkins, 2003).

Sobre os marcadores relacionados ao estresse, GSSG apresentou variação de seus níveis entre os homens, fato que pode ser explicado pelo processo descrito acima sobre o efluxo de seu excesso nos eritrócitos para o exterior da célula, já que não encontramos diferenças nos valores de GSH e GSH total. E, diferentemente do que foi visto quando analisamos os pacientes sem os extratificar, a medida de antioxidantes enzimáticos apresentou variação. O consumo de H₂O₂ também apresentou diferença. Na detecção do consumo de H₂O₂ pode-se inferir sobre a atividade não só da catalase como de peroxiredoxidas (Rhee e Woo, 2011). Esta medida teve diminuição de seus valores entre os homens das 6 h para 36 h pós-PCR, mas não se verificou diferença entre os sexos.

Além disso, sabe-se que homens e mulheres não reagem da mesma forma a manifestação de doenças relacionadas com a produção e interferência de espécies reativas, como por exemplo, doenças vasculares. Sugere-se que tais diferenças possam ocorrer devido aos níveis de hormônios característicos de cada sexo (Miller, De Silva, *et al.*, 2007). Porém, as mulheres incluídas em nosso estudo apresentaram média de idade superior ao período em que a diferença entre níveis de hormônios como estrógeno e testosterona são mais evidentes.

A exposição dos eritrócitos a altas concentrações de ERO, a falta de núcleo e mitocôndria e a incapacidade de sintetizar novas proteínas aumentam a vulnerabilidade destas células ao estresse oxidativo (Pandey e Rizvi, 2011). Somando-se a este fato, a atividade das enzimas sofre grande influência da concentração de substratos e produtos. Os efeitos das ERO não são somente o dano que podem causar as estruturas celulares, mas também podem

interferir na atividade de enzimas antioxidantes (Miller, De Silva, *et al.*, 2007). Por exemplo, em 1990, um estudo demonstrou que catalase, GPx e SOD podem ser inativadas por peróxidos e ERO como o radical hidroxil (Pigeolet *et al.*, 1990). Mais tarde, em 2002, outro estudo demonstrou que a atividade da peroxiredoxina 1 diminuía com o passar do tempo, e verificou-se-se que isso se deve a sensibilidade do seu sítio ativo em sofrer hiperoxidação (Yang *et al.*, 2002). Além da inativação de enzimas alterações proteômicas também podem ocorrer (Li *et al.*, 2012), e as células podem expressá-las em quantidades diferentes entre os sexos. Em um estudo realizado com artéria femoral de suínos, verificou-se que SOD1 e SOD2 são expressos em menor quantidade em machos do que em fêmeas (Laughlin *et al.*, 2003). No entanto, na artéria basilar de ratos não encontrou-se diferença (Miller, Drummond, *et al.*, 2007). Assim como a SOD, outras enzimas podem apresentar tais diferenças na sua expressão em diferentes tecidos e tre os sexos.

Variações esperadas e não identificadas neste estudo talvez não tenham ocorrido devido ao viés de seleção sofrido pela ocorrência de óbito ao longo do mesmo e da possibilidade de os pacientes que sobreviveram apresentarem uma melhor condição de defesa contra o grande choque gerado pela PCR.

5. CONCLUSÃO

Existem várias lacunas a respeito da fisiopatologia, tratamento e prognóstico da SPCR. Neste estudo evidenciamos a relação entre o processo de estresse oxidativo e a evolução da SPCR. Como já mencionado, já existem estudos fazendo esta relação, mas nenhum acompanhou a evolução da SPCR por tanto tempo. O completo entendimento sobre como se desenvolve a SPCR e os fatores que a influenciam faz-se necessário para que novas práticas terapêuticas e marcadores de patologias sejam propostas, já que não se evoluiu muito nas últimas décadas, a não ser pelo uso terapêutico da hipotermia, a qual sabe-se que é eficaz para a recuperação dos pacientes que sofrem PCR, mas pouco se sabe sobre os mecanismos relacionados a isso. Os bons resultados pelo uso da hipotermia realça a ideia de que a recuperação dos pacientes pós-PCR não depende somente do RCE, mas também pelos processos fisiopatológicos envolvidos após a PCR.

O estresse oxidativo, por possuir grande influência no dano causado por processos isquêmicos, é considerado um fator importante. A diferença da resposta de homens e mulheres também deve ser considerada como um importante fator para a construção de novas terapias.

Neste estudo verificamos nos parâmetros clínicos mudanças já descritas como característica da resposta a PCR, dentre eles alterações na temperatura durante a normotermia, pH abaixo dos valores considerados normais e níveis de lactato superiores. Além destes, a proteína-C reativa com valores extrapolando os níveis normais, evidenciando a síndrome da resposta inflamatória sistêmica, também sugerida como consequência do grande choque isquêmico gerado pela PCR, e a hemoglobina, importante proteína susceptível ao estresse oxidativo devido a alta exposição nos eritrócitos.

Os parâmetros relacionados ao estresse mostraram haver influência do estresse oxidativo, fato já esperado. A depleção dos níveis de glutatona, tanto reduzida quanto

oxidada em eritrócitos, o aumento dos níveis de NO[•] nos eritrócitos e a variação na atividade da GsT ocorrendo em fases posteriores a inicial demonstram que mudanças no metabolismo oxidativo continuam a ocorrer ao longo da SPCR.

Diferenças entre os resultados obtidos entre homens e mulheres evidenciam que o processo pós-isquêmico não ocorre da mesma forma, como também já previsto. GSSG e o consumo de H₂O₂ apresentaram diferença entre os momentos analisados nos homens, mas não nas mulheres. Somente as mulheres apresentaram variações nos valores de glicose, sendo a média dos valores no último momento considerada como hiperglicemia, fator que acarreta um mau prognóstico. As razões para essa diferença de resposta permanecem ainda não totalmente esclarecidas e poucos estudos fazem essa relação. Nosso estudo faz-se ainda mais importante devido ao fato de que a maioria das justificativas para tais eventos seja a presença ou ausência de hormônios sexuais como testosterona e estrógeno, e no nosso caso, a média de idade entre as mulheres encontra-se na fase pós-menopausa.

6. PERSPECTIVAS

As principais perspectivas para este estudo são analisar os mesmo parâmetros em pacientes tratados com hipotermia, além de estudar a expressão de genes relacionados ao metabolismo oxidativo e produção de radicais livres, tanto em pacientes tratados com a hipotermia quanto a normotermia. Estes dados poderão ajudar a compreender e aumentar a eficiência de possíveis tratamentos e marcadores diagnóstico para pacientes pós-PCR.

Devido ao possível viés de seleção sobre aqueles que sofreram óbito e sobre os que sobreviveram, temos como perspectivas também, realizar uma regressão de COX para verificar mudanças nos parametros analisados de acordo com a análise de sobrevivência dos pacientes.

7. REFERÊNCIAS

- ADRIE, C. et al. Successful cardiopulmonary resuscitation after cardiac arrest as a "sepsis-Like" syndrome. **Circulation**, v. 106, n. 5, p. 562-568, Jul 30 2002. ISSN 0009-7322. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000177323700016 >.
- ALLEN, C. L.; BAYRAKTUTAN, U. Oxidative stress and its role in the pathogenesis of ischaemic stroke. **International Journal of Stroke**, v. 4, n. 6, p. 461-470, Dec 2009. ISSN 1747-4930. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000271466900011 >.
- ARTEEL, G. E.; BRIVIBA, K.; SIES, H. Protection against peroxynitrite. **Febs Letters**, v. 445, n. 2-3, p. 226-230, Feb 26 1999. ISSN 0014-5793. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000079122800002 >.
- ARTHUR, J. R. The glutathione peroxidases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 57, n. 13-14, p. 1825-1835, Dec 2000. ISSN 1420-682X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000166644300003 >.
- BAIRD, T. A. et al. Persistent poststroke hyperglycemia is independently associated with infarct expansion and worse clinical outcome. **Stroke**, v. 34, n. 9, p. 2208-2214, Sep 2003. ISSN 0039-2499. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000185135300047 >.
- BALLATORI, N. et al. Molecular mechanisms of reduced glutathione transport: role of the MRP/CFTR/ABCC and OATP/SLC21A families of membrane proteins. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 204, n. 3, p. 238-255, May 1 2005. ISSN 0041-008X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000228769100004 >.
- BASSETTI, C. et al. Early prognosis in coma after cardiac arrest: A prospective clinical, electrophysiological, and biochemical study of 60 patients. **Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry**, v. 61, n. 6, p. 610-615, Dec 1996. ISSN 0022-3050. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1996VY19300014 >.
- BEMEUR, C.; STE-MARIE, L.; MONTGOMERY, J. Increased oxidative stress during hyperglycemic cerebral ischemia. **Neurochemistry International**, v. 50, n. 7-8, p. 890-904, Jun 2007. ISSN 0197-0186. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000248436900003 >.
- BERNARD, S. A. et al. Treatment of comatose survivors of out-of-hospital cardiac arrest with induced hypothermia. **New England Journal of Medicine**, v. 346, n. 8, p. 557-563, Feb 2002. ISSN 0028-4793. Disponível em: <<Go to ISI>://000173926700003 >.
- BLUM, J.; FRIDOVICH, I. INACTIVATION OF GLUTATHIONE-PEROXIDASE BY SUPEROXIDE RADICAL. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 240, n. 2, p. 500-508, 1985 1985. ISSN 0003-9861. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1985AMW0900002 >.
- BOLLI, R. Basic and clinical aspects of myocardial stunning. **Progress in Cardiovascular Diseases**, v. 40, n. 6, p. 477-516, 1998. ISSN 0033-0620. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000074313200001 >.
- BOLLI, R.; MARBAN, E. Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. **Physiological Reviews**, v. 79, n. 2, p. 609-634, 1999. ISSN 0031-9333. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000080163200010 >.
- BOLLI, R.; PATEL, B. FACTORS THAT DETERMINE THE OCCURRENCE OF REPERFUSION ARRHYTHMIAS. **American Heart Journal**, v. 115, n. 1, p. 20-29, 1988. ISSN 0002-8703. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1988L592200004 >.

BRADFORD, M. M. RAPID AND SENSITIVE METHOD FOR QUANTITATION OF MICROGRAM QUANTITIES OF PROTEIN UTILIZING PRINCIPLE OF PROTEIN-DYE BINDING. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976. ISSN 0003-2697. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1976BU74400029 >.

BRYAN, N. S.; GRISHAM, M. B. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 43, n. 5, p. 645-657, Sep 1 2007. ISSN 0891-5849. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000248679500001 >.

BULUT, S. et al. Successful out-of-hospital cardiopulmonary resuscitation: what is the optimal in-hospital treatment strategy? **Resuscitation**, v. 47, n. 2, p. 155-161, 2000. ISSN 0300-9572. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000089703900008 >.

CHAN, P. H. Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 21, n. 1, p. 2-14, Jan 2001. ISSN 0271-678X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000166016600002 >.

CHO, Y. M. et al. Blood ammonia is a predictive biomarker of neurologic outcome in cardiac arrest patients treated with therapeutic hypothermia. **American Journal of Emergency Medicine**, v. 30, n. 8, p. 1395-1401, Oct 2012. ISSN 0735-6757. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000309813900011 >.

CUMMINS, R. O. et al. Recommended guidelines for reviewing, reporting, and conducting research on in-hospital resuscitation: The in-hospital "Utstein style". **Academic Emergency Medicine**, v. 4, n. 6, p. 603-627, Jun 1997. ISSN 1069-6563. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1997XD36900014 >.

CUZZOCREA, S. et al. Antioxidant therapy: A new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. **Pharmacological Reviews**, v. 53, n. 1, p. 135-159, 2001. ISSN 0031-6997. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000166966200007 >.

DART, R. C.; SANDERS, A. B. OXYGEN FREE-RADICALS AND MYOCARDIAL REPERFUSION INJURY. **Annals of Emergency Medicine**, v. 17, n. 1, p. 53-58, Jan 1988. ISSN 0196-0644. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1988L432800012 >.

DASS, P. D.; BERMES, E. W.; HOLMES, E. W. RENAL AND HEPATIC OUTPUT OF GLUTATHIONE IN PLASMA AND WHOLE-BLOOD. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1156, n. 1, p. 99-102, Dec 8 1992. ISSN 0006-3002. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1992KE83200016 >.

DAVIES, S. W. et al. LIPID-PEROXIDATION ASSOCIATED WITH SUCCESSFUL THROMBOLYSIS. **Lancet**, v. 335, n. 8692, p. 741-743, Mar 31 1990. ISSN 0140-6736. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1990CW99400001 >.

DI BARI, M. et al. Cardiopulmonary resuscitation of older, in-hospital patients: Immediate efficacy and long-term outcome. **Critical Care Medicine**, v. 28, n. 7, p. 2320-2325, Jul 2000. ISSN 0090-3493. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000088315300021 >.

DIRKSEN, M. T. et al. Reperfusion injury in humans: A review of clinical trials on reperfusion injury inhibitory strategies. **Cardiovascular Research**, v. 74, n. 3, p. 343-355, Jun 1 2007. ISSN 0008-6363. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000247160200005 >.

DONATO, R. Intracellular and extracellular roles of s100 proteins. **Microscopy Research and Technique**, v. 60, n. 6, p. 540-551, Apr 15 2003. ISSN 1059-910X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000181885200002 >.

DOWNEY, J. M. FREE-RADICALS AND THEIR INVOLVEMENT DURING LONG-TERM MYOCARDIAL-ISCHEMIA AND REPERFUSION. **Annual Review of Physiology**, v. 52, p. 487-504, 1990 1990. ISSN 0066-4278. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1990CT66200028 >.

GABAY, C. Mechanisms of disease - Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation (vol 340, pg 448, 1999). **New England Journal of Medicine**, v. 340, n. 17, p. 1376-1376, Apr 29 1999. ISSN 0028-4793. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000080001700030 >.

GARIBOTTO, G. et al. Interorgan exchange of aminothiols in humans. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 284, n. 4, p. E757-E763, Apr 2003. ISSN 0193-1849. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000181426100013 >.

GERLACH, R. et al. Active secretion of S100B from astrocytes during metabolic stress. **Neuroscience**, v. 141, n. 4, p. 1697-1701, 2006 2006. ISSN 0306-4522. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000240222000005 >.

GIUSTARINI, D. et al. Red blood cells as a physiological source of glutathione for extracellular fluids. **Blood Cells Molecules and Diseases**, v. 40, n. 2, p. 174-179, Mar-Apr 2008. ISSN 1079-9796. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000253474400006 >.

GOSS, J. R. et al. The antioxidant enzymes glutathione peroxidase and catalase increase following traumatic brain injury in the rat. **Experimental Neurology**, v. 146, n. 1, p. 291-294, Jul 1997. ISSN 0014-4886. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1997XJ92200033 >.

GRISHAM, M. B.; JOHNSON, G. G.; LANCASTER, J. R. Quantitation of nitrate and nitrite in extracellular fluids. **Nitric Oxide, Pt a - Sources and Detection of No; No Synthase**, v. 268, p. 237-246, 1996 1996. ISSN 0076-6879. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1996BG02D00023 >.

HAIMOTO, H.; HOSODA, S.; KATO, K. DIFFERENTIAL DISTRIBUTION OF IMMUNOREACTIVE S100-ALPHA AND S100-BETA PROTEINS IN NORMAL NONNERVOUS HUMAN-TISSUES. **Laboratory Investigation**, v. 57, n. 5, p. 489-498, Nov 1987. ISSN 0023-6837. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1987L178800004 >.

HALLIWELL B, G. J. **Free Radicals in Biology and Medicine. 3rd. New York: Oxford University Press, 2007.**

HANDELMAN, G. J.; LEVIN, N. W. Iron and anemia in human biology: a review of mechanisms. **Heart Failure Reviews**, v. 13, n. 4, p. 393-404, Dec 2008. ISSN 1382-4147. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000256008900004 >.

HOLZER, M. et al. Mild therapeutic hypothermia to improve the neurologic outcome after cardiac arrest (vol 346, pg 549, 2002). **New England Journal of Medicine**, v. 346, n. 22, p. 1756-1756, May 30 2002. ISSN 0028-4793. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000175834100029 >.

HUET, O. et al. Postresuscitation syndrome: Potential role of hydroxyl radical-induced endothelial cell damage. **Critical Care Medicine**, v. 39, n. 7, p. 1712-1720, Jul 2011. ISSN 0090-3493. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000291721800014 >.

JACOB, M. et al. Haematocrit is invalid for estimating red cell volume: a prospective study in male volunteers. **Blood Transfusion**, v. 10, n. 4, p. 471-479, Oct 2012. ISSN 1723-2007. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000311532900010 >.

JAUCH, E. C. Part 11: Adult Stroke: 2010 American Heart Association Guidelines for Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care (vol 122, pg S818, 2010). **Circulation**, v. 124, n. 15, Oct 11 2011. ISSN 0009-7322. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000296049300005 >.

JURMANN, M. J. et al. PULMONARY REPERFUSION INJURY - EVIDENCE FOR OXYGEN-DERIVED FREE-RADICAL MEDIATED DAMAGE AND EFFECTS OF DIFFERENT FREE-RADICAL SCAVENGERS. **European Journal of Cardio-Thoracic Surgery**, v. 4, n. 12, p. 665-670, 1990. ISSN 1010-7940. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1990EP51500007 >.

KARATEPE, M. Simultaneous determination of ascorbic acid and free malondialdehyde in human serum by HPLC-UV. **Lc Gc North America**, p. 104-106, Jun 2004. ISSN 1527-5949. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000222083500061 >.

KARIMOVA, A.; PINSKY, D. J. The endothelial response to oxygen deprivation: biology and clinical implications. **Intensive Care Medicine**, v. 27, n. 1, p. 19-31, 2001. ISSN 0342-4642. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000166897700006 >.

KEENAN, S. P. et al. Variation in length of intensive care unit stay after cardiac arrest: Where you are is as important as who you are. **Critical Care Medicine**, v. 35, n. 3, p. 836-841, 2007. ISSN 0090-3493. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000244470800021 >.

KIM, J. et al. Acute Normovolemic Hemodilution Can Aggravate Neurological Injury After Spinal Cord Ischemia in Rats. **Anesthesia and Analgesia**, v. 114, n. 6, p. 1285-1291, Jun 2012. ISSN 0003-2999. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000304504000021 >.

KIRSHENBAUM, L. A.; SINGAL, P. K. INCREASE IN ENDOGENOUS ANTIOXIDANT ENZYMES PROTECTS HEARTS AGAINST REPERFUSION INJURY. **American Journal of Physiology**, v. 265, n. 2, p. H484-H493, Aug 1993. ISSN 0002-9513. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1993LW03200009 >.

KLIEGEL, A. et al. Serial lactate determinations for prediction of outcome after cardiac arrest. **Medicine**, v. 83, n. 5, p. 274-279, Sep 2004. ISSN 0025-7974. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000223943700002 >.

KOERNER, J. E.; ANDERSON, B. A.; DAGE, R. C. PROTECTION AGAINST POSTISCHEMIC MYOCARDIAL DYSFUNCTION IN ANESTHETIZED RABBITS WITH SCAVENGERS OF OXYGEN-DERIVED FREE-RADICALS - SUPEROXIDE-DISMUTASE PLUS CATALASE, N-2-MERCAPTOPROPIONYL GLYCINE AND CAPTOPRIL. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 17, n. 2, p. 185-191, 1991. ISSN 0160-2446. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1991EU56100002 >.

KONDO, T.; AWADA, F. **Experimental Protocols for Reactive Oxygen and Nitrogen Species**. Oxford: Oxford University Press: 57-60 p. 2000.

KRUEGER, A. et al. Nitrotyrosine and Nitrate/Nitrite Levels in Cardiac Arrest Survivors Treated With Endovascular Hypothermia. **Physiological Research**, v. 61, n. 4, p. 425-430, 2012 2012. ISSN 0862-8408. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000309194600011 >.

LANGHELLE, A. et al. In-hospital factors associated with improved outcome after out-of-hospital cardiac arrest. A comparison between four regions in Norway. **Resuscitation**, v. 56, n. 3, p. 247-263, Mar 2003. ISSN 0300-9572. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000181803800002 >.

LARDINOIS, O. M.; MESTDAGH, M. M.; ROUXHET, P. G. Reversible inhibition and irreversible inactivation of catalase in presence of hydrogen peroxide. **Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1295, n. 2, p. 222-238, Jul 18 1996. ISSN 0167-4838. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1996UY02400013 >.

LAUGHLIN, M. H. et al. Gender, exercise training, and eNOS expression in porcine skeletal muscle arteries. **Journal of Applied Physiology**, v. 95, n. 1, p. 250-264, Jul 2003. ISSN 8750-7587. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000183354700032 >.

LAVIER, S. et al. Mode of death after admission to an intensive care unit following cardiac arrest. **Intensive Care Medicine**, v. 30, n. 11, p. 2126-2128, 2004. ISSN 0342-4642. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000224956000021 >.

LEITE, M. C. et al. A simple, sensitive and widely applicable ELISA for S100B: Methodological features of the measurement of this glial protein. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 169, n. 1, p. 93-99, Mar 30 2008. ISSN 0165-0270. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000254681100012 >.

LEVINE, R. L. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 32, n. 9, p. 790-796, May 1 2002. ISSN 0891-5849. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000175291200002 >.

LI, X. et al. Metabolic Adaptation to a Disruption in Oxygen Supply during Myocardial Ischemia and Reperfusion Is Underpinned by Temporal and Quantitative Changes in the Cardiac Proteome. **Journal of Proteome Research**, v. 11, n. 4, p. 2331-2346, Apr 2012. ISSN 1535-3893. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000302388100025 >.

LLOYD, J. Heart Disease and Stroke Statistics-2009 Update: A Report From the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee (vol 119, pg e21, 2009). **Circulation**, v. 124, n. 16, p. E424-E424, Oct 18 2011. ISSN 0009-7322. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000296562900006 >.

LOW, F. M.; HAMPTON, M. B.; WINTERBOURN, C. C. Peroxiredoxin 2 and peroxide metabolism in the erythrocyte. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 10, n. 9, p. 1621-1629, Sep 2008. ISSN 1523-0864. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000257468000011 >.

MALORNI, W. et al. Redox features of the cell: A gender perspective. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 9, n. 11, p. 1779-1801, Nov 2007. ISSN 1523-0864. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000250226500001 >.

MARITIM, A. C.; SANDERS, R. A.; WATKINS, J. B. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: A review. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 17, n. 1, p. 24-38, 2003. ISSN 1095-6670. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000181327600003 >.

MAXWELL, S. R. J.; LIP, G. Y. H. Reperfusion injury: A review of the pathophysiology, clinical manifestations and therapeutic options. **International Journal of Cardiology**, v. 58, n. 2, p. 95-117, 1997. ISSN 0167-5273. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1997WH16800001 >.

MILLER, A. A. et al. Effect of gender and sex hormones on vascular oxidative stress. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 34, n. 10, p. 1037-1043, Oct 2007. ISSN 0305-1870. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000248977900013 >.

_____. Effect of gender on NADPH-oxidase activity, expression, and function in the cerebral circulation - Role of estrogen. **Stroke**, v. 38, n. 7, p. 2142-2149, Jul 2007. ISSN 0039-2499. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000247513300040 >.

MONOSTORI, P. et al. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples: An in-depth review. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 877, n. 28, p. 3331-3346, 2009. ISSN 1570-0232. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000270483800008 >.

NADKARNI, V. M. et al. First documented rhythm and clinical outcome from in-hospital cardiac arrest among children and adults. **Jama-Journal of the American Medical Association**, v. 295, n. 1, p. 50-57, 2006. ISSN 0098-7484. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000234381100020 >.

NAGAO, K. et al. Relationship between the hemoglobin level at hospital arrival and post-cardiac arrest neurologic outcome. **American Journal of Emergency Medicine**, v. 30, n. 5, p. 770-774, Jun 2012. ISSN 0735-6757. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000305472400021 >.

NEGOVSKY, V. A. The second step in resuscitation-the treatment of the post-resuscitation disease (Reprinted from Resuscitation, vol 1, pg 1-7, 1972). **Resuscitation**, v. 83, n. 10, p. 1187-1190, Oct 2012. ISSN 0300-9572. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000309050600015 >.

NEUMAR, R. W. Molecular mechanisms of ischemic neuronal injury. **Annals of Emergency Medicine**, v. 36, n. 5, p. 483-506, 2000. ISSN 0196-0644. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000165619400012 >.

_____. Optimal oxygenation during and after cardiopulmonary resuscitation. **Current Opinion in Critical Care**, v. 17, n. 3, p. 236-240, Jun 2011. ISSN 1070-5295. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000290040400006 >.

NOLAN, J. P. et al. Outcome following admission to UK intensive care units after cardiac arrest: a secondary analysis of the ICNARC Case Mix Programme Database. **Anaesthesia**, v. 62, p. 1207-1216, 2007. ISSN 0003-2409. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000250726900003 >.

_____. Post-cardiac arrest syndrome: Epidemiology, pathophysiology, treatment, and prognostication A Scientific Statement from the International Liaison Committee on Resuscitation; the American Heart Association Emergency Cardiovascular Care Committee; the Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia; the Council on Cardiopulmonary, Perioperative, and Critical Care; the Council on Clinical Cardiology; the Council on Stroke. **Resuscitation**, v. 79, n. 3, p. 350-379, 2008. ISSN 0300-9572. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000262051700004 >.

OKSANEN, T. et al. Strict versus moderate glucose control after resuscitation from ventricular fibrillation. **Intensive Care Medicine**, v. 33, n. 12, p. 2093-2100, Dec 2007. ISSN 0342-4642. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000251157400009 >.

OKU, K. et al. CEREBRAL AND SYSTEMIC ARTERIOVENOUS OXYGEN MONITORING AFTER CARDIAC-ARREST - INADEQUATE CEREBRAL OXYGEN DELIVERY. **Resuscitation**, v. 27, n. 2, p. 141-152, 1994. ISSN 0300-9572. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1994NJ12900007 >.

OLDENBURG, B. et al. Review article: iron and inflammatory bowel disease. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 15, n. 4, p. 429-438, Apr 2001. ISSN 0269-2813. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000168010700001 >.

ORNATO, J. P. et al. Factors associated with the occurrence of cardiac arrest during hospitalization for acute myocardial infarction in the second national registry of myocardial infarction in the US. **Resuscitation**, v. 48, n. 2, p. 117-123, Feb 2001. ISSN 0300-9572. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000166685600004 >.

_____. RAPID CHANGE IN PULMONARY VASCULAR HEMODYNAMICS WITH PULMONARY-EDEMA DURING CARDIOPULMONARY RESUSCITATION. **American Journal of Emergency Medicine**, v. 3, n. 2, p. 137-142, 1985. ISSN 0735-6757. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1985AEB7400009 >.

PACHER, P.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiological Reviews**, v. 87, n. 1, p. 315-424, Jan 2007. ISSN 0031-9333. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000243594500008 >.

PANDEY, K. B.; RIZVI, S. I. BIOMARKERS OF OXIDATIVE STRESS IN RED BLOOD CELLS. **Biomedical Papers-Olomouc**, v. 155, n. 2, p. 131-136, Jun 2011. ISSN 1213-8118. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000294040300004 >.

PATTERSON, C. E.; RHOADES, R. A. PROTECTIVE ROLE OF SULFHYDRYL-REAGENTS IN OXIDANT LUNG INJURY. **Experimental Lung Research**, v. 14, p. 1005-1019, 1988. ISSN 0190-2148. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1988R330200011 >.

PEBERDY, M. A. et al. Part 9: Post-Cardiac Arrest Care 2010 American Heart Association Guidelines for Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care. **Circulation**, v. 122, n. 18, p. S768-S786, 2010. ISSN 0009-7322. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000283047600009 >.

_____. Cardiopulmonary resuscitation of adults in the hospital: A report of 14 720 cardiac arrests from the National Registry of Cardiopulmonary Resuscitation. **Resuscitation**, v. 58, n. 3, p. 297-308, Sep 2003. ISSN 0300-9572. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000185508900012 >.

PIGEOLET, E. et al. GLUTATHIONE-PEROXIDASE, SUPEROXIDE-DISMUTASE, AND CATALASE INACTIVATION BY PEROXIDES AND OXYGEN DERIVED FREE-RADICALS. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 51, n. 3, p. 283-297, Feb 15 1990. ISSN 0047-6374. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1990CP23000008 >.

PULASKI, L. et al. Identification of the multidrug-resistance protein (MRP) as the glutathione-S-conjugate export pump of erythrocytes. **European Journal of Biochemistry**, v. 241, n. 2, p. 644-648, Oct 15 1996. ISSN 0014-2956. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1996VP65100044 >.

REA, T. D. et al. Incidence of EMS-treated out-of-hospital cardiac arrest in the United States. **Resuscitation**, v. 63, n. 1, p. 17-24, Oct 2004. ISSN 0300-9572. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000224444400004 >.

_____. Increasing use of cardiopulmonary resuscitation during out-of-hospital ventricular fibrillation arrest - Survival implications of guideline changes. **Circulation**, v. 114, n. 25, p. 2760-2765, Dec 19 2006. ISSN 0009-7322. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000243522300005 >.

RHEE, S. G.; WOO, H. A. Multiple Functions of Peroxiredoxins: Peroxidases, Sensors and Regulators of the Intracellular Messenger H₂O₂, and Protein Chaperones. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 15, n. 3, p. 781-794, Aug 2011. ISSN 1523-0864. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000292446300012 >.

ROMERO, J. C.; RECKELHOFF, J. F. Role of angiotensin and oxidative stress in essential hypertension. **Hypertension**, v. 34, n. 4, p. 943-949, 1999. ISSN 0194-911X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000083486500043 >.

ROTHERMUNDT, M. et al. S100B in brain damage and neurodegeneration. **Microscopy Research and Technique**, v. 60, n. 6, p. 614-632, Apr 15 2003. ISSN 1059-910X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000181885200009 >.

RUIZ-BAILEN, M. et al. Reversible myocardial dysfunction after cardiopulmonary resuscitation. **Resuscitation**, v. 66, n. 2, p. 175-181, 2005. ISSN 0300-9572. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000231347700011 >.

SAFAR, P. RESUSCITATION FROM CLINICAL DEATH - PATHOPHYSIOLOGIC LIMITS AND THERAPEUTIC POTENTIALS. **Critical Care Medicine**, v. 16, n. 10, p. 923-941, 1988. ISSN 0090-3493. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1988Q354400003 >.

SAMBORSKA-SABLIK, A.; SABLIK, Z.; GASZYNSKI, W. The role of the immuno-inflammatory response in patients after cardiac arrest. **Archives of Medical Science**, v. 7, n. 4, p. 619-626, Aug 2011. ISSN 1734-1922. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000294988300014 >.

SANDRONI, C. et al. In-hospital cardiac arrest: survival depends mainly on the effectiveness of the emergency response. **Resuscitation**, v. 62, n. 3, p. 291-297, Sep 2004. ISSN 0300-9572. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000223809100006 >.

_____. In-hospital cardiac arrest: incidence, prognosis and possible measures to improve survival. **Intensive Care Medicine**, v. 33, n. 2, Feb 2007. ISSN 0342-4642. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000244026200006 >.

SHARMA, A. B. et al. Oxidative stress reversibly inactivates myocardial enzymes during cardiac arrest. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 292, n. 1, p. H198-H206, Jan 1 2007. ISSN 0363-6135. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000243383300023 >.

SHARPE, P. C.; MULHOLLAND, C.; TRINICK, T. ASCORBATE AND MALONDIALDEHYDE IN STROKE PATIENTS. **Irish Journal of Medical Science**, v. 163, n. 11, p. 488-491, Nov 1994. ISSN 0021-1265. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1994PR12000002 >.

SHINOZAKI, K. et al. Serum S-100B is superior to neuron-specific enolase as an early prognostic biomarker for neurological outcome following cardiopulmonary resuscitation. **Resuscitation**, v. 80, n. 8, p. 870-875, Aug 2009. ISSN 0300-9572. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000268862100007 >.

SIMPSON, P. J.; LUCCHESI, B. R. FREE-RADICALS AND MYOCARDIAL-ISCHEMIA AND REPERFUSION INJURY. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 110, n. 1, p. 13-30, Jul 1987. ISSN 0022-2143. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1987J021100003 >.

TEASDALE, G.; JENNETT, B. ASSESSMENT OF COMA AND IMPAIRED CONSCIOUSNESS - PRACTICAL SCALE. **Lancet**, v. 2, n. 7872, p. 81-84, 1974 1974. ISSN 0140-6736. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1974T535500009 >.

THOM, S. R. et al. Release of glutathione from erythrocytes and other markers of oxidative stress in carbon monoxide poisoning. **Journal of Applied Physiology**, v. 82, n. 5, p. 1424-1432, May 1997. ISSN 8750-7587. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1997WX86800007 >.

VAN ELDIK, L. J.; WAINWRIGHT, M. S. The Janus face of glial-derived S100B: Beneficial and detrimental functions in the brain. **Restorative Neurology and Neuroscience**, v. 21, n. 3-4, p. 97-108, 2003 2003. ISSN 0922-6028. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000186690900003 >.

VERMA, S. et al. Fundamentals of reperfusion injury for the clinical cardiologist. **Circulation**, v. 105, n. 20, p. 2332-2336, 2002. ISSN 0009-7322. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000175853600003 >.

VUKMIR, R. B.; SODIUM BICARBONATE STUDY, G. Prehospital cardiac arrest and the adverse effect of male gender on outcome. **Critical Care Medicine**, v. 27, n. 1, p. A82-A82, Jan 1999. ISSN 0090-3493. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000078236900193 >.

_____. Prehospital cardiac arrest and the adverse effect of male gender, but not age, on outcome. **Journal of Womens Health**, v. 12, n. 7, p. 667-673, Sep 2003. ISSN 1540-9996. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000188439100006 >.

WATANABE, F.; HASHIMOTO, T.; TAGAWA, K. ENERGY-INDEPENDENT PROTECTION OF THE OXIDATIVE-PHOSPHORYLATION CAPACITY OF MITOCHONDRIA AGAINST ANOXIC DAMAGE BY ATP AND ITS NON-METABOLIZABLE ANALOGS. **Journal of Biochemistry**, v. 97, n. 4, p. 1229-1234, 1985. ISSN 0021-924X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1985AES1700030 >.

WEBB, J. D.; COLEMAN, M. L.; PUGH, C. W. Hypoxia, hypoxia-inducible factors (HIF), HIF hydroxylases and oxygen sensing. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, n. 22, p. 3539-3554, Nov 2009. ISSN 1420-682X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000271396600002 >.

WIGGINTON, J. G. et al. Sex-related differences in the presentation and outcome of out-of-hospital cardiopulmonary arrest: A multiyear, prospective, population-based study. **Critical Care Medicine**, v. 30, n. 4, p. S131-S136, Apr 2002. ISSN 0090-3493. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000174970400002 >.

YANG, K. S. et al. Inactivation of human peroxiredoxin I during catalysis as the result of the oxidation of the catalytic site cysteine to cysteine-sulfinic acid. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 41, p. 38029-38036, Oct 11 2002. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000178529600009 >.

YASMIN, W.; STRYNADKA, K. D.; SCHULZ, R. Generation of peroxynitrite contributes to ischemia-reperfusion injury in isolated rat hearts. **Cardiovascular Research**, v. 33, n. 2, p. 422-432, Feb 1997. ISSN 0008-6363. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1997WH79000023 >.

ZWEMER, C. F. et al. Gender differences in 24-hour outcome following resuscitation after 9 minutes of cardiac arrest in dogs. **Critical Care Medicine**, v. 25, n. 2, p. 330-338, Feb 1997. ISSN 0090-3493. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1997WJ26800024 >.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Seu familiar está sendo convidado a participar de uma pesquisa de cunho acadêmico do Grupo de parada cardiorrespiratória do Hospital Conceição, intitulada: **Estudo de Estresse Oxidativo na Síndrome de Injúria-Reperfusão Pós-Parada Cardiorrespiratória através de array de rt-PCR, Parâmetros Hemodinâmicos e Bioquímicos**, que tem como objetivo principal estudar marcadores oxidativos em parada cardiorrespiratória. O tema escolhido se justifica pela importância do manejo dos pacientes pós parada cardiorrespiratória. O trabalho está sendo realizado pela acadêmica Tássia Machado Medeiros e sob a supervisão e orientação da Prof^a Dra. Mara da Silveira Benfato.

INFORMAÇÃO: A parada cardiorrespiratória é a situação clínica onde o paciente não apresenta débito cardíaco, ou seja, o coração e o processo respiratório deixam de funcionar. Este evento acarreta em danos a função dos órgãos, dentre estes os mais prejudicados se incluem o cérebro e o coração. Os mecanismos que causam esses danos ainda não são bem entendidos, mas sabe-se que isto está relacionado com mudanças nos mecanismos de produção de defesas celulares. Este estudo pretende identificar os mecanismos envolvidos com essas defesas para melhorar o tratamento e possivelmente a recuperação do paciente. O material biológico a ser usado na pesquisa será sangue proveniente do cateter central do paciente (não será “picado”), o qual é um procedimento de rotina realizado em qualquer unidade de tratamento intensivo, sem danos ao paciente.

Procedimento do Estudo: As coletas serão realizadas 6h, 12h, 36h e 72h após a parada cardiorrespiratória. Após a coleta as amostras serão encaminhadas para o Laboratório de Estresse Oxidativo, no Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para posterior análise.

Riscos e Benefícios: O paciente não será submetido a nenhum tipo de risco. Os benefícios incluem o melhor conhecimento dos mecanismos envolvidos e posterior aperfeiçoamento do tratamento dos pacientes melhorando o prognóstico de pessoas afetadas por este evento.

Os dados de identificação serão confidenciais e os nomes reservados.

Os dados obtidos serão utilizados somente para este estudo, sendo os mesmos armazenados pelo(a) pesquisador(a) principal durante 5 (cinco) anos e após totalmente destruídos (conforme preconiza a Resolução 196/96).

EU _____, recebi as informações sobre os objetivos e a importância desta pesquisa de forma clara e concordo em participar do estudo.

Declaro que também fui informado:

- Da garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento acerca dos assuntos relacionados a esta pesquisa;
 - De que minha participação é voluntária e terei a liberdade de retirar o meu consentimento, a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo para a minha vida pessoal e nem para o atendimento prestado a mim;
 - Da garantia que não serei identificado quando da divulgação dos resultados e que as informações serão utilizadas somente para fins científicos do presente projeto de pesquisa;
 - Sobre o projeto de pesquisa e a forma como será conduzido e que em caso de dúvida ou novas perguntas poderei entrar em contato com a pesquisadora Tássia Machado Medeiros, telefone (51)2103-2723, email tassia.medeiros@ufrgs.br e endereço rua Bento Gonçalves, n° 9500, prédio 434031, laboratório 110, Bairro Agronomia – Porto Alegre.
 - Também que, se houverem dúvidas quanto a questões éticas, poderei entrar em contato com Daniel Demétrio Faustino da Silva, Coordenador-geral do Comitê de Ética em Pesquisa do GHC pelo telefone 3357-2407, endereço Av. Francisco Trein 596, 3° andar, Bloco H, sala 11.
- Declaro que recebi cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, ficando outra via com a pesquisadora.

Porto Alegre, ____, de _____ de 20__.

Assinatura do entrevistado

Nome:

Assinatura da pesquisadora

Nome da pesquisadora:

Se familiar analfabeto:

Este formulário foi lido para _____ (nome do paciente) em ____/____/____ (data) pelo _____ (nome do pesquisador) enquanto eu estava presente. Obs.: não esquecer de colocar campo de assinatura da testemunha, nome e data.

Assinatura da Testemunha

Nome:

Data: ____/____/____

APENDICE 2

Dados - Pós-parada

Paciente n°: _____

Dados Pessoais

Nome: _____ Idade: _____

Sexo: _____ Origem étnica: _____

Endereço: _____ Telefone: _____

SINAIS VITAIS

	6h pós-parada	12h pós-parada	36h pós-parada	72h pós-parada
PA				
FC				
FR				
Sat O ₂				
Temperatura				

Protocolo de hipotermia? () Sim () Não

Obs.:

Medicações em uso:

Motivo da parada:

EXAMES LABORATORIAIS

pH		Glicose	
PCO ₂		Ác. Úrico	
PO ₂		IST	
HCO ₃		Ferritina	
Sat O ₂		TIBC	
Excesso de Base		Ferro	
Colesterol total		Albumina	
HDL		Hematócrito	
LDL		Leucócitos	
Triglicerídeos		Hb	
PCR-us			