

**Liliane Moreira Ruiz**

**Avaliação funcional e inflamatória de pulmões submetidos  
ao tratamento com solução salina hipertônica em modelo  
de morte encefálica**

Versão Corrigida

(A versão original se encontra disponível na Biblioteca do Programa de Pós-Graduação de Cirurgia Torácica e Cardiovascular e na Biblioteca Digital de teses e Dissertações da USP)

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

Programa: Cirurgia Torácica e Cardiovascular  
Orientador: Prof. Dr. Paulo Manuel Pego  
Fernandes

São Paulo

2021

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

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

©reprodução autorizada pelo autor

Ruiz, Liliane Moreira  
Avaliação funcional e inflamatória de pulmões  
submetidos ao tratamento com solução salina  
hipertônica em modelo de morte encefálica / Liliane  
Moreira Ruiz. -- São Paulo, 2021.  
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo.  
Programa de Cirurgia Torácica e Cardiovascular.  
Orientador: Paulo Manuel Pego Fernandes.

Descritores: 1.Transplante de pulmão 2.Morte  
encefálica 3.Mecânica ventilatória 4.Solução salina  
hipertônica 5.Modelos Animais

USP/FM/DBD-143/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

**Dedicatória**



Aos meus pais Dirceu e Lucia,

“ Eu tenho tanto pra lhes falar  
Mas com palavras não sei dizer  
Como é grande o meu amor por vocês”

Agradecer é pouco a quem me deu vida e ensinou a viver. Pai e mãe, vocês são minha fonte de inspiração e exemplo. Sem vocês eu nada conseguiria.

AMO VOCÊS!!!

A minha irmã Tatiane,

Obrigada pela parceria de sempre, e por todo apoio que sempre dedicou a mim. Não canso de repetir, sou sua fã. Obrigada pelo mais bonito presente que você poderia me dar, a pequerrucha Maria Clara.

AMO VOCÊS!!!

Ao meu amor Marcio Ricardo,

Faltam-me palavras para agradecer por todo apoio e dedicação. Obrigada pela paciência e por ser minha calma em tempos de mares revoltos.

Obrigada por compartilhar dos meus sonhos e expectativas, e principalmente por fazer deles os seus.

AMO VOCÊS!!!

## **Agradecimentos Especiais**

---

---

À Deus por me permitir a experiência da vida.

Aos meus pais, pelo amor e dedicação e por sonharem meus sonhos comigo.

Ao meu amor Marcio Ricardo, pela compreensão, ensinamentos e apoio. Seguir ao seu lado na caminhada da vida é um grande encanto. Vamos longe amor.

À minha irmã Tatiane, sobrinha Maria Clara e cunhado Cassio, por me apoiarem e compreenderem minha ausência em alguns momentos.

Às minhas amigas de longa data, Semíramis e Dna. Dita. A amizade de vocês é um presente, obrigada pelo ombro amigo tantas vezes solicitado. Amo vocês.

Aos meus avós, tios e primos das famílias Moreira e Ruiz. A vida com vocês torna-se muito mais bonita. Obrigada por fazerem parte dela. Amo vocês.

À minha sogra Rosalina e meu sogro Silvio. Obrigada pelo apoio, pela torcida e por me acolherem como uma filha. Vocês são especiais.

Aos meus cunhados Alex Fernando e Fernanda, obrigada pelas risadas, modas sertanejas e cervejas divididas. Vocês alegram qualquer ambiente.

À minha enteada Laura Fernanda. Que delícia é o convívio com você, temos um mundo só nosso de brincadeiras e carinho partilhados, que muitas vezes foi um balsamo em meio ao turbilhão de preocupações.

Ao meu orientador Paulo Manuel Pêgo-Fernandes, obrigada por me aceitar como aluna e por acreditar no meu trabalho. Pelos ensinamentos e pelo exemplo de profissional.

À Natalia Ap. Nepomuceno, que privilegio trabalhar ao seu lado. Obrigada por todo apoio e ensinamentos diários. Você é brilhante.

À Karina Andrighetti, o aprendizado ao seu lado é constante, seja sobre trabalho ou sobre a vida. Você é um exemplo, do tipo de pessoa que temos orgulho de conhecer. Obrigada!!

À Tatiana Machado, uma profissional exemplar. Um prazer trabalhar ao seu lado. Obrigada por toda ajuda na conclusão desta tese.

Aos amigos da Experimental/InCor: Elenice, Richard, Giseli, Nelsinho, Selminha, Sueli, Anderson, Annelise, Suellen e Bruna. Agradeço imensamente a cada um de vocês, por estarem sempre dispostos a ajudar.

Aos amigos do biotério: Dario, Hugo, Roberto, Vicente, Pedro e Edna. Obrigada por cuidarem dos nossos animais com tanto zelo e pela disposição em ajudar.

Ao amigo Aristides, obrigada pela análise estatística e por toda conversa sempre acompanhada de um aprendizado. Você é um professor nato Ari.

Aos amigos da pós graduação: Vanessa Sana, Fabio Riuto e Paolo Oliveira, pelas trocas de informações e sugestões sempre tão valiosas.

Às queridas Neusa, Juliana, Sidney, Monica, Val e Luana do Programa de Cirurgia Torácica e Cardiovascular, obrigada pela ajuda com todos os funcionários.

**Epígrafe**

---

---

“Todos os dias, logo cedo dou uma piscadinha para Deus e peço:

Tomara que as nossas vontades coincidam.

E se não coincidirem, que a Sua prevaleça.”

Caio Fernando de Abreu

**Normatização adotada**

---

---

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento de sua publicação:

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

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

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

## Sumário

---

---

---

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
|          | <b>Lista de abreviaturas, siglas e símbolos.</b> |           |
|          | <b>Lista de figuras</b>                          |           |
|          | <b>Lista de tabelas</b>                          |           |
|          | <b>Resumo</b>                                    |           |
|          | <b>Abstract</b>                                  |           |
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO.....</b>                           | <b>01</b> |
| <b>2</b> | <b>OBJETIVOS.....</b>                            | <b>06</b> |
| 2.1      | Objetivo principal.....                          | 07        |
| 2.2      | Objetivos específicos.....                       | 07        |
| <b>3</b> | <b>REVISÃO DA LITERATURA.....</b>                | <b>08</b> |
| 3.1      | Transplante.....                                 | 09        |
| 3.2      | Transplante Pulmonar.....                        | 11        |
| 3.3      | Disponibilidade de órgãos para doação.....       | 13        |
| 3.4      | Morte Encefálica.....                            | 15        |
| 3.5      | Solução Salina Hipertônica (SSH).....            | 18        |
| 3.6      | Mecânica Respiratória.....                       | 20        |
| <b>4</b> | <b>METODOLOGIA.....</b>                          | <b>23</b> |
| 4.1      | Protocolo Experimental.....                      | 24        |
| 4.2      | Delineamento do Estudo.....                      | 25        |
| 4.2.1    | Anestesia.....                                   | 26        |
| 4.2.2    | Procedimento cirúrgico.....                      | 27        |
| 4.2.3    | Modelo de morte encefálica.....                  | <b>28</b> |
| 4.3      | Avaliação Mecânica Ventilatória.....             | 30        |
| 4.4      | Avaliação Funcional.....                         | 30        |

---

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 4.5      | Contagem de células sanguíneas.....                                     | 31        |
| 4.6      | Análise Histológica.....  | 31        |
| 4.7      | Dosagens de citocinas no Lavado Bronco Alveolar.....                    | 32        |
| 4.7.1    | Teste ELISA - <i>Enzime-Linked Immunosorbent Assay</i> – Etapas.....    | 32        |
| 4.8      | Dosagens de citocinas no tecido pulmonar.....                           | 33        |
| 4.9      | Avaliação utilizando doppler transcraniano.....                         | 33        |
| 4.10     | Análise estatística.....  | 34        |
| 4.11     | Análises estatísticas descritivas.....                                  | 34        |
| 4.12     | Análises estatísticas inferenciais.....                                 | 34        |
| <b>5</b> | <b>RESULTADOS.....</b>  | <b>35</b> |
| 5.1      | Pressão Arterial Média.....   | 36        |
| 5.2      | Dados Gasometria.....   | 37        |
| 5.3      | Mecânica Ventilatória.....  | 39        |
| 5.3.1    | Resistencia das Vias Aéreas (RAW).....                                  | 40        |
| 5.3.2    | Resistencia Tecidual (Gtis).....  | 40        |
| 5.3.3    | Elastância (Htis).....  | 41        |
| 5.4      | Ensaio Imunoenzimatico ELISA.....                                       | 42        |
| 5.5      | Dosagem de citocinas e malondialdeído no tecido pulmonar Multiplex..... | 42        |
| 5.6      | Análise Histológica.....  | 46        |
| 5.6.1    | Infiltrado Neutrofílico.....  | 46        |
| 5.6.2    | Edema perivascular.....   | 48        |
| 5.7      | Avaliação utilizando doppler transcraniano.....                         | 49        |
| <b>6</b> | <b>DISCUSSÃO.....</b>   | <b>51</b> |
| <b>7</b> | <b>CONCLUSÕES.....</b>  | <b>61</b> |
| <b>8</b> | <b>ANEXOS.....</b>  | <b>63</b> |
| <b>9</b> | <b>REFERÊNCIAS.....</b>   | <b>69</b> |

**Listas**

---

---

ABTO – Associação Brasileira de Transplante de Órgãos;

Gtis - Resistência de tecidos;

Htis - Elastância de tecidos;

ICAM - Molécula de adesão intercelular;

SSH – Solução Salina Hipertônica;

MDA – Malondialdeído;

TxP – Transplante Pulmonar;

IL - Interleucina;

ISHLT - International Society for Heart & Lung Transplantation;

LIM – Laboratório de Investigação Médica;

ME – Morte encefálica;

MV – Mecânica ventilatória.

NaCl – Cloreto de sódio;

PAM – Pressão Arterial Média;

PIC – Pressão Intracraniana;

Raw - Resistência de vias aéreas;

TNF- $\alpha$  - Fator de necrose tumoral alfa;

|   | Pág. |
|---|------|
| <b>Figura 1</b> Gráfico mostrando a evolução do número de transplantes ao longo dos últimos 10 anos, no cenário brasileiro..... | 14   |
| <b>Figura 2</b> Esquema com os processos fisiopatológicos da morte encefálica.<br>.....   | 16   |
| <b>Figura 3</b> Esquemática do protocolo experimental.....  | 26   |
| <b>Figura 4</b> (4A) Broca motorizada; (4B) Cateter do tipo Fogarty-4F (Edwards Lifescience LLC, Irvine, CA, USA) .....         | 28   |
| <b>Figura 5</b> Sequência da trepanação na calota craniana do animal.<br>.....  | 29   |
| <b>Figura 6</b> Animal traqueostomizado, cateterizado e com cateter Fogarty-4F já inserido e insuflado na calota craniana.....  | 29   |
| <b>Figura 7</b> Lâmina de parênquima pulmonar para quantificação do infiltrado neutrofílico.....                                | 47   |
| <b>Figura 8</b> Lâmina de parênquima pulmonar para avaliação de edema perivascular. ....  | 49   |
| <b>Figura 9</b> Avaliação descritiva do doppler transcraniano.....  | 50   |

|                   |  |    |
|-------------------|--|----|
| <b>Gráfico 1</b>  | Pressão arterial média dos animais.....  | 37 |
| <b>Gráfico 2</b>  | Quantificação de leucócitos no sangue periférico colhidos nos momentos inicial e final do experimento..... | 39 |
| <b>Gráfico 3</b>  | Avaliação da mecânica ventilatória, resistência das vias aéreas dos pulmões.....                           | 40 |
| <b>Gráfico 4</b>  | Avaliação da mecânica ventilatória, resistência tecidual dos pulmões.....                                  | 41 |
| <b>Gráfico 5</b>  | Avaliação da elastância pulmonar ao longo do tempo.....  | 41 |
| <b>Gráfico 6</b>  | Dosagem de citocinas IL-1 $\beta$ .....  | 43 |
| <b>Gráfico 7</b>  | Dosagem de citocinas IL-6.....   | 44 |
| <b>Gráfico 8</b>  | Dosagem dos níveis IL-10 no tecido pulmonar.....   | 44 |
| <b>Gráfico 9</b>  | Dosagem de citocinas TNF-alfa.....   | 45 |
| <b>Gráfico 10</b> | Dosagem de biomarcador para dano oxidativo. Malondialdeído (MDA).....                                      | 45 |
| <b>Gráfico 11</b> | Infiltrado Neutrofílico.....   | 46 |
| <b>Gráfico 12</b> | Presença de edema perivascular .....   | 48 |

|                 |  |    |
|-----------------|--|----|
| <b>Tabela 1</b> | Análise de gases do sangue arterial e venoso.....  | 38 |
| <b>Tabela 2</b> | Análise dos marcadores inflamatórios. Ensaio Imunoenzimático ELISA – realizado no lavado bronco alveolar.....  | 42 |
| <b>Tabela 3</b> | Tabela com média e erro padrão da análise de interleucinas no tecido pulmonar (pg/mg).....                     | 64 |
| <b>Tabela 4</b> | Tabela com média e erro padrão da análise de malondialdeído no tecido pulmonar (ng/mL) pela técnica ELISA..... | 65 |
| <b>Tabela 5</b> | Tabela com média e erro padrão da avaliação da resistência das vias aéreas (RAW).....                          | 65 |
| <b>Tabela 6</b> | Tabela com média e erro padrão da avaliação da resistência tecidual (Gtis).....                                | 65 |
| <b>Tabela 7</b> | Tabela com média e erro padrão da avaliação da elastância (Htis).....  | 66 |
| <b>Tabela 8</b> | Tabela com média e erro padrão da avaliação de edema perivascular pela técnica de H/E.....                     | 66 |
| <b>Tabela 9</b> | Tabela com média e erro padrão da avaliação de infiltrado neutrofílico pela técnica de H/E.....                | 66 |

**Resumo**

---

---

Ruiz LM. *Avaliação funcional e inflamatória de pulmões submetidos ao tratamento com solução salina hipertônica em modelo de morte encefálica [tese]*. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021.

**Introdução:** O transplante de órgãos representa uma forma de tratamento para diversas pneumopatias em estágio avançado. O doador em Morte Encefálica (ME) é fonte majoritária para transplante de pulmão. A ME induz uma série de alterações hemodinâmicas, hormonais e inflamatórias que podem deteriorar a viabilidade dos órgãos. A elucidação destas alterações pode levar a um melhor tratamento dos doadores de órgãos e, conseqüentemente, a um melhor desfecho após o transplante. A solução salina hipertônica (SSH) é comumente utilizada no cenário clínico, pois apresenta expansão rápida de volume intravascular e ação imunomodulatória. O objetivo deste trabalho é investigar a atuação da SSH na mecânica ventilatória e na atividade inflamatória de pulmões de ratos submetidos a ME. **Métodos:** Ratos Wistar foram distribuídos em 4 grupos: Control, n = 10 (Control): ratos submetidos à extração do bloco cardiopulmonar; Morte Encefálica, n = 8 (ME): ratos tratados com solução salina isotônica (4 mL/kg) imediatamente após a morte encefálica; Salina Hipertônica 0h, n = 9 (Hip.0'): ratos tratados com solução salina hipertônica (4 mL/kg) imediatamente após a morte encefálica; Salina Hipertônica 1h, n = 9 (Hip.60'): ratos tratados com solução salina hipertônica (4 mL/kg) decorridos 60 minutos da morte encefálica. Foram avaliadas as características hemodinâmicas, as trocas gasosas, mecânica ventilatória, mediadores inflamatórios e avaliação histopatológica do pulmão ao longo de 240 minutos de ME. **Resultados:** Todos os grupos apresentaram comportamento semelhante quanto a pressão arterial média, sendo observado pico hipertensivo seguido por período de hipotensão. A ME causou queda nos valores de pH, pO<sub>2</sub> e HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (p<0,05), além de queda nos valores de leucócitos totais. Na mecânica ventilatória, observamos aumento da resistência das vias aéreas (RAW), resistência tecidual (Gtis) e elastância (Htis) no grupo ME (p<0,05), os grupos tratados não apresentaram comprometimento dos parâmetros analisados ao longo do tempo (p>0,05). Na dosagem de citocinas e malondialdeído avaliados no tecido pulmonar, o grupo Control diferiu dos demais grupos, apresentando valores mais baixos. Na análise histológica, o grupo ME apresentou maior área de edema perivascular e maior contagem de neutrófilos do que o grupo control e o grupo Hip.60' (p <0,05). **Conclusão:** O tratamento com a SSH foi eficaz para prevenir as alterações dos componentes elásticos e resistivos pulmonares, mantendo-os em níveis basais. Constatamos que o tratamento tardio reduziu edema perivascular e recrutamento de neutrófilos no tecido pulmonar.

**Descritores:** Transplante de pulmão; Morte encefálica; Solução salina hipertônica; Modelos Animais.

## **Abstract**



Ruiz LM. *Functional and inflammatory evaluation of lungs submitted with hypertonic saline treatment in a brain death model* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2021.

**Introduction:** Organ transplantation represents a form of treatment for several lung diseases at an advanced stage. The Brain Death (BD) donor is the major source for lung transplantation. BD induces a series of hemodynamic, hormone and inflammatory changes that can deteriorate organ viability. The elucidation of these changes can lead to a better treatment of organ donors and, consequently, to a better outcome after transplantation. Hypertonic saline solution (HSS) is used in the clinical setting because of the rapid expansion of intravascular volume and immunomodulatory action. The aim of this work is to investigate the role of HSS in ventilatory mechanics and in the inflammatory activity of the lungs from rats submitted to BD. **Methods:** Wistar rats were divided in 4 groups: Control, n = 10 (Control): rats discovered by cardiopulmonary block extraction; Brain Death, n = 8 (BD): rats treated with isotonic saline solution (4 mL/kg) immediately after brain death; Hypertonic saline 0h, n = 9 (Hip.0 '): rats treated with hypertonic saline solution (4 mL/kg) immediately after brain death; Hypertonic saline 1h, n = 9 (Hip.60 '): rats treated with hypertonic saline solution (4 mL / kg) 60 minutes after brain death. They were evaluated as hemodynamic characteristics, such as gas exchange, ventilatory mechanics, inflammatory mediators and histopathological evaluation of the lung over 240 minutes of BD. **Results:** All groups have shown the same pattern regarding to mean arterial blood pressure, with a sharp increase followed by hypotension. BD caused a drop in pH, pO<sub>2</sub> and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> values (p < 0.05), in addition to a drop in total leukocyte values. In ventilatory mechanics, we observed an increase in airway resistance (RAW), tissue resistance (Gtis) and elastance (Htis) in the BD group (p < 0.05), the groups treated with no impairment of parameters over time ( p> 0.05). Regarding to cytokine and malondialdehyde levels, the Control group differed from the other groups, with lower values. The BD group has a larger area of perivascular edema and a higher neutrophil count than the control group and the Hip.60 ' group (p <0.05). **Conclusion:** Treatment with HSS was effective in preventing changes in pulmonary elastic and resistive components, keeping them at basic levels. We found that late treatment reduced perivascular edema and neutrophil recruitment in lung tissue.

**Descriptors:** Lung transplantation; Brain death; Hypertonic saline solution; Model, Animal.

# Introdução



O transplante pulmonar representa uma forma de tratamento para diversas pneumopatias em estágio avançado, evidenciando uma melhora significativa na qualidade de vida, aumentando o tempo de sobrevivência dos pacientes acometidos por diferentes patologias<sup>1,2</sup>. O transplante de pulmão ganhou notoriedade após grandes avanços na área da terapia intensiva, imunologia e farmacologia<sup>3,4</sup>. Um expressivo aumento no número de centros transplantadores ao redor do mundo, com resultados efetivos, desencadeou um relevante crescimento de pacientes em listas de espera, uma consequência já esperada, devido ao aumento da credibilidade na técnica<sup>5</sup>. Segundo *The International Society of Heart & Lung Transplantation* (ISHLT), houve uma evolução no número de transplantes realizados, o procedimento passou de cerca de 2000 casos em 2005, para pouco mais de 4000 casos em 2015<sup>6,7</sup>.

Embora o número de transplantes realizados tenha aumentado, ainda existe um desequilíbrio relacionado à oferta de órgãos disponíveis e o número de pessoas que aguardam o transplante, decorrendo uma maior mortalidade em fila de espera devido à escassez de órgãos para doação<sup>6,8</sup>. A maior causa dos insucessos em transplantes está relacionado à disfunção primária do enxerto, uma lesão proveniente do processo de isquemia e reperfusão, que resulta em aumento da morbidade e mortalidade no período pós-operatório<sup>8-10</sup>, que ocorre nas primeiras 72h pós-transplante e é caracterizada por dano alveolar inespecífico, edema pulmonar e hipoxemia<sup>6,8,9</sup>.

Os doadores de órgãos são, em geral, vítimas de trauma encefálico associado à acidentes de trânsito, quedas ou agressões<sup>4,10</sup>. O trauma encefálico quando seguido de morte encefálica (ME), compreende a parada irreversível das funções do encéfalo, sendo um processo complexo que altera não apenas a fisiologia, mas também a bioquímica celular<sup>10</sup>.

Na ME ocorre uma série de eventos em cascata, culminando em um intenso processo inflamatório, que conduzem a disfunção múltipla de órgãos, repercutindo na qualidade dos órgãos transplantados<sup>4,10-12</sup>. A ME inicia-se pelo aumento progressivo da pressão intracraniana, em decorrência da expansão volumétrica do conteúdo intracraniano. Com o aumento do volume intracraniano, o conteúdo liquórico é drenado, causando comprometimento no retorno venoso, com elevação progressiva da pressão intracraniana (PIC)<sup>4,10,12</sup>. Este processo resulta na herniação transtentorial do tronco cerebral pelo forâmen magno, elevando a PIC até o momento que interrompe completamente a circulação arterial encefálica, causando a ME<sup>4,10,12</sup>.

O momento que precede a herniação cerebral é marcado por extrema elevação da pressão intracraniana e por hiperestimulação simpática, levando à Tríade de Cushing, também conhecida como tempestade autonômica. Essa estimulação desenfreada é rápida e leva à hipertensão, bradicardia e elevação do débito cardíaco. Essa é a última tentativa do organismo de manter a perfusão cerebral. Após a tempestade autonômica ocorre a perda do tônus simpático levando a uma profunda vasodilatação<sup>10-12</sup>.

Durante o período de intensa descarga adrenérgica o sangue é redistribuído e ocorre um aumento do retorno venoso ao ventrículo direito o qual aumenta rapidamente seu débito, aumentando o fluxo pulmonar. Simultaneamente a este processo, a pressão de átrio esquerdo está elevada devido à vasoconstrição periférica intensa de tal forma que a pressão hidrostática capilar é muito aumentada promovendo ruptura de capilares com edema intersticial e hemorragia alveolar<sup>10,12</sup>.

Além disso, a tempestade autonômica determina a ativação do sistema imunológico, que se caracteriza pelo aumento na expressão de mediadores inflamatórios, como as interleucinas IL-1 $\beta$ , IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF) -  $\alpha$ , desencadeando o risco de lesão pulmonar na reperfusão do órgão<sup>12-15</sup>.

A solução salina hipertônica (SSH) é comumente utilizada na prática clínica. Se caracteriza por ser um expansor de volume utilizado no tratamento do choque hemorrágico, no qual ocorre uma importante perda de sangue, devendo ser a pressão arterial restabelecida com rapidez, a fim de preservar a vida e diminuir sequelas<sup>16-19</sup>. Além disso, a SSH atua nos neutrófilos, macrófagos e células T, diminuindo a inflamação<sup>19-21</sup>.

Estudos propuseram a administração de pequenos volumes (4mL/kg) de solução salina hipertônica a 7,5% para o tratamento do choque hemorrágico<sup>18,22</sup>, condição frequente em traumatismos cujo desfecho pode ser a ME. O presente trabalho foi baseado nas vantagens da SSH, que inclui a necessidade de pouco volume em relação a outras soluções, além de possuir importante

efeito imunomodulatório<sup>16</sup>. Estudos com SSH, em casos de trauma encefálico, demonstram o aumento no diâmetro dos vasos cerebrais e diminuição na adesão endotelial de leucócitos<sup>20</sup>.

Trabalhos prévios demonstraram que a ME é um dos fatores, relacionados ao doador, associados aos piores resultados do enxerto após transplante de fígado, rim, coração e pulmão<sup>8, 13, 23-25</sup>. Desta forma, os cuidados com o doador para a preservação do pulmão, parecem ter importância fundamental na função pulmonar após o transplante<sup>8, 13, 23, 24, 26</sup>. Os pulmões são órgãos altamente vulneráveis aos eventos que se seguem à morte encefálica. A SSH por vezes utilizada como expansor volumétrico em doadores em choque, possui efeitos hemodinâmicos e imunomodulatórios que podem contribuir na preservação dos pulmões em doadores após ME.

Nesse estudo pesquisamos a evolução da função pulmonar, da mecânica ventilatória e do processo inflamatório, em modelo experimental de ME em ratos submetidos ao tratamento com SSH ao longo de 4 horas.

## **2. Objetivos**

---

---

## **2.1 Objetivo Principal**

Avaliar o impacto da solução salina hipertônica, na mecânica ventilatória e inflamação, em modelo experimental de morte encefálica.

## **2.2 Objetivos Específicos**

Analisar o perfil inflamatório dos diferentes grupos, através da análise da expressão de marcadores inflamatórios e estresse oxidativo para: TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$ , IL-6, IL-10, ICAM e MDA;

Avaliar o efeito do tratamento com solução salina hipertônica na infiltração neutrofílica no tecido pulmonar;

Investigar o impacto do tratamento com solução salina hipertônica na formação de edema perivascular em tecido pulmonar.

### **3. Revisão de Literatura**

---

---

### 3.1 Transplante

O interesse do homem pelo corpo pode ser comprovado por meio de escritos filosóficos, teológicos, médicos e de enfermagem, no qual eram descritos os cuidados e as experiências do indivíduo em relação aos órgãos do corpo humano durante vários períodos da história da humanidade<sup>27, 28</sup>. Existem relatos que demonstram que o transplante já aparecia como ideia em registros no ano 300 a.C.<sup>29, 30</sup>.

Inúmeras descobertas ao longo dos anos e as experiências em transplante de órgãos se fortaleceram a partir do século XX<sup>27</sup>, principalmente com o desenvolvimento da técnica de anastomose, uma técnica operatória revolucionária<sup>27, 29, 30</sup>.

Ao analisar a história dos transplantes no mundo, nota-se que se trata de uma narrativa de sucesso. Através do inegável avanço em um curto espaço de tempo, marcado por incansáveis tentativas, seguidas de conquistas, perdas e algumas decepções<sup>30</sup>. Alexis Carrel e Guthrie foram os primeiros a realizarem um transplante cardíaco, inicialmente utilizando um modelo animal canino, realizado no *Rockefeller Institute* e no *Johns Hopkins University*. Por este estudo, em 1912 receberam o prêmio Nobel em fisiologia e medicina, demonstrando a importância que a comunidade científica expressava frente a possibilidade de realizar transplantes<sup>27, 29, 30</sup>.

O primeiro grupo a relatar a rejeição do enxerto foi Mann e colaboradores no ano de 1933, na *Georgetown University*, através de um transplante cardíaco heterotópico no pescoço de cães, no qual observaram infiltração no tecido cardíaco por leucócitos. Entre os anos de 1918 e 1920, Dederrer e equipe concluíram, através de transplante renal realizado entre gêmeos univitelinos, que não houve nenhum tipo de rejeição do enxerto<sup>30</sup>.

Em 1940, na antiga União Soviética, Demikhov desenvolveu um estudo pioneiro em cães com uma técnica cirúrgica simples, essencial para o sucesso dos seus experimentos e fundamental para demonstrar para a comunidade científica, a exequibilidade do transplante de coração e de coração-pulmão<sup>29, 30</sup>.

No ano de 1967, o cirurgião de um hospital sul-africano Christian Neethling Barnard, tornou-se o pioneiro dos transplantes de coração em humanos<sup>28-30</sup>. A realização do transplante de coração foi um incentivo aos estudos das reações de rejeição do enxerto, a importância do diagnóstico precoce e sua prevenção<sup>27</sup>. Um fato determinante na era dos transplantes, no que se refere ao cenário da farmacologia, foi a descoberta dos medicamentos imunossupressores, o qual possibilitou a redução dos efeitos de rejeição do enxerto<sup>30</sup>.

Houve uma revolução no meio científico, após os anos 60, com a descoberta da azatioprina. No entanto, este imunossupressor de primeira

geração era pouco seletivo, ou seja, impedia de forma inespecífica a proliferação das células ativadas<sup>29</sup>.

A partir de 1975, foi desenvolvida a ciclosporina, que age na produção das linfocinas, tornando a imunossupressão mais específica, dando um novo estímulo para a realização dos transplantes<sup>30</sup>.

No Brasil, a realização dos transplantes teve seu início no Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, na década de 60, sendo atualmente um Hospital de referência e de desenvolvimento de tecnologia nesta área com impacto nacional e internacional<sup>30</sup>.

No dia 26 do mês de Março de 2018, foram comemorados os 50 anos do primeiro transplante homólogo ortotópico e com sucesso, ocorrido no Brasil e na América do Sul, realizado em humanos e executado pelo Professor Euricydes de Jesus Zerbini e equipe.

### **3.2 Transplante Pulmonar**

As primeiras técnicas descritas na literatura, no que se refere ao transplante de pulmão, tiveram seu início em 1905, realizado pelo cirurgião vascular Alexi Carrel, que demonstrou por meio de estudos experimentais a viabilidade da técnica de anastomose de vasos<sup>28</sup>.

Em 1940, o cirurgião russo Demikhov, executou inúmeros transplantes de pulmão em cães, sem apresentar quadro de hipotermia e sem a necessidade do uso da circulação extracorpórea, demonstrando a exequibilidade da técnica cirúrgica do transplante<sup>30</sup>. Após 10 anos, na França, Henri Metras realizou vários transplantes pulmonares em cães, com uma sobrevida considerável para a época, de até 20 dias, sendo que diversas técnicas retratadas por Metras, são utilizadas nos dias atuais<sup>30</sup>. Na década de 60, James Hardy e equipe contribuíram de forma significativa para a história dos transplantes, realizando mais de 400 transplantes de pulmão em cães, nos quais puderam constatar que a rejeição do enxerto poderia ser controlada com o uso de imunossupressores. Efetuaram, em 1963, o primeiro transplante de pulmão em humanos. Tratava-se de um transplante unilateral esquerdo e o paciente evoluiu para óbito após 18 dias por insuficiência renal<sup>30</sup>.

A partir do estudo de James Hardy, as portas se abriram para que novos grupos realizassem o transplante de pulmão ao redor do mundo, porém, o sucesso da técnica ainda era limitado, em virtude da disfunção primária do enxerto, sepse ou rejeição aguda<sup>30</sup>.

No ano de 1980, na “era pós ciclosporina”, um grupo da Universidade de Standford, realizou o primeiro transplante utilizando o bloco coração-pulmão, no qual a paciente apresentou uma sobrevida de mais de cinco anos. Este acontecimento encorajou outros grupos a realizarem este procedimento. Em 1983, o grupo liderado pelo Dr. Joel Cooper em Toronto, realizou o primeiro

transplante isolado de pulmão. A partir desses primeiros movimentos, outras técnicas foram sendo desenvolvidas e as já existentes foram aprimoradas<sup>28, 30</sup>.

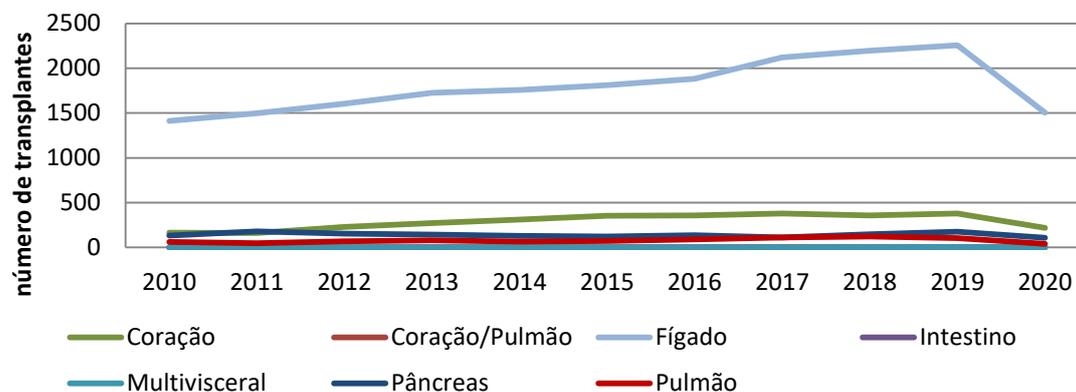
O avanço das técnicas cirúrgicas e a descoberta de novos imunossuppressores tornaram o transplante uma alternativa sólida e muito utilizada nos dias atuais<sup>31, 32</sup>.

Atualmente, no Brasil, existem seis centros de transplantes pulmonares ativos, distribuídos em três estados (Rio Grande do Sul (2), São Paulo (3) e Ceara (1))<sup>7</sup>.

### **3.3 Disponibilidade de órgãos para doação**

Existem fatores limitantes quanto à oferta de órgão para transplante, que apresentam variações de acordo com a realidade de cada país. O aproveitamento de pulmões doados internacionalmente é de aproximadamente 20%, e em São Paulo esta taxa é de apenas 5%<sup>6</sup>. Apesar do crescimento no número de transplante nos últimos anos, esse valor ainda é muito inferior quando comparado aos outros órgãos sólidos (Figura 01). Diversos fatores contribuem para essa frequência, por exemplo, o caráter complexo do processo cirúrgico, exigindo equipe médica especializada<sup>6</sup>.

## Número Absoluto de transplantes (anual)



|                       | 2010 | 2011 | 2012 | 2013 | 2014 | 2015 | 2016 | 2017 | 2018 | 2019 | 2020 |
|-----------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| <b>Coração</b>        | 166  | 160  | 228  | 272  | 311  | 353  | 357  | 380  | 357  | 378  | 218  |
| <b>Coração/Pulmão</b> | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    | 2    | 0    |
| <b>Fígado</b>         | 1412 | 1497 | 1603 | 1726 | 1758 | 1810 | 1882 | 2122 | 2195 | 2256 | 1506 |
| <b>Intestino</b>      | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    | 0    | 0    | 0    | 2    |
| <b>Multivisceral</b>  | 0    | 0    | 0    | 1    | 0    | 2    | 0    | 1    | 0    | 4    | 1    |
| <b>Pâncreas</b>       | 133  | 181  | 153  | 143  | 128  | 121  | 135  | 113  | 146  | 175  | 108  |
| <b>Pulmão</b>         | 61   | 49   | 69   | 80   | 67   | 74   | 92   | 112  | 121  | 104  | 39   |

**Figura 01:** Evolução do número de transplantes ao longo dos últimos anos no cenário brasileiro.

Fonte: Adaptado dos registros da Sociedade Brasileira de Transplante de Órgãos (ABTO) 2020.

Apesar dos grandes avanços relacionados às técnicas de transplantes e aos cuidados com o doador, o número de órgãos viáveis disponíveis para transplante continua abaixo do necessário, e em consequência pessoas morrem à espera de órgãos<sup>33</sup>. O tempo médio aproximado de espera em lista para receber o transplante pulmonar é de 18 meses<sup>32</sup>. Segundo dados da literatura, cerca de 40% dos pacientes que aguardam pelo transplante pulmonar acabam não resistindo e evoluindo para óbito<sup>32, 33</sup>.

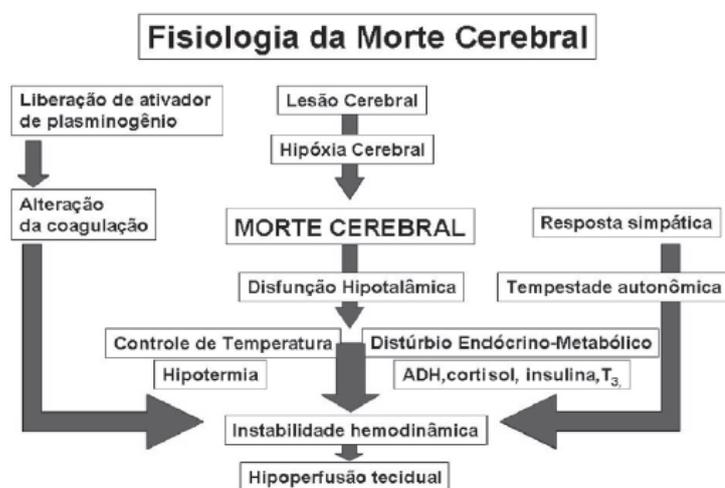
Existem alguns fatores que contribuem de forma significativa para a recusa dos órgãos para transplante, com conseqüente redução no número de cirurgias realizadas. Destes, podemos destacar a recusa familiar, a causa morte e a demora em diagnosticar o processo de morte encefálica. Essas duas últimas situações levam a uma piora considerável do órgão, tornando-o muitas vezes inviável para o transplante<sup>6, 27</sup>.

### **3.4 Morte Encefálica**

Em 1959 a ME foi descrita pela primeira vez como “*coma depaseé*”, após avaliação de pacientes em coma com ausência de respostas a estímulos dolorosos<sup>4, 34, 35</sup>.

O processo de morte encefálica apresenta alta complexidade, alterando a bioquímica celular e a fisiologia do organismo como um todo, ocorrendo principalmente hipertensão arterial, bradicardia e alterações no padrão respiratório (Figura 2). Estas alterações que ocorrem no momento inicial ou até mesmo as que ocorrem tardiamente influenciam na viabilidade de múltiplos órgãos para doação<sup>4, 36</sup>.

Estudos recentes demonstram que o processo de morte encefálica, induz injúria pulmonar devido à intensa resposta inflamatória do organismo e instalação do processo de estresse oxidativo<sup>37-39</sup>.



**Figura 2:** Esquema com os processos fisiopatológicos da morte encefálica. (Fonte D'Império F. 2006)

O trauma inicial desencadeia uma cascata de eventos, como danos teciduais e a obstrução dos fluidos ou ainda a acumulação abundante de líquido, resultando em um aumento gradativo da pressão intracraniana e comprometimento do retorno venoso<sup>4,35,39</sup>. Com o comprometimento da perfusão tecidual do encéfalo ocorrem formações de áreas isquêmicas, que atingem o tronco encefálico ocorrendo a liberação de catecolaminas, levando a um comprometimento da região distal do mesencéfalo e o centro vagal

cardiomotor. Este evento é conhecido como tempestade autonômica ou simpática, promovendo um aumento da hipertensão arterial sistêmica, bradicardia e alterações do ritmo respiratório. Esses três sinais são conhecidos como tríade de Cushing, descrito pela primeira vez em 1902 pelo neurocirurgião americano Harvey Cushing<sup>40</sup>. Segundo a literatura, atinge 1/3 dos casos de hipertensão intracraniana, e indica perigo iminente de herniação cerebral e necessidade imediata de descompressão<sup>40</sup>. Essas variações hemodinâmicas contribuem para a lesão isquêmica que ocorre nos órgãos dos doadores<sup>4, 6, 8</sup>.

Esses acontecimentos pós-morte encefálica promovem efeitos diretos e danosos no tecido pulmonar. A hipertensão sistêmica, por exemplo, promove uma pressão elevada nos capilares pulmonares, resultando em danos endoteliais<sup>9</sup>.

Os pacientes que apresentam instabilidade hemodinâmica e são submetidos à ressuscitação hídrica, podem piorar o quadro de edema pulmonar. Estas alterações culminam com o desequilíbrio da ventilação, perfusão e hipoxemia. Além disso, ocorre a ativação do sistema imune, em virtude da tempestade autonômica, caracterizada pelo aumento na expressão de mediadores inflamatórios, incluindo citocinas, como a interleucina IL-1 $\beta$ , IL-6, fator de necrose tumoral alfa TNF- $\alpha$ , aumentando assim o risco de injúria pulmonar na reperfusão do órgão<sup>9, 10, 12-14, 27</sup>.

### 3.5 Solução Salina Hipertônica

A SSH é um cristalóide com elevada concentração de cloreto de sódio, que desde a década de 80, vêm sendo utilizada na prática clínica como uma alternativa segura e eficiente na reanimação de vítimas do choque hemorrágico<sup>16, 17</sup>.

Estudos em animais demonstram o potencial efeito da solução salina hipertônica, não se restringindo apenas ao restabelecimento da pressão arterial como expansor de volume, mas também como um controlador de arritmias cardíacas, além da modulação inflamatória e redução de sequelas de lesões no cérebro e coração<sup>16, 20</sup>.

Devido a seu potencial osmótico, a SSH apresenta efeitos hemodinâmicos e vasoregulador. Os efeitos hemodinâmicos estão associados à expansão do volume no interior do vaso levando ao aumento e manutenção da pressão arterial média. O efeito vasoregulador está relacionado ao aumento do diâmetro vascular pela expansão plasmática, diminuição do edema celular endotelial e redução da resistência vascular. Além disso, a SSH tem efeito imunomodulatório que está associado à inibição da atividade leucocitária<sup>18, 22, 41, 42</sup>.

O meio de administração da SSH comumente utilizada é por via endovenosa, utilizando para isso uma bomba de infusão. Os efeitos adversos observados são: mielinolise pontina (doença desmielinizante causada por oscilações abruptas na osmolaridade sérica), falência renal e sobrecarga hídrica, podendo levar ao edema periférico ou falência cardíaca<sup>18, 22, 42</sup>.

Estudos propõem a administração de pequenos volumes (4 mL/kg) de SSH a 7,5% para o tratamento do choque hemorrágico, condição frequente em traumatismos cujo desfecho é a morte encefálica. Essa proposta é baseada nas vantagens da SSH, incluindo a necessidade de pouco volume em relação a outras soluções, além de possuir importante efeito imunomodulatório<sup>16, 20</sup>. Em casos de trauma encefálico, o uso de SSH aumentou o diâmetro dos vasos cerebrais e diminuiu adesão endotelial de leucócitos<sup>17, 20</sup>.

### **3.6 Mecânica Respiratória**

A ventilação mecânica é uma peça fundamental no suporte a vida. Existe uma correlação entre danos cerebrais e alteração na mecânica ventilatória já bem explorada na literatura<sup>43</sup>.

Conceitualmente a mecânica respiratória envolve o processo de expiração e inspiração, esse movimento de entrada e saída de ar é dependente de forças externas, podendo ser espontânea, realizado pelos músculos respiratórios ou de forma artificial, quando uma máquina gera a pressão entre o sistema de ventilação e a via aérea. O conjunto pulmão–parede torácica pode ser comparado a duas molas que se empurram uma contra a outra<sup>43</sup>. O fenômeno físico do movimento pulmonar é influenciado pela impedância do sistema respiratório. Entende-se por impedância, a somatória das forças opostas à expansão pulmonar na fase inspiratória, ou seja, se desenvolve em função da resistência elástica dos tecidos<sup>43, 44</sup>.

A inspiração acontece quando ocorre um desequilíbrio entre a pressão dos pulmões e a pressão da parede torácica. No momento da inspiração, a pressão gerada pelos músculos responsáveis por esse movimento devem superar a retração elástica dos pulmões e da parede torácica<sup>43</sup>.

A curva de pressão-volume reflete as propriedades elásticas do pulmão. Para cada volume é determinado uma pressão transpulmonar. A pressão transpulmonar é determinada pela diferença entre a pressão alveolar e pleural<sup>44</sup>.

Devido as estruturas elásticas presente nos pulmões, ocorrem variações de volume de acordo com a tensão exercida sobre a massa tecidual, essas variações de volume que estão relacionadas às variações de pressão

denominam-se complacência, isto é, a complacência do sistema respiratório pode ser entendida pela capacidade de se distender dos pulmões, uma medida das propriedades elásticas dos pulmões e do tórax e da sua resistência à deformidade frente a qualquer força representada por esforços variáveis<sup>44</sup>.

A elastância é definida como a variação de pressão (cmH<sub>2</sub>O, mmHg ou kPa) por unidade de variação de volume (L ou mL), sendo usada para descrever as propriedades elásticas do sistema respiratório, além disso, a elastância é o inverso da complacência, exemplificando: Um pulmão enrijecido apresenta baixa complacência e alta elastância<sup>44</sup>.

A resistência total do sistema respiratório pode ser subdividida em duas partes, a resistência das vias aéreas (propriedades viscoelásticas dos pulmões) e resistência tecidual/adicional. Entende-se por resistência das vias aéreas o grau de dificuldade que o fluxo de ar tem para se movimentar através das vias aéreas, sendo esse um parâmetro importante na avaliação funcional pulmonar<sup>45</sup>.

Algumas condições patológicas, tais como, fibrose pulmonar, edema pulmonar, atelectasias e hipertensão pulmonar tendem a reduzir a complacência pulmonar, isto é, para uma mesma variação de volume é necessário uma grande variação de pressão<sup>43, 46</sup>.

A resistência das vias aéreas está relacionada ao fluxo nas vias aéreas entre a boca e os alvéolos, e relaciona-se à dificuldade que o fluxo de ar tem

para se movimentar através das vias aéreas. Pode ser calculada pela diferença que existe de pressão entre o alvéolo e a boca, dividida pela taxa de fluxo aéreo<sup>45, 47</sup>.

A lesão cerebral, independente da causa, está relacionada a umas das mais importantes ocorrências de morte no cenário atual. E nesta situação, há uma parcela significativa de pacientes que desenvolvem complicações, sendo a disfunção respiratória uma das mais comuns, e estes achados podem estar correlacionados a um pior desfecho neurológico<sup>48</sup>. Alguns estudos indicam a ocorrência de edema, congestão e hemorragia pulmonar em metade dos pacientes que sofreram lesão cerebral e evoluíram para óbito<sup>49</sup>. De forma semelhante, observaram alterações na arquitetura pulmonar, com presença de infiltrado neutrofílico em modelo experimental de traumatismo cranioencefálico<sup>50</sup>.

## **4. Metodologia**

---

---

Este estudo foi realizado no Laboratório de Investigação Médica LIM 61 da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, localizado na divisão de experimentação no Instituto do Coração. Os animais foram manipulados de acordo com as diretrizes do *National Institute of Health* (1985) para o cuidado, manuseio e utilização de animais de laboratório. O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq), protocolo de pesquisa aprovado sob o número: 057/13 – 3863/12/119, Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Este estudo foi financiado pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) sob o número 2013/01972-6.

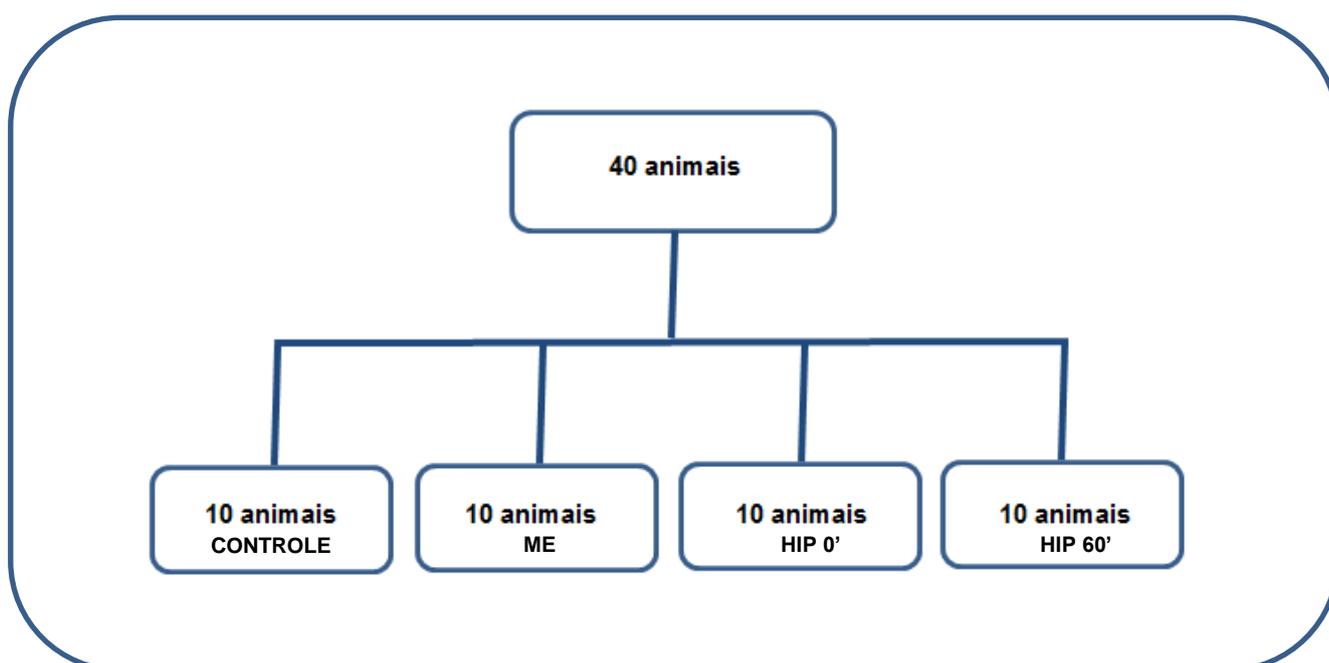
#### **4.1 Protocolo Experimental**

Foram utilizados 40 ratos *Wistar* machos, provenientes do biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pesando entre 250 e 350 g. Os animais foram mantidos a  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , período de claro e escuro de 12 horas, sem restrições à ingestão de água e ração.

Os animais foram distribuídos de forma aleatória, através de sorteio nos seguintes grupos experimentais:

- (1) Controle (CONTROL): ratos submetidos à extração do bloco cardiopulmonar;
- (2) Morte Encefálica (ME): ratos submetidos à morte encefálica e tratados com solução salina isotônica (4 mL/kg) ao longo do tempo;
- (3) Salina Hipertônica 0h (Hip 0): ratos submetidos à morte encefálica e tratados com solução salina hipertônica (4 mL/kg) imediatamente após a morte encefálica;
- (4) Salina Hipertônica 1h (Hip 60): ratos submetidos à morte encefálica e tratados com solução salina hipertônica (4 mL/kg) decorridos 60 minutos da morte encefálica.

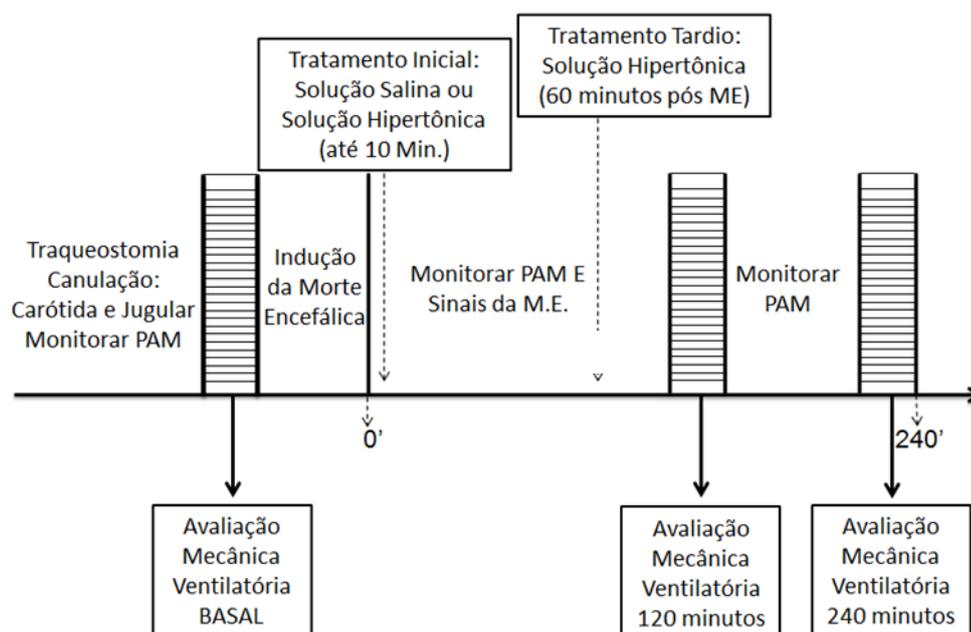
#### Grupos Experimentais:



## 4.2 Delineamento do Estudo

### 4.2.1 Anestesia

Os animais foram submetidos à indução anestésica em câmara fechada com isoflurano a 5%, intubados, colocados em ventilação mecânica e submetidos à traqueostomia, foi utilizado ventilador para pequenos animais (Harvard Apparatus, Modelo 683), ressaltando que nos momentos em que foi avaliada a mecânica ventilatória, os animais foram colocados em ventilador específico (flexiVent, SCIREQ Montreal, PQ, Canadá), os dois ventiladores utilizados no estudo foram ajustados com  $FiO_2$  de 100 %, volume corrente de 10 mL/kg, 70 ciclos por minuto e PEEP de 3,0  $cmH_2O$ . O plano anestésico foi mantido com isoflurano a 2% até o momento da indução da ME. A oferta de isoflurano foi cessada após a indução da ME (Figura 3).



**Figura 3** – Esquematização do protocolo experimental.

#### 4.2.2 Procedimento cirúrgico

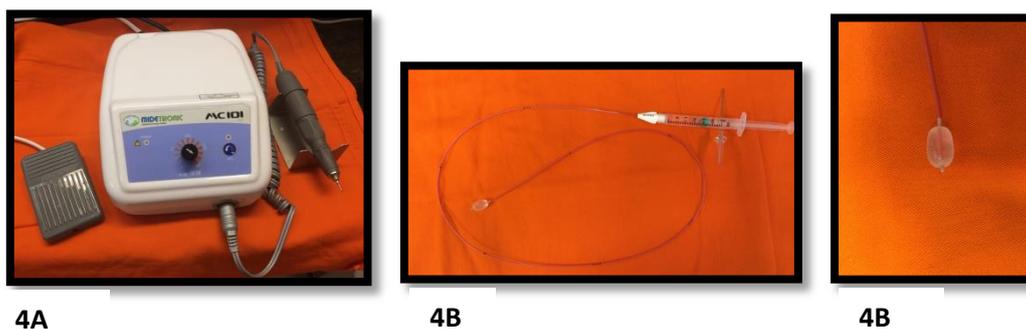
Os animais, posicionados em decúbito dorsal foram mantidos em luz aquecedora, realizou-se então assepsia com clorexidina na região para a realização da traqueostomia, com extensão lateral direita e exposição da artéria carótida e veia jugular.

A artéria carótida e a veia jugular direita foram canuladas, utilizando cateter confeccionados com perfusor infantil e dispositivo periférico intravenoso (tamanho 24G) preenchidos com solução salina heparinizada (500 IU/mL) e inseridos delicadamente com auxílio de microscópio estereoscópico binocular (Zeiss, modelo Stemi 508). O cateter da artéria foi conectado a um transdutor de pressão (P23XL Viggo-Spectramed Statham, CA, USA) acoplado a um monitor (DIXTAL, DX 2021, Brasil) para registro da Pressão Arterial Media (PAM). A veia jugular foi utilizada para infusão contínua de solução salina a 0,9% (2mL/kg/h) para minimizar a desidratação e para a administração do tratamento da solução salina hipertônica.

O grupo controle foi submetido à traqueostomia, seguido de uma laparotomia, e extração do bloco cardiopulmonar.

### 4.2.3 Modelo de morte encefálica

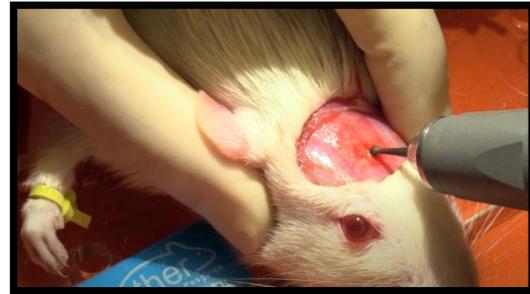
Os animais foram colocados em decúbito ventral para realização da trepanação. Utilizando-se uma broca motorizada foi realizada a perfuração da calota craniana para inserção intracraniana de um cateter do tipo Fogarty-4F (Edwards Lifescience LLC, Irvine, CA, USA) (figuras 4A e 4B). A efetiva indução da ME ocorreu através da rápida insuflação do cateter com 500  $\mu$ L de salina, sendo confirmada por pico hipertensivo, ausência de reflexos, midríase bilateral e apneia. Após a indução da morte encefálica a anestesia foi suspensa (Figuras 5A, 5B, 5C, 5D e 6).



**Figura 4-** (4A) Broca motorizada; (4B) Cateter do tipo Fogarty-4F (Edwards Lifescience LLC, Irvine, CA, USA)



5A



5B



5C



5D

**Figura 5-** Sequencia da trepanação na calota craniana do animal. (5A e 5B) Identificação da região exata no qual foi inserido o cateter; (5C e 5D) Inserção do cateter na calota craniana.



**Figura 6 –** Animal traqueostomizado, cateterizado e com cateter Fogarty-4F já inserido e insuflado na calota craniana.

Os parâmetros hemodinâmicos avaliados neste estudo basearam-se no monitoramento e registro contínuos da pressão arterial media (PAM).

#### **4.3 Avaliação Mecânica Ventilatória**

Foram quantificados a resistência de vias aéreas ( $R_{aw}$ ), a elastância de tecidos ( $H_{tis}$ ) e a resistência de tecidos ( $G_{tis}$ ), pelo modelo de oscilação forçada, durante todo o período de avaliação do animal antes e após a morte encefálica. A avaliação da Mecânica ocorreu em três momentos durante o experimento, a primeira denominada basal, a segunda avaliação ocorreu duas horas após o animal ter sido submetido à morte encefálica e a terceira e última avaliação foi realizada no final do experimento, após quatro horas de morte encefálica.

#### **4.4 Avaliação Funcional**

Amostras de sangue foram coletadas da artéria carótida e da veia jugular para determinação dos parâmetros gasométricos (Radiometer ABL 800, Radiometer Medical, Copenhagen, Denmark), nos momentos basal e final do experimento.

#### **4.5 Contagem de células sanguíneas**

As contagens totais de leucócitos foram determinadas em amostras de sangue obtidas através da punção da extremidade distal da cauda dos animais no início e final do experimento. Foi adicionado na amostra coletada 380 µl de corante (turk). As contagens totais de leucócitos foram determinadas usando uma câmara de Neubauer.

#### **4.6 Análise Histológica**

Um fragmento do pulmão de cada animal foi coletado e acondicionado em formol para análise histopatológica. O tecido foi fixado em lâmina e logo depois foi corado com hematoxilina e eosina. Os parâmetros avaliados para inferir o grau de inflamação pulmonar nos diferentes grupos experimentais foram: edema perivascular e índice de infiltrado neutrofílico. A análise foi realizada com programa de analisador de imagem Case Viewer, com medidas da área de edema perivascular em relação ao perímetro do vaso pulmonar e do índice de infiltrado neutrofílico em relação ao tamanho do septo alveolar. Os pulmões foram avaliados por dois investigadores independentes.

#### 4.7 Dosagens de citocinas no Lavado Bronco Alveolar

A análise do perfil inflamatório também contemplou a realização de ensaios imunoenzimáticos (ELISA), um método específico para ratos, comercialmente disponíveis (Quantikine Rat **IL-6**, Quatikine Rat **IL-1 $\beta$** , Quantikine Rat **TNF- $\alpha$** , Quatikine Rat **IL10** e Quantikine Rat **ICAM**, R&D Systems Inc, Minneapolis MN-USA).

##### 4.7.1 Teste ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* – Etapas

A ligação do antígeno ao anticorpo ocorreu em uma microplaca contendo 96 poços que já possuem em seu interior o anticorpo monoclonal específico. Foi adicionado nos poços as amostras a serem analisadas e os reagentes específicos, seguindo-se a incubação por 60/90 minutos na dependência do kit utilizado. Seguiu-se com a etapa da lavagem para que as ligações inespecíficas fossem eliminadas. Foi adicionado um anti-anticorpo marcado com uma enzima. Aguardou-se o período de fixação, seguido de lavagem, após o qual foi adicionado um substrato cromógeno que reagiu com a enzima liberando uma coloração específica e um resultado colorimétrico.

A placa foi colocada numa leitora específica, no qual apresenta um software adequado que realiza a leitura da absorbância da placa a 450 nm, os resultados foram expressos na tela do computador, demonstrando curva padrão validada.

#### **4.8 Dosagens de citocinas no tecido pulmonar**

As amostras dos tecidos foram coletadas ao final do experimento e armazenadas em tubos específicos e mantidas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Os mediadores inflamatórios no tecido pulmonar foram mensurados usando a metodologia xMap (Luminex™ xMAP - kit Cat. # RECYTMAG-65K-04 - Millipore (St. Charles-Missouri-USA)), para TNF- $\alpha$ , IL-6, IL1- $\beta$ , IL-10.

#### **4.9 Avaliação utilizando doppler transcraniano.**

Realizamos em alguns animais uma ultrassonografia transcraniana colorida, utilizando a unidade de Ultrassom Micromaxx (Sonosite, EUA) em conjunto com um transdutor linear de 6 a 14 MHz, gel de condução para ultrassom foi aplicado para melhorar a condutividade.

#### **4.10 Análise estatística**

#### **4.11 Análises estatísticas descritivas**

As análises descritivas para os dados quantitativos foram realizadas, apresentando as médias acompanhadas dos respectivos erros padrão. Os pressupostos da distribuição normal em cada grupo e a homogeneidade das variâncias entre os grupos foram avaliados respectivamente, com o teste de Shapiro-Wilk e com o teste de Levene.

#### **4.12 Análises estatísticas inferenciais**

Para a análise de dois fatores (Grupo e Tempo), foi utilizada ANOVA de duplo fator de medidas repetidas para um único fator (Tempo). Quando foi necessário realizar comparações múltiplas de médias, utilizou-se o teste de Bonferroni. O teste Anova One Way foi utilizado para avaliar as variáveis: (edema perivascular, infiltrado neutrofílico, citocinas).

Foi considerado uma probabilidade de erro tipo I ( $\alpha$ ) de 0,05 em todas as análises inferenciais. As análises estatísticas descritivas e inferenciais foram executada com o software SPSS versão 13 (SPSS 13.0 for Windows).

## **5. Resultados**



Houve 12% de mortalidade dos animais durante o período experimental analisado.

Perdas por grupos: ME: 2 perdas, Hip.0': 2 perdas, Hip.60': 1 perda.

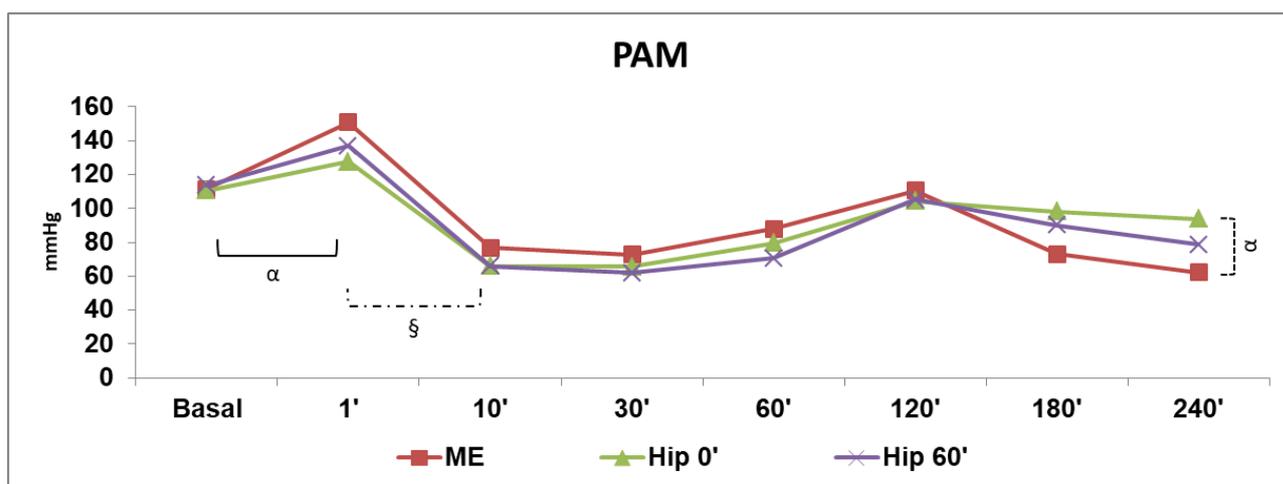
Os resultados estão representados em gráficos de média e erro padrão.

### **5.1 Pressão Arterial Média**

Os animais foram monitorados por todo o período do experimento. Não houve diferença significativa da pressão arterial média entre os grupos no momento basal ( $p=0,781$ ).

Após a indução da ME, observamos um aumento significativo da PAM durante o primeiro minuto após a insuflação do cateter ( $p=0,001$ ), seguido de queda expressiva ( $p<005$ ). Após 2h houve recuperação da PAM nos grupos Hip.0', Hip.60' e ME ( $p<0,05$ ). Ao final do experimento o grupo Hip.0' mostrou PAM superior ao ME, evidenciando uma possível influência do tratamento precoce nos valores da PAM ao longo do tempo ( $p=0,041$ ) ( Gráfico 01).

**Gráfico 01** – Pressão arterial média dos animais. Encontramos aumento significativo da pressão no primeiro minuto após a insuflação do cateter ( $\alpha$   $p < 0,05$ ), seguido de queda significativa ( $\S$   $p < 0,05$ ). A partir do momento 120', os níveis de pressão se recuperaram nos grupos ME, Hip.0 min. e Hip.60 min. Ao final do experimento, o grupo hip.0 'apresentou diferença estatística quando comparado ao grupo ME ( $\neq$   $p = 0,041$ ).



## 5.2 Dados Gasometria

A comparação entre os dados de gasometria colhidos no início e ao final dos experimentos, evidenciou a queda no pH e na concentração de  $\text{HCO}_3^-$  em todos os grupos estudados. Além disso, os parâmetros gasométricos foram prejudicados pela ME, evidenciados pela diminuição da  $\text{pO}_2$  arterial ( $p < 0,035$ ) e venosa ( $p < 0,027$ ) ao final do protocolo. A queda da  $\text{pO}_2$  também foi observada nos grupos tratados com hipertônica ( $p < 0,05$ ). Não houve diferenças significativas na dosagem de  $\text{Na}^+$  (sódio),  $\text{pCO}_2$ ,  $\text{SatO}_2$  e lactato arterial e venoso analisados nos momentos inicial e final do protocolo experimental. Os dados estão apresentados na Tabela 01.

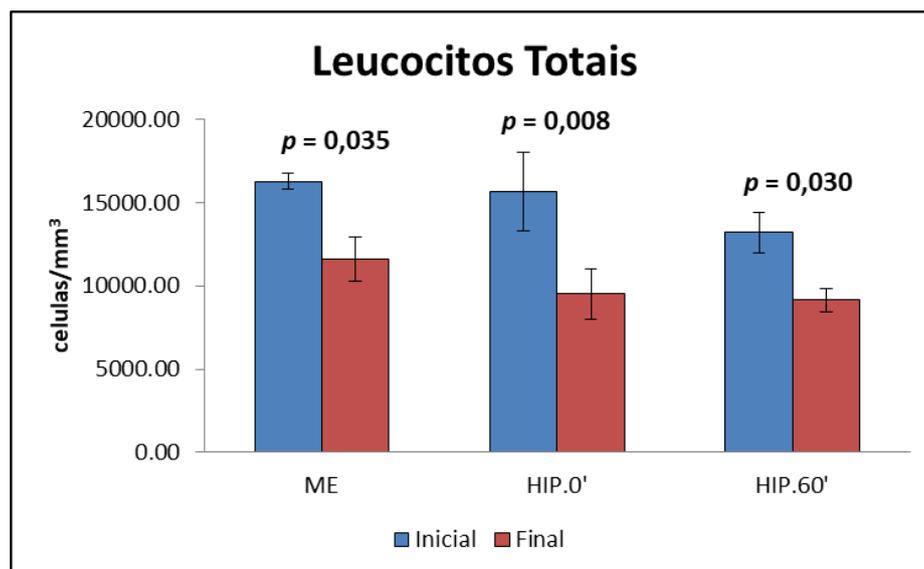
**Tabela 01** – Análise de gases do sangue arterial e venoso. Houve diminuição dos valores de pH e  $pO_2$  e em todos os grupos ( $p < 0,05$ ) em todos os grupos estudados. A análise do  $HCO_3^-$  mostrou diferença nos grupos ME e Hip.60 min. ( $p < 0,05$ ). A tabela mostra os dados coletados nos momentos inicial e final do protocolo de morte encefálica.

|   | ME          |             | HIP 0'      |             | HIP 60'     |             | Valor de p |
|---|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|
|   | Inicial     | Final       | Inicial     | Final       | Inicial     | Final       |            |
| pH art.                                     | 7,40±0,02*  | 7,25±0,04*  | 7,41±0,02*  | 7,32±0,04*  | 7,45±0,02*  | 7,29±0,04*  | *<0,028    |
| pH ven.                                     | 7,41±0,01*  | 7,13±0,05   | 7,40±0,01*  | 7,27±0,04*  | 7,40±0,01*  | 7,13±0,04*  | *<0,035    |
| pO <sub>2</sub> art. (mmHg)                 | 298,2±50,0* | 163,4±40,6* | 332,7±37,3* | 226,7±30,3* | 384,1±39,5* | 153,7±32,1* | *<0,035    |
| pO <sub>2</sub> ven.(mmHg)                  | 72,4±9,3*   | 26,3±6,7*   | 66,0±7,4*   | 43,7±5,3*   | 66,4±7,42*  | 42,5±5,36*  | *<0,027    |
| HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> art. (mmol/L) | 21,9 ±0,8*  | 13,9±1,3*   | 22,6±0,8    | 16,3±1,2    | 23,6±0,8*   | 15,7±1,3*   | *<0,005    |

## Gráfico 2. Quantificação de leucócitos no sangue periférico

A ME ocasionou a diminuição do número de leucócitos circulantes ao longo do experimento, evidenciado pela menor concentração de leucócitos ao final do período de ME quando comparado com a concentração inicial ( $p=0,035$ ). Essa queda também foi observada no grupo Hip.0' ( $p=0,008$ ) e Hip.60' ( $p=0,030$ ). Os dados estão apresentados no gráfico 2.

**Gráfico 2** – Quantificação de leucócitos no sangue periférico colhidos nos momentos inicial e final do experimento. Houve diferença estatística na comparação dos grupos ME (\* $p=0,035$ ); HIP 0' (\*\* $p=0,008$ ); HIP 60' (\*\* $p=0,030$ ). Valores são expressos como média  $\pm$  S.E.M.



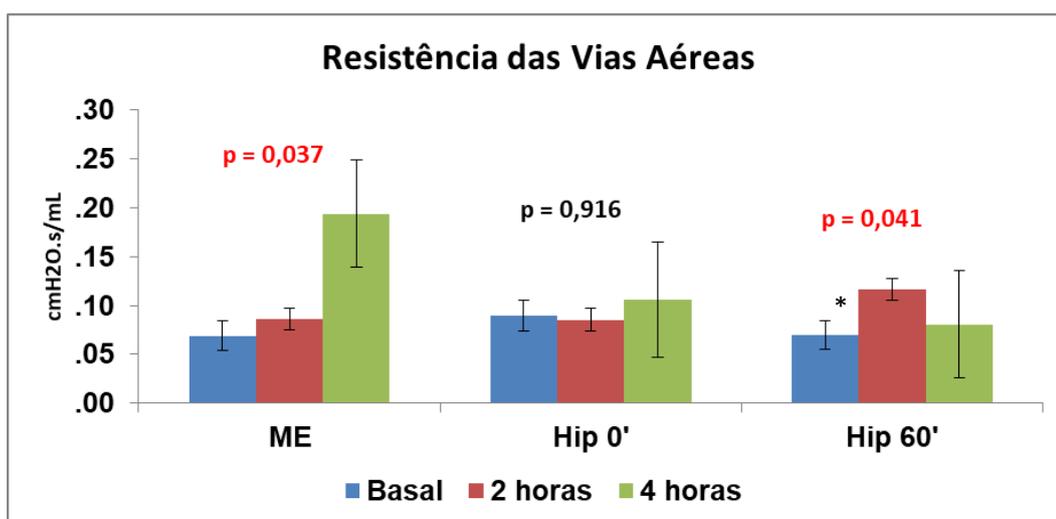
### 5.3 Mecânica Ventilatória

A ME promoveu importantes alterações na mecânica ventilatória, evidenciadas pelo aumento progressivo e significativo da resistência das vias aéreas (*RAW*) ao longo do tempo ( $p=0,037$ ). O tratamento com SSH preveniu o aumento da *RAW* ao final do protocolo de ME, apresentando valores similares aos basais (HIP0':  $p=0,137$  e HIP60':  $p=0,041$ ). Apesar da recuperação ao final do experimento, observamos aumento da *RAW* após 2h de ME no grupo HIP60' (Gráfico 03).

Além de modificar parâmetro relacionado ao componente de vias aéreas, a interferência da ME sobre a mecânica pulmonar foi evidenciada pelo aumento progressivo da resistência tecidual –  $G_{tis}$  (momentos inicial vs. 4h;  $p=0,022$ ) (Gráfico 4) e elastância tecidual -  $H_{tis}$  (momentos inicial vs. 2h,  $p=0,042$ ; e inicial vs. 4h,  $p=0,032$ ) (Gráfico 5)). Por sua vez, a SSH atuou promovendo manutenção dos valores de mecânica em relação aos dados basais ao longo do tempo.

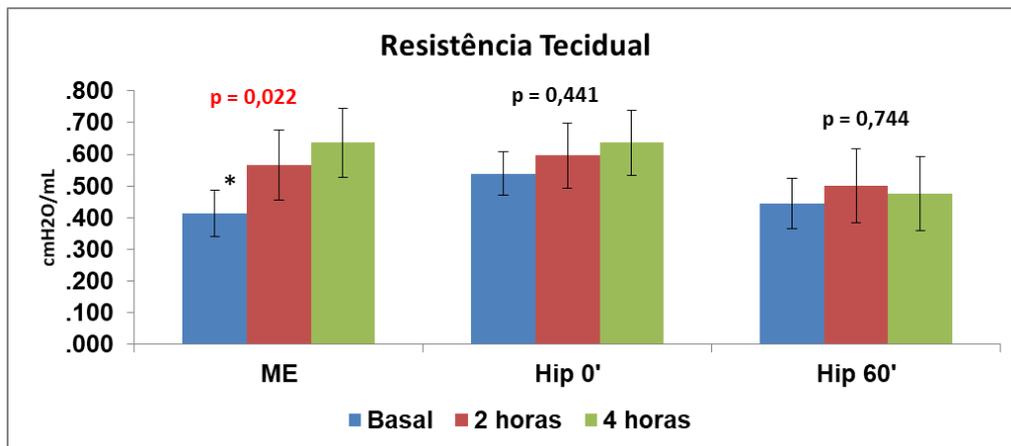
### 5.3.1 Resistencia das Vias Aéreas (RAW)

**Gráfico 03-** Avaliação da mecânica ventilatória, resistência das vias aéreas dos pulmões. Houve diferença estatística na comparação dos tempos no grupo ME entre os tempos basal e 4h ( $*p = 0,037$ ) e no grupo Hip.60' basal e 2h ( $*p = 0,041$ ). Grupos: ME ( $n=8$ ); HIP 0 ( $n=8$ ); HIP 60' ( $n=9$ ). Os valores representam a média  $\pm$  EPM.



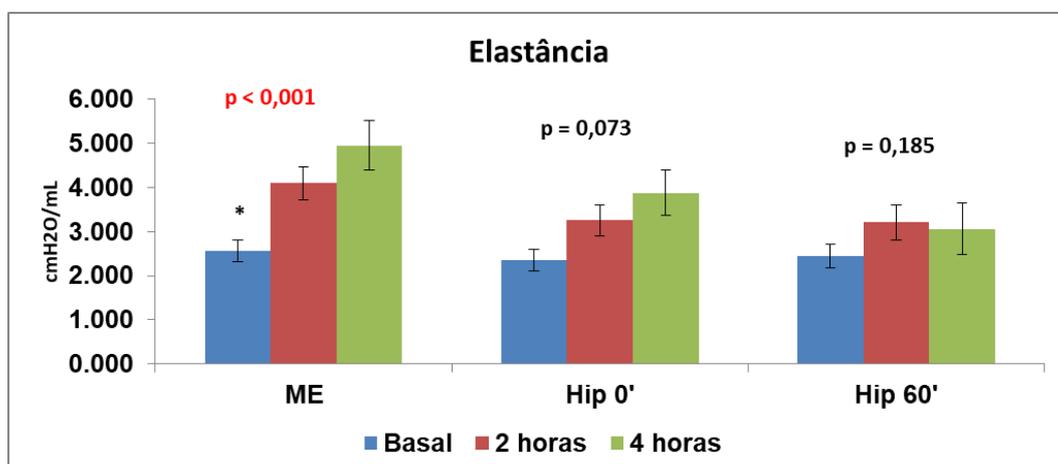
### 5.3.2 Resistencia Tecidual (Gtis)

**Gráfico 04-** Avaliação da mecânica ventilatória, resistência tecidual dos pulmões. Houve diferença estatística na comparação dos tempos no grupo ME entre os tempos basal X 2h e basal X 4h (\* $p < 0,05$ ). Grupos: ME (n=8); HIP 0 (n=8); HIP 60' (n=9). Os valores representam a média  $\pm$  EPM.



### 5.3.3 Elastância (Htis)

**Gráfico 05-** Avaliação da elastância pulmonar ao longo do tempo. Houve diferença estatística na comparação dos tempos no grupo ME, entre os momentos basal X 2h e basal X 4h (\* $p < 0,001$ ). Grupos: ME (n=8); HIP 0 (n=8); HIP 60' (n=9). Os valores representam a média  $\pm$  EPM.



#### 5.4 Ensaio Imunoenzimatico ELISA.

Não observamos diferenças nos resultados de imunoabsorção enzimática (ELISA), referente aos marcadores inflamatórios IL6, IL1 $\beta$ , IL10, ICAM e TNF- $\alpha$  dosados no Lavado Bronco Alveolar (LBA) extraídos dos pulmões ao final do experimento. ( $p>0,999$ ). Os dados estão apresentados na Tabela 02.

**Tabela 02** – Análise dos marcadores inflamatórios. Ensaio Imunoenzimatico ELISA – realizado no lavado bronco alveolar. Não observamos diferença estatística entre os grupos. ( $p=0,999$ ). Grupos: ME (n=8); HIP 0' (n=8); HIP 60' (n=9). Os valores representam a média  $\pm$  EPM.

|                       | ME                 | Hip0'              | Hip60'             |
|-----------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| IL-6 (pg/mL)          | 0,7071 $\pm$ 0,284 | 0,7790 $\pm$ 0,133 | 0,7990 $\pm$ 0,241 |
| IL-1 $\beta$ (pg/mL)  | 0,2786 $\pm$ 0,105 | 0,4020 $\pm$ 0,091 | 0,4345 $\pm$ 0,071 |
| IL-10 (pg/mL)         | 0,1234 $\pm$ 0,006 | 0,1099 $\pm$ 0,016 | 0,1189 $\pm$ 0,004 |
| ICAM (pg/mL)          | 2,9378 $\pm$ 1,231 | 4,4978 $\pm$ 1,994 | 2,8408 $\pm$ 0,840 |
| TNF- $\alpha$ (pg/mL) | 0,2884 $\pm$ 0,038 | 0,2283 $\pm$ 0,044 | 0,2419 $\pm$ 0,083 |

#### 5.5 Dosagem de citocinas e malondialdeído no tecido pulmonar Multiplex

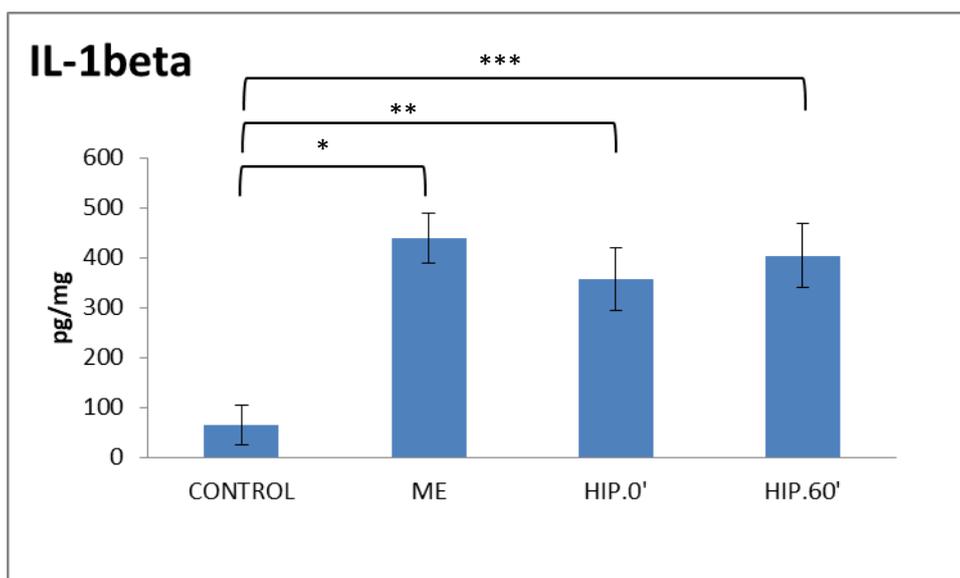
Com relação ao perfil inflamatório, o grupo ME apresentou aumento significativo na concentração da IL-1  $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  em relação ao grupo

control ( $p < 0,001$ ). O aumento da expressão de IL-1  $\beta$  e IL-6 também foi observado nos grupos tratados com SSH, Hip.0' e Hip. 60' ( $p = 0,016$  e  $p = 0,014$ , respectivamente). Os níveis de TNF- $\alpha$  no grupo Hip.0' e Hip.60' foram semelhantes aos do grupo control ( $p > 0,05$ ). A IL-10 não apresentou diferença significativa (Figura 3).

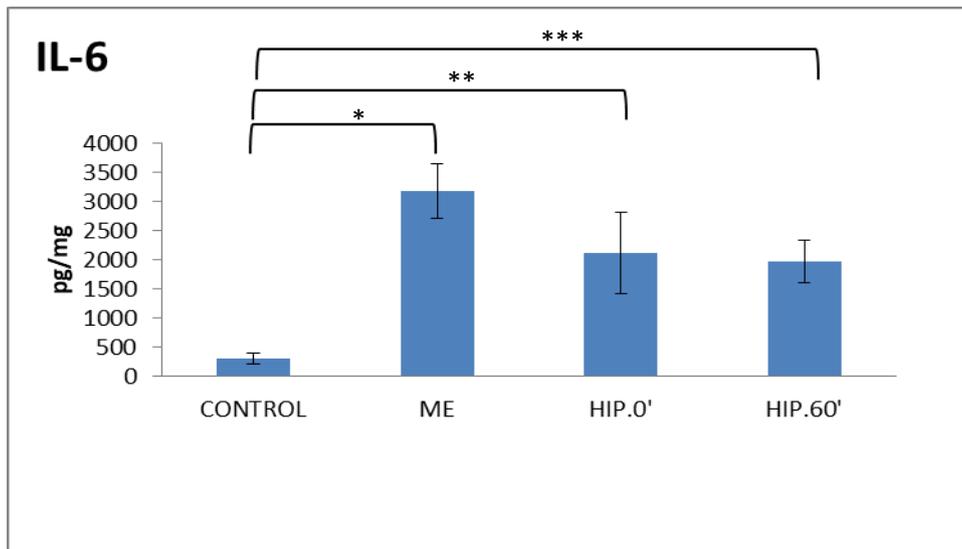
Um expressivo aumento nos níveis de MDA foi notado, nos grupos que sofreram a ação da ME quando comparados ao grupo control ( $p = 0,017$ ) (Figura 4).

Os valores representam a média  $\pm$  EPM. Gráficos 06, 07, 08 e 09.

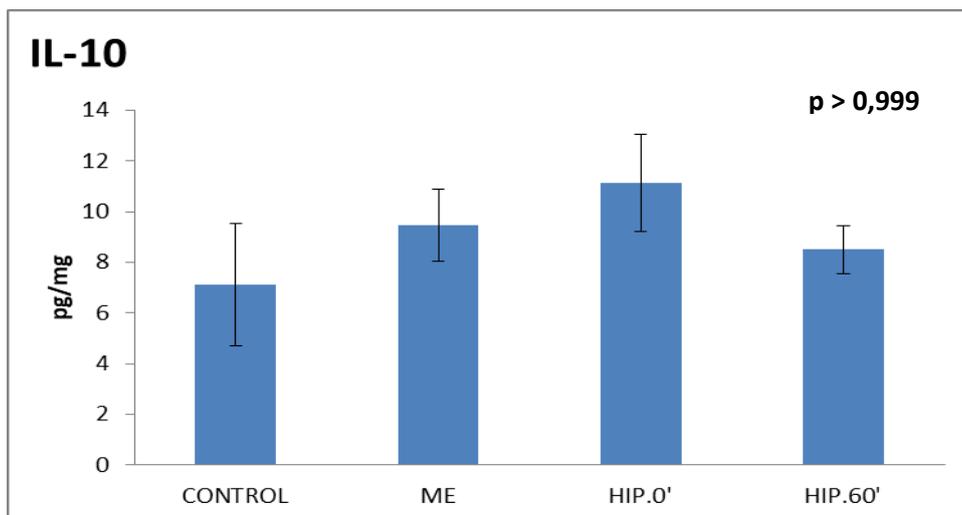
**Gráfico 06** - Dosagem de citocinas. Foram encontradas diferenças significativas entre os grupos. IL1-beta ( \* control x ME –  $p < 0,001$ ); (\*\* control x Hip.0' –  $p = 0,016$ ); (\*\*\*) CONTROL x Hip.60' –  $p = 0,002$ ). Grupos: ME (n=8); HIP 0 (n=9); HIP 60' (n=9). Os valores representam a média  $\pm$  EPM.



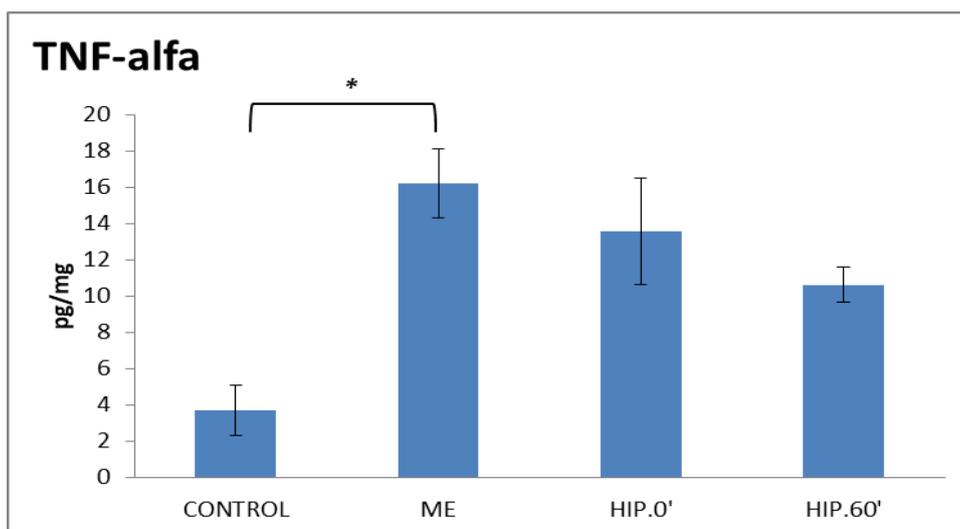
**Gráfico 07** - Dosagem de citocinas. Foram encontradas diferenças significativas entre os grupos. IL-6 ( \*control X ME -  $p < 0,001$ ); (\*\*control X Hip.0' -  $p = 0,011$ ); (\*\*\* control X Hip.60' -  $p = 0,014$ ). Grupos: ME (n=8); HIP 0 (n=9); HIP 60' (n=9). Os valores representam a média  $\pm$  EPM.



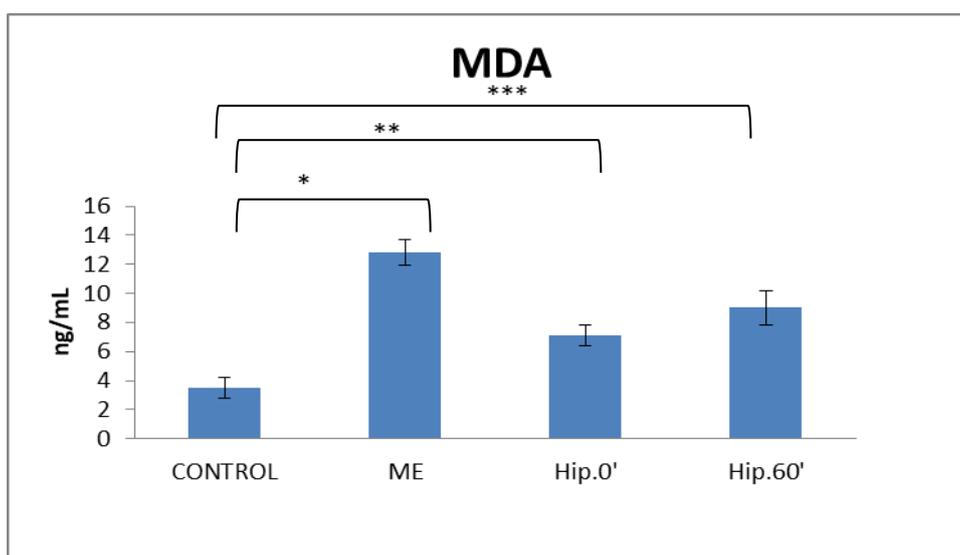
**Gráfico 08** - Dosagem dos níveis IL-10 no tecido pulmonar. Não houve diferença estatística entre os grupos.



**Gráfico 09** - Dosagem de citocinas. Foram encontradas diferenças significativas entre os grupos. TNF-alfa ( \* control x ME -  $p < 0,001$ ); (\*\* control x hip.0' -  $p = 0,114$ ); (\*\*\*) control x Hip.60' -  $p = 0,097$ ). Valores são expressos como média  $\pm$  S.E.M.



**Gráfico 10** - Dosagem de biomarcador para dano oxidativo. Malondialdeído (MDA). Houve diferença estatística entre os grupos: (\* control x ME -  $p < 0,001$ ); (\*\* control x Hip.0' -  $p = 0,017$ ); (\*\*\*) control x Hip. 60' -  $p < 0,001$ ). Valores são expressos como média  $\pm$  S.E.M.

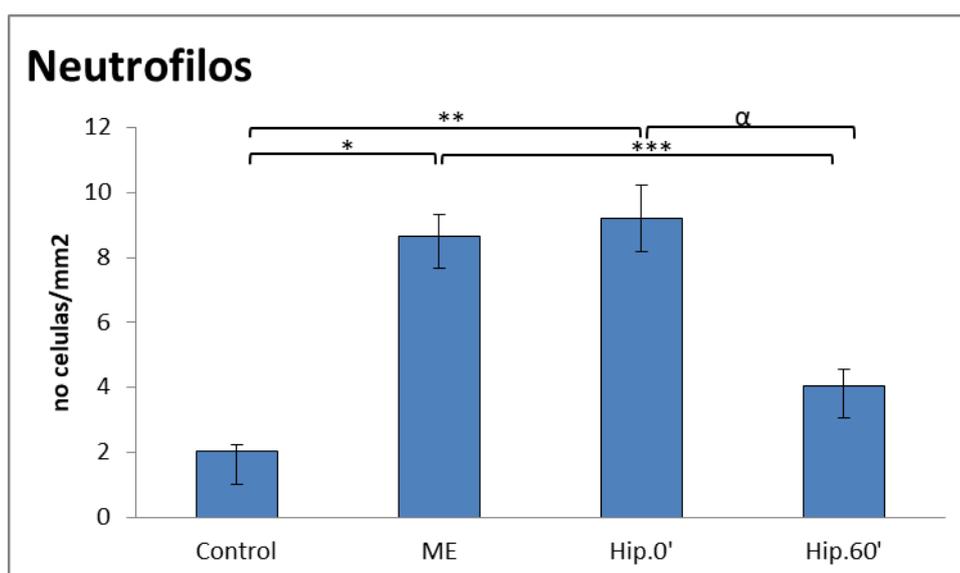


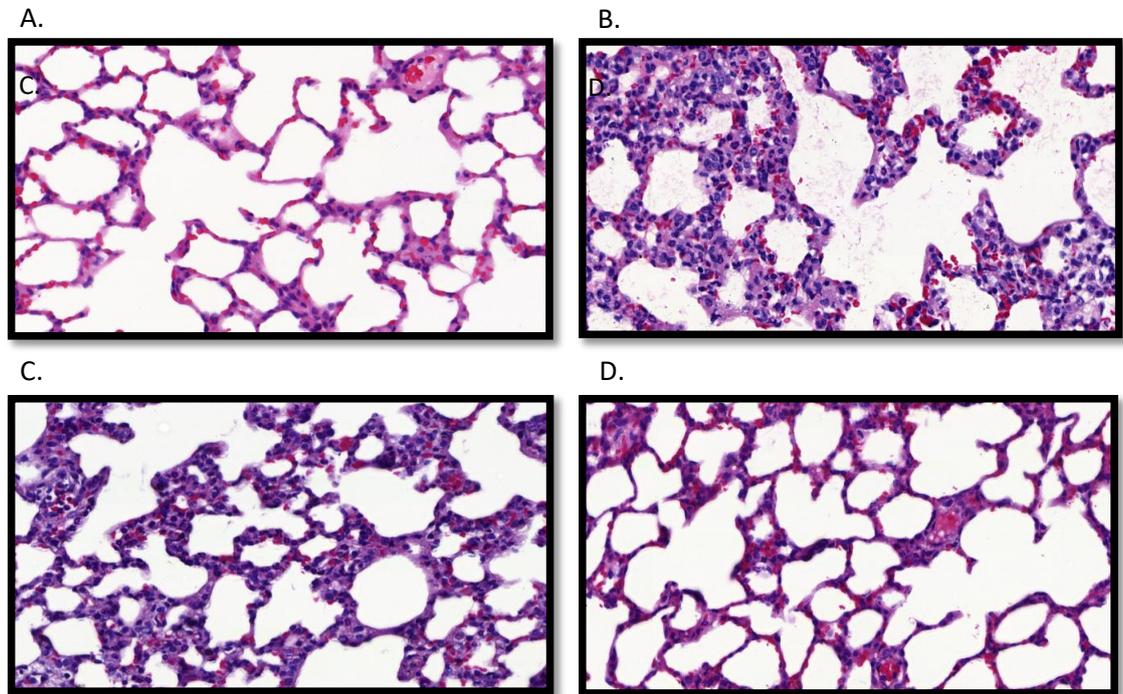
## 5.6 Análise Histológica

### 5.6.1 Infiltrado Neutrófilico

Em relação à quantificação de neutrófilos, o tratamento tardio (Hip.60') reduziu o infiltrado neutrófilico ( $p < 0,05$ ), mostrando quantificação semelhante ao grupo control (Gráfico 11). O grupo ME apresentou maior quantidade de neutrófilos com 8,75 células/mm<sup>2</sup> quando comparado com os grupos CONTROL e Hip.60'.

**Gráfico 11** – Infiltrado Neutrófilico dos grupos. Houve diferença estatística entre os grupos: \* ME X Control ( $p < 0,001$ ), \*\*\* ME X Hip. 60 ( $p = 0,015$ ), \*\* Control X Hip.0' ( $p = 0,009$ ) e  $\alpha$  Hip.0' X Hip.60' ( $p = 0,027$ ).



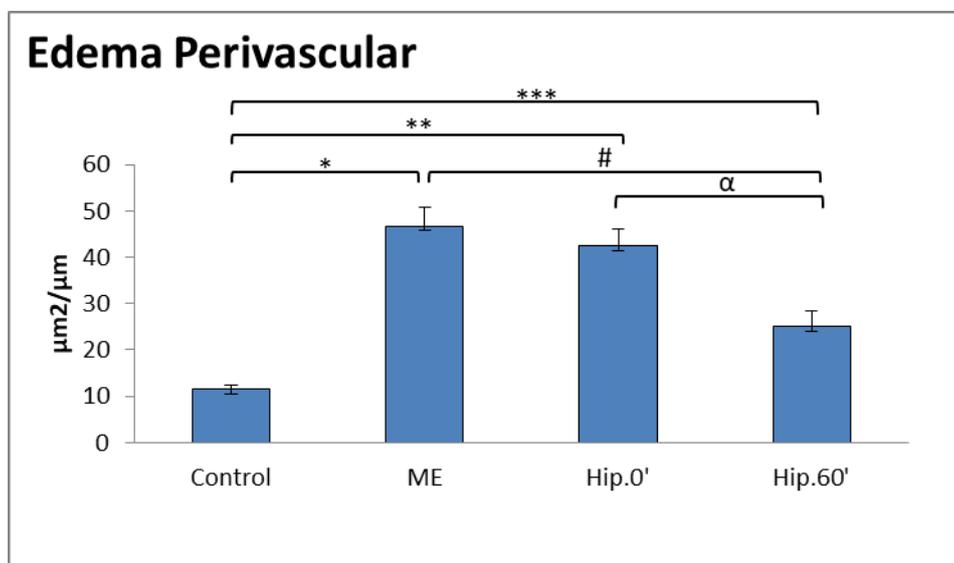


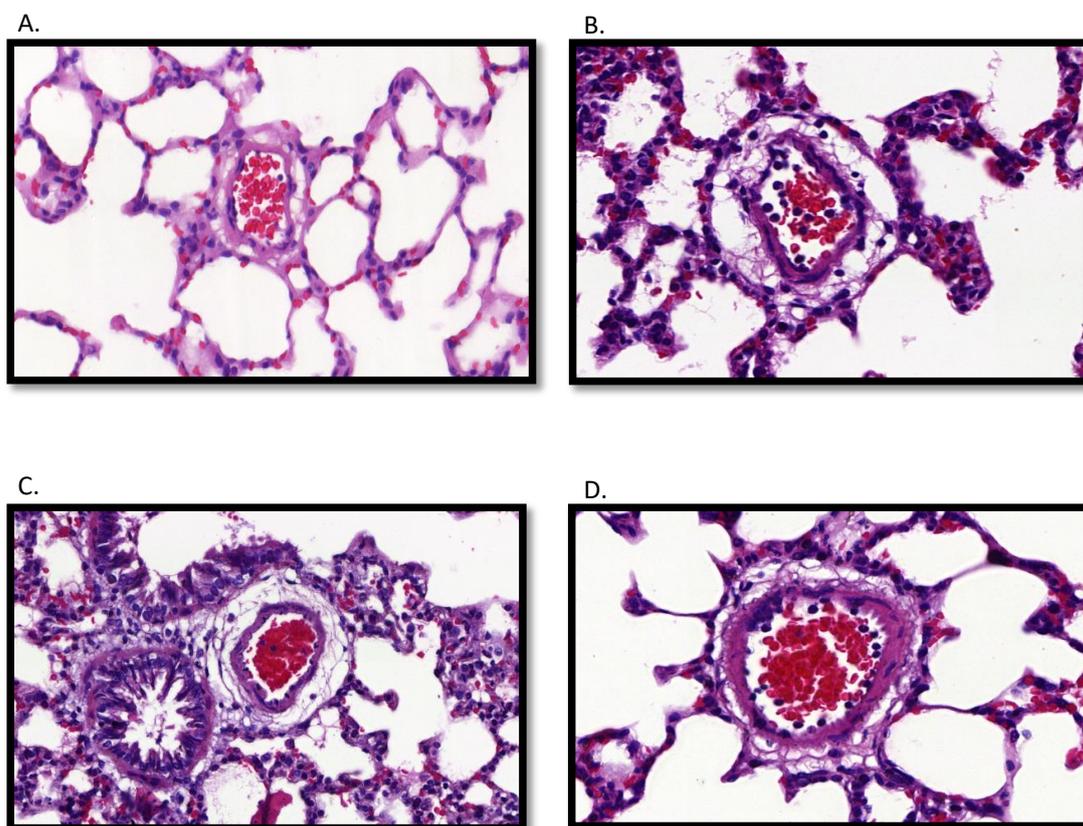
**Figura 7** - Lâmina de parênquima pulmonar para quantificação do infiltrado neutrofílico. Aumento de 30X. O grupo ME apresentou maior quantificação de neutrófilo. Coloração em Hematoxilina-eosina. A: control; B: ME; C: Hip.0' e D: Hip.60'.

### 5.6.2 Edema perivascular

Em relação ao edema perivascular, o tratamento tardio também se mostrou eficaz, apresentando menor área de edema, diferindo dos grupos ME e Hip.0 ( $p < 0,05$ ). Gráfico 12. O grupo ME apresentou maior área de edema perivascular  $47,84 \mu\text{m}^2/\mu\text{m}$  quando comparado com os grupos Control e Hip.60'.

**Gráfico 12** – Presença de edema perivascular medido em área de edema por  $\mu\text{m}^2$ . Nas comparações múltiplas houve significância estatística nas comparações entre os grupos. \* ME X Control ( $p=0,017$ ), \*\*Control X Hip.0' ( $p=0,021$ ), \*\*\* Control X Hip. 60' ( $p=0,047$ ),  $\alpha$  Hip.0' vs Hip.60' ( $p=0,037$ ) e # ME X Hip. 60 ( $p=0,035$ ),





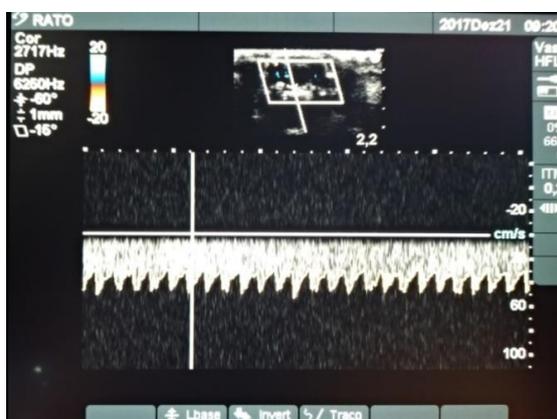
**Figura 8-** Lâmina de parênquima pulmonar para avaliação de edema perivascular. Aumento de 30X. O grupo ME apresentou maior área de edema, seguido do grupo Hip.0'. Coloração em Hematoxilina-eosina. A: control; B: ME; C: Hip.0' e D: Hip.60'.

### 5.7 Avaliação utilizando doppler transcraniano

A avaliação do doppler transcraniano foi realizada em duas etapas: a primeira foi realizada nos animais anestesiados antes do procedimento de trepanação e indução a ME e a segunda após a indução da ME através da insuflação do Fogarty-4F. Através da ultrassonografia 2-D visualizamos a

imagem do crânio, bem como as estruturas cerebrais dos animais. Em seguida o ultrassom doppler colorido foi usado e as artérias extra, intracraniana, artéria carótida interna direita e artéria cerebral média direita foram visualizadas. Após a insuflação do Fogarty-4F, o doppler foi realizado novamente e monitorado até nenhum sinal vascular intracraniano ser obtido. Picos sistólicos abaixo de 10 cm/s foram recuperados na artéria carótida interna direita ao nível da base do crânio, compatíveis com colapso circulatório encefálico. Evidenciando uma resposta positiva na condução da técnica de ME.

#### Presença de fluxo:



#### Ausência de fluxo:



**Figura 9-** Avaliação descritiva do doppler transcraniano, evidenciando ausência de fluxo nos grupos submetidos a ME e em comparativo presença de fluxo em animais não submetidos a ME

## **6. Discussão**



Dados levantados em 2020, pela ABTO (Associação Brasileira de Transplante de Órgãos), aproximadamente 43 mil adultos e crianças esperam em fila por um transplante de órgãos<sup>51</sup>. Este fato é atribuído a vários fatores, tais como, a recusa que algumas famílias têm a doação de órgãos, a falta de cuidado com o doador, a dificuldade de comunicação entre as unidades de saúde e as equipes transplantadoras e a demora no diagnóstico da ME. Estes fatores comprometem a qualidade do órgão e sua possível utilização<sup>52</sup>.

A ideia que norteou a realização do presente estudo foi baseada em uma problemática atual, a escassez de órgãos viáveis para transplante e os efeitos da ME sobre o organismo. Observamos os efeitos hemodinâmicos e o impacto na mecânica ventilatória no animal, quando o mesmo foi submetido à morte encefálica com posterior tratamento utilizando SSH a 7,5%, com isso pudemos avaliar os efeitos do tratamento com SSH e sua possível contribuição na melhora do órgão alvo, visto que existem inúmeros benefícios descritos associados ao uso da SSH, relacionados à hemodinâmica, modulação imunológica e atenuação da pressão intracraniana (PIC). O propósito em realizar o tratamento em dois momentos distintos, sendo eles imediatamente e uma hora após a indução da ME, deve-se a possibilidade de analisar o efeito da SSH no início do processo inflamatório e decorridos uma hora da indução de ME.

A metodologia de ME que foi utilizada, refere-se a um procedimento bem estabelecido. Pilla e colaboradores descreveram em detalhes a execução do

modelo empregado, semelhante ao que realizamos em nosso estudo, diferindo apenas na quantidade de solução utilizada para insuflar o balão<sup>5,53</sup>. Existem trabalhos já publicados em nosso meio, os quais utilizaram exatamente a mesma técnica empregada<sup>54</sup>. Correia e colaboradores utilizaram o modelo de ME em ratos, com tratamento de SSH para avaliação da microcirculação mesentérica e demonstraram a eficácia do método de indução da ME<sup>41</sup>.

O cuidado com a hemodinâmica na ME, é fundamental para a viabilidade da doação dos órgãos. Existem vários trabalhos clínicos e experimentais, demonstrando as consequências da ME na hemodinâmica do paciente<sup>4,55,56</sup>. Em nosso estudo observamos um quadro de hipotensão instalado nos primeiros 60 minutos de experimento. Correia e colaboradores descreveram semelhante ocorrência e o associaram à hipoperfusão mesentérica<sup>41</sup>. Contudo, a literatura é bem farta no que tange a descrição do quadro de hipotensão arterial durante a ME<sup>57</sup>. É sabido que este cenário se estabelece após a ocorrência da descarga autonômica, seguida de intensa vasodilatação. Os dados alcançados no presente estudo corroboram com as informações encontradas por Guetti e colaboradores, que descrevem como sendo a alteração fisiopatológica mais severa da ME<sup>57</sup>.

Ao analisar os parâmetros gasométricos dos animais, notamos uma queda expressiva nos valores de pH e nos índices de pressão parcial de oxigênio (PaO<sub>2</sub>), sugerindo presença de distúrbios ácido-base. Podemos associar este evento à total perda de homeostase que a ME causa e na

dificuldade em manter os parâmetros hemodinâmicos estáveis. Lee e colaboradores, através de uma revisão retrospectiva de prontuários eletrônicos, descreveram a ocorrência deste evento em 37,7% dos pacientes, atribuindo-o às mudanças fisiopatológicas da ME<sup>58</sup>. Outro estudo realizado em ratos submetidos à ME e tratados com bloqueadores  $\alpha$ -adrenérgicos, demonstrou semelhantes resultados na gasometria<sup>59</sup>. Esses dados diferiram dos encontrados por Correia et al., um estudo experimental em ratos submetidos à ME, no qual não observaram diferença nas análises das pressões parciais de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> no sangue<sup>60</sup>.

Muitas das variações hemodinâmicas ocorridas a partir do processo de ME são acompanhadas por alterações do perfil imunológico<sup>12</sup>. Quando avaliamos os leucócitos totais no sangue periférico, constatamos uma diminuição expressiva nos índices em todos os grupos estudados, ou seja, observamos a instalação de leucopenia nos animais após indução da ME. Esses achados coincidiram com resultados evidenciados por estudos clínicos e experimentais<sup>38,61</sup>, que indicaram alterações no sistema imunológico periférico, quando o órgão é acometido por Acidente Vascular Cerebral (AVC) ou trauma, com desfecho em ME. Esses autores demonstraram que a lesão cerebral causa dano encefálico, inflamação local e alterações no sistema imunológico periférico que desencadeia uma regulação negativa da medula óssea, culminando no número reduzido de células de defesa<sup>38, 61, 62</sup>.

As mudanças na hemodinâmica e as alterações hematológicas observadas até aqui, associam-se com as alterações da função pulmonar. A

incapacidade em manter as trocas gasosas em níveis estáveis e a homeostase do pH sanguíneo, está intimamente relacionada à mecânica ventilatória, que na ME encontra-se comprometida, demonstradas neste trabalho através do aumento da resistência das vias aéreas, resistência tecidual e da elastância ao longo do tempo de experimento.

Em relação à mecânica ventilatória (MV), o propósito da análise ocorreu pela fundamental importância e contribuição que este dado oferece para uma avaliação pulmonar adequada. Podemos considerar que uma MV comprometida, implica em mau prognóstico no pós-transplante pulmonar (TxP), acarretando em dano pulmonar com conseqüente evolução para disfunção primária do enxerto<sup>63</sup>,

<sup>64</sup>.

Não encontramos na literatura estudos experimentais relacionando a evolução da MV durante a ME, entretanto, sabemos da ocorrência da lesão tecidual no pulmão e que a hemodinâmica é prejudicada com aumento da pressão da artéria pulmonar (PAP), resistência vascular pulmonar (PVR), frequência cardíaca (FC) e débito cardíaco (DC)<sup>65</sup>.

Nossos resultados demonstraram que a resistência das vias aéreas (RAW) aumentou de forma expressiva no grupo ME, o mesmo ocorreu entre os tempos basal e duas horas do grupo que recebeu tratamento tardio (Hip.60'), evidenciando a instalação do processo inflamatório, seguido de uma recuperação pós tratamento, que resultou na normalização do parâmetro avaliado. Quando observamos os resultados da resistência tecidual (GTIS), notamos um quadro de piora progressiva no grupo ME, evento não observado

nos demais grupos. Na análise da elastância pulmonar (HTIS), houve piora gradual das propriedades elásticas no grupo ME. Os resultados obtidos nestas análises tornou evidente a influência da ME na MV. Seguindo essa linha de raciocínio, dados encontrados em um estudo realizado em humanos, no qual foi analisado a MV em pacientes com lesão cerebral, observou-se a ocorrência de alteração na elastância da parede torácica e do sistema respiratório, além da resistência pulmonar<sup>65</sup>, resultados semelhantes aos encontrados em nosso estudo experimental. Em outro estudo, Almeida e colaboradores, em modelo de lesão pulmonar por isquemia e reperfusão, relataram a formação de edema associada à piora nos parâmetros de mecânica ventilatória<sup>66</sup>.

Como comentado, a instabilidade hemodinâmica promovida pela ME pode evoluir com aumento da permeabilidade capilar, com consequente desenvolvimento de edema alveolar, espessamento da membrana hialina e infiltrado neutrofílico. Estudos demonstram que as alterações podem iniciar de forma precoce<sup>64, 67, 68</sup>. Em nosso estudo identificamos a lesão pulmonar após a ME através da formação de edema perivascular e presença de infiltrado neutrofílico. Este evento ocorre devido à perda da integridade vascular, com consequente extravasamento e um inevitável acúmulo de líquido no tecido perivascular, causando redução na capacidade de oxigenação e nutrição dos tecidos. Achados semelhantes foram observados em um estudo com transplante pulmonar em ratos tratados com peptídeo XII B13, no qual os autores relatam que durante o evento da tempestade autonômica com consequente inflamação

sistêmica, ocorreu perda da integridade do vaso, observado através de análise histopatológica do pulmão<sup>67</sup>.

Os danos causados pela ME são progressivos, e altera a permeabilidade microvascular de diversos órgãos<sup>54</sup>, este cenário pode estar associado à formação de edema e presença de infiltrado neutrofílico<sup>68</sup>, sugestivos de edema pulmonar neurogênico (EPN). O EPN tem sido cada vez mais estudado na literatura especializada por sua correlação com piores resultados na prática clínica, em função do aumento da morbimortalidade dos pacientes<sup>69</sup>. O pico de liberação de catecolaminas que ocorre no momento da ME, pode ser capaz de causar insuficiência cardíaca, seguida de hipertensão pulmonar. O quadro de hipertensão pulmonar aguda associado à liberação de citocinas de forma desenfreada aumenta a permeabilidade dos vasos, podendo resultar em EPN, entretanto, mais estudos que esclareçam esse mecanismo são necessários. Apesar do indicativo, a avaliação da EPN requer atenção. Artigos sustentam que seu diagnóstico é apenas clínico, pois não existem biomarcadores que possam evidenciar com clareza sua presença<sup>69-71</sup>. Observamos através dos nossos resultados que o tratamento com SSH reduziu o edema nos animais tratados tardiamente, entretanto, não observamos tal resposta nos animais do grupo tratado de forma imediata, corroborando com alguns artigos clínicos e experimentais, que demonstraram resultados eficazes na redução do edema<sup>72-75</sup>. Acreditamos que o tempo de resposta da SSH no grupo tratado de forma imediata não tenha sido observado, devido à curta duração dos efeitos circulatórios da SSH. Estudos apontam que para a obtenção de um efeito

intravascular prolongado é necessário combinar SSH com coloides (p.e. dextrana), obtendo assim efeito sinérgico entre as soluções<sup>76, 77</sup>.

É comum a utilização da SSH como tratamento para reestabelecer os padrões hemodinâmicos e por apresentar efeito imunomodulatório. Leidenz et al. em um estudo descritivo clínico sobre o uso da SSH no tratamento da hipertensão intracraniana, descrevem sobre a situação ocorrida no desencadeamento da ME, destacando o cenário promissor do uso da SSH, referindo-se à ação dos agentes hiperosmolares no estabelecimento de gradiente osmótico, através da barreira hematoencefálica sem promover desidratação sistêmica<sup>78</sup>.

Através de estudos experimentais, concluiu-se que a ME é capaz de aumentar o risco de rejeição aguda e disfunção crônica do enxerto<sup>24, 25</sup>, situações comumente associadas aos insucessos no TxP. Existem marcadores inflamatórios que estão diretamente relacionados à disfunção primária do enxerto (DPE)<sup>79,80</sup>. É de suma importância que alguns destes marcadores sejam analisados. Alguns trabalhos citam uma razão entre as citocinas IL-6 (inflamatória) e IL-10(anti-inflamatória) e sua correlação com a DPE nos primeiros 30 dias pós TxP<sup>79, 80</sup>.

Em relação aos marcadores inflamatórios, é sabido que a expressiva ativação celular e molecular ocorre de forma imediata após o início agudo da ME, abrangendo a supregulação de citocinas inflamatórias, tais como IL-6 e TNF- $\alpha$ . Estas citocinas possibilitam uma resposta inflamatória sistêmica<sup>81-83</sup>.

Zweers *et al.* demonstraram em suas pesquisas que a ME induziu uma resposta inflamatória no pulmão do doador, acentuando a rejeição crônica a longo prazo após o TxP<sup>84</sup>.

No intuito de compreender a atuação da SSH neste cenário, e sua possível ação imunomodulatória no órgão, optamos em analisar marcadores inflamatórios específicos, sendo eles IL-6, IL1- $\beta$  e TNF- $\alpha$  e análise do marcador anti-inflamatório IL-10. Realizamos as análises no LBA e no tecido pulmonar. Na análise do LBA, não observamos efeito da SSH entre os grupos, por outro lado, no tecido pulmonar, notamos expressivo aumento dos níveis de TNF- $\alpha$  no grupo ME, corroborando com os resultados encontrados por Nepomuceno e colaboradores, que demonstraram redução dos valores de TNF- $\alpha$  no tecido pulmonar, utilizando como tratamento a SSH em modelo de doador para transplante com choque hemorrágico<sup>42</sup>. Outro estudo recentemente publicado e com metodologia semelhante à utilizada neste trabalho, mostrou níveis de TNF- $\alpha$  aumentados no tecido pulmonar no grupo submetido à ME, sugerindo que determinados processos inflamatórios observados sejam desencadeados por traumas correlacionados à própria ME<sup>85</sup>. Neste cenário, Mitra e colaboradores, através de estudo “*in vitro*” por meio de cultura celular, utilizando combinação de citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$  em meio contendo SSH, demonstraram o efeito benéfico da SSH e seu protagonismo em atenuar a resposta pró-inflamatória, diminuindo a expressão das citocinas avaliadas<sup>86</sup>.

Diante dos dados apresentados, foi possível demonstrar que a SSH 7,5% é capaz de preservar as características resistivas e elásticas pulmonares,

além de atuar de forma positiva na redução do edema perivascular e infiltrado neutrofílico, influenciando na resposta inflamatória provocada pela ME. Trata-se de uma solução de fácil acesso e de baixo custo, sendo, portanto, encontrada nos mais diversificados centros hospitalares e passível de uso na prática clínica em possíveis doadores de órgãos, associadas ou não a agentes anti-inflamatórios.

## **7. Conclusões**

---

---

Concluimos que o tratamento com SSH a 7,5%, após indução da ME em ratos:

Principal:

- Preservou as características resistivas e elásticas pulmonares;
- Reduziu a infiltração neutrofílica no pulmão.

Específicas:

- Não alterou as concentrações dos marcadores inflamatórios TNF- $\alpha$ , IL-1  $\beta$ , IL-6, IL-10 e ICAM;
- Reduziu o número de neutrófilos no tecido pulmonar;
- Reduziu o edema perivascular.

## **8. Anexos**

---

---

**Tabela 1** - Tabela com média e erro padrão da pressão arterial média em mmHg dos animais

| Pressão Arterial Média ( mmHg) |               |                |               |              |               |                |                |              |
|--------------------------------|---------------|----------------|---------------|--------------|---------------|----------------|----------------|--------------|
|                                | Basal         | Pico           | 10'           | 30'          | 60'           | 120'           | 180'           | 240'         |
| ME                             | 111.375 ± 9.4 | 150.875 ± 22.4 | 76.625 ± 14.8 | 72.75 ± 19.7 | 88 ± 14.30    | 110.375 ± 22.8 | 73.125 ± 12.28 | 62.25 ± 12.8 |
| Hip 0'                         | 110.66 ± 5.6  | 127.44 ± 9.5   | 65.88 ± 5.5   | 65.55 ± 2.6  | 79.44 ± 14.08 | 104.33 ± 15.7  | 98.22 ± 16.43  | 93.66 ± 8.28 |
| Hip 60'                        | 113.5 ± 6.5   | 137 ± 20.20    | 66 ± 8.6      | 62 ± 11.7    | 70.5 ± 14.10  | 105.25 ± 15.9  | 90.125 ± 12.96 | 78.5 ± 7.32  |

**Tabela 2** - Tabela com média e erro padrão de leucócitos no sangue periférico colhidos nos momentos inicial e final do experimento (células/mm<sup>3</sup>)

| Leucócitos Totais (células/mm <sup>3</sup> ) |               |         |             |         |
|--|---------------|---------|-------------|---------|
|  | Média Inicial | EP      | Média Final | EP      |
| ME   | 16272.22      | 493.22  | 11613.75    | 1353.59 |
| HIP.0'                                       | 15655.56      | 2371.02 | 9518.75     | 1531.8  |
| HIP.60'                                      | 13200.00      | 1239.57 | 9136.67     | 719.74  |

**Tabela 3** - Tabela com média e erro padrão da análise de interleucinas no tecido pulmonar (pg/mg).

| Interleucinas Multiplex (pg/mg) |         |       |         |       |         |       |         |       |
|---------------------------------|---------|-------|---------|-------|---------|-------|---------|-------|
|                                 | Control | EP    | ME      | EP    | Hip.0'  | EP    | Hip.60' | EP    |
| IL1-beta                        | 82.17   | 67.9  | 440.28  | 31.8  | 308.80  | 36.9  | 410.58  | 32.4  |
| IL-6                            | 437.74  | 400.2 | 3388.64 | 131.4 | 2100.12 | 463.5 | 1833.27 | 323.5 |
| IL-10                           | 7.13    | 1.18  | 9.47    | 1.67  | 11.12   | 1.67  | 8.50    | 0.77  |
| TNF-alfa                        | 3.60    | 1.45  | 16.23   | 4     | 13.42   | 2.46  | 10.64   | 1.74  |

**Tabela 4** - Tabela com média e erro padrão da análise de malondialdeído no tecido pulmonar (ng/mL) pela técnica ELISA.

| Malondialdeído (ng/mL) |       |     |
|------------------------|-------|-----|
| MDA                    |       |     |
|                        | Média | EP  |
| CONTROL                | 3.5   | 0.7 |
| ME                     | 12.8  | 0.9 |
| Hip.0'                 | 7.1   | 0.7 |
| Hip.60'                | 9     | 1.2 |

**Tabela 5** - Tabela com média e erro padrão da avaliação da resistência das vias aéreas (RAW).

| Resistência das Vias Aéreas (cmH <sub>2</sub> O.s/mL) |     |      |        |      |         |      |
|---|-----|------|--------|------|---------|------|
|   | ME  | EP   | Hip 0' | EP   | Hip 60' | EP   |
| Basal   | .07 | .016 | .09    | .015 | .07     | .017 |
| 2 horas   | .09 | .012 | .09    | .011 | .12     | .012 |
| 4 horas   | .19 | .059 | .11    | .055 | .08     | .063 |

**Tabela 6** - Tabela com média e erro padrão da avaliação da resistência tecidual (Gtis).

| Resistência Tecidual (cmH <sub>2</sub> O/mL) |      |      |        |      |         |      |
|--|------|------|--------|------|---------|------|
|  | ME   | EP   | Hip 0' | EP   | Hip 60' | EP   |
| Basal  | .412 | .073 | .539   | .069 | .445    | .078 |
| 2 horas                                      | .566 | .109 | .596   | .103 | .502    | .117 |
| 4 horas                                      | .636 | .109 | .637   | .102 | .475    | .116 |

**Tabela 7** - Tabela com média e erro padrão da avaliação da elastância (Htis).

| <b>Elastância (cmH<sub>2</sub>O.s/mL)</b> |       |      |        |      |         |      |
|---|-------|------|--------|------|---------|------|
|   | ME    | EP   | Hip 0' | EP   | Hip 60' | EP   |
| Basal                                     | 2.568 | .251 | 2.351  | .236 | 2.452   | .268 |
| 2 horas                                   | 4.097 | .376 | 3.256  | .354 | 3.209   | .401 |
| 4 horas                                   | 4.955 | .555 | 3.882  | .523 | 3.064   | .593 |

**Tabela 8** - Tabela com média e erro padrão da avaliação de edema perivascular pela técnica de H/E.

| <b>EDEMA (<math>\mu\text{m}^2/\mu\text{m}</math>)</b> |       |      |
|---|-------|------|
|   | Média | EP   |
| Control   | 11.9  | 7.10 |
| ME  | 47.9  | 3.29 |
| HIP.0'  | 41.2  | 5.15 |
| HIP0.60'  | 23.9  | 6.39 |

**Tabela 9** - Tabela com média e erro padrão da avaliação de infiltrado neutrofílico pela técnica de H/E.

| <b>NEUTRÓFILOS (nº de células/<math>\mu\text{m}^2</math>)</b> |       |        |
|---|-------|--------|
|   | Média | EP     |
| Control   | 2.1   | .46193 |
| ME  | 8.3   | .86580 |
| HIP.0'  | 8.5   | .34869 |
| HIP.60'   | 4.1   | .86087 |



**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

A CEUA da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 18/04/16, **APROVOU** o documento abaixo mencionado, recebido em 12/04/16, para o Protocolo de Pesquisa n<sup>o</sup> **057/13**, intitulado: **“Avaliação funcional de pulmões submetidos ao tratamento de solução salina hipertônica em modelo de morte encefálica”**, apresentado pela Comissão Científica do INCOR

- Alteração de Pesquisador Executante de Paulo Manuel Pêgo-Fernandes para **Liliane Moreira Ruiz** para ser utilizado como Tese de Doutorado
- Alteração no tempo de avaliação da Morte Encefálica, passando de seis horas para quatro horas

Pesquisador Responsável: Paulo Manoel Pêgo-Fernandes

CEUA-FMUSP, 18 de Abril de 2016



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

PROJETO: MORTE ENCEFALICA (LILIANE). Data: \_\_\_/\_\_\_/2015

Experimento #: \_\_\_\_\_

Ratos Wistar

Peso: \_\_\_\_\_ g GRUPO:  ME  Hipertônica 0'  Hipertônica 60'

PAM

|              |              |              |            |               |             |            |            |    |    |    |            |            |            |
|--------------|--------------|--------------|------------|---------------|-------------|------------|------------|----|----|----|------------|------------|------------|
| Basal (Hr: ) | Pico         | 1'           | 2'         | 3'            | 4'          | 5'         | 6'         | 7' | 8' | 9' | 10' (Hr: ) | 15' (Hr: ) | 20' (Hr: ) |
| 25' (Hr: )   | 30' (Hr: )   | 35' (Hr: )   | 40' (Hr: ) | 45' (Hr: )    | 50' (Hr: )  | 55' (Hr: ) | 60' (Hr: ) |    |    |    |            |            |            |
| 1h30' (Hr: ) | 2 hrs (Hr: ) | 2h30' (Hr: ) | 3hrs(Hr: ) | 3h 30' (Hr: ) | 4hrs (Hr: ) |            |            |    |    |    |            |            |            |
|              |              |              |            |               |             |            |            |    |    |    |            |            |            |
|              |              |              |            |               |             |            |            |    |    |    |            |            |            |

Leucograma inicial=  
Leucograma final =

GASOMETRIA

| Gasos/Tempo | pH  |     | PCO2 |     | PO2 |     | Hct |     | BE  |     | SatO2 |     | Lact |     |
|-------------|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------|-----|------|-----|
|             | Art | Ven | Art  | Ven | Art | Ven | Art | Ven | Art | Ven | Art   | Ven | Art  | Ven |
| Inicial     |     |     |      |     |     |     |     |     |     |     |       |     |      |     |
| 240' p. ME  |     |     |      |     |     |     |     |     |     |     |       |     |      |     |

MECÂNICA PULMONAR

| BASAL | Quick Prime (1) | Snap Shot(1) | Quick Prime (2) | Snap Shot(2) | Quick Prime (3) | Snap Shot(3) |
|-------|-----------------|--------------|-----------------|--------------|-----------------|--------------|
|       | Rn=             | Rrs=         | Rn=             | Rrs=         | Rn=             | Rrs=         |
|       | I =             | Ers=         | I =             | Ers=         | I =             | Ers=         |
|       | G=              | Crs=         | G=              | Crs=         | G=              | Crs=         |
|       | H=              | Cod=         | H=              | Cod=         | H=              | Cod=         |
|       | ETA=            |              | ETA=            |              | ETA=            |              |
|       | COD cp=         |              | COD cp=         |              | COD cp=         |              |

| 2h p/ ME | Quick Prime (1) | Snap Shot(1) | Quick Prime (2) | Snap Shot(2) | Quick Prime (3) | Snap Shot(3) |
|----------|-----------------|--------------|-----------------|--------------|-----------------|--------------|
|          | Rn=             | Rrs=         | Rn=             | Rrs=         | Rn=             | Rrs=         |
|          | I =             | Ers=         | I =             | Ers=         | I =             | Ers=         |
|          | G=              | Crs=         | G=              | Crs=         | G=              | Crs=         |
|          | H=              | Cod=         | H=              | Cod=         | H=              | Cod=         |
|          | ETA=            |              | ETA=            |              | ETA=            |              |
|          | COD cp=         |              | COD cp=         |              | COD cp=         |              |

| 4h p/ ME | Quick Prime (1) | Snap Shot(1) | Quick Prime (2) | Snap Shot(2) | Quick Prime (3) | Snap Shot(3) |
|----------|-----------------|--------------|-----------------|--------------|-----------------|--------------|
|          | Rn=             | Rrs=         | Rn=             | Rrs=         | Rn=             | Rrs=         |
|          | I =             | Ers=         | I =             | Ers=         | I =             | Ers=         |
|          | G=              | Crs=         | G=              | Crs=         | G=              | Crs=         |
|          | H=              | Cod=         | H=              | Cod=         | H=              | Cod=         |
|          | ETA=            |              | ETA=            |              | ETA=            |              |
|          | COD cp=         |              | COD cp=         |              | COD cp=         |              |

 Coleta de LBA Coleta de citocinas – Final Pulmão Patologia

Observações: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## **9. Referências Bibliográficas**

---

---

1. Studer SM, Levy RD, McNeil K, Orens JB. Lung transplant outcomes: a review of survival, graft function, physiology, health-related quality of life and cost-effectiveness. *Eur Respir J*. 2004;24(4):674 -85.
2. Christie JD, Edwards LB, Kucheryavaya AY, Benden C, Dobbels F, Kirk R, et al. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Twenty-eighth Adult Lung and Heart-Lung Transplant Report--2011. *J Heart Lung Transplant*. 2011;30(10):1104 -22.
3. de Perrot M, Liu M, Waddell TK, Keshavjee S. Ischemia-reperfusion-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;167(4):490 -511.
4. D'Império F. [Brain death, multiorgan donor and lung transplantation]. *Rev Bras Ter Intensiva*. 2007;19(1):74 -84.
5. Araujo LF, Holand AR, Paludo AeO, Silva É, Forgiarini LA, Forgiarini LF, et al. Effect of the systemic administration of methylprednisolone on the lungs of brain-dead donor rats undergoing pulmonary transplantation. *Clinics (Sao Paulo)*. 2014;69(2):128 -33.
6. Afonso Júnior JE, Werebe EeC, Carraro RM, Teixeira RH, Fernandes LM, Abdalla LG, et al. Lung transplantation. *Einstein (Sao Paulo)*. 2015;13(2):297 -304.
7. The international Society for Heart & Lung Transplantation [Internet]. 2018.
8. Pêgo-Fernandes PM, Medeiros IL, Mariani AW, Fernandes FG, Unterpertinger FoV, Samano MN, et al. Ex vivo lung perfusion: initial Brazilian experience. *J Bras Pneumol*. 2009;35(11):1107 -11.
9. Camargo PC, Teixeira RH, Carraro RM, Campos SV, Afonso Junior JE, Costa AN, et al. Lung transplantation: overall approach regarding its major aspects. *J Bras Pneumol*. 2015;41(6):547 -53.
10. ALMIR FERREIRA DE ANDRADE WSP, ROBSON LUIS OLIVEIRA DE AMORIM, EBERVAL GADELHA FIGUEIREDO, ELOY RUSAFÁ NETO., TEIXEIRA MJ. MECANISMOS MECANISMOS DE LESÃO CEREBRAL CEREBRAL NO TRAUMATISMO TRAUMATISMO CRANIOENCEFÁLICO. *Rev Assoc Med Bras*. 2009;55:75-81.
11. TAYANNE, DIAS KC. **ASSISTÊNCIA DE ENFERMAGEM NA**

## MANUTENÇÃO DO POTENCIAL DOADOR NA UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA 2012.

12. Skrabal CA, Thompson LO, Potapov EV, Southard RE, Joyce DL, Youker KA, et al. Organ-specific regulation of pro-inflammatory molecules in heart, lung, and kidney following brain death. *J Surg Res.* 2005;123(1):118 -25.
13. van der Hoeven JA, Ploeg RJ, Postema F, Molema I, de Vos P, Girbes AR, et al. Induction of organ dysfunction and up-regulation of inflammatory markers in the liver and kidneys of hypotensive brain dead rats: a model to study marginal organ donors. *Transplantation.* 1999;68(12):1884 -90.
14. Cypel M, Kaneda H, Yeung JC, Anraku M, Yasufuku K, de Perrot M, et al. Increased levels of interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  in donor lungs rejected for transplantation. *J Heart Lung Transplant.* 2011;30(4):452 -9.
15. Cypel M, Kaneda H, Yeung JC, Anraku M, Yasufuku K, de Perrot M, et al. Increased levels of interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  in donor lungs rejected for transplantation. *J Heart Lung Transplant.* 2011;30(4):452 -9.
16. Badiwala MV, Ramzy D, Tumati LC, Tepperman ED, Sheshgiri R, Prodger JL, et al. Donor pretreatment with hypertonic saline attenuates primary allograft dysfunction: a pilot study in a porcine model. *Circulation.* 2009;120(11 Suppl):S206 -14.
17. Pivetta M. A solução que salva. *Pesquisa Fapesp: Agosto 2002; 2002.*
18. Poli-de-Figueiredo LF, Cruz RJ, Sannomiya P, Rocha-E-Silva M. Mechanisms of action of hypertonic saline resuscitation in severe sepsis and septic shock. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.* 2006;6(2):201 -6.
19. Shukla A, Hashiguchi N, Chen Y, Coimbra R, Hoyt DB, Junger WG. Osmotic regulation of cell function and possible clinical applications. *Shock.* 2004;21(5):391 -400.
20. White H, Cook D, Venkatesh B. The use of hypertonic saline for treating intracranial hypertension after traumatic brain injury. *Anesth Analg.* 2006;102(6):1836 -46.
21. Pascual JL, Khwaja KA, Chaudhury P, Christou NV. Hypertonic saline and the microcirculation. *J Trauma.* 2003;54(5 Suppl):S133 -40.

22. Rocha-e-Silva M, Poli de Figueiredo LF. Small volume hypertonic resuscitation of circulatory shock. *Clinics (Sao Paulo)*. 2005;60(2):159 -72.
23. Kusaka M, Pratschke J, Wilhelm MJ, Ziai F, Zandi-Nejad K, Mackenzie HS, et al. Activation of inflammatory mediators in rat renal isografts by donor brain death. *Transplantation*. 2000;69(3):405 -10.
24. Wilhelm MJ, Pratschke J, Beato F, Taal M, Kusaka M, Hancock WW, et al. Activation of the heart by donor brain death accelerates acute rejection after transplantation. *Circulation*. 2000;102(19):2426 -33.
25. Pratschke J, Wilhelm MJ, Laskowski I, Kusaka M, Beato F, Tullius SG, et al. Influence of donor brain death on chronic rejection of renal transplants in rats. *J Am Soc Nephrol*. 2001;12(11):2474 -81.
26. Pratschke J, Wilhelm MJ, Kusaka M, Beato F, Milford EL, Hancock WW, et al. Accelerated rejection of renal allografts from brain-dead donors. *Ann Surg*. 2000;232(2):263 -71.
27. Elenice Dias Ribeiro de Paula Lima MBBM, Djair Daniel Nakamae. ASPECTOS ÉTICO-LEGAIS DA RETIRADA E TRANSPLANTE DE TECIDOS, ÓRGÃOS E PARTES DO CORPO HUMANO. *Rev latino-am enfermagem*. 1997:5-12.
28. Israel Lopes de Medeiros PMP-F, Fábio Biscegli Jatene. Transplante pulmonar. *Revista de Medicina*. 2009.
29. Langer RM, Vladimir P, Demikhov, a pioneer of organ transplantation. *Transplant Proc*. 2011;43(4):1221 -2.
30. Silva PR. Transplantation. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2008;23(3):444.
31. Paulo Manuel Pêgo Fernandes MNS, Jader Joel Machado Junqueira ,, Daniel Reis Waisberg GSN, Fabio Biscegli Jatene. Perfil do doador de pulmão disponibilizado no estado de São Paulo, Brasil, em 2006. *J Bras Pneumol*. 2008:497-505.
32. Hachem RR. Acute Rejection and Antibody-Mediated Rejection in Lung Transplantation. *Clin Chest Med*. 2017;38(4):667 -75.
33. Marinho A, Cardoso SeS, Almeida VV. [Geographic disparities in organ transplantation in Brazil]. *Cad Saude Publica*. 2010;26(4):786 -96.

34. Agnolo CMD, Freitas RA, Almeida DF, Lanjoni VP, MLF. O. Morte Encefálica: Assistência de Enfermagem. *Jornal Brasileiro de Transplante*. 2010;1221 - 80.
35. Morato EG. Morte encefálica: conceitos essenciais, diagnóstico e atualização. *Rev Med Minas Gerais*. 2009;227-36.
36. D'Império F. Transplante de pulmão: morte cerebral e o potencial doador de órgãos. *Pulmão RJ*. 2006;15(2):100-9.
37. Breithaupt-Faloppa AC, Ferreira SG, Kudo GK, Armstrong R, Tavares-de-Lima W, da Silva LF, et al. Sex-related differences in lung inflammation after brain death. *J Surg Res*. 2016;200(2):714 -21.
38. Simas R, Sannomiya P, Cruz JW, Correia CeJ, Zanoni FL, Kase M, et al. Paradoxical effects of brain death and associated trauma on rat mesenteric microcirculation: an intravital microscopic study. *Clinics (Sao Paulo)*. 2012;67(1):69 -75.
39. Simão RR, Ferreira SG, Kudo GK, Junior RA, Silva LFFd, Sannomiya P, et al. Sex differences on solid organ histological characteristics after brain death. *Acta Cirurgica Brasileira*. 2016;278 - 85.
40. Peiffer KM. Brain Death and Organ Procurement: Nursing management of adults with brain injury is crucial to the viability of donors organs. *AJN The American Journal of Nursing*. 2007;107(3):58 - 67.
41. Correia CJ, Armstrong R, Carvalho PO, Simas R, Sanches DCJ, Breithaupt-Faloppa AC, et al. Hypertonic Saline Solution Reduces Microcirculatory Dysfunction and Inflammation in a Rat Model of Brain Death. *Shock*. 2018.
42. Nepomuceno NA, de Oliveira-Braga KA, Ruiz LM, Correia AT, Silva Pato EZ, da Silva LF, et al. Effect of hypertonic saline in the pretreatment of lung donors with hemorrhagic shock. *J Surg Res*. 2018;225:181-8.
43. Welkins R. Fundamentos da Terapia Respiratória. 9 ed. University of Texas Health Science Center at San Antonio, San Antonio, Texas2009.
44. Saraiva S. Mecânica Ventilatória e Controle da Respiração. *Revista Brasileira de Anestesiologia*. 1996:164 - 74.
45. Gritti LA, Barreto SS. A new approach to the determination of airway resistance: interrupter technique vs. plethysmography. *J Bras Pneumol*. 2011;37(1):61 -8.

46. Porto EF, Castro AA, Leite JR, Miranda SV, Lancauth A, Kumpel C. Comparative analysis of respiratory systems compliance in three different positioning (lateral, dorsal and sitting) in patients in prolonged invasive mechanical ventilation. *Rev Bras Ter Intensiva*. 2008;20(3):213 -9.
47. CARLOS ALBERTO DE CASTRO PEREIRA MÂFM. Pletismografia e resistência das vias aéreas. *J Pneumol*. 2002.
48. Holland MC, Mackersie RC, Morabito D, Campbell AR, Kivett VA, Patel R, et al. The development of acute lung injury is associated with worse neurologic outcome in patients with severe traumatic brain injury. *J Trauma*. 2003;55(1):106 -11.
49. Rogers FB, Shackford SR, Trevisani GT, Davis JW, Mackersie RC, Hoyt DB. Neurogenic pulmonary edema in fatal and nonfatal head injuries. *J Trauma*. 1995;39(5):860 -6; discussion 6-8.
50. Weber DJ, Gracon AS, Ripsch MS, Fisher AJ, Cheon BM, Pandya PH, et al. The HMGB1-RAGE axis mediates traumatic brain injury-induced pulmonary dysfunction in lung transplantation. *Sci Transl Med*. 2014;6(252):25 2ra124.
51. Garcia VD. Dimensionamento dos Transplantes no Brasil e em cada estado
- ABTO: Valter Duro Garcia
- 2020 [RBT Veículo Oficial da Associação Brasileira de Transplante de Órgãos Registro Brasileiro de Transplantes ].
52. Cypel M, Yeung JC, Machuca T, Chen M, Singer LG, Yasufuku K, et al. Experience with the first 50 ex vivo lung perfusions in clinical transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2012;144(5):1200 -6.
53. Pilla ES, Pereira RB, Junior LAF, Forgiarini LF, Paludo AdO, Kulczynski JMU, et al. Efeitos da metilprednisolona na atividade inflamatória e estresse oxidativo nos pulmões de ratos com morte cerebral. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 2013;39.
54. Simas R, Ferreira SG, Menegat L, Zanoni FL, Correia CJ, Silva IA, et al. Mesenteric hypoperfusion and inflammation induced by brain death are not affected by inhibition of the autonomic storm in rats. *Clinics (Sao Paulo)*. 2015;70(6):446 -52.
55. Bugge JF. Brain death and its implications for management of the potential organ donor. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2009;53(10):1239 -50.

- 
56. Jawitz OK, Raman V, Barac Y, Mulvihill MS, Moore C, Choi AY, et al. Impact of Donor Brain Death Duration on Outcomes After Lung Transplantation. *Ann Thorac Surg.* 2019;108(5):1519 -26.
  57. Guetti NR, Marques IR. [Nursing assistance to the potential organ donor with brain death]. *Rev Bras Enferm.* 2008;61(1):91 -7.
  58. Lee JH, Kim MS, Na S, Koh SO, Sim J, Choi YS. Evaluation of acid-base status in brain dead donors and the impact of metabolic acidosis on organ retrieval. *Minerva Anesthesiol.* 2013;79(9):1011 -20.
  59. Avlonitis VS, Wigfield CH, Kirby JA, Dark JH. The hemodynamic mechanisms of lung injury and systemic inflammatory response following brain death in the transplant donor. *Am J Transplant.* 2005;5(4 Pt 1):684 -93.
  60. Correia CJ, Coutinho E Silva RDS, Soares RGF, Armstrong R, Ricardo-da-Silva FY, Sannomiya P, et al. Hypertonic saline reduces cell infiltration into the lungs after brain death in rats. *Pulm Pharmacol Ther.* 2020;61:101901.
  61. Denes A, McColl BW, Leow-Dyke SF, Chapman KZ, Humphreys NE, Grecnis RK, et al. Experimental stroke-induced changes in the bone marrow reveal complex regulation of leukocyte responses. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2011;31(4):1036 -50.
  62. Menegat L, Simas R, Caliman JM, Zanoni FL, Jacysyn JF, da Silva LFF, et al. Evidence of bone marrow downregulation in brain-dead rats. *Int J Exp Pathol.* 2017;98(3):158 -65.
  63. Avlonitis VS, Wigfield CH, Golledge HD, Kirby JA, Dark JH. Early hemodynamic injury during donor brain death determines the severity of primary graft dysfunction after lung transplantation. *Am J Transplant.* 2007;7(1):83 -90.
  64. Koutsoukou A, Katsiari M, Orfanos SE, Kotanidou A, Daganou M, Kyriakopoulou M, et al. Respiratory mechanics in brain injury: A review. *World J Crit Care Med.* 2016;5(1):65 -73.
  65. Zhou H, Fu Z, Wei Y, Liu J, Cui X, Yang W, et al. Hydrogen inhalation decreases lung graft injury in brain-dead donor rats. *J Heart Lung Transplant.* 2013;32(2):251 -8.
  66. Almeida FM , Saraiva-Romanholo BM , Vieira RP , Moriya HT , Ligeiro-de-Oliveira AP , Lopes FD , et al. Compensatory lung growth after bilobectomy in emphysematous rats. *PLoS One.* 2017.

67. Schossleitner K, Habertheuer A, Finsterwalder R, Friedl HP, Rauscher S, Gröger M, et al. A Peptide to Reduce Pulmonary Edema in a Rat Model of Lung Transplantation. *PLoS One*. 2015;10(11):e0142115.
68. Rostron AJ, Avlonitis VS, Cork DM, Grenade DS, Kirby JA, Dark JH. Hemodynamic resuscitation with arginine vasopressin reduces lung injury after brain death in the transplant donor. *Transplantation*. 2008;85(4):597 -606.
69. StatPearls. 2020.
70. Busl KM, Bleck TP. Neurogenic Pulmonary Edema. *Crit Care Med*. 2015;43(8):1710 -5.
71. Cruz AS, Menezes S, Silva M. Neurogenic pulmonary edema due to ventriculo-atrial shunt dysfunction: a case report. *Braz J Anesthesiol*. 2016;66(2):200 -3.
72. Holms CA, Otsuki DA, Kahvegian M, Massoco CO, Fantoni DT, Gutierrez PS, et al. Effect of hypertonic saline treatment on the inflammatory response after hydrochloric acid-induced lung injury in pigs. *Clinics (Sao Paulo)*. 2015;70(8):577 -83.
73. Petroni RC, Biselli PJ, de Lima TM, Theobaldo MC, Caldini ET, Pimentel RN, et al. Hypertonic Saline (NaCl 7.5%) Reduces LPS -Induced Acute Lung Injury in Rats. *Inflammation*. 2015;38(6):2026 -35.
74. Han J, Ren HQ, Zhao QB, Wu YL, Qiao ZY. Comparison of 3% and 7.5% Hypertonic Saline in Resuscitation After Traumatic Hypovolemic Shock. *Shock*. 2015;43(3):244 -9.
75. Toung TJ, Chang Y, Lin J, Bhardwaj A. Increases in lung and brain water following experimental stroke: effect of mannitol and hypertonic saline. *Crit Care Med*. 2005;33(1):203 -8; discussion 59-60.
76. Velasco IT, Pontieri V, Rocha e Silva M, Lopes OU. Hyperosmotic NaCl and severe hemorrhagic shock. *Am J Physiol*. 1980;239(5):H664 -73.
77. Kramer GC, Perron PR, Lindsey DC, Ho HS, Gunther RA, Boyle WA, et al. Small-volume resuscitation with hypertonic saline dextran solution. *Surgery*. 1986;100(2):239 -47.
78. Leidenz FAB, Lacerda GC, Garcia IL, Resende JA, Garrido LC, Porto LB, et al. Uso de solução salina hipertônica em casos

de hipertensão intracraniana decorrente

de traumatismo cranioencefálico. *Rev Med Minas Gerais*. 2010:S30-S2.

79. de Perrot M, Bonser RS, Dark J, Kelly RF, McGiffin D, Menza R, et al. Report of the ISHLT Working Group on Primary Lung Graft Dysfunction part III: donor-related risk factors and markers. *J Heart Lung Transplant*. 2005;24(10):1460 -7.

80. Kaneda H, Waddell TK, de Perrot M, Bai XH, Gutierrez C, Arenovich T, et al. Pre-implantation multiple cytokine mRNA expression analysis of donor lung grafts predicts survival after lung transplantation in humans. *Am J Transplant*. 2006;6(3):544 -51.

81. McKeating EG, Andrews PJ, Mascia L. Leukocyte adhesion molecule profiles and outcome after traumatic brain injury. *Acta Neurochir Suppl*. 1998;71:200-2.

82. Glynos C, Athanasiou C, Kotanidou A, Korovesi I, Kaziani K, Livaditi O, et al. Preclinical pulmonary capillary endothelial dysfunction is present in brain dead subjects. *Pulm Circ*. 2013;3(2):419 -25.

83. Takada M, Nadeau KC, Hancock WW, Mackenzie HS, Shaw GD, Waaga AM, et al. Effects of explosive brain death on cytokine activation of peripheral organs in the rat. *Transplantation*. 1998;65(12):1533 -42.

84. Zweers N, Petersen AH, van der Hoeven JA, de Haan A, Ploeg RJ, de Leij LF, et al. Donor brain death aggravates chronic rejection after lung transplantation in rats. *Transplantation*. 2004;78(9):1251 -8.

85. Simas R, Zanoni FL, Silva RDSC, Moreira LFP. Brain death effects on lung microvasculature in an experimental model of lung donor. *J Bras Pneumol*. 2020;46(2) :e20180299.

86. Mitra S, Schiller D, Anderson C, Gamboni F, D'Alessandro A, Kelher M, et al. Hypertonic saline attenuates the cytokine-induced pro-inflammatory signature in primary human lung epithelia. *PLoS One*. 2017;12(12):e0189536.