

Daniel Marcelo Silva Magalhães

**Estudo dos efeitos da solução salina hipertônica
sobre a função e alterações do tecido cardíaco em
modelo de morte encefálica em ratos**

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

Programa de Cirurgia Torácica e Cardiovascular
Orientador: Prof. Dr. Luiz Felipe Pinho Moreira

São Paulo

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Magalhães, Daniel Marcelo Silva

Estudo dos efeitos da solução salina hipertônica sobre a função e alterações do tecido cardíaco em modelo de morte encefálica em ratos / Daniel Marcelo Silva Magalhães. -- São Paulo, 2017.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Cirurgia Torácica e Cardiovascular .

Orientador: Luiz Felipe Pinho Moreira.

Descritores: 1.Morte encefálica 2.Solução salina hipertônica 3.Função ventricular 4.Inflamação 5.Apoptose 6.Ratos Wistar

USP/FM/DBD-042/17

Dedicatória

"Sem esmorecer para não desmerecer"

Oswaldo Cruz

A JOSÉ SEVERINO DE MAGALHÃES (*in memoriam*), meu pai, exemplo de competência, honestidade e generosidade, cujos ensinamentos me guiam e fortalecem a cada dia.

À DANIELA, minha querida esposa, alma gêmea que tive a sorte de encontrar aos 12 anos de idade e com a qual tenho o prazer de conviver em família. Mulher gerreira e determinada, cúmplice de todas as horas, minha amiga, meu alento, meu amor.

A meus filhos, LUCA e LAVÍNIA, que são como a brisa refrescante do amor puro e verdadeiro nas nossas vidas. Suas existências me incentivam a progredir como ser humano.

À DONA CARMINHA, minha mãe, que nos guiou, desde o princípio, com amor, carinho e dedicação, mas também com firmeza.

Aos meus irmãos, EDUARDO, CHRISTIANNE E VINÍCIUS, cujo companheirismo e amizade sempre me incentivaram.

A PAULO MARQUES, o primeiro doutor da família, cuja limitação física jamais o fez desistir. Que me inspirou com sua generosidade, persistência e capacidade de superação.

Agradecimientos

Ao PROF. DR. LUIZ FELIPE PINHO MOREIRA por ter me aceito como orientando e ter compartilhado comigo seu precioso tempo, dando-me a oportunidade, assim como a tantos, de desenvolver ciência nesta instituição, engrandecendo-a no cenário nacional e internacional.

Aos Professores membros da banca de qualificação, PROF. DR^a. PAULINA SANNOMIYA, PROF. DR. RENATO ASSAD, E PROF. DR. ALFREDO FIORELLI, cujas construtivas observações muito contribuíram para o aprimoramento desta tese.

Aos companheiros de bancada, DR. FERNANDO LUIZ ZANONI, DR. CRISTIANO DE JESUS CORREIA E DR. RAFAEL SIMAS, pelo empenho diário na realização dos experimentos e dosagens. Eles foram fundamentais para execução desse projeto.

Aos meus companheiros de equipe, DR. MAURÍLIO ONOFRE DEININGER, DR. ORLANDO GOMES DE OLIVEIRA E DR. JOSÉ REINALDO DE MOURA COELHO, que me deram suporte nessa empreitada, certamente trabalhando em dobro na minha ausência. Especialmente a Maurílio que sempre me abriu as portas.

Aos colegas de laboratório, ANA, THALES, SUELI, LAURA, ROBERTA e ISMAEL, pelos reiterados auxílios prestados e companheirismo constante.

A SÉRGIO, funcionário do LIM 11, que sempre nos ajuda nas tarefas cotidianas do laboratório.

Aos PROFESSORES E COLEGAS do programa de pós-graduação em Cirurgia Torácica e Cardiovascular.

À secretaria da pós-graduação, JULIANA LATTARI, NEUSA RODRIGUES E MÔNICA SOUTO, pela ajuda indispensável em todas as questões e dificuldades enfrentadas no decorrer dessa trajetória acadêmica.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento do projeto.

A DEUS,

pelo dom da vida em livre arbítrio.

A Vós, nosso salvador, toda honra e glória.

“Pois o Senhor é quem dá sabedoria e de Sua boca procedem o conhecimento e o discernimento”. Provérbios 2:6

Epígrafe

*“A alegria está na luta,
na tentativa, no sofrimento envolvido,
e não na vitória propriamente dita”*

Mahatma Gandhi

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.

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

Sumário

	Lista de abreviaturas	
	Lista de símbolos	
	Lista de figuras	
	Lista de tabelas	
	Resumo	
	Abstract	
1	INTRODUÇÃO.....	1
2	OBJETIVOS.....	10
2.1	Objetivo geral.....	11
2.2	Objetivos específicos.....	11
3	MÉTODOS.....	12
3.1	Protocolo experimental.....	13
3.2	Anestesia e preparo cirúrgico.....	15
3.2.1	Implante de cateter em artéria caudal.....	15
3.2.2	Implante de cateter em veia jugular interna direita.....	16
3.2.3	Implante de dispositivo para indução da morte encefálica.....	16
3.2.4	Implante de cateter de microcondutância.....	16
3.3	Leucograma, gasometria e eletrólitos.....	17
3.4	Análise da pressão arterial média sistêmica e da frequência cardíaca.....	18
3.5	Análise das curvas pressão-volume.....	18
3.5.1	Parâmetros de função sistólica do ventrículo esquerdo.....	19
3.5.2	Parâmetros de função diastólica do ventrículo esquerdo.....	20
3.6	Eutanásia e descarte dos animais.....	20
3.7	Análise do tecido cardíaco.....	20
3.7.1	Estudo histológico.....	20
3.7.2	Estudo imuno-histoquímico.....	21
3.7.2.1	Expressão de moléculas de adesão leucocitária.....	22
3.7.2.2	Expressão de moléculas de apoptose.....	23
3.7.2.3	Expressão de alfa-actina.....	23
3.7.3	Dosagem de fator de necrose tumoral alfa e citocinas no tecido cardíaco.....	24
3.8	Dosagem de corticosterona e troponina-I.....	24
3.9	Análise estatística.....	25

4	RESULTADOS.....	26
4.1	Leucograma, gasometria e eletrólitos.....	27
4.2	Análise da pressão arterial média sistêmica e da frequência cardíaca.....	28
4.2.1	Pressão arterial média.....	28
4.2.2	Frequência cardíaca.....	28
4.3	Análise da função ventricular esquerda.....	30
4.3.1	Parâmetros de função sistólica do ventrículo esquerdo.....	30
4.3.1.1	Pressão sistólica final.....	30
4.3.1.2	Pressão diastólica final.....	30
4.3.1.3	dP/dt máximo.....	31
4.3.1.4	Volume diastólico final.....	32
4.3.1.5	Volume sistólico.....	33
4.3.1.6	Fração de ejeção.....	34
4.3.1.7	Trabalho sistólico.....	35
4.3.1.8	Débito Cardíaco.....	36
4.3.2	Parâmetros de função diastólica do ventrículo esquerdo.....	37
4.3.2.1	dP/dt mínimo.....	37
4.3.2.2	Tau.....	38
4.4	Análise do tecido cardíaco.....	39
4.4.1	Histologia cardíaca.....	39
4.4.2	Estudo imuno-histoquímico.....	40
4.4.2.1	Expressão de moléculas de adesão leucocitária.....	40
4.4.2.2	Expressão de moléculas de apoptose.....	41
4.4.2.3	Expressão de alfa-actina.....	42
4.4.3	Dosagem de fator de necrose tumoral alfa e citocinas.....	43
4.5	Dosagem de corticosterona e troponina-I.....	44
5	DISCUSSÃO.....	45
6	CONCLUSÕES.....	53
7	ANEXOS.....	55
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

Listas

AEC	3-amino-etil-carbazol
CINC-1	citocina quimiotóxica de neutrófilos tipo 1
DC	débito cardíaco
dP/dt_{max}	velocidade máxima de elevação da pressão no ventrículo durante a sístole
dP/dt_{min}	velocidade máxima de diminuição da pressão no ventrículo durante a diástole
ELISA	enzima-imuno ensaio
et al	e outros
FC	frequência cardíaca
FE	fração de ejeção
FNT- α	fator de necrose tumoral alfa
FO	falso operado
HRP	enzima peroxidase de rábano
ICAM-1	molécula de adesão intercelular
IL-1 β	Interleucina um beta
IL-6	interleucina seis
ME	morte encefálica
n	número
PAM	pressão arterial média
PBS	tampão fostato salina
PDF	pressão diastólica final
PSF	pressão sistólica final
SH	solução salina hipertônica
SH1	salina hipertônica um minuto

SH60	salina hipertônica sessenta minutos
Tau	tempo de relaxamento isovolumétrico
VCAM-1	molécula de adesão vascular
VDF	volume diastólico final
VE	ventrículo esquerdo
VS	volume sistólico
VSF	volume sistólico final
TBST	solução tampão “ <i>tris</i> ” com “ <i>tween</i> ” vinte
TS	trabalho sistólico

°C	graus Celsius
ciclos/min	ciclos por minuto
F	french
g	grama
<i>g</i>	gravidade
G	gauge
h	hora
min	minuto
μL	microlitros
μm	micrometro
mL	mililitros
mL/kg	mililitros por quilo
pg/g	picograma por grama
PMN	polimorfonucleares
±	mais ou menos
%	percentual
<	menor que

Figura 1	Organograma do protocolo experimental.....	14
Figura 2	Curva pressão-volume.....	18
Figura 3	Variação da pressão arterial média em ratos submetidos à morte encefálica e tratados com solução salina hipertônica.....	29
Figura 4	Variação da frequência cardíaca em ratos submetidos à morte encefálica e tratados com solução salina hipertônica.....	29
Figura 5	Variação da pressão sistólica e diastólica final em ratos submetidos à morte encefálica e tratados com solução salina hipertônica.....	31
Figura 6	Variação do dP/dt máximo em ratos submetidos à morte encefálica e tratados com solução salina hipertônica.....	32
Figura 7	Variação do volume diastólico final em ratos submetidos à morte encefálica e tratados com solução salina hipertônica.....	33
Figura 8	Variação do volume sistólico em ratos submetidos à morte encefálica e tratados com solução salina hipertônica.....	34
Figura 9	Variação da fração de ejeção em ratos submetidos à morte encefálica e tratados com solução salina hipertônica.....	35
Figura 10	Variação do trabalho sistólico em ratos submetidos à morte encefálica e tratados com solução salina hipertônica.....	36
Figura 11	Variação do débito cardíaco em ratos submetidos à morte encefálica e tratados com solução salina hipertônica.....	37
Figura 12	Variação do dP/dt mínimo em ratos submetidos à morte encefálica e tratados com solução salina hipertônica.....	38
Figura 13	Variação da Tau em ratos submetidos à morte encefálica e tratados com solução salina hipertônica.....	39
Figura 14	Efeito do tratamento com solução salina hipertônica na histologia de ratos submetidos à morte encefálica.....	40
Figura 15	Efeito do tratamento com solução salina hipertônica na expressão tecidual de moléculas de adesão leucocitária em ratos submetidos à morte encefálica.....	41
Figura 16	VCAM-1 - Fotomicrografias do tecido miocárdico marcado por imuno-histoquímica e corado com hematoxilina-eosina, mostrando o efeito do tratamento com solução salina hipertônica na expressão tecidual de VCAM-1 em ratos submetidos à morte encefálica.....	41

Figura 17	Efeito do tratamento com solução salina hipertônica na expressão tecidual de BCL-2 em ratos submetidos à morte encefálica.....	42
Figura 18	BCL-2 - Fotomicrografias do tecido miocárdico marcado por imuno-histoquímica e corado com hematoxilina-eosina, mostrando o efeito do tratamento com solução salina hipertônica na expressão tecidual de BCL-2 em ratos submetidos à morte encefálica.....	42
Figura 19	Efeito do tratamento com solução salina hipertônica na expressão tecidual alfa-actina em ratos submetidos à morte encefálica.....	43
Figura 20	Efeito do tratamento com solução salina hipertônica na concentração tecidual cardíaca de fator de necrose tumoral alfa e Cinc-1 em ratos submetidos à morte encefálica.....	43
Figura 21	Efeito do tratamento com solução salina hipertônica na concentração tecidual cardíaca de interleucina-1 β e interleucina-10 em ratos submetidos à morte encefálica.....	44
Figura 22	Efeito do tratamento com solução salina hipertônica na dosagem sérica de corticosterona e troponina-I em ratos submetidos à morte encefálica.....	44

Tabela 1 Dosagem sérica de sódio em ratos submetidos à morte encefálica e tratados com solução salina hipertônica..... 27

Resumo

Magalhães D.M. Estudo dos efeitos da solução salina hipertônica sobre a função e alterações do tecido cardíaco em modelo de morte encefálica em ratos [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

INTRODUÇÃO: O transplante cardíaco é o melhor tratamento para a insuficiência cardíaca em sua fase terminal. A morte encefálica (ME) é responsável por causar instabilidade hemodinâmica e hipoperfusão tecidual, levando a alterações inflamatórias e disfunção miocárdica em potenciais dadores de órgãos. A solução salina hipertônica (SH) é um expansor de volume plasmático capaz de restaurar a hemodinâmica, além de ter efeito imunomodulador. **OBJETIVO:** Em um modelo de ME, testamos a hipótese de que o tratamento com SH previne a disfunção do ventrículo esquerdo (VE) e a lesão miocárdica. **MÉTODOS:** A ME foi induzida em ratos Wistar anestesiados pela insuflação de um cateter balão implantado no espaço subdural, exceto nos animais falso-operados (FO; n = 6). Após a indução da ME, os animais controle receberam apenas solução salina convencional (controle; n = 6). Os animais tratados foram divididos aleatoriamente para receber SH (NaCl a 7,5%, 4 mL / kg) 1 min (SH1; n = 6) ou 60 min (SH60; n = 6) após indução da ME. A função cardíaca foi avaliada continuamente durante 6 h, pela análise da curva pressão-volume no VE. Os marcadores de lesão miocárdica, resposta inflamatória e as proteínas relacionadas à apoptose celular foram dosados no soro ou em fragmentos de tecido cardíaco por imuno-histoquímica ou ensaio-imuno-enzimático, quando apropriado. **RESULTADOS:** A ME associou-se à diminuição da função sistólica do VE, quando comparada ao grupo FO. A utilização de SH após a indução de ME provocou melhora da função sistólica do VE (pressão sistólica final, velocidade

máxima de elevação da pressão no VE, volume sistólico, fração de ejeção, trabalho sistólico e débito cardíaco) 6 h mais tarde, quando comparado ao controle. No entanto, não foram observadas vantagens em relação ao relaxamento ventricular (velocidade máxima de queda da pressão no VE e tempo de relaxamento isovolumétrico - Tau) após o mesmo período. Além disso, quando comparado aos grupos em que houve ME, o tratamento com SH aumentou a expressão de proteína anti-apoptótica e diminuiu a expressão de moléculas de adesão vascular e fator de necrose tumoral alfa. Não foram observadas alterações histológicas ou de proteínas estruturais significativas entre os grupos. **CONCLUSÃO:** Os dados mostram que a SH melhora a função sistólica do VE e reduz o dano ao tecido miocárdico em ratos submetidos à ME, mesmo quando o tratamento foi realizado durante o processo desencadeado por este evento.

Descritores: Morte encefálica, solução salina hipertônica, função ventricular, inflamação, apoptose, ratos Wistar.

Abstract

Magalhães D.M. Study of hypertonic saline solution effects on cardiac function and tissue changes in a rodent brain death model [Thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2017.

BACKGROUND: Heart transplantation represents the most effective treatment for end-stage heart failure. Brain death (BD) is responsible for hemodynamic instability and organ hypoperfusion leading to inflammatory changes and myocardial dysfunction in potential organ donors. Hypertonic saline (HS) is a volume expander capable of restoring hemodynamics in addition to having an immunomodulatory effect. **OBJECTIVE:** In a rat model of BD, we tested the hypothesis that treatment with HS would prevent left ventricular (LV) dysfunction and myocardial injury. **METHODS:** BD was induced in anesthetized Wistar rats by inflating a subdurally placed balloon catheter, except in Sham operated animals (n=6). After BD induction, control animals received only common saline solution (n=6). Treated animals were randomly divided to receive HS (7.5% NaCl, 4mL/kg) 1 min (HS1; n=6) or 60 min (HS60; n=6) after BD induction. We continuously assessed cardiac function for 6h by LV pressure–volume analysis. Inflammatory response, markers of myocardium injury and cellular apoptosis related proteins were investigated in serum or tissue fragments by immunohistochemistry or enzyme-immune-assay when appropriated. **RESULTS:** Compared with Sham, BD was associated with decreased LV systolic and diastolic function. HS treatment after BD induction improved LV systolic function (end-systolic pressure, maximum rate of rise of LV pressure, stroke volume, ejection fraction, systolic work and cardiac output) 6h later when compared with Control. However, no ventricular relaxation advantages were observed (maximum

rate of fall of LV pressure and time constant of LV pressure decay – Tau) after the same time. In addition, compared with BD groups HS treatment increased anti-apoptotic protein expression and decreased vascular adhesion molecule and tumor necrosis factor alfa expression. No significant histologic or structural proteins changes were observed between groups. **CONCLUSION:** Observed data show that HS improves LV systolic function and reduces myocardial tissue compromise in BD rats, even when the treatment was performed during the process triggered by this event.

Descriptors: Brain death; saline solution, hypertonic; ventricular function; inflammation; apoptosis; rats, wistar.

1. Introdução

A insuficiência cardíaca é uma condição clínica com alta prevalência e morbi-mortalidade, cujas internações hospitalares recorrentes estão associadas à diminuição da qualidade de vida^{1,2}. Em detrimento dos recentes avanços terapêuticos, incluindo o uso de novos medicamentos e dispositivos^{2,3}, o transplante cardíaco permanece como a melhor opção terapêutica em seu estágio terminal, com sobrevida média de 10 anos^{3,4}. A qualidade do enxerto, a ausência de comorbidades no receptor e o acesso adequado ao tratamento são os principais fatores envolvidos no sucesso do transplante^{4,5}. De acordo com o Registro da Sociedade Internacional para Transplante de Coração e Pulmão, o número de transplantes cardíacos manteve-se estável na última década, apesar da demanda crescente⁴. A principal limitação para sua realização consiste no número reduzido de doações e na baixa qualidade dos enxertos disponíveis^{4,5}.

Antes do final do século XIX, a perda irreversível da função cardíaca e pulmonar definia morte, porém em 1947, quando Claude Beck realizou a primeira desfibrilação de um coração humano bem-sucedida, abriram-se caminhos para várias descobertas que culminaram na definição atual de morte encefálica (ME)⁶. Os estudos de Mollaret e Goulon *apud* Snodgrass⁷ sobre o coma, em 1959, e a realização do primeiro transplante cardíaco, na África do Sul, em 1967, destacaram a necessidade de definir critérios mais específicos para determinação do coma⁸, fazendo com que a Faculdade de Medicina de Harvard organizasse um comitê para estabelecer critérios relativos ao coma irreversível⁹.

Bates *et al.*¹⁰ estudaram a rápida deterioração orgânica provocada pela ME, observando que 88% dos indivíduos com esse diagnóstico, quando mantidos sob suporte intensivo, evoluíam para parada cardíaca em até 24 horas; verificaram ainda,

que todos chegavam a essa condição em no máximo 5 dias. Tal fato tem relevância clínica, visto que mais de 25% dos potenciais doadores podem ser excluídos do transplante, devido à instabilidade hemodinâmica ou disfunção orgânica, provocada pela ME^{4,5}. A partir de então, houve um crescente interesse na fisiopatologia dessa condição e suas consequências, o que impulsionou a pesquisa envolvendo o transplante de órgãos.

Em 1901, o neurocirurgião americano Harvey Cushing descreveu um reflexo caracterizado por hipertensão, bradicardia e alteração respiratória, provocado pela elevação excessiva da pressão intracraniana (reflexo de Cushing)¹¹. Muitos anos depois, com o advento do transplante cardíaco, surgiram os primeiros e clássicos estudos, inicialmente desenvolvidos por Novitzky *et al.*¹², em um modelo bem estabelecido de ME em babuínos. Eles observaram que a insuflação de um cateter balão no espaço intracraniano produzia a ME, causando elevação súbita e efêmera da pressão arterial média e da frequência cardíaca, conseqüente à lesão do tronco cerebral e a intensa ativação simpática, com liberação de grande quantidade de catecolaminas. Após esta perturbação inicial, estes parâmetros apresentam declínio progressivo, recuperando-se parcialmente cerca de 1 h depois^{12,13}. Desde então, a ME é estudada exaustivamente por este método¹⁴. Além das alterações hemodinâmicas, a ME também provoca distúrbios neuro-endócrinos, inflamatórios e microcirculatórios^{14,15}. Estas alterações fisiopatológicas constituem-se, até hoje, em desafio à adequada preservação de órgãos para o transplante de maneira geral, especialmente para o transplante pulmonar e cardíaco, visto que são os primeiros órgãos a se deteriorar neste cenário^{4,5}. Estudos experimentais em animais com ME confirmam menor sobrevida dos indivíduos que receberam enxertos de coração,

pulmão, rins e fígado, em detrimento daqueles que os obtiveram de doadores vivos, demonstrando que a ME provoca um ambiente deletério para os órgãos e sistemas, sendo responsável pela falha de muitos enxertos^{14,15}.

Alguns métodos mais elaborados de monitorização hemodinâmica foram desenvolvidos nos últimos anos, inclusive para pequenos animais, como a utilização de cateter de microcondutância, capazes de informar continuamente as variações de pressão e volume intraventriculares, possibilitando uma análise mais precisa¹⁶. Utilizando-se dessa tecnologia, Shiliang *et al.*¹⁷ estabeleceram um modelo “*in vivo*” de ME, em ratos, para analisar sua influência na função cardíaca, demonstrando piora progressiva da função ventricular esquerda no decorrer de 5 horas. Além disso, constataram que, quanto maior o tempo decorrido de ME, pior a recuperação do órgão após o transplante. A análise dessas curvas proporcionou melhor entendimento dos fenômenos envolvidos na ME, possibilitando identificar parâmetros hemodinâmicos relacionados diretamente à contratilidade, dependentes ou não do enchimento ventricular e de sua pós-carga, à medida que alguns tratamentos propostos pudessem ser empregados.

O evento central no processo de deterioração da ME é a perda da regulação neural, particularmente simpática dos vasos periféricos, levando à queda abrupta da resistência vascular (pós-carga)¹⁸. Conseqüentemente, há diminuição progressiva da pressão arterial e da pressão de perfusão coronariana, que associada à inflamação, alteração da microcirculação e depleção hormonal, causam a disfunção miocárdica^{15,18}. Galinanes *at al.*¹⁹ demonstraram, em roedores, que a explantação e a perfusão “*ex-vivo*” do coração podia reverter a disfunção causada pela ME, recuperando a função cardíaca aos mesmos níveis dos animais controle. Em outros

estudos subsequentes, em que se utilizou modelo canino de circulação cruzada, cujas pressões de enchimento cardíaco foram mantidas constantes e adequadas, postulou-se que os fatores humorais e neurais são corresponsáveis pela “reação inicial de Cushing”, após indução de ME, e que a combinação de ambos os fatores é capaz de causar a reação máxima²⁰. Nesse mesmo modelo, observou-se que, se as condições de pressão coronariana e enchimento cardíaco fossem mantidas normais, nenhuma ou mínima disfunção cardíaca acontecia, independentemente da intensidade da reação inicial²⁰.

O mecanismo celular envolvido na lesão miocárdica ainda precisa ser esclarecido e inclui redução da afinidade de proteínas contráteis pelo cálcio, diminuição da liberação de cálcio intracelular e redução da ativação dos canais de cálcio mecano-sensíveis¹⁵. Embora haja evidências fortes dos efeitos diretos das condições de enchimento e pós-carga na função contrátil, a correlação entre a perfusão coronariana e a contratilidade é mais complexa. A própria limitação do suprimento de oxigênio, devido à diminuição de pressão de perfusão coronariana, pode provocar redução adicional da contratilidade, causando um estado auto-regulatório negativo que culmina em disfunção ventricular¹⁵. Herijgers *et al.*²¹ mostraram em seu estudo que o endotélio das artérias coronárias de cães em ME está mais sujeito ao vasoespasmos, podendo contribuir para lesão miocárdica direta.

Além das alterações macro-hemodinâmicas e na homeostase hormonal, estudo realizado com ratos em ME identificou alterações na microcirculação do fígado, com dano celular e comprometimento da função hepática^{22,23}. As mudanças na microcirculação observadas são caracterizadas por falha na perfusão sinusoidal, ativação da interação leucócito-endotélio nas veias sinusóides e redução da perfusão

microvascular²³. Alterações semelhantes também são observadas no pâncreas²⁴ e rins²⁵. Estudo com microscopia intravital, um método capaz de analisar a microcirculação “*in vivo*”, demonstrou que a ME também produz diminuição do fluxo mesentérico²⁶, com aumento da inflamação, traduzido por aumento da expressão de moléculas de adesão intercelular (ICAM-1) e vascular (VCAM-1), citocinas inflamatórias, além de redução dos níveis séricos de corticosterona^{26,27}.

Há outros fatores associados à lesão tecidual na ME como: baixos níveis plasmáticos de hormônios tireoideanos^{12,28,29}, hormônio antidiurético^{29,30} e corticosterona³⁰; e elevados níveis de catecolaminas, endotelina, renina e angiotensina II³⁰, que são hormônios vasoconstritores. A ME pode induzir resposta inflamatória sistêmica pela liberação de mediadores circulantes pelo cérebro isquêmico e pela liberação maciça de hormônios vasoconstritores, que causam metabolismo anaeróbio e indução inflamatória de células endoteliais, provocadas pelo aumento das forças de cisalhamento, e por indução de isquemia³¹. Há ativação de genes ligados à inflamação nos diferentes órgãos³², com elevação importante de citocinas inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (FNT- α), interleucina-1- β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6)^{31,33,34}, além de aumento da expressão de moléculas de adesão leucocitária (ICAM-1) e (VCAM-1), E-selectina e P-selectina^{26,27,31}. Alguns estudos mostram que há elevação considerável de mediadores inflamatórios em órgãos que falharam como enxerto, correlacionando diretamente inflamação e lesão orgânica no transplante^{35,36}. Em modelos de ME, confirmou-se inflamação tecidual, caracterizada por aumento de infiltrado celular inflamatório, incluindo macrófagos e leucócitos polimorfonucleares^{37,38}(PMN).

Em consequência da resposta inflamatória sistêmica na ME, observa-se ativação dos genes relacionados à apoptose, com aumento, por exemplo, da expressão de Caspase-3. Por outro lado, há diminuição da expressão de proteínas anti-apoptóticas como a Bcl-2, entre outras^{39,40}. Alguns marcadores de necrose miocárdica como a troponina, ou proteínas como a alfa-actina, que são proteínas estruturais cardíacas⁴¹, podem estar elevadas no coração de doadores com disfunção do enxerto e servem para avaliar o risco de falência primária dos mesmos, podendo ser úteis na detecção de lesão tecidual^{42,43}.

A partir de vários estudos, observamos que, provavelmente, a disfunção orgânica que se segue à ME tem causa multifatorial, ou seja, é consequência de alterações hemodinâmicas, reação inflamatória, alterações microcirculatórias e neuro-humorais no potencial doador de órgãos¹⁵.

Estudos com solução salina hipertônica (SH) apareceram a partir da necessidade de reposição rápida de fluidos em situações de emergência como, por exemplo, no choque hemorrágico⁴⁴. Por conseguinte, foram descobertas suas propriedades hemodinâmicas, microcirculatórias e anti-inflamatórias, que ampliaram as possibilidades de sua utilização⁴⁵. Traverso *et al.*⁴⁶ compararam os efeitos da administração de várias concentrações de cloridrato de sódio (0,9; 5; 7,5 e 10%) em porcos anestesiados e submetidos à hemorragia severa. Eles concluíram que 14 mL/kg da solução 7,5% de cloreto de sódio produz um resultado significativamente melhor nas taxas de sobrevivência, comparados as outras concentrações estudadas. Em contraste, o uso da solução a 10% associa-se à morte precoce, que pode ter sido decorrente de inotropismo negativo. A aplicação de um *bolus* intravenoso de SH

resulta em rápida e intensa elevação da concentração plasmática de sódio, produzindo, conseqüentemente, forte gradiente osmótico transmembrana⁴⁴.

O principal mecanismo de ação da SH é a mobilização instantânea de fluido endógeno para o espaço intravascular, entretanto, vários outros efeitos têm sido estudados⁴⁴. Dados de alguns estudos experimentais em animais falharam em confirmar uma estimulação cardíaca direta, provocada pela SH, sendo atribuído o efeito hemodinâmico a melhora das pressões de enchimento e pós-carga⁴⁷. Estudos em animais sugerem que sua rápida resposta cardiovascular também está associada à liberação de eicosanóides como prostaglandinas em detrimento a tromboxanos⁴⁸. Há provavelmente também ação do óxido nítrico nesse processo, com melhora do tônus vasomotor na microcirculação⁴⁹. De acordo com Wade *et al.*⁵⁰, há uma resposta neuroendócrina à ressuscitação com SH, com diminuição do cortisol, da aldosterona e do hormônio corticotrófico. Porém, este efeito é secundário à hemodiluição associada à expansão plasmática. Em contraste, eles observaram redução na concentração plasmática de norepinefrina, epinefrina, lisina, vasopressina e renina, causada por alteração da liberação hormonal.

O aumento quimiotáxico dos leucócitos circulantes e sua adesão ao endotélio de capilares e veias são reconhecidos como fatores essenciais nas lesões de isquemia/reperfusão⁵¹ e estados de choque^{52,53}, bem como na própria ME^{26,27}. O mecanismo molecular da adesão leucocitária às células endoteliais foi investigado por Thiel *et al.*⁵⁴ e Oreopoulos *et al.*⁵⁵, demonstrando que há melhora significativa do perfil inflamatório em resposta à hiperosmolaridade. Rizoli *et al.*⁵⁶, em estudo clínico controlado e randomizado, demonstraram que, em pacientes com choque hemorrágico, a administração de SH associada ao dextran exerce efeitos

imunomodulatórios profundos, promovendo um balanço anti-inflamatório adequado que favorece a recuperação orgânica após o choque hemorrágico.

Diversos estudos mostram uma melhora da microcirculação pancreática⁵⁷, mesentérica⁵⁸ e pulmonar⁵⁹ provocada pela utilização da SH em condições de choque. De acordo com Badiwala *et al.*⁶⁰, a utilização da SH 7,5% na preservação de órgãos revelou proteção contra o dano miocárdico, quando utilizada antes de períodos prolongados de isquemia e reperfusão. Utilizando um modelo porcino de transplante cardíaco ortotópico, esses autores estabeleceram que o tratamento com SH, imediatamente antes da coleta e preservação do coração para o transplante, diminuiu a injúria endotelial e melhora a recuperação ventricular após o transplante. Além desses efeitos, a SH também se mostra benéfica na redução da apoptose em modelos de choque hemorrágico^{61,62}. Em ratos submetidos a lesões térmicas, a SH mostra capacidade de aumentar as defesas do organismo e ao mesmo tempo reduzir a apoptose⁶³.

Resumidamente, a ME produz alterações hemodinâmicas e funcionais cardíacas, bem como alterações inflamatórias e microcirculatórias nos órgãos afetados, com indução da morte celular programada. Por outro lado, a SH é capaz de melhorar a condição hemodinâmica em diversas situações de choque, diminuindo a reação inflamatória tecidual, com melhora da microcirculação orgânica e redução da apoptose. Diante disso, a intenção desse estudo é investigar os efeitos da SH 7,5% em um modelo de ME em ratos, observando as consequências nas alterações da função cardíaca e do tecido miocárdico.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste estudo é investigar os efeitos da solução salina hipertônica sobre a função cardíaca e alterações do tecido miocárdico em modelo de morte encefálica em ratos.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliação do perfil hemodinâmico e da função ventricular esquerda;
- Avaliação das alterações inflamatórias do tecido miocárdico;
- Avaliação das alterações histopatológicas do coração.

3. Métodos

Foram utilizados ratos *Wistar* machos, pesando entre 250 e 350 g, fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cirurgia Cardiovascular e Fisiologia da Circulação e no Centro de Cirurgia Experimental do Instituto do Coração de São Paulo. Todos os animais foram mantidos em ambiente controlado para temperatura (23 ± 2 °C), umidade e exposição à luz, com ciclo claro\escuro de 12 h, e livre acesso à ração e água.

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, e os experimentos foram realizados em conformidade com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Esse estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (#2012/19841-2).

3.1 Protocolo experimental

Foram utilizados 24 animais, divididos em 4 grupos, monitorizados durante 6 h consecutivas, recebendo solução salina de manutenção na velocidade de 2 mL/h. Após a inserção dos cateteres, um tempo de 10 minutos de estabilização foi observado, em seguida, 5 min antes da indução da ME, os parâmetros basais começaram a ser adquiridos.

- Grupo falso operado (FO) – Os animais foram mantidos anestesiados, sem indução de ME.

- Grupo controle – Após indução da ME, os animais foram tratados com solução salina 0,9% (4 mL/kg), infundida em 5 min, logo após indução de ME;
- Grupo salina hipertônica 1 min (SH1) – Animais submetidos à ME e tratados 1 min após, com solução salina hipertônica 7,5% (4 mL/kg), infundida em 5 min;
- Grupo salina hipertônica 60 min (SH60) – Ratos submetidos à ME e tratados com solução salina hipertônica 7,5% (4 mL/kg), infundida de forma semelhante, 60 min após indução de ME.

A Figura 1 representa organograma esquemático na linha de tempo (min), onde estão demonstrados os momentos em que houve intervenção. O período inicial corresponde ao tempo de estabilização e início da aquisição dos dados. O tempo zero indica o instante em que foi induzida a ME, pela insuflação do dispositivo intracraniano; os demais momentos representam o momento em que o tratamento foi instituído ou no qual alguma coleta de material foi realizada para posterior análise.

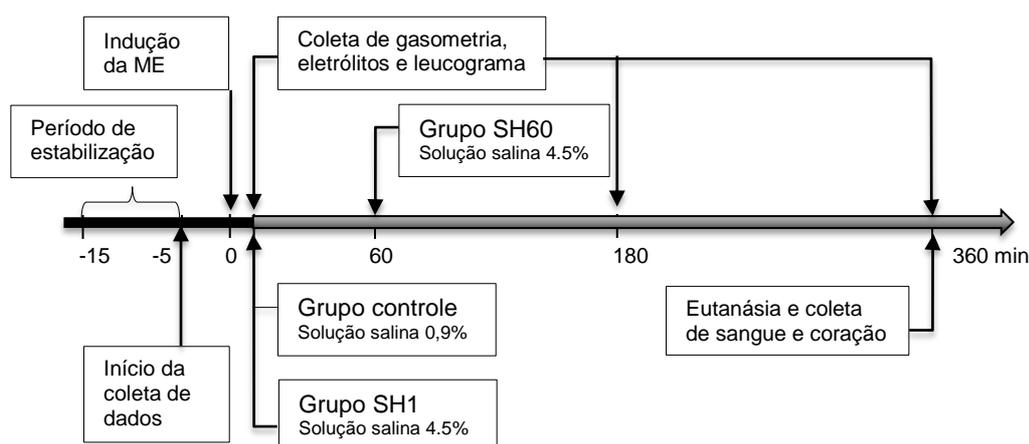


Figura 1- Organograma do protocolo experimental.

ME = morte encefálica; FO = falso operado; SH1 = grupo salina hipertônica 1 minuto; SH60 = grupo salina hipertônica 60 min.

3.2 Anestesia e preparo cirúrgico

A indução anestésica foi realizada em câmara fechada, com fluxo contínuo de uma mistura de oxigênio (100%) e isoflurano (5%), seguida por intubação orotraqueal com *jelco*® 16 G (BD Insyte, Juiz de Fora, MG, Brasil). Após a intubação, os animais foram mantidos em ventilação mecânica, utilizando-se ventilador para pequenos animais (Havard 683, Havard Apparatus Inc., Holliston, MA, USA), com volume corrente de 10 mL/kg, frequência respiratória de 70 ciclos/min e fração inspirada de oxigênio de 100%. A anestesia foi mantida com isoflurano 2% até a indução da ME. Após a indução anestésica, os animais foram submetidos à assepsia da região cervical antero-lateral, região mediana longitudinal do crânio e caudal proximal, seguida de tricotomia.

3.2.1 Implante de cateter em artéria caudal

Com o animal em decúbito dorsal, sobre placa aquecida (37 °C), a região proximal da cauda foi incisada, para dissecação e isolamento da artéria caudal. Sob visão direta, um cateter heparinizado de polietileno (Clay Adams PE-10, conectado a PE-50) foi implantado e fixado para monitorização contínua da pressão arterial média e da frequência de pulso. Esse cateter foi conectado a um transdutor de pressão (MPVS - Ultra Single Segment Foundation System for Rats da ADInstruments Inc., Colorado Springs, CO, USA) acoplado a sistema multicanal computadorizado de aquisição de dados biológicos (Labchart 8 da ADInstruments Inc., Colorado Springs, CO, USA).

3.2.2 Implante de cateter em veia jugular interna direita

Ainda com o animal em decúbito dorsal, a região anterior direita do pescoço foi incisada, para dissecação e isolamento da veia jugular interna, onde foi introduzido um cateter de polietileno (Clay Adams PE-10). Utilizou-se essa via para infusão de solução salina convencional de manutenção na velocidade de 2 mL/h e para administração dos tratamentos pré-estabelecidos, com auxílio de uma bomba de infusão contínua (Havard Apparatus Inc., Holliston, MA, USA).

3.2.3 Implante de dispositivo para indução de morte encefálica

Com o animal posicionado em decúbito ventral, realizou-se uma incisão longitudinal na calota craniana, para sua exposição parcial. Utilizando-se uma broca motorizada (Dentsclear – Indústria de Aparelhos Odontológicos, São Paulo, Brasil), procedeu-se à trepanação do crânio. Em seguida, um cateter balão inflável (Fogarty® 4 F - Edwards Lifescience LLC, Irvine, CA, USA), foi introduzido no espaço intracraniano e devidamente fixado, para que, no momento oportuno, fosse insuflado com 0,5 mL de solução salina, provocando, assim, a ME.

3.2.4 Implante de cateter de microcondutância

Utilizando-se a mesma incisão cervical, com o animal ainda em decúbito dorsal, realizou-se dissecação e isolamento da artéria carótida interna direita, por onde foi introduzido, retrogradamente, um cateter de microcondutância (SPR-838 - AD

Instruments Inc., Colorado Springs, CO, USA), até a ponta do ventrículo esquerdo. Esse cateter registra simultaneamente a variação de condutância no tecido e a pressão intracavitária no decorrer do tempo. A variação de condutância se relaciona diretamente com a variação de volume intracavitário em um dado momento, gerando uma curva pressão-volume contínua. A aquisição dos dados biológicos foi realizada por um sistema (MPVS - Ultra Single Segment Foundation System for Rats da AD Instruments Inc., Colorado Springs, CO, USA) que transmite, continuamente, informações para o “*software*” (Labchart 8 – AD Instruments Inc., Colorado Springs, CO, USA) instalado no computador. As informações da curva pressão-volume de cada experimento ficam armazenadas na memória do computador para posterior análise dos dados.

3.3 Leucograma, gasometria e eletrólitos

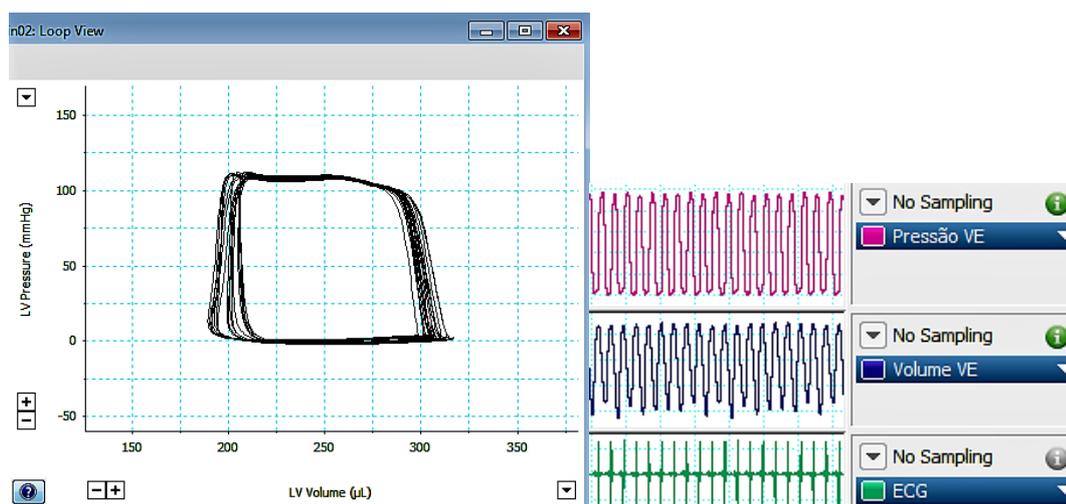
Amostras foram colhidas no início, meio e ao término de cada procedimento. A leucometria foi obtida por punção caudal de 20 μ L de sangue, analisado por aparelho automatizado (Mindray bc-2800Vet – bio Brasil). Amostras, em seringa heparinizada, também foram colhidas no cateter da artéria caudal, para análise de gasometria e eletrólitos em aparelho automatizado (Radiometer ABL 555 – Radiometer Medical, Copenhagen, Denmark).

3.4 Análise da pressão arterial média sistêmica e da frequência cardíaca

Os dados de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) foram obtidos pelo cateter implantado na artéria caudal e foram armazenados continuamente no decorrer do tempo no programa utilizado para aquisição de dados (Labchart 8 da ADInstruments Inc., Colorado Springs, CO, USA).

3.5 Análise das curvas pressão-volume

As curvas de pressão-volume (Figura 2) foram analisadas a partir dos dados gerados pelo cateter de microcondutância implantado no ventrículo esquerdo com a utilização de software (Labchart 8 da ADInstruments Inc., Colorado Springs, CO, USA).



FONTE: Tela impressa do programa Labchart 8 – ADInstruments Inc (Colorado Springs, CO – USA)

Figura 2 - Curva pressão-volume.

LV = "left ventricle"; VE = ventrículo esquerdo; ECG = eletrocardiograma

3.5.1 Parâmetros de função sistólica do ventrículo esquerdo:

- Pressão sistólica final (PSF) – representa a pressão atingida na cavidade ventricular esquerda imediatamente antes da abertura da válvula aórtica;
- Pressão diastólica final (PDF) – pressão na cavidade ventricular esquerda imediatamente antes do início da sístole;
- dP/dt máximo (dP/dt_{max}) – representa a velocidade máxima de elevação da pressão no ventrículo esquerdo, durante a sístole.
- Volume diastólico Final (VDF) – quantidade de sangue no ventrículo esquerdo ao final da diástole, imediatamente antes da sístole;
- Volume sistólico (VS) – representa a quantidade de sangue bombeado pelo coração a cada batimento e pode ser calculado pela diferença entre VDF e volume sistólico final (VSF), que indica a quantidade de sangue dentro do ventrículo ao final da sístole ($VS = VDF - VSF$);
- Fração de ejeção (FE) – que é a razão percentual entre o VS e o VDF ($FE = VS/VDF \%$) e representa a quantidade percentual de sangue ejetada pelo coração a cada batimento;
- Trabalho sistólico (TS) – que é o trabalho realizado pelo ventrículo para ejetar contra a resistência arterial periférica;
- Débito cardíaco (DC) – representa o volume de sangue bombeado por intervalo de tempo pelo coração, ou seja, é o produto da VS pela FC ($DC = VS \times FC$).

3.5.2 Parâmetros de função diastólica do ventrículo esquerdo:

- dP/dt mínimo (dP/dt_{\min}) – representa a velocidade máxima de queda da pressão no ventrículo esquerdo, durante a diástole.
- Tau – tempo de relaxamento isovolumétrico;

3.6 Eutanásia e descarte dos animais

Ao término do período experimental, os animais foram submetidos à exsanguinação por punção da aorta abdominal. O sangue e o coração foram colhidos para posterior análise. Após a devida acomodação, os animais foram identificados e encaminhados para descarte por uma empresa especializada.

3.7 Análise do tecido cardíaco

O coração foi excisado e seccionado ao longo de seu maior eixo em três partes iguais, para serem utilizadas na realização da histologia, imuno-histoquímica e dosagem de citocinas, respectivamente.

3.7.1 Estudo histológico

Amostras do tecido cardíaco de cada grupo experimental foram fixadas em formalina a 10% e incluídas em parafina. Cortes de 4 μ m de espessura foram corados com hematoxilina-eosina e colocados em lâminas para estudo histológico em

microscopia óptica. As análises foram realizadas por dois pesquisadores independentes, cegados, que utilizaram um escore progressivo de intensidade, variando de 1 a 4, para ausente, leve, moderado e intenso, respectivamente. O escore 1 representava ausência de edema ou infiltrado celular leucocitário; 2, infiltrado celular ou edema acometendo menos de 25% dos campos da amostra; 3, indicava acometimento entre 25% e 75%; e 4, quando havia edema e infiltrado em percentual acima de 75% da amostra.

3.7.2 Estudo imuno-histoquímico

A mesma metodologia inicial foi empregada para imunodeteção de moléculas de adesão leucocitária, moléculas de apoptose e de alfa-actina.

Amostras foram congeladas em nitrogênio líquido à temperatura de -80°C , para realização de cortes seriados com $8\ \mu\text{m}$ de espessura. Posteriormente, foram colocadas sobre lâminas de vidro, previamente revestidas com organo-silane (Sigma Chemical Co, St. Louis, Mo, EUA), e fixadas em acetona gelada por 10 min. Finalmente, as lâminas foram lavadas com solução tampão “tris” com “tween 20” (TBST) e permeabilizadas com TBST associado a “Triton X-100[®]”, seguido por bloqueio de sítios inespecíficos com tampão específico (Superblock[®], Thermo Scientific, Illinois, EUA) além de bloqueio da peroxidase endógena (solução de H_2O_2 2%). A partir dessa preparação inicial, a seguinte metodologia específica foi empregada para cada análise:

3.7.2.1 Expressão de moléculas de adesão leucocitária

Para a imunodeteccção das moléculas de adesão leucocitária ICAM-1 e VCAM-1, foram utilizados anticorpos primários anti-ICAM-1 de rato (CD54, Abcam, Cambridge, EUA) e anti-VCAM-1 de camundongo (Abcam Inc., Cambridge, MA, USA), diluídos na proporção de 1:50 e 1:100, respectivamente, em solução de TBST contendo 1% de soro albumina bovina. A incubação dos cortes foi realizada por 1 h, a temperatura de 37 °C. As lâminas, então, foram lavadas com TBST e incubadas com solução na concentração de 1:200 de anticorpo secundário anti-camundongo (ICAM-1) ou anti-coelho (VCAM-1), associados a enzima peroxidase de rábano (HRP) (Millipore, Billerica, MA, EUA) por 2 h a 37 °C. Após nova lavagem com TBST, as lâminas foram incubadas com solução de substrato 3-amino-9-etilcarbazol (AEC) por 5 a 10 min e contra coradas com hematoxilina. Para o controle negativo as amostras foram incubadas com tampão fosfato salina (PBS), sem a presença de anticorpos. As lâminas foram incubadas com solução de substrato 3-amino-9-etilcarbazol (AEC) por 5 a 10 min e contra coradas com hematoxilina. Para o controle negativo as amostras foram incubadas com tampão fosfato salina (PBS), sem a presença de anticorpos.

A análise foi realizada com auxílio de sistema de aquisição de imagens digital DS-Ri1 (Nikon, Tokyo, Japan), acoplada a um microscópio com aumento de 40 x (Nikon), utilizando-se o software NIS-Elements-BR (Nikon). Os valores foram obtidos como percentual de área marcada.

3.7.2.2 Expressão de moléculas de apoptose

Para imunodeteção de Bcl-2 e Caspase-3, foi utilizada a mesma metodologia empregada descrita anteriormente para as moléculas de adesão leucocitária, porém, os anticorpos empregados foram policlonais anti-Bcl-2 (Abcam Inc., Cambridge, MA, USA) e anti-caspase-3 (Abcam Inc. Cambridge, MA, USA), na diluição de 1:50 e de 1:100 respectivamente. O anticorpo secundário empregado foi anti-camundongo e anti-coelho, respectivamente, na diluição de 1:200, associados a enzima peroxidase de rábano (HRP) (Millipore, Billerica, MA, EUA) por 2 h a 37 °C. As lâminas foram incubadas com solução AEC por 5 a 10 min e contra coradas com hematoxilina. Para o controle negativo as amostras foram incubadas com PBS, sem a presença de anticorpos. A análise foi realizada da mesma forma, por percentual de área marcada.

3.7.2.3 Expressão de alfa-actina

Para a imunodeteção de alfa-actina, foi utilizada a mesma metodologia empregada anteriormente, porém o anticorpo empregado foi anti- α -actina (*Dako North America Inc.*), na diluição de 1:500, conforme especificação do fabricante. As lâminas foram incubadas com solução AEC por 5 a 10 min e contra coradas com hematoxilina. Para o controle negativo as amostras foram incubadas com PBS, sem a presença de anticorpos. A análise foi realizada da mesma forma, por percentual de área marcada.

3.7.3 Dosagem de fator de necrose tumoral alfa e citocinas no tecido cardíaco

O estudo do fator de necrose tumoral alfa e das citocinas foi realizado a partir de amostra de tecido cardíaco colhida ao final do experimento. O material foi macerado, ressuspendido em PBS e submetido à centrifugação (1118 g) por 15 min a 4 °C, sendo o sobrenadante separado em alíquotas de 500 µL e armazenados a - 80 °C.

A quantificação do fator de necrose tumoral alfa, interleucina-1β, interleucina-10 e da citocina quimiotática para neutrófilos (CINC-1), que é - análoga da interleucina-8, foi realizada pelo método enzima-imuno-ensaio (ELISA), utilizando-se o *kit Duo-set*[®] (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA). Os resultados foram expressos em pg/g, para as concentrações no tecido.

3.8 Dosagem de corticosterona e troponina-I

A partir de sangue colhido na aorta abdominal ao final do experimento, amostras de soro foram obtidas por centrifugação (1118 g) por 15 min, em temperatura ambiente. Alíquotas de 500 µL do sobrenadante foram armazenadas a - 80 °C.

As concentrações séricas de corticosterona e da troponina-I foram determinadas por ELISA, segundo instruções do fabricante (R&D Systems Inc).

3.9 Análise estatística

Trata-se de um estudo experimental em que os resultados obtidos foram analisados com emprego do “*software Graphpad Prism 6.0*” e expressos como média \pm erro padrão da média ou mediana com variação de mínimo ao máximo. Utilizou-se análise de variância de duplo fator (ANOVA) seguidos do pós-teste de Dunnet para comparação dos grupos FO e SH em relação ao controle ou, quando apropriado, teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn. Foi considerado significativo $p < 0,05$.

4. Resultados

Não houve mortalidade dos animais relatados, nem perda de dados durante o período experimental analisado.

4.1 Leucograma, gasometria e eletrólitos

Em todos os grupos, não foram observadas diferenças nos gases sanguíneos, na contagem celular e nos níveis de eletrólitos basais (resultados não mostrados). Em relação ao sódio plasmático, observamos elevação significativa desse parâmetro no grupo controle, quando comparado ao grupo FO, ao final do experimento. No grupo SH1, houve elevação significativa do sódio no tempo 180 min, em relação ao grupo controle, porém essa diferença não permaneceu ao final dos 360 min. No caso do grupo SH60, identificou-se elevação significativa, a partir do tempo 180 min, que permaneceu até o final do experimento, quando comparado ao grupo controle (Tabela 1).

Tabela 1- Dosagem sérica de sódio em ratos submetidos à morte encefálica e tratados com solução salina hipertônica.

Tempo (min)	FO	Controle	SH1	SH60
0	139 ± 01	141 ± 02	138 ± 01	142 ± 02
180	140 ± 01	145 ± 01	156 ± 01*	155 ± 01*
360	142 ± 01*	150 ± 01	146 ± 02	159 ± 02*

FO = Falso operado; SH1 = grupo salina hipertônica 1 minuto; SH60 = grupo salina hipertônica 60 min.
Dados expressos em média ± erro padrão da média.

*P <0.05 comparado ao grupo controle. #P <0.05 comparado ao grupo FO

4.2 Análise da pressão arterial média sistêmica e da frequência cardíaca

4.2.1 Pressão arterial média

Antes da indução da ME, não foi observada diferença significativa da PAM entre os grupos experimentais. Os animais submetidos à ME apresentaram inicialmente redução significativa da PAM após sua indução, porém, no grupo controle, após 180 min, a PAM recuperou-se, atingindo os mesmos níveis do grupo FO, com nova redução significativa observada ao final de 360 min. Os animais tratados com SH revelaram um comportamento diferente, quando comparados ao grupo controle: o grupo SH1 mostrou uma elevação significativa e sustentada da PAM entre 120 min e 240 min de experimentação, com posterior redução para níveis semelhantes ao grupo controle; enquanto o grupo SH60, mostrou elevação significativa da PAM a partir de 300 min até o final do experimento (Figura 3).

4.2.2 Frequência cardíaca

Antes da indução da ME, não foi observada diferença significativa da FC entre os grupos experimentais. No grupo FO, a FC permaneceu constante no decorrer do tempo, no entanto, observou-se um declínio progressivo nos animais submetidos à ME. No grupo SH60, detectou-se uma redução significativa adicional da FC, quando comparada aos animais do grupo controle, após 240 min de experimentação (Figura 4).

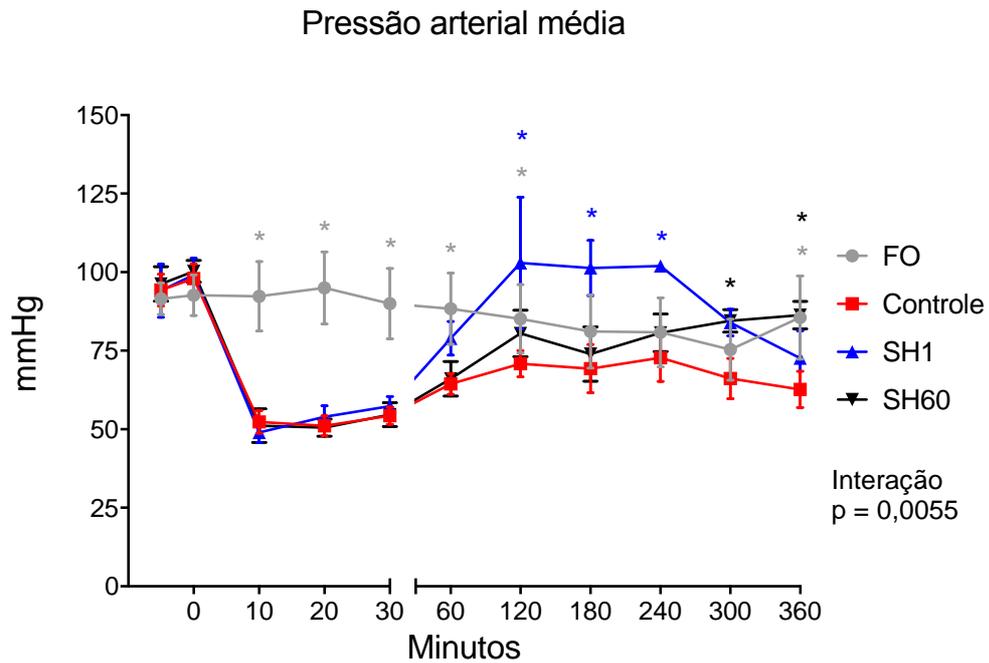


Figura 3 - Variação da pressão arterial média em ratos submetidos à morte encefálica e tratados com solução salina hipertônica.

FO = grupo falso operado; SH1 = grupo salina hipertônica 1 minuto; SH60 = grupo salina hipertônica 60 min. Dados expressos em média \pm erro padrão da média (em cada grupo, $n = 6$). * $P < 0.05$ comparado ao grupo controle.

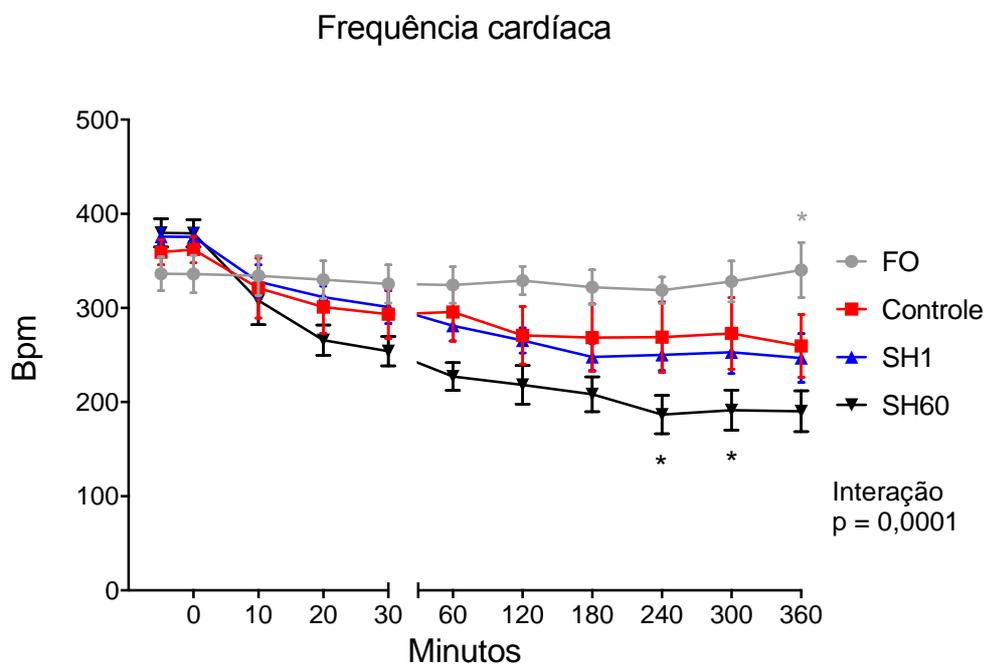


Figura 4 - Variação da frequência cardíaca em ratos submetidos à morte encefálica e tratados com solução salina hipertônica.

FO = grupo falso operado; SH1 = grupo salina hipertônica 1 minuto; SH60 = grupo salina hipertônica 60 min. Dados expressos em média \pm erro padrão da média (em cada grupo, $n = 6$). * $P < 0.05$ comparado ao grupo controle.

4.3 Análise da função ventricular esquerda

Antes da morte encefálica, não foram observadas diferenças significativas nos parâmetros de função sistólica e diastólica entre os grupos estudados.

4.3.1 Parâmetros de função sistólica do ventrículo esquerdo

4.3.1.1 Pressão sistólica final

Após a indução da ME, há uma redução significativa da PSF no grupo controle, quando comparado ao grupo FO, que permaneceu durante os 60 primeiros min de experimento. Embora o grupo HS1 não tenha exibido diferença significativa, quando comparado ao grupo controle, observou-se uma elevação significativa da PSF no grupo SH60, que se estabeleceu consistentemente após 300 min de experimentação (Figura 5).

4.3.1.2 Pressão diastólica final

Não houve diferença significativa da PDF nos grupos estudados em relação ao grupo controle (Figura 5).

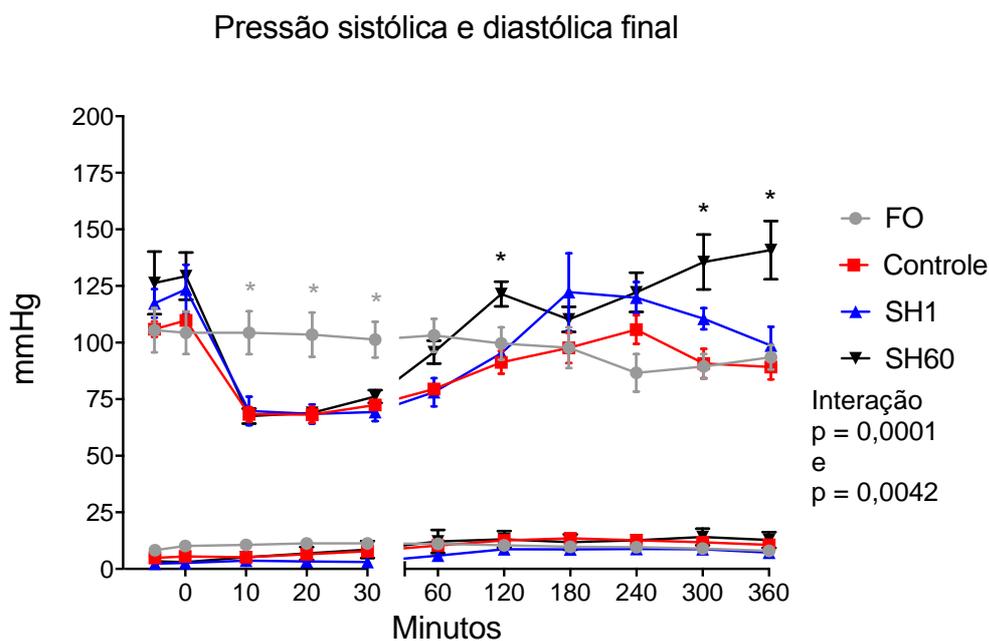


Figura 5 - Variação da pressão sistólica e diastólica final em ratos submetidos à morte encefálica e tratados com solução salina hipertônica.

FO = grupo falso operado; SH1 = grupo salina hipertônica 1 minuto; SH60 = grupo salina hipertônica 60 min. Dados expressos em média \pm erro padrão da média (em cada grupo, n = 6). *P < 0.05 comparado ao grupo controle.

4.3.1.3 dP/dt máximo

Observou-se redução significativa do dP/dt_{max} nos animais submetidos à ME que persistiu até 60 min após sua indução, a partir do que houve recuperação até atingir níveis semelhantes ao grupo FO. Após 300 min de experimentação, detectou-se nova diminuição significativa na dP/dt_{max} no grupo controle, enquanto os grupos SH1 e SH60 mantiveram níveis semelhantes ao grupo FO (Figura 6).

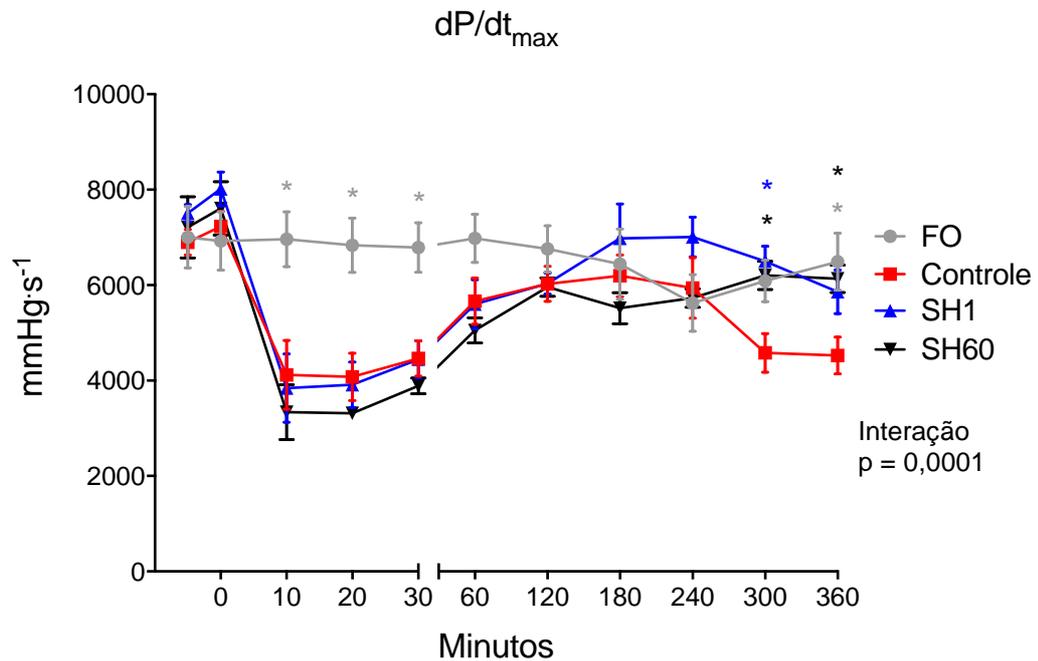


Figura 6 - Variação do dP/dt máximo em ratos submetidos à morte encefálica e tratados com solução salina hipertônica.

FO = grupo falso operado; SH1 = grupo salina hipertônica 1 minuto; SH60 = grupo salina hipertônica 60 min. Dados expressos em média \pm erro padrão da média (em cada grupo, n = 6). *P < 0.05 comparado ao grupo controle.

4.3.1.4 Volume diastólico final

Não se observou diferença significativa no VDF do ventrículo esquerdo entre o grupo controle e o grupo FO, durante todo o experimento. Entretanto, o grupo SH1 apresentou elevação significativa desse parâmetro, a partir de 10 min até o final do experimento, quando comparado ao grupo controle. O mesmo não aconteceu com o grupo SH60 que manteve níveis semelhantes ao grupo controle (Figura 7).

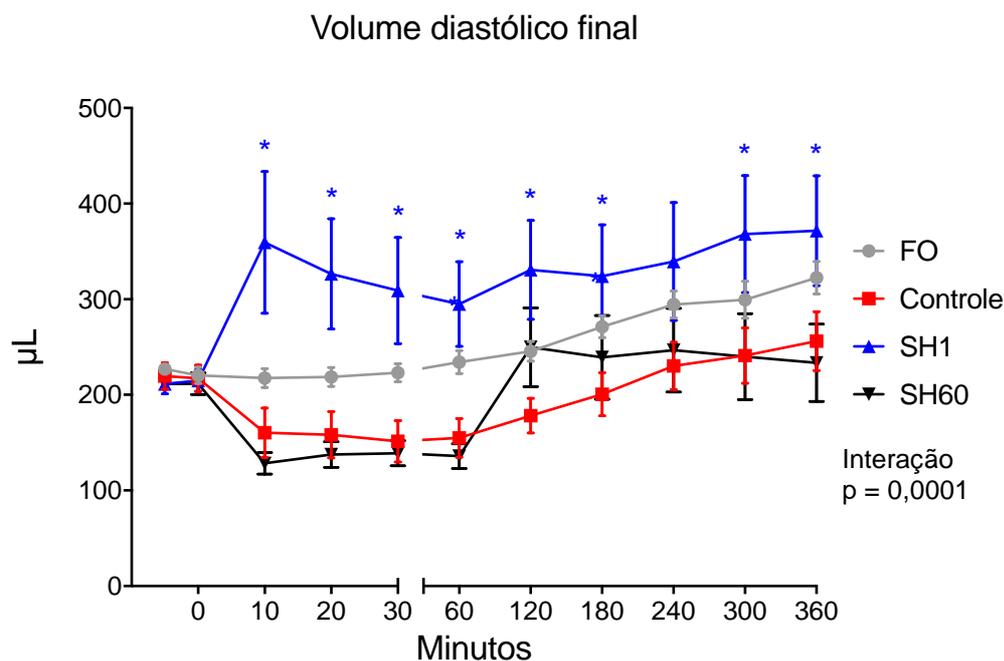


Figura 7 - Variação do volume diastólico final em ratos submetidos à morte encefálica e tratados com solução salina hipertônica.

FO = grupo falso operado; SH1 = grupo salina hipertônica 1 minuto; SH60 = grupo salina hipertônica 60 min. Dados expressos em média \pm erro padrão da média (em cada grupo, $n = 6$). * $P < 0.05$ comparado ao grupo controle.

4.3.1.5 Volume sistólico

Após a indução da ME, observou-se que os animais do grupo SH1 apresentaram curva de variação do VS semelhante ao grupo FO, demonstrando diferença significativa em relação ao grupo controle ao final do experimento. O grupo SH60, apesar de ter apresentado elevação desse parâmetro após a realização do tratamento, não atingiu diferença significativa em relação ao grupo controle (Figura 8).

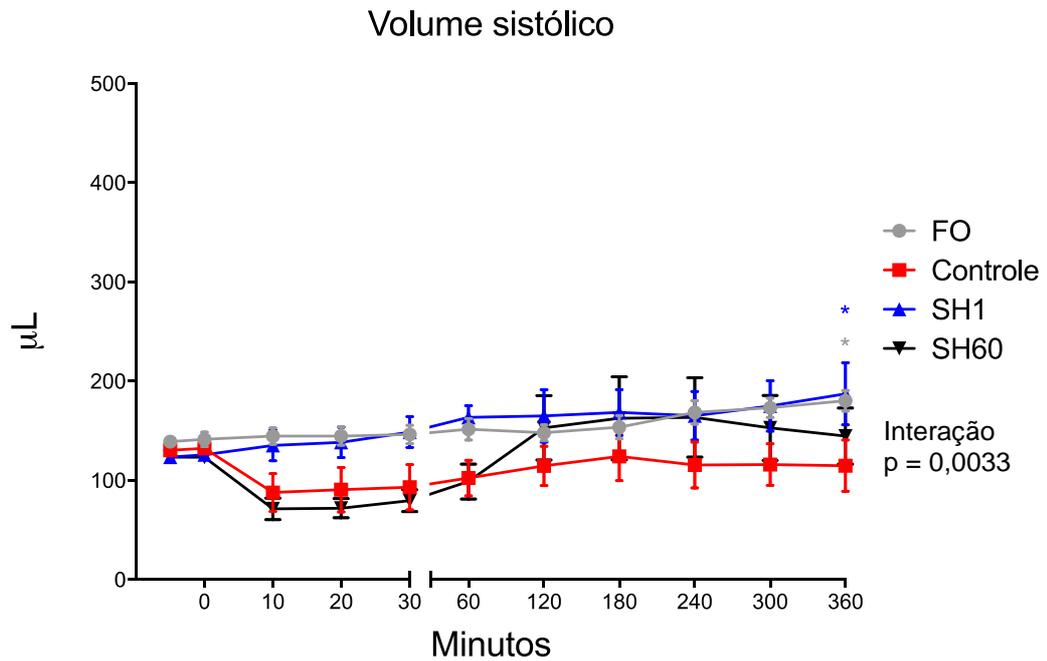


Figura 8 - Variação do volume sistólico em ratos submetidos à morte encefálica e tratados com solução salina hipertônica.

FO = grupo falso operado; SH1 = grupo salina hipertônica 1 minuto; SH60 = grupo salina hipertônica 60 min. Dados expressos em média \pm erro padrão da média (em cada grupo, $n = 6$). * $P < 0.05$ comparado ao grupo controle.

4.3.1.6 Fração de ejeção

Após a indução da ME, observa-se que não houve uma divergência significativa entre as curvas de FE. Uma elevação significativa desse parâmetro foi observada no grupo SH60, em relação ao grupo controle após 300 min de experimentação, que permaneceu até o final do experimento. Não se observou diferença significativa entre o grupo SH1 e o grupo controle (Figura 9).

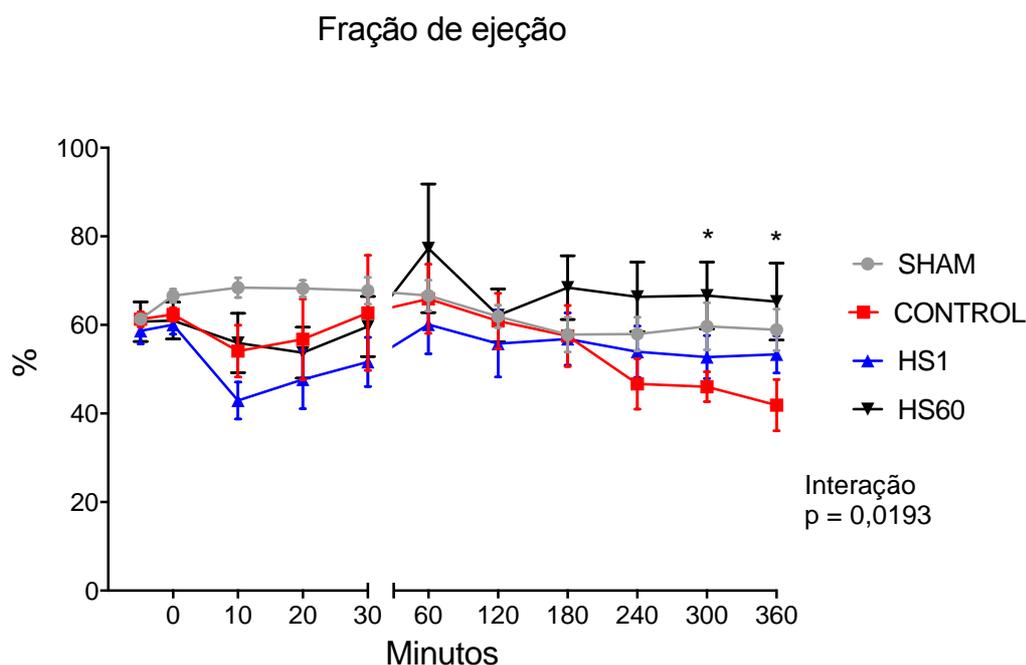


Figura 9 - Variação da fração de ejeção em ratos submetidos à morte encefálica e tratados com solução salina hipertônica.

FO = grupo falso operado; SH1 = grupo salina hipertônica 1 minuto; SH60 = grupo salina hipertônica 60 min. Dados expressos em média \pm erro padrão da média (em cada grupo, n = 6). *P < 0.05 comparado ao grupo controle.

4.3.1.7 Trabalho sistólico

Após a indução da ME, observa-se redução significativa do TS no grupo controle, quando comparado ao grupo FO, que se mantém por 60 min, havendo recuperação a partir desse tempo. O grupo SH1, apresentou comportamento semelhante ao grupo FO, observando-se diferença significativa em relação ao grupo controle a partir de 180 min, até quase o final do experimento. O grupo SH60 apresentou comportamento semelhante ao grupo controle até a administração do tratamento. A partir de 60 min, observou-se uma elevação desse parâmetro em relação ao grupo controle, apresentando diferença estatisticamente significante a partir de 240 min, até quase o final do experimento (Figura 10)

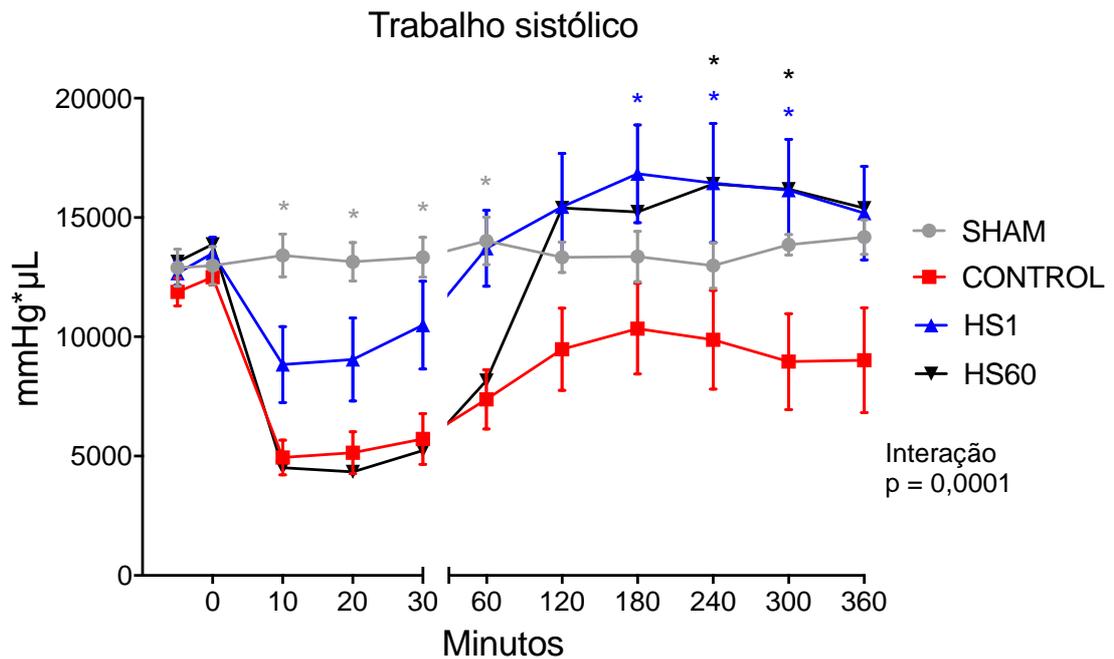


Figura 10 - Variação do trabalho sistólico em ratos submetidos à morte encefálica e tratados com solução salina hipertônica.

FO = grupo falso operado; SH1 = grupo salina hipertônica 1 minuto; SH60 = grupo salina hipertônica 60 min. Dados expressos em média \pm erro padrão da média (em cada grupo, $n = 6$). * $P < 0.05$ comparado ao grupo controle.

4.3.1.8 Débito Cardíaco

Observou-se, a partir da indução da ME, uma redução significativa do DC no grupo controle, em relação ao grupo FO, que persistiu até o final do experimento. O grupo SH1, tratado com solução hipertônica logo após a indução da ME, apresentou elevação significativa do DC, a partir de 10 min até 60 min, só voltando a divergir, significativamente, ao final do experimento. O grupo SH60 não apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle (Figura 11).

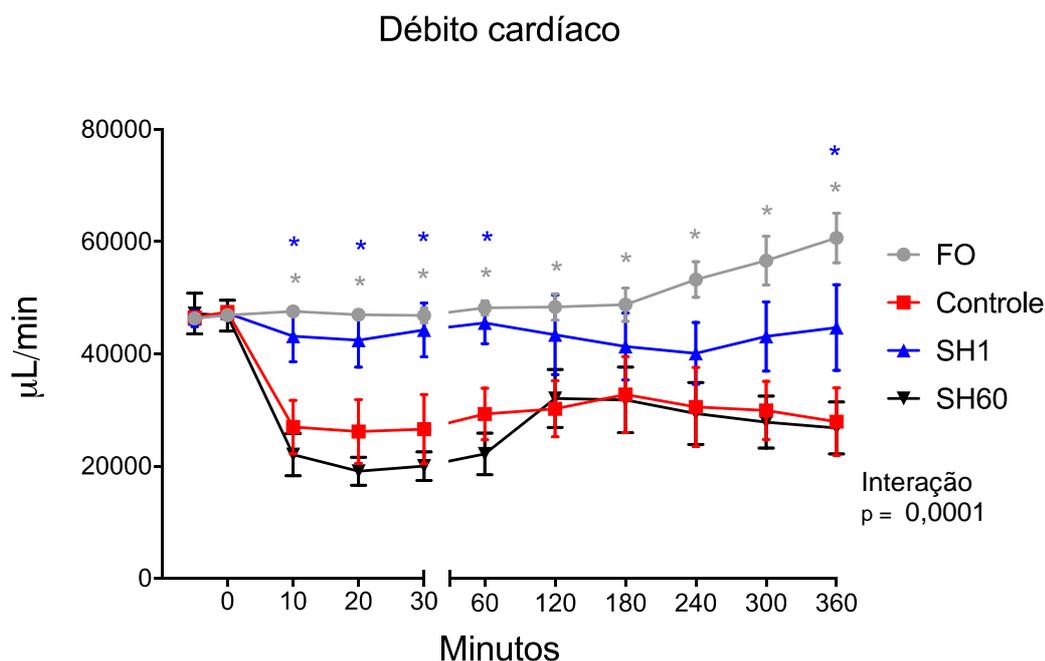


Figura 11 - Variação do débito cardíaco em ratos submetidos à morte encefálica e tratados com solução salina hipertônica.

FO = grupo falso operado; SH1 = grupo salina hipertônica 1 minuto; SH60 = grupo salina hipertônica 60 min. Dados expressos em média \pm erro padrão da média (em cada grupo, $n = 6$). * $P < 0.05$ comparado ao grupo controle.

4.3.2 Parâmetros de função diastólica do ventrículo esquerdo

Antes da indução da ME não se observa diferença significativa entre os grupos estudados.

4.3.2.1 dP/dt Mínimo

A partir da indução da ME, observa-se uma elevação significativa do dP/dt_{\min} nos grupos em que a ME foi induzida, quando comparados ao grupo FO. Há uma recuperação do grupo controle, a partir de 240 min, que não se sustentou até o final do experimento. Os grupos SH1 e SH60 apresentaram comportamentos semelhantes ao grupo controle (Figura 12).

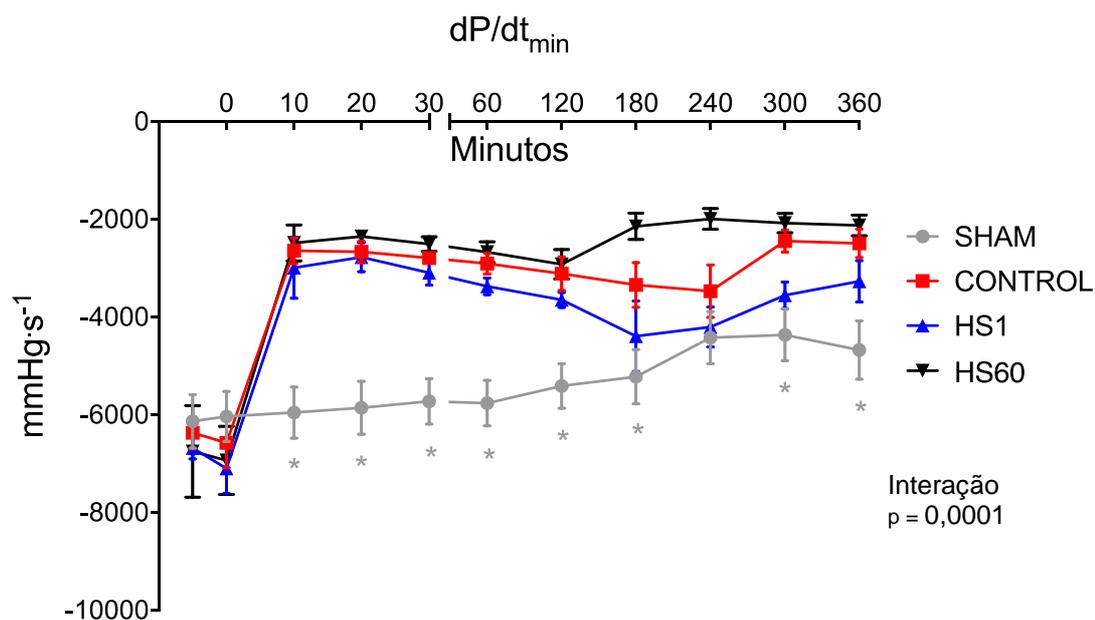


Figura 12 - Variação do dP/dt mínimo em ratos submetidos à morte encefálica e tratados com solução salina hipertônica.

FO = grupo falso operado; SH1 = grupo salina hipertônica 1 minuto; SH60 = grupo salina hipertônica 60 min. Dados expressos em média \pm erro padrão da média (em cada grupo, n = 6). *P < 0.05 comparado ao grupo controle.

4.3.2.2 Tau

No grupo controle, houve elevação significativa da Tau, em relação ao grupo FO, a partir do tempo 120 min até o final do experimento. O grupo SH1 apresentou comportamento semelhante ao grupo controle durante todo experimento. No grupo SH60, verificou-se elevação significativa desse parâmetro, em relação ao grupo controle, a partir do tempo 180 min até o final do experimento (Figura 13).

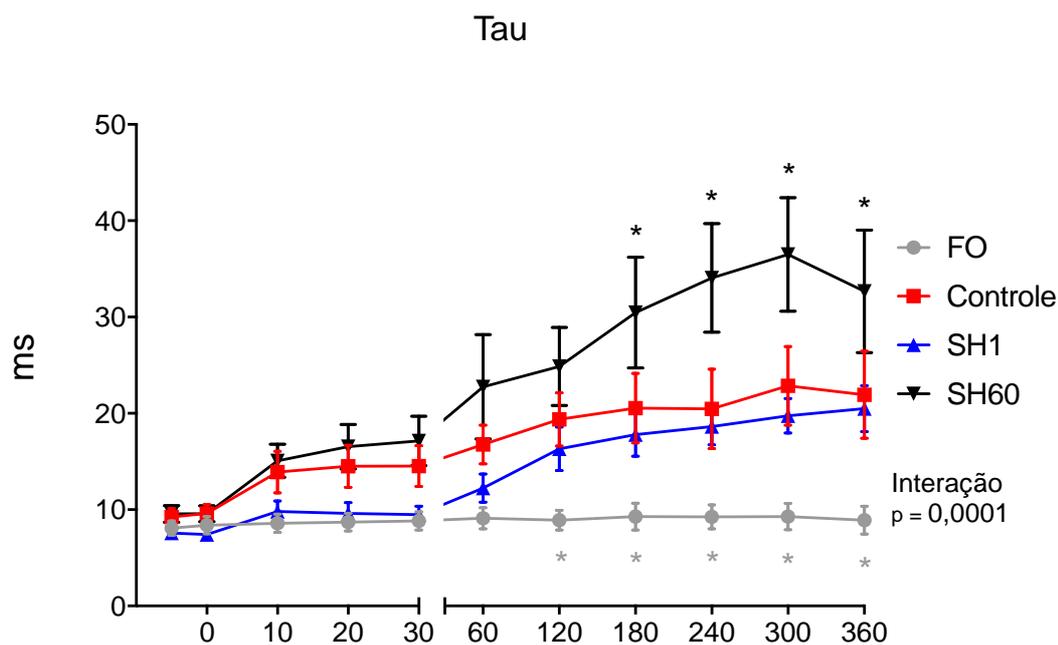


Figura 13 - Variação da Tau em ratos submetidos à morte encefálica e tratados com solução salina hipertônica.

FO = grupo falso operado; SH1 = grupo salina hipertônica 1 minuto; SH60 = grupo salina hipertônica 60 min. Dados expressos em média \pm erro padrão da média (em cada grupo, $n = 6$). * $P < 0.05$ comparado ao grupo controle.

4.4 Análise do tecido cardíaco

4.4.1 Histologia cardíaca

Em relação às alterações histológicas no tecido cardíaco, não se observou diferença significativa entre os grupos estudados no que se refere a infiltrado celular e edema, decorridos 360 min da indução de ME (Figura 14).

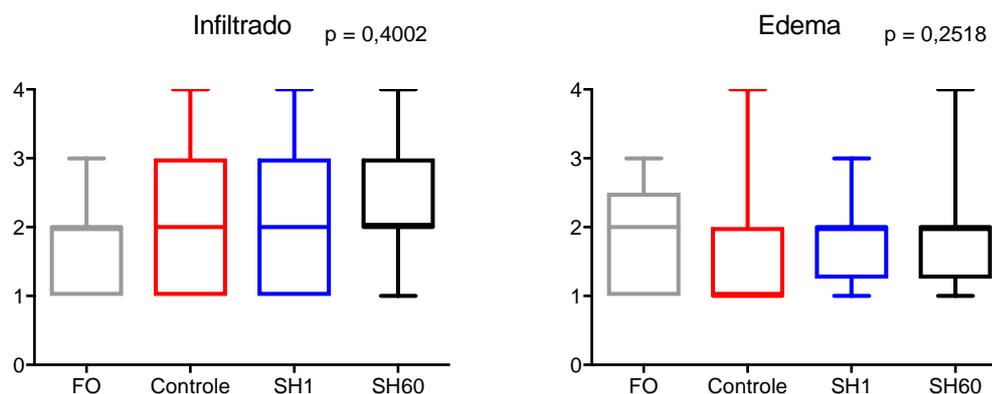


Figura 14 - Efeito do tratamento com solução salina hipertônica na histologia de ratos submetidos à morte encefálica.

FO = grupo falso operado; SH1 = grupo salina hipertônica 1 minuto; SH60 = grupo salina hipertônica 60 min. Dados expressos em mediana \pm mínimo/máximo. * $P < 0.05$ comparado ao grupo controle.

4.4.2 Estudo imuno-histoquímico

4.4.2.1 Expressão de moléculas de adesão leucocitária

A expressão tecidual miocárdica de moléculas de adesão leucocitária em animais submetidos à ME está representada na Figura 15. Não se observou diferença significativa na expressão de ICAM-1 entre os grupos estudados, quando comparados ao grupo controle. Em relação a VCAM-1, verificou-se uma redução significativa de sua expressão nos grupos tratados com SH, quando comparados ao grupo controle. Na Figura 16 observamos lâminas

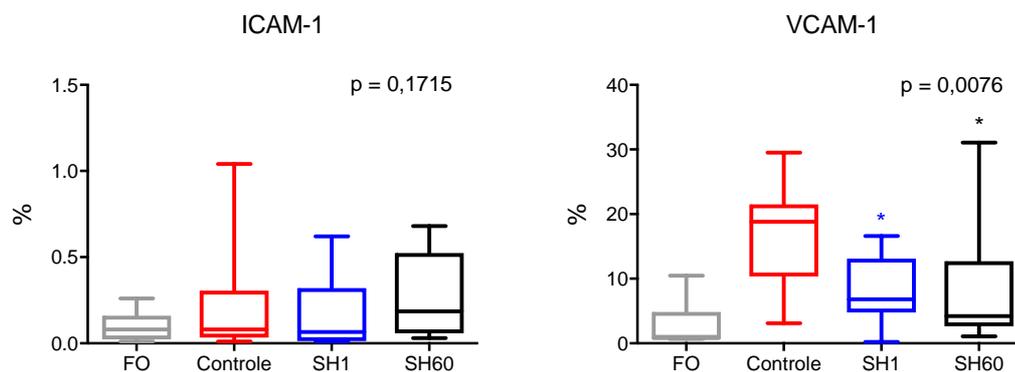


Figura 15 - Efeito do tratamento com solução salina hipertônica na expressão tecidual de moléculas de adesão leucocitária em ratos submetidos à morte encefálica.

FO = grupo falso operado; SH1 = grupo salina hipertônica 1 minuto; SH60 = grupo salina hipertônica 60 min. Dados expressos em mediana \pm mínimo/máximo. * $P < 0.05$ comparado ao grupo controle.

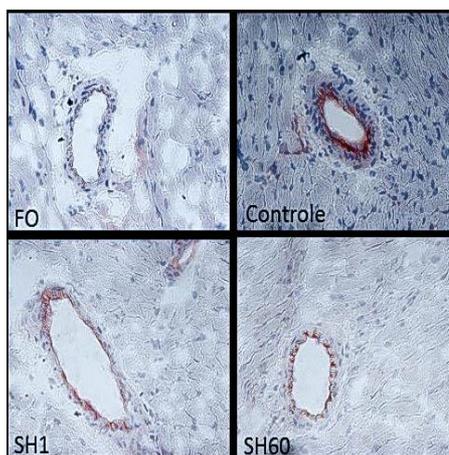


Figura 16 - VCAM-1 - Fotomicrografias do tecido miocárdico marcado por imunohistoquímica e corado com hematoxilina-eosina, mostrando o efeito do tratamento com solução salina hipertônica na expressão tecidual de VCAM-1 em ratos submetidos à morte encefálica.

FO = grupo falso operado; Controle = grupo controle; SH1 = grupo salina hipertônica 1 minuto; SH60 = grupo salina hipertônica 60 min.

4.4.2.2 Expressão de moléculas de apoptose

Observou-se aumento significativo da expressão tecidual de Bcl-2, nos grupos tratados com SH, quando comparados ao grupo controle (Figura 17 e Figura 18). Não houve marcação significativa de caspase-3 nos tecidos estudados em todos os grupos.

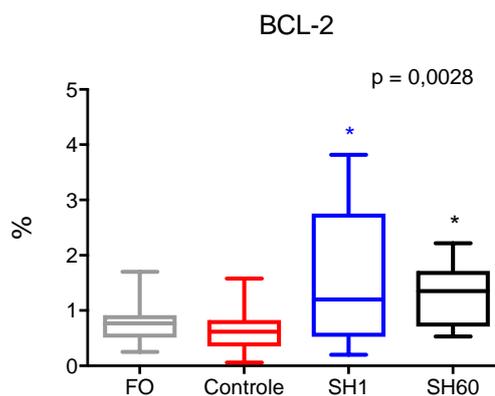


Figura 17 - Efeito do tratamento com solução salina hipertônica na expressão tecidual de BCL-2 em ratos submetidos à morte encefálica.

FO = grupo falso operado; SH1 = grupo salina hipertônica 1 minuto; SH60 = grupo salina hipertônica 60 min. Dados expressos em mediana \pm mínimo/máximo. * $P < 0.05$ comparado ao grupo controle.

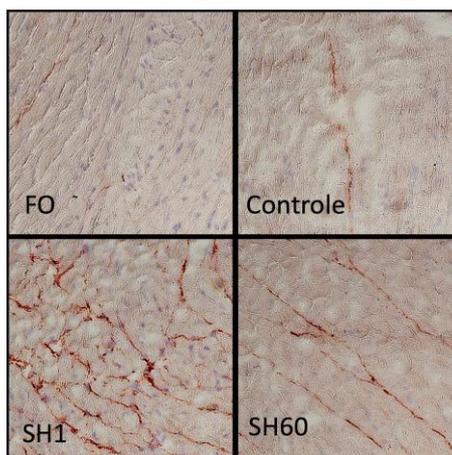


Figura 18 - BCL-2 - Fotomicrografias do tecido miocárdico marcado por imunohistoquímica e corado com hematoxilina-eosina, mostrando o efeito do tratamento com solução salina hipertônica na expressão tecidual de BCL-2 em ratos submetidos à morte encefálica.

FO = grupo falso operado; Controle = grupo controle; SH1 = grupo salina hipertônica 1 minuto; SH60 = grupo salina hipertônica 60 min.

4.4.2.3 Expressão de alfa-actina

Não foi observada diferença significativa entre os grupos estudados na expressão tecidual de alfa-actina ao final do experimento (Figura 19).

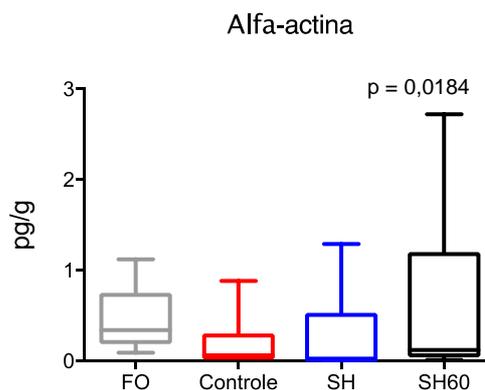


Figura 19 - Efeito do tratamento com solução salina hipertônica na expressão tecidual alfa-actina em ratos submetidos à morte encefálica.

FO = grupo falso operado; SH1 = grupo salina hipertônica 1 minuto; SH60 = grupo salina hipertônica 60 min. Dados expressos em mediana \pm mínimo/máximo. * $P < 0,05$ comparado ao grupo controle.

4.4.3 Dosagem de fator de necrose tumoral alfa e citocinas

Houve uma redução significativa na concentração tecidual do FNT- α , no grupo SH1, quando comparado ao grupo controle, porém o mesmo não aconteceu em relação ao grupo SH60 min. Em relação às citocinas: Cinc-1, IL-1 β e IL-10; não se observou diferença significativa entre os grupos estudados, após 360 min de experimentação (Figura 20 e Figura 21).

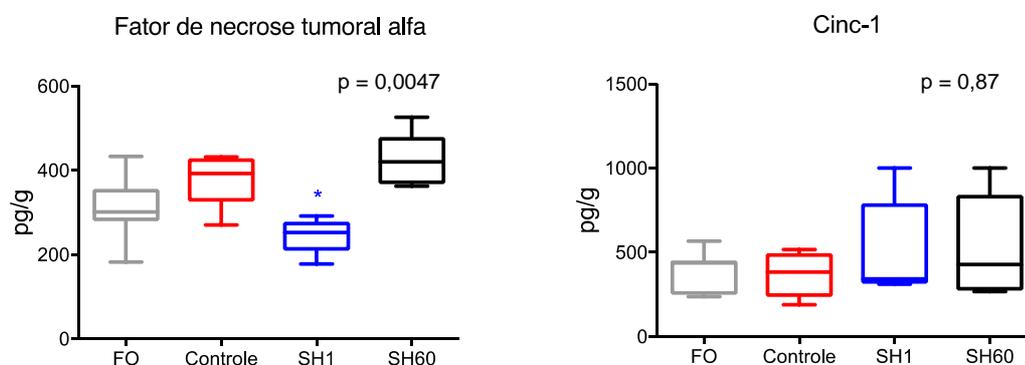


Figura 20 - Efeito do tratamento com solução salina hipertônica na concentração tecidual cardíaca de fator de necrose tumoral alfa e Cinc-1 em ratos submetidos à morte encefálica.

FO = grupo falso operado; SH1 = grupo salina hipertônica 1 minuto; SH60 = grupo salina hipertônica 60 min. Dados expressos em mediana \pm mínimo/máximo. * $P < 0,05$ comparado ao grupo controle.

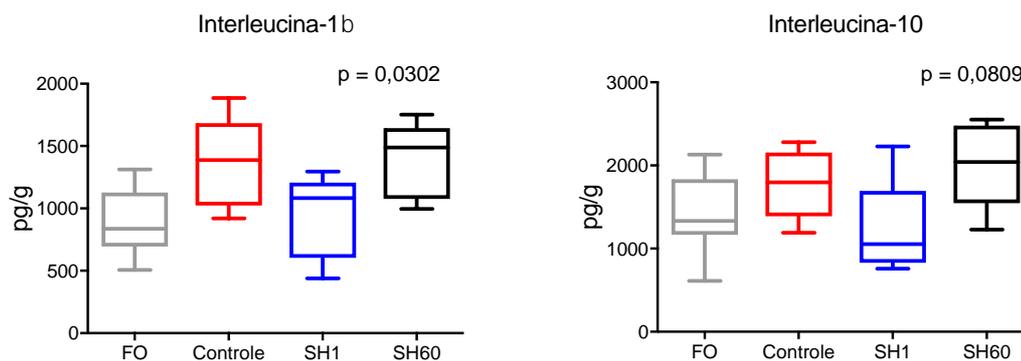


Figura 21- Efeito do tratamento com solução salina hipertônica na concentração tecidual cardíaca de interleucina-1 β e interleucina-10 em ratos submetidos à morte encefálica.

FO = grupo falso operado; SH1 = grupo salina hipertônica 1 minuto; SH60 = grupo salina hipertônica 60 min. Dados expressos em mediana \pm mínimo/máximo. *P < 0.05 comparado ao grupo controle.

4.5 Dosagem de corticosterona e troponina-I

Houve uma redução significativa na dosagem sérica de corticosterona no grupo controle, quando comparado ao grupo FO, após 360 min da indução da ME. O tratamento com SH não modificou essa redução em relação ao grupo controle. Em relação à Troponina-I, não houve diferença significativa em suas dosagens séricas, quando comparados os grupos estudados ao final de 360 min de experimento (Figura 22).

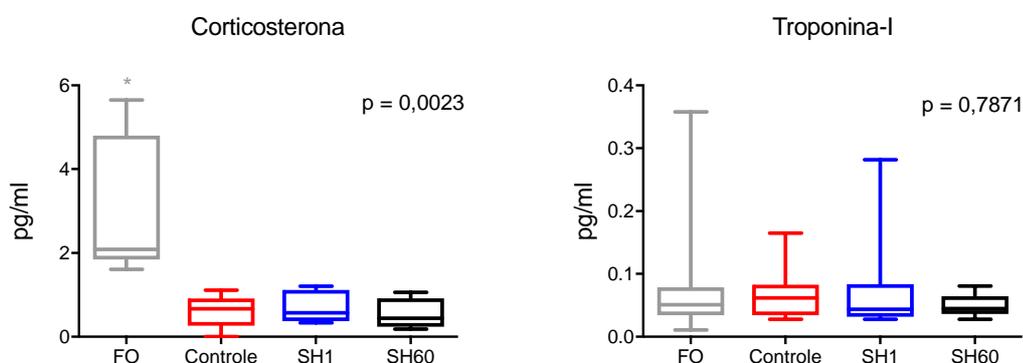


Figura 22 - Efeito do tratamento com solução salina hipertônica na dosagem sérica de corticosterona e troponina-I em ratos submetidos à morte encefálica.

FO = grupo falso operado; SH1 = grupo salina hipertônica 1 minuto; SH60 = grupo salina hipertônica 60 min. Dados expressos em mediana \pm mínimo/máximo. *P < 0.05 comparado ao grupo controle

5. Discussão

No presente estudo, observamos os efeitos hemodinâmicos e sobre a função ventricular esquerda do tratamento com SH após indução da ME. Constatamos que, tanto seu uso precoce, quanto tardio, impactaram positivamente na melhora desses parâmetros. Embora não se tenha observado diferenças histológicas significativas ou de marcadores de lesão tecidual entre os grupos tratados, a SH provocou aumento da expressão de moléculas anti-apoptóticas e diminuição de parâmetros inflamatórios, principalmente no grupo tratado precocemente.

A indução da ME é um fenômeno catastrófico que causa elevação súbita e intensa, porém efêmera, da pressão arterial média e da frequência cardíaca, provocada pela descarga de catecolaminas, correspondente ao reflexo de Cushing¹². Esses efeitos são seguidos por perda da regulação neural do tônus vascular periférico, provocando queda da resistência vascular sistêmica e hipovolemia relativa, que é agravada pelo *diabetes insipidus*¹⁵. Essa cadeia de eventos conduz o potencial doador ao colapso hemodinâmico¹⁵.

Na ME, como demonstrado anteriormente por Shiliang *et al.*¹⁷, há uma redução progressiva da pressão arterial média e da contratilidade miocárdica, representados pela diminuição da fração de ejeção, da elastância ventricular e do trabalho sistólico recrutável dependente de pré-carga, bem como da função diastólica, caracterizada pela piora do dP/dt_{min} e da Tau. Em nosso estudo, cujo modelo é semelhante ao adotado por aqueles autores, observamos um comportamento semelhante dos parâmetros funcionais do ventrículo esquerdo nos animais controle, quando comparados ao grupo falso operado. No entanto, em contraste com o que eles encontraram, verificamos uma recuperação transitória da pressão arterial média, cerca de 2 h após a indução da ME. Possivelmente, essa diferença está relacionada

aos diferentes protocolos anestésicos empregados, visto que, enquanto naquele trabalho foi utilizado o fenobarbital intraperitoneal, que tem efeitos mais prolongados na diminuição da resistência vascular periférica, nosso grupo administrou isoflurano inalatório, cujos efeitos desaparecem rapidamente após sua descontinuação no momento da indução da ME. Entretanto, nossos achados estão de acordo com os obtidos por Sebening *et al.*¹³, em cães, e podem ser explicados pelo padrão bifásico de liberação de catecolaminas encontrado por Chiari *et al.*⁶⁴ em seu estudo.

Baseados no entendimento da fisiopatologia da ME, foram propostos diversos estudos experimentais e clínicos, com a finalidade de identificar fatores que pudessem evitar a deterioração orgânica presente nessa condição. A administração de hormônio tireoidiano, por exemplo, mostra-se capaz de melhorar o estado metabólico e hemodinâmico⁶⁵⁻⁶⁸ de animais em ME, porém esse resultado não se traduz em melhora clínica de potenciais doadores em uma metanálise⁶⁹. Apesar dos corticoides não demonstrarem benefício em alguns estudos experimentais⁷⁰, estudos clínicos prospectivos, utilizando baixas doses de hidrocortisona⁷¹ ou metilpredinisona⁷², demonstram eficácia na melhora hemodinâmica pós-transplante, com repercussão positiva na sobrevida dos pacientes. A utilização de vasopressina, por sua vez, mostra-se benéfica, tanto em modelos experimentais^{73,74}, quanto clínicos⁷⁵, na melhora da condição hemodinâmica de potenciais doadores, entretanto não se traduz em melhora efetiva do resultado tardio pós-transplante. Apesar de ser de mais difícil implantação rotineira, a diálise peritoneal, mostra-se bastante benéfica na manutenção do potencial doador^{76,77}. Em estudo clínico prospectivo⁷⁷, com a utilização dessa técnica, há redução da necessidade de drogas vasoativas, bem como

reposição volêmica, acompanhada de melhora no fluxo tecidual orgânico, implicando maior disponibilidade de órgãos para o transplante. Em modelos animais⁷⁸⁻⁸⁰ e clínicos⁸¹, a utilização de betabloqueadores mostra-se benéfica na manutenção da função ventricular nas primeiras horas após a ME, como também na prevenção da lesão miocárdica provocada pela tempestade autonômica^{80,81}, entretanto, seu uso é de difícil aplicação clínica, devido à necessidade da administração antes do desenvolvimento da ME, evento normalmente imprevisível na prática clínica. O mecanismo envolvido é a dessensibilização de receptores beta-adrenérgicos^{82,83}, com diminuição da atividade da adenilato-ciclase⁸³ provocada pela tempestade autonômica e que pode ser abolida pela ação dos betabloqueadores⁸⁴. Outra medida utilizada na prática clínica, na tentativa de compensar a instabilidade hemodinâmica provocada pela ME, é a reposição volêmica com cristaloides^{85,86}, porém, mesmo quando guiada por monitorização hemodinâmica invasiva⁸⁷, não comprova benefício em estudo randomizado⁸⁸, deixando uma lacuna a ser preenchida no manejo volêmico adequado desses potenciais doadores.

Apesar de alguns estudos preliminares indicarem um pior resultado do transplante associado à hipernatremia nos potenciais doadores⁸⁹, estudos subsequentes⁹⁰, inclusive um multicêntrico, demonstram que os pacientes com melhor evolução pós-transplante são exatamente aqueles cujos doadores apresentam níveis séricos mais elevados de sódio⁹¹. A utilização da SH já está bastante estabelecida em modelos de choque hemorrágico, associada ou não ao uso de coloides^{44,92}, mostrando excelentes resultados na recuperação hemodinâmica e microcirculatória, com consequente melhora da perfusão orgânica e diminuição da inflamação⁵⁴⁻⁵⁶. Estudo comparativo entre SH e salina convencional mostra que aquela é capaz de

reestabelecer, rápida e eficazmente, a volemia e o transporte de oxigênio⁹³. Em modelos animais de choque hemorrágico, a SH apresenta a capacidade de provocar vasodilatação das arteríolas pré-capilares, melhorando a microcirculação^{44,54-56}. Esse efeito também é observado em modelos de fígado⁹⁴, pâncreas⁵⁷, intestinos⁵⁸ e pulmões⁵⁹. Os primeiros a utilizar a SH na ME foram Sztark *et al.*⁹⁵, demonstrando, em um estudo clínico, que seu uso na ME é capaz de melhorar o débito cardíaco e o transporte de oxigênio em potenciais doadores de órgãos. No presente estudo, assim como demonstrado por aqueles autores, a utilização de SH, logo após a indução da ME, resultou em melhora do volume diastólico final por aumento da pré-carga cardíaca e, conseqüentemente, do débito cardíaco e do volume sistólico, em relação ao grupo controle, comprovando o efeito benéfico do tratamento.

A ME provoca piora sensível da função diastólica¹⁷, traduzida pelo aumento da dpdt min e da tau, resultados que estão de acordo com os encontrados em nosso modelo. O tratamento com SH, por outro lado, causa melhora da função sistólica, em modelos de choque^{100,101}, porém o mesmo não acontece com a função diastólica¹⁰². Em nosso estudo, a SH também não causou melhora da função diastólica. No grupo tratado precocemente, os resultados foram semelhantes ao grupo controle, em relação aos parâmetros de função diastólica. Porém, no grupo tratado tardiamente, houve piora da função diastólica, traduzida pelo aumento da Tau, em relação ao grupo controle. Nesse grupo, observou-se uma redução significativa da frequência cardíaca, que pode ter provocado redução adicional da Tau. A bradicardia encontrada pode ser resultante do aumento excessivo da osmolaridade observada nesse grupo, quando comparado ao grupo que utilizou precocemente a SH ou ao controle. A acentuação da hipernatremia demonstrada pode ter sido causada pelo efeito adicional dos baixos

níveis de hormônio anti-diurético na fase mais tardia da ME, como foi caracterizado em outros modelos^{15,30}.

Além das manifestações hemodinâmicas clássicas, a ME também produz uma gama de efeitos neuro-humorais e inflamatórios que culminam com a lesão tecidual¹⁵. Novitzky *et al.*¹⁰³ demonstraram que a ME causa alterações importantes nas miofibrilas cardíacas observadas por histologia em babuínos, que foram atenuadas pela simpatectomia bilateral. De acordo com o trabalho de Silva *et al.*¹⁰⁴, a ME produz alterações discretas na histologia cardíaca em ratos, que não são modificadas pelo bloqueio epidural. Estudos demonstraram que a elevação da troponina-I sérica em potenciais doadores está relacionada ao pior prognóstico do transplante^{41,43}. Em nosso estudo, não foi identificada nenhuma alteração significativa no perfil histopatológico, quando comparados os diferentes grupos, nem, tampouco, identificada alteração na expressão de alpha-actina ou elevação plasmática de troponina-I em relação ao grupo controle. Apesar do tempo experimental relativamente longo, pode ter sido insuficiente, para que aparecessem alterações nesse modelo, visto que os animais do grupo controle apresentaram deterioração hemodinâmica progressiva na fase tardia após a ME. Essas diferentes respostas também podem estar relacionadas à própria espécie animal estudada.

Um dos mecanismos envolvidos na piora funcional e na deterioração dos enxertos para o transplante de maneira geral está interligado à morte celular causada por apoptose^{39,40}. Adrie *et al.*⁴⁰, demonstraram em pacientes com ME um aumento da expressão de proteínas pro-apoptóticas e elevação de citocinas inflamatórias. Belhaj *et al.*¹⁰⁵ verificaram que a metilprednisona reduz, mas não abole, a reação inflamatória e a apoptose produzida pela ME. Em nosso trabalho, não foi detectada

elevação da caspase-3 em nenhum dos grupos, ou seja, não apareceram evidências de aumento de apoptose, por outro lado, a SH, quando utilizada, aumentou a expressão tecidual de Bcl-2, sugerindo prevenção contra apoptose. Esses resultados estão de acordo com estudos realizados com SH em modelo de choque^{61,62,63}.

A ME está relacionada diretamente a alteração inflamatória, independente da resposta hemodinâmica, visto que o bloqueio epidural, que é capaz de inibir as manifestações cardíacas da tempestade autonômica, não interfere na resposta inflamatória¹⁰⁴. A ME cursa com aumento de citocinas inflamatórias e aumento do fator de necrose tumoral alfa, assim como demonstrado previamente em vários estudos^{33,34}. A inflamação está diretamente relacionada à deterioração orgânica na ME^{34,35,106}, como demonstram estudos experimentais com administração de inibidores de interleucinas, cujo efeito mostra-se favorável na manutenção de órgãos em potenciais doadores¹⁰⁷. Por outro lado, a SH demonstra capacidade imunomoduladora e anti-inflamatória comprovada por vários estudos^{52,53,56}. Um trabalho clínico, randomizado e prospectivo realizado por Rizoli *et al.*⁵⁶, em pacientes com choque hemorrágico, demonstrou que o uso da SH em dose única de 250 mL é superior à solução salina convencional na diminuição da resposta dos neutrófilos ao choque, melhorando as citocinas anti-inflamatórias e reduzindo as citocinas pró-inflamatórias, incluindo o fator de necrose tumoral alfa. Segundo Chen *et al.*¹⁰⁸, um dos mecanismos envolvidos no efeito anti-inflamatório da SH envolve os canais de panexina-1 dos PMN, além de outras ectonucleotidases que produzem adenosina que bloqueia os PMN por estimulação de seus receptores A2a. Pascual *et al.*¹⁰⁹ e outros autores¹¹⁰ demonstraram que a SH é capaz de reduzir a expressão de moléculas de adesão leucocitária em modelos de choque. Nesse trabalho,

especificamente, a SH foi capaz de diminuir a expressão de moléculas de adesão leucocitária como VCAM-1 e, quando utilizada precocemente, reduzir os níveis de fator de necrose tumoral alfa, demonstrando efeito imunomodulador positivo no coração.

A ME é uma condição sistêmica multifatorial que está relacionada ao dano orgânico precoce, que é agravado pelo manejo inadequado do potencial doador. Até o presente momento, os estudos ainda não deixaram claro qual a melhor estratégia na conduta da instabilidade hemodinâmica causada pela ME. Como demonstrado nesse estudo, a utilização da SH, que é um método fácil e barato, foi capaz de melhorar a hemodinâmica geral e funcional cardíaca, diminuindo a deterioração tardia da ME, bem como teve a capacidade de diminuir a atividade inflamatória e a apoptose. O conjunto desses efeitos pode ser vantajoso na manutenção de potenciais doadores de órgãos, abrindo uma nova perspectiva de utilização da SH nesse cenário.

6. Conclusão

O tratamento com SH provocou melhora da função sistólica em ratos submetidos à ME, mesmo quando empregado após transcorridos 60 min de sua indução. Em relação à função diastólica, porém, o mesmo não aconteceu. Houve piora dos parâmetros diastólicos nos animais tratados tardiamente, quando comparados ao grupo controle. Em relação ao perfil hemodinâmico, à SH não provocou alterações sustentáveis na PAM ou na FC nesse modelo, no decorrer do tempo.

Os resultados encontrados nesse trabalho mostraram que a SH provoca melhora do padrão inflamatório de animais submetidos à ME, com redução significativa da expressão de moléculas de adesão leucocitária, fator de necrose tumoral alfa e aumento de proteínas anti-apoptóticas.

No que concerne às alterações estruturais, não se observaram diferenças significativas provocadas pelo tratamento com SH nos animais submetidos à ME, quando comparados ao tratamento com salina convencional.

7. Anexos

Tabelas de variação dos parâmetros com média e erro padrão da média de seis animais em cada grupo.

PAM	FO		Controle		SH1		SH60	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
-5	91,54	4,99	94,30	5,10	94,06	8,45	96,26	5,49
0	92,70	6,52	97,94	4,65	99,14	5,28	100,28	3,42
5	93,45	9,52	57,48	7,80	46,84	3,08	57,11	7,62
10	92,34	11,08	52,35	3,62	48,97	3,18	51,15	5,37
20	95,00	11,46	51,05	3,19	53,96	3,53	50,47	2,79
30	90,00	11,18	54,32	2,73	57,35	3,14	54,64	3,82
60	88,38	11,30	64,45	3,31	78,97	5,37	66,07	5,49
120	85,16	10,91	70,88	4,20	102,92	20,92	80,51	7,39
180	81,10	11,73	69,31	7,65	101,33	8,81	73,93	8,65
240	80,85	10,99	72,77	7,56	101,93	1,88	80,74	5,99
300	75,36	9,74	66,15	6,44	83,91	4,25	84,48	3,65
360	85,55	13,21	62,70	5,81	72,57	8,80	86,35	4,38

FC	FO		Controle		SH1		SH60	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
-5	336,38	17,97	359,30	13,31	375,88	8,42	379,67	15,11
0	336,20	20,01	361,97	14,03	375,45	9,04	379,34	14,42
5	335,95	21,38	346,23	29,97	350,77	19,13	342,03	24,08
10	334,15	21,00	321,13	31,88	327,85	17,98	308,08	25,64
20	330,02	20,14	301,02	27,84	311,50	11,86	265,70	16,29
30	325,65	20,30	293,42	25,99	301,12	17,55	253,99	15,70
60	324,33	19,58	295,65	31,00	281,25	16,19	227,27	14,84
120	329,18	15,06	270,87	30,74	265,45	13,37	218,26	20,68
180	322,08	18,57	268,52	35,87	247,98	14,50	208,33	18,48
240	318,92	14,15	269,15	37,45	250,17	16,62	186,69	20,48
300	328,13	21,83	272,92	38,11	252,97	22,67	191,41	21,31
360	340,20	29,26	259,73	33,40	246,88	26,05	190,25	21,74

PSF	FO		Controle		SH1		SH60	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
-5	105,42	9,80	105,95	3,41	117,36	6,31	126,32	13,84
0	104,35	9,41	109,74	3,99	123,52	10,81	129,38	10,46
5	104,07	9,57	73,20	3,69	85,05	8,75	80,99	5,97
10	104,32	9,47	68,27	3,25	69,79	6,32	67,56	3,28
20	103,47	9,77	68,19	3,53	68,44	4,28	68,90	2,45
30	101,34	7,89	72,38	1,78	69,34	4,09	76,23	2,91

60	103,21	7,24	79,48	2,59	78,08	6,21	95,78	5,08
120	99,61	7,12	91,21	4,98	95,27	5,83	121,46	5,43
180	97,70	9,06	97,69	6,74	122,30	17,10	110,31	5,57
240	86,60	8,34	105,73	6,31	119,82	6,91	122,26	8,71
300	89,43	5,54	90,79	6,49	110,55	4,72	135,58	12,10
360	93,50	5,34	89,20	5,51	98,70	8,34	140,80	12,98

PDF	FO		Controle		SH1		SH60	
Tempo	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
-5	8,23	2,24	4,82	1,11	2,34	0,54	3,33	0,90
0	10,08	2,38	5,50	0,92	2,63	0,62	2,98	0,68
5	10,19	2,44	4,57	0,96	5,51	1,54	4,98	1,49
10	10,59	2,43	5,09	1,13	3,63	0,96	5,14	1,73
20	11,21	2,35	6,43	1,44	3,20	1,10	6,82	2,83
30	11,22	2,20	7,73	1,61	3,07	0,63	8,51	3,74
60	11,09	2,13	10,35	1,09	5,86	1,21	12,08	5,06
120	10,37	1,69	12,56	1,58	8,71	2,42	13,01	3,69
180	9,78	1,59	13,49	1,78	8,65	2,70	11,83	3,45
240	9,59	1,80	12,63	1,50	8,81	2,54	12,70	2,76
300	9,03	1,63	11,76	1,38	8,69	2,05	14,12	3,71
360	7,94	1,71	10,57	1,14	7,24	1,97	12,73	3,53

dP/dt _{max}	FO		Controle		SH1		SH60	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
-5	7004,00	643,16	6895,00	270,61	7506,33	179,94	7212,17	638,45
0	6924,17	612,27	7229,67	316,52	8017,83	354,57	7609,33	561,59
5	6893,50	571,96	5042,83	774,52	5788,17	1198,87	4529,17	788,14
10	6963,00	574,94	4122,00	721,29	3841,33	717,23	3340,50	574,51
20	6835,50	567,45	4075,67	497,34	3912,83	476,03	3313,17	126,44
30	6786,50	520,79	4461,50	372,35	4446,17	393,45	3891,17	164,56
60	6979,83	507,17	5664,50	485,23	5603,00	514,87	5053,50	266,37
120	6762,33	488,35	6027,33	367,58	6035,17	221,95	5961,33	194,12
180	6440,00	738,78	6195,17	436,89	6979,17	721,26	5517,33	324,55
240	5623,67	593,30	5942,83	634,66	7007,67	413,74	5729,67	191,69
300	6087,17	432,85	4581,83	406,32	6499,83	315,48	6206,00	297,01
360	6493,50	599,61	4524,83	385,91	5861,17	457,55	6134,67	287,80

vdf	FO		Controle		SH1		SH60	
Tempo	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
-5	226,85	6,34	219,72	13,98	211,50	10,34	211,35	6,68
0	220,25	8,63	217,30	13,89	215,03	11,40	211,75	11,39
5	216,15	10,28	167,87	22,26	406,27	109,65	122,85	13,76
10	217,63	10,06	160,36	25,86	359,38	74,18	128,39	11,39
20	218,67	9,82	158,18	24,39	326,45	57,60	137,55	13,41
30	223,23	9,47	151,47	21,79	308,95	55,58	138,95	13,28

60	234,35	12,12	154,88	20,31	295,02	44,35	135,97	13,12
120	245,63	10,37	178,33	18,21	330,62	51,96	249,87	41,18
180	271,25	11,34	200,55	22,72	324,10	53,58	239,22	43,89
240	294,38	14,09	230,28	24,72	339,50	61,79	246,73	43,76
300	299,50	19,39	241,12	28,94	368,20	61,16	239,84	44,92
360	322,58	17,07	256,23	30,97	371,63	57,49	233,49	40,56

VS	FO		Controle		SH1		SH60	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
-5	139,28	6,66	130,43	5,68	123,55	5,27	123,69	6,52
0	141,52	7,23	132,27	5,49	126,05	1,78	123,52	5,39
5	141,60	8,06	96,74	12,58	147,33	12,06	80,81	13,25
10	144,90	8,39	87,91	19,06	135,33	15,67	71,36	10,81
20	144,85	9,11	90,71	22,42	138,54	15,27	72,04	9,67
30	146,42	9,29	93,36	22,85	148,72	15,60	79,69	11,05
60	151,63	10,87	102,38	17,87	163,67	11,90	98,98	17,66
120	148,08	8,12	114,65	19,92	164,97	26,34	153,06	32,55
180	153,67	11,75	124,29	24,63	168,67	23,14	162,63	42,04
240	168,48	11,78	115,70	23,08	165,30	24,40	163,61	40,02
300	173,20	9,84	116,02	20,97	175,28	25,55	153,04	32,76
360	180,30	10,31	114,83	25,99	187,48	31,36	144,75	28,19

FE	FO		Controle		SH1		SH60	
	Tempo	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média
-5	61,35	1,26	61,30	1,68	58,64	2,96	60,76	4,48
0	66,58	1,48	62,39	1,57	60,02	2,15	60,99	4,15
5	67,67	2,30	60,41	5,84	41,77	5,93	66,63	8,85
10	68,44	2,26	54,11	5,88	42,95	4,17	55,93	6,68
20	68,21	1,87	56,79	9,11	47,72	6,61	53,75	5,77
30	67,73	3,04	62,75	13,01	51,65	5,58	59,63	6,80
60	66,63	3,50	65,88	7,81	60,08	6,63	77,29	14,55
120	61,95	2,55	60,87	6,25	55,77	7,56	62,16	5,96
180	57,83	3,95	57,53	6,91	56,83	5,93	68,45	7,21
240	57,94	3,78	46,70	5,73	53,93	5,82	66,34	7,86
300	59,70	5,33	46,05	3,36	52,78	4,86	66,65	7,56
360	58,91	4,65	41,90	5,82	53,33	4,22	65,24	8,70

TS	FO		Controle		SH1		SH60	
	Tempo	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média
-5	12900,00	776,32	11883,33	585,05	12666,67	510,34	13143,00	1657,83
0	12983,33	802,25	12500,00	324,55	13500,00	677,25	13881,83	1419,48
5	12933,33	734,24	6209,33	699,53	10511,33	1340,33	6224,17	1540,71
10	13416,67	894,21	4949,00	729,01	8843,17	1587,43	4516,83	1005,27
20	13150,00	808,19	5144,00	878,16	9051,00	1743,71	4337,83	655,10
30	13333,33	833,33	5722,50	1060,53	10488,50	1845,62	5230,17	854,30

60	14016,67	996,47	7385,50	1250,98	13713,33	1588,79	8170,00	1720,18
120	13333,33	639,62	9477,50	1716,66	15450,00	2242,88	15402,67	3776,84
180	13366,67	1054,09	10342,67	1897,87	16833,33	2052,10	15237,50	4258,56
240	12983,33	956,88	9880,33	2074,39	16450,00	2494,36	16411,00	4491,69
300	13866,67	434,10	8960,67	2007,86	16150,00	2129,44	16184,17	4646,22
360	14183,33	727,74	9016,83	2198,71	15185,67	1964,55	15394,00	3516,54

DC	FO		Controle		SH1		SH60	
Tempo	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
-5	46300,00	685,57	46516,67	672,52	46300,00	1419,62	47197,17	3628,89
0	46883,33	575,28	47516,67	510,83	47266,67	708,36	46832,00	2755,93
5	46733,33	713,05	33083,33	4317,67	50400,00	3822,30	28316,00	5412,04
10	47566,67	576,00	27000,00	4748,33	43200,00	4536,96	22053,17	3763,96
20	46983,33	1152,22	26216,67	5656,53	42500,00	4820,79	19074,67	2506,83
30	46850,00	1310,15	26633,33	6180,81	44300,00	4818,64	20001,67	2563,28
60	48183,33	1251,24	29350,00	4599,40	45566,67	3708,88	22185,17	3733,11
120	48383,33	2339,72	30266,67	5021,86	43450,00	7109,75	32072,67	5189,96
180	48800,00	2994,88	32789,50	6763,42	41350,00	5964,38	31806,67	5836,82
240	53250,00	3196,95	30575,83	7059,87	40166,67	5522,72	29403,33	5536,08
300	56633,33	4354,90	29983,33	5173,36	43166,67	6208,95	27831,33	4649,05
360	60650,00	4430,26	27950,00	6017,35	44750,00	7660,41	26804,17	4650,36

dp/dt _{min}	FO		Controle		SH1		SH60	
Tempo	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
-5	-6136,67	546,02	-6376,33	333,56	-6683,67	228,18	-6753,00	940,65
0	-6041,83	514,23	-6582,50	510,49	-7102,00	513,59	-6938,00	698,04
5	-5905,67	505,49	-3286,83	376,50	-4373,50	1088,48	-3691,80	488,34
10	-5962,33	525,33	-2649,00	264,70	-2995,00	624,23	-2487,40	367,55
20	-5862,67	544,69	-2669,83	217,44	-2776,50	298,44	-2354,40	128,20
30	-5731,17	467,55	-2795,33	135,49	-3101,00	254,91	-2512,00	152,75
60	-5765,83	466,66	-2908,50	218,17	-3376,17	167,92	-2673,80	214,75
120	-5415,33	458,80	-3116,83	343,62	-3652,83	155,20	-2925,00	302,11
180	-5225,17	555,41	-3346,33	459,42	-4397,83	717,91	-2146,80	271,84
240	-4426,17	530,65	-3474,17	537,13	-4208,00	411,92	-1997,00	211,76
300	-4368,17	532,23	-2447,17	228,02	-3558,00	277,15	-2080,60	198,58
360	-4682,33	600,09	-2497,00	292,74	-3275,00	425,47	-2129,40	210,10

Tau	FO		Controle		SH1		SH60	
Tempo	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
-5	8,08	0,75	9,24	0,90	7,56	0,30	9,55	0,87
0	8,40	0,90	9,60	0,95	7,41	0,34	9,59	0,83
5	8,54	0,94	10,90	1,51	8,68	0,84	12,14	1,01
10	8,59	0,96	13,91	2,18	9,80	1,11	15,07	1,71
20	8,71	0,92	14,49	2,21	9,61	1,14	16,53	2,32
30	8,84	0,96	14,53	2,12	9,49	0,88	17,13	2,56

60	9,12	1,09	16,76	2,02	12,23	1,47	22,76	5,43
120	8,92	1,03	19,38	2,77	16,32	2,27	24,86	4,05
180	9,29	1,40	20,55	3,62	17,78	2,25	30,45	5,75
240	9,26	1,24	20,45	4,13	18,62	1,88	34,05	5,66
300	9,28	1,36	22,86	4,09	19,75	1,78	36,49	5,89
360	8,91	1,44	21,93	4,53	20,50	2,40	32,66	6,36

8. Referências Bibliográficas

1. Krumholz HM, Merrill AR, Schone EM, Schreiner GC, Chen J, Bradley EH, et al. Patterns of hospital performance in acute myocardial infarction and heart failure 30-day mortality and readmission. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes*. 2009;2(5):407-13.
2. Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JG, Coats AJ, et al; Authors/Task Force Members; Document Reviewers. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC). Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur J Heart Fail*. 2016 May 20.
3. Kirklin JK, Cantor R, Mohacsi P, Gummert J, De By T, Hannan MM, et al. First Annual IMACS Report: A global International Society for Heart and Lung Transplantation Registry for Mechanical Circulatory Support. *J Heart Lung Transplant*. 2016;35(4):407-12.
4. Stehlik J, Edwards LB, Kucheryavaya AY, Benden C, Christie JD, Dipchand AI, et al; International Society of Heart and Lung Transplantation. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: 29th official adult heart transplant report--2012. *J Heart Lung Transplant*. 2012;31(10):1052-64.
5. Toyoda Y, Guy TS, Kashem A. Present status and future perspectives of heart transplantation. *Circ J*. 2013;77(5):1097-110.
6. De Georgia MA. History of brain death as death: 1968 to the present. *J Crit Care*. 2014;29(4):673-8.

7. Snodgrass SR. The evolution of brain death. *Pediatr Neurol.* 2014. ;51(4):478-80.
8. Hoffenberg R. Christiaan Barnard: his first transplants and their impact on concepts of death. *BMJ.* 2001 Dec 22-29;323(7327):1478-80. Erratum in: *BMJ* 2002;324(7335):465.
9. Landmark article Aug 5, 1968: A definition of irreversible coma. Report of the Ad Hoc Committee of the Harvard Medical School to examine the definition of brain death. *JAMA.* 1984;252(5):677-9.
10. Bates D, Caronna JJ, Cartlidge NE, Knill-Jones RP, Levy DE, Shaw DA, et al. A prospective study of nontraumatic coma: methods and results in 310 patients. *Ann Neurol.* 1977;2(3):211-20.
11. Fodstad H, Kelly PJ, Buchfelder M. History of the cushing reflex. *Neurosurgery.* 2006;59(5):1132-7;
12. Novitzky D, Wicomb WN, Cooper DKC, Rose AG, Fraser RC, Barnard CN. Electrocardiographic, haemodynamic, and endocrine changes occurring during experimental brain death in the Chacma baboon. *Heart Transplant.* 1984; 4:63-9.
13. Sebening C, Hagl C, Szabo G, Tochtermann U, Strobel G, Schnabel P, et al. Cardiocirculatory effects of acutely increased intracranial pressure and subsequent brain death. *Eur J Cardiothorac Surg* 1995;9: 360–72
14. Wilhelm MJ, Pratschke J, Laskowski IA, Paz DM, Tilney NL. Brain death and its impact on the donor heart-lessons from animal models. *J Heart Lung Transplant.* 2000;19(5):414-8.

15. Weymann A, Schmack B, Szabó G. Pathophysiological Consequences of Brain Death. *Transplantationsmedizin*. 2011; 23: 140-145.
16. Pacher P, Nagayama T, Mukhopadhyay P, Bátkai S, Kass DA. Measurement of cardiac function using pressure-volume conductance catheter technique in mice and rats. *Nat Protoc*. 2008;3(9):1422-34.
17. Li S, Korkmaz S, Loganathan S, Radovits T, Hegedűs P, Karck M, Szabó G. Short-and long-term effects of brain death on post-transplant graft function in a rodent model. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2015;20(3):379-86.
18. Herijgers P, Flameng W. The effect of brain death on cardiovascular function in rats. Part II. The cause of the in vivo haemodynamic changes. *Cardiovasc Res*. 1998;38(1):107-15.
19. Galinanes M, Hearse DJ. Brain death-induced impairment of cardiac contractile performance can be reversed by explantation and may not preclude the use of the hearts for transplantation. *Circ Res* 1992;71:1213.
20. Szabó G, Hackert T, Sebening C, Melnitschuk S, Vahl CF, Hagl S. Role of neural and humoral factors in hyperdynamic reaction and cardiac dysfunction following brain death. *J Heart Lung Transplant* 2000;19:683–93.
21. Herijgers P, Nishimura Y, Flameng W. Endothelial activation through brain death? *J Heart Lung Transplant*. 2004;23(9 Suppl):S234-9.
22. Okamoto S, Corso CO, Leiderer R, Rascher W, Yamamoto Y, Yamaoka Y, Messmer K. Role of hypotension in brain-death associated impairment of liver microcirculation and viability. *Transpl Int*. 2000;13(6):428-35.

23. Okamoto S, Corso CO, Kondo T, Leiderer R, Rascher W, Yamamoto Y, et al. Changes in hepatic microcirculation and histomorphology in brain-dead organ donors: an experimental study in rats. *Eur J Surg.* 1999 ;165(8):759-66.
24. Obermaier R, von Dobschuetz E, Keck T, Hopp HH, Drognitz O, Schareck W, et al. Brain death impairs pancreatic microcirculation. *Am J Transplant.* 2004;4(2):210-5.
25. Mehrabi A, Golling M, Körting M, Hashemi B, Ahmadi R, Kashfi A, et al. Different impact of normo and hypotensive brain death on renal macro-and-microperfusion an experimental evaluation in a porcine model. *Nephrol Dial Transplant.* 2004;19(10):2456-63.
26. 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.
27. Simas R, Sannomiya P, Cruz JW, Correia Cde J, 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..
28. Novitzky D, Cooper DK, Wicomb WN. Endocrine changes and metabolic responses. *Transplant Proc.* 1988;20(5 Suppl 7):33-8.
29. Chen EP, Bittner HB, Kendall SW, Van Trigt P. Hormonal and hemodynamic changes in a validated animal model of brain death. *Crit Care Med.* 1996 ;24(8):1352-9.

30. Lopau K, Mark J, Schramm L, Heidbreder E, Wanner C. Hormonal changes in brain death and immune activation in the donor. *Transpl Int.* 2000;13 Suppl 1:S282-5.
31. Barklin A. Systemic inflammation in the brain-dead organ donor. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2009;53(4):425-35.
32. Pratschke J, Wilhelm MJ, Kusaka M, Hancock WW, Tilney NL. Activation of proinflammatory genes in somatic organs as a consequence of brain death. *Transplant Proc.* 1999;31(1-2):1003-5.
33. Birks EJ, Burton PB, Owen V, Mullen AJ, Hunt D, Banner NR, et al. Elevated tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in myocardium and serum of malfunctioning donor hearts. *Circulation* 2000; 102 (19 Suppl.3): III352-8.
34. 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.
35. Jassem W, Koo DD, Cerundolo L, Rela M, Heaton ND, Fuggle SV. Leukocyte infiltration and inflammatory antigen expression in cadaveric and living-donor livers before transplant. *Transplantation.* 2003;75(12):2001-7.
36. Zivna H, Zivny P, Navratil P, Palicka V, Cerny V, Holeckova M, et al. The role of cytokines and antioxidant status in graft quality prediction. *Transplant Proc.* 1999;31(5):2094.
37. Okamoto S, Yamamoto Y, Yamaoka Y, Messmer K. Liver transplants from brain-dead donors: microcirculation and histomorphology. *Transplant Proc.* 2000;32(2):327.

38. Novitzky D, Horak A, Cooper DK, Rose AG. Electrocardiographic and histopathologic changes developing during experimental brain death in the baboon. *Transplant Proc.* 1989;21(1 Pt 3):2567-9.
39. Pérez López S, Vázquez Moreno N, Escudero Augusto D, Astudillo González A, Alvarez Menéndez F, Goyache Goñi F, et al. A molecular approach to apoptosis in the human heart during brain death. *Transplantation.* 2008 ;86(7):977-82.
40. Adrie C, Monchi M, Fulgencio JP, Cottias P, Haouache H, Alvarez-Gonzalez A, et al. Immune status and apoptosis activation during brain death. *Shock.* 2010;33(4):353-62.
41. Boccheciampe N, Perrier JF, Lalot JM, Voltz C, Strub P, Treuvey L, et al. Sequential measurements of troponin Ic values in brain-dead patients considered as potential heart donors. *Int J Cardiol.* 2007;117(1):136-7.
42. Potapov EV, Wagner FD, Loebe M, Ivanitskaia EA, Müller C, Sodian R, et al. Elevated donor cardiac troponin T and procalcitonin indicate two independent mechanisms of early graft failure after heart transplantation. *Int J Cardiol.* 2003;92(2-3):163-7.
43. Potapov EV, Ivanitskaia EA, Loebe M, Möckel M, Müller C, Sodian R, et al. Value of cardiac troponin I and T for selection of heart donors and as predictors of early graft failure. *Transplantation.* 2001;71(10):1394-400.
44. Kreimeier U, Prueckner S. Small-volume resuscitation from hemorrhagic shock by hypertonic saline dextran -- conceptual basis and historical background. *Eur Surg Res.* 2002;34(1-2):138-44.

45. Pascual JL, Khwaja KA, Chaudhury P, Christou NV. Hypertonic saline and the microcirculation. *J Trauma*. 2003;54(5 Suppl):S133-40.
46. Traverso LW, Bellamy RF, Hollenbach SJ, Witcher LD: Hypertonic sodium chloride solutions: Effect on hemodynamics and survival after hemorrhage in swine. *J Trauma* 1987;27: 32–39.
47. Welte M, Goresch T, Frey L, Holzer K, Zwissler B, Messmer K: Hypertonic saline dextran does not increase cardiac contractile function during small volume resuscitation from hemorrhagic shock in anesthetized pigs. *Anesth Analg* 1995;80:1099–1107.
48. Rabinovici R, Yue TL, Krausz MM, Sellers TS, Lynch KM, Feuerstein G: Hemodynamic, hematologic and eicosanoid mediated mechanisms in 7.5 percent sodium chloride treatment of uncontrolled hemorrhagic shock. *Surg Gynecol Obstet* 1992;175:341–354.
49. Buga GM, Gold ME, Fukuto JM, Ignarro LJ: Shear stress-induced release of nitric oxide from endothelial cells grown on beads. *Hypertension* 1991;17:187–193.
50. Wade CE, Hannon JP, Bossone CA, Hunt MM, Loveday JA, Coppes RI, Gildengorin VL: Neuroendocrine responses to hypertonic saline/dextran resuscitation following hemorrhage. *Circ Shock* 1991;35:37–43.
51. Granger DN, Benoit JN, Suzuki M, Grisham MB: Leukocyte adherence to venular endothelium during ischemia-reperfusion. *Am J Physiol* 1989; 20:G683–G688.

52. Motaharinia J, Etezadi F, Moghaddas A, Mojtahedzadeh M. Immunomodulatory effect of hypertonic saline in hemorrhagic shock. *Daru*. 2015;23:47.
53. Wang YL, Lam KK, Cheng PY, Kung CW, Chen SY, Chao CC, et al. The cardioprotective effect of hypertonic saline is associated with inhibitory effect on macrophage migration inhibitory factor in sepsis. *Biomed Res Int*. 2013;2013:201614.
54. Thiel M, Buessecker F, Eberhardt K, Chouker A, Setzer F, Kreimeier U, et al: Effects of hypertonic saline on expression of human polymorphonuclear leukocyte adhesion molecules. *J Leukoc Biol* 2001;70:261–273.
55. Oreopoulos GD, Hamilton J, Rizoli SB, Fan J, Lu Z, Li YH, et al. In vivo and in vitro modulation of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 expression by hypertonicity. *Shock*. 2000;14(3):409-14.
56. Rizoli SB, Rhind SG, Shek PN, Inaba K, Filips D, Tien H, et al. The immunomodulatory effects of hypertonic saline resuscitation in patient sustaining traumatic hemorrhagic shock: a randomized, controlled, double-blinded trial. *Ann Surg*. 2006;243(1):47-57.
57. Mann O, Kaifi J, Bloechle C, Schneider CG, Yekebas E, Kluth D, et al. Therapeutic small-volume resuscitation preserves pancreatic microcirculation in acute experimental pancreatitis of graded severity in rats. *Pancreatology*. 2009;9(5):652-61.
58. Zakaria el R, Tsakadze NL, Garrison RN. Hypertonic saline resuscitation improves intestinal microcirculation in a rat model of hemorrhagic shock. *Surgery*. 2006;140(4):579-87.

59. Nerlich M, Gunther R, Demling RH. Resuscitation from hemorrhagic shock with hypertonic saline or lactated Ringer's (effect on the pulmonary and systemic microcirculations). *Circ Shock*. 1983;10(2):179-88.
60. Badiwala MV, Ramzy D, Tumiati 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.
61. Shires GT, Browder LK, Steljes TP, Williams SJ, Browder TD, Barber AE. The effect of shock resuscitation fluids on apoptosis. *Am J Surg*. 2005 ;189(1):85-91.
62. Murao Y, Hata M, Ohnishi K, Okuchi K, Nakajima Y, Hiasa Y, et al. Hypertonic saline resuscitation reduces apoptosis and tissue damage of the small intestine in a mouse model of hemorrhagic shock. *Shock*. 2003 ;20(1):23-8.
63. Chen LW, Su MT, Chen PH, Liu WC, Hsu CM. Hypertonic saline enhances host defense and reduces apoptosis in burn mice by increasing toll-like receptors. *Shock*. 2011;35(1):59-66.
64. Chiari P, Hadour G, Michel P, Piriou V, Rodriguez C, Budat C, et al. Biphasic response after brain death induction: prominent part of catecholamines release in this phenomenon. *J Heart Lung Transplant*. 2000 ;19(7):675-82.
65. Hing AJ, Hicks M, Garlick SR, Gao L, Kesteven SH, Faddy SC, et al. The effects of hormone resuscitation on cardiac function and hemodynamics in a porcine brain-dead organ donor model. *Am J Transplant*. 2007;7(4):809-17.

66. Cooper DK, Novitzky D, Wicomb WN. Hormonal therapy in the brain-dead experimental animal. *Transplant Proc.* 1988;20(5 Suppl 7):51-4.
67. Votapka TV, Canvasser DA, Pennington DG, Koga M, Swartz MT. Effect of triiodothyronine on graft function in a model of heart transplantation. *Ann Thorac Surg.* 1996;62(1):78-82.
68. Novitzky D, Cooper DK, Morrell D, Isaacs S. Change from aerobic to anaerobic metabolism after brain death, and reversal following triiodothyronine therapy. *Transplantation.* 1988;45(1):32-6.
69. Rech TH, Moraes RB, Crispim D, Czepielewski MA, Leitão CB. Management of the brain-dead organ donor: a systematic review and meta-analysis. *Transplantation.* 2013;95(7):966-74.
70. Rebolledo RA, Liu B, Akhtar MZ, Ottens PJ, Zhang JN, Ploeg RJ, Leuvenink HG. Steroid Anti-Inflammatory Effects Did Not Improve Organ Quality in Brain-Dead Rats. *Biomed Res Int.* 2015;2015:207534.
71. Pinsard M, Ragot S, Mertes PM, Bleichner JP, Zitouni S, Cook F, et al. Interest of low-dose hydrocortisone therapy during brain-dead organ donor resuscitation: the CORTICOME study. *Crit Care.* 2014;18(4):R158.
72. Kotsch K, Ulrich F, Reutzel-Selke A, Pascher A, Faber W, Warnick P, et al. Methylprednisolone therapy in deceased donors reduces inflammation in the donor liver and improves outcome after liver transplantation: a prospective randomized controlled trial. *Ann Surg.* 2008;248(6):1042-50.

73. 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.
74. Callahan DS, Neville A, Bricker S, Kim D, Putnam B, Bongard F, et al. The effect of arginine vasopressin on organ donor procurement and lung function. *J Surg Res*. 2014;186(1):452-7.
75. Plurad DS, Bricker S, Neville A, Bongard F, Putnam B. Arginine vasopressin significantly increases the rate of successful organ procurement in potential donors. *Am J Surg*. 2012;204(6):856-60; discussion 860-1.
76. Smith JW, Matheson PJ, Morgan G, Matheson A, Downard C, Franklin GA, et al. Addition of direct peritoneal lavage to human cadaver organ donor resuscitation improves organ procurement. *J Am Coll Surg*. 2015; 220 (4): 53947.
77. Smith JW, Ghazi CA, Cain BC, Hurt RT, Garrison RN, Matheson PJ. Direct peritoneal resuscitation improves inflammation, liver blood flow, and pulmonary edema in a rat model of acute brain death. *J Am Coll Surg*. 2014 ;219(1):79-87.
78. Siaghy EM, Halejcio-Delophont P, Devaux Y, Richoux JP, Villemot JP, Burlet C, et al. Protective effects of labetalol on myocardial contractile function in brain-dead pigs. *Transplant Proc*. 1998;30(6):2842-3.
79. McLean KM, Pandalai PK, Pearl JM, Bulcao CF, Lyons JM, Wagner CJ, et al. Beta-adrenergic receptor antagonism preserves myocardial function after brain death in a porcine model. *J Heart Lung Transplant*. 2007 ;26(5):522-8.

80. Ferrera R, Hadour G, Tamion F, Henry JP, Mulder P, Richard V, et al. Brain death provokes very acute alteration in myocardial morphology detected by echocardiography: preventive effect of beta-blockers. *Transpl Int.* 2011 ;24(3):300-6.
81. Audibert G, Charpentier C, Seguin-Devaux C, Charretier PA, Grégoire H, Devaux Y, et al. Improvement of donor myocardial function after treatment of autonomic storm during brain death. *Transplantation.* 2006;82(8):1031-6.
82. Pandalai PK, Lyons JM, Duffy JY, McLean KM, Wagner CJ, Merrill WH, et al. Role of the beta-adrenergic receptor kinase in myocardial dysfunction after brain death. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2005;130(4):1183-9.
83. D'Amico TA, Meyers CH, Koutlas TC, Peterseim DS, Sabiston DC, Van Trigt P, et al. Desensitization of myocardial b-adrenergic receptors and deterioration of left ventricular function after brain death. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1995;110:746-51.
84. Pandalai PK, McLean KM, Bulcao CF, Duffy JY, D'Souza KM, Merrill WH, et al. Acute beta-blockade prevents myocardial beta-adrenergic receptor desensitization and preserves early ventricular function after brain death. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2008;135(4):792-8.
85. Randell T, Orko R, Höckerstedt K. Peroperative fluid management of the brain-dead multiorgan donor. *Acta Anaesthesiol Scand.* 1990;34(7):592-5.

86. Westphal GA, Caldeira Filho M, Fiorelli A, Vieira KD, Zacliffevis V, Bartz M, et al; Task Force of the Brazilian Association of Intensive Medicine, Brazilian Association of Organs Transplantation, Transplantation Center of Santa Catarina. Guidelines for maintenance of adult patients with brain death and potential for multiple organ donations: the Task Force of the Brazilian Association of Intensive Medicine the Brazilian Association of Organs Transplantation, and the Transplantation Center of Santa Catarina. *Transplant Proc.* 2012;44(8):2260-7.
87. P Cinotti R, Roquilly A, Mahé PJ, Feuillet F, Yehia A, Belliard G, et al. Pulse pressure variations to guide fluid therapy in donors: a multicentric echocardiographic observational study. *J Crit Care.* 2014;29(4):489-94.
88. Al-Khafaji A, Elder M, Lebovitz DJ, Murugan R, Souter M, Stuart S, et al. Protocolized fluid therapy in brain-dead donors: the multicenter randomized MOnIToR trial. *Intensive Care Med.* 2015;41(3):418-26.
89. Hoefler D, Smits JMA, de Vries E, Antretter H, Laufer G. Elevated donor sodium levels are a risk factor for increased 1-year mortality after heart transplantation. *J Heart Lung Transplant.* 2005;25(suppl):S70.
90. Kaczmarek I, Groetzner J, Mueller M, Landwehr P, Uberfuhr P, Nollert G, et al. Impact of donor serum sodium levels on outcome after heart transplantation. *J Heart Lung Transplant.* 2005;24: 928 –931.
91. Kaczmarek I, Tenderich G, Groetzner J, Deutsch MA, Schulz U, BeirasFernandez A, et al. The controversy of donor serum sodium levels in heart transplantation: a multicenter experience. *Thorac Cardiovasc Surg.* 2006;54:313–316.

92. Zhao JX, Wang B, You GX, Wang Y, Chen G, Wang Q, et al. Hypertonic Saline Dextran Ameliorates Organ Damage in Beagle Hemorrhagic Shock. *PLoS One*. 2015;10(8):e0136012.
93. Urbano J, López-Herce J, Solana MJ, Del Castillo J, Botrán M, Bellón JM. Comparison of normal saline, hypertonic saline and hypertonic saline colloid resuscitation fluids in an infant animal model of hypovolemic shock. *Resuscitation*. 2012;83(9):1159-65.
94. Corso CO, Okamoto S, Leiderer R, Messmer K. Resuscitation with hypertonic saline dextran reduces endothelial cell swelling and improves hepatic microvascular perfusion and function after hemorrhagic shock. *J Surg Res*. 1998;80(2):210-20.
95. Sztark F, Tentillier E, Thicoipé M, Gékière JP, Lassié P, Petitjean ME, Dabadie P. Use of hypertonic saline solutions in the resuscitation of brain-dead organ donors. *Transplant Proc*. 1995;27(4):2473.
96. Waagstein LM, Wennberg E, Waagstein F, Haljamäe H. Hypertonic saline without or with dextran-70 in the treatment of experimental acute myocardial ischemia and reperfusion. *Crit Care Med*. 1999;27(3):605-16.
97. Harada K, Franklin A, Johnson RG, Grossman W, Morgan JP. Acidemia and hypernatremia enhance postischemic recovery of excitation-contraction coupling. *Circ Res*. 1994;74:1197-1209
98. Halejcio-Delophont P, Siaghy EM, Devaux Y, Richoux JP, Bischoff N, Carteaux JP, et al. Consequences of brain death on coronary blood flow and myocardial metabolism. *Transplant Proc*. 1998;30:2840-1

99. Hegedüs P, Li S, Korkmaz-Icöz S, Radovits T, Mayer T, Al Said S, et al. Dimethyloxalyglycine treatment of brain-dead donor rats improves both donor and graft left ventricular function after heart transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2016;35(1):99-107.
100. Van Haren FM, Sleight J, Boerma EC, La Pine M, Bahr M, Pickkers P, van der Hoeven JG. Hypertonic fluid administration in patients with septic shock: a prospective randomized controlled pilot study. *Shock*. 2012;37(3):268-75.
101. Kien ND, Reitan JA, White DA, Wu CH, Eisele JH. Cardiac contractility and blood flow distribution following resuscitation with 7.5% hypertonic saline in anesthetized dogs. *Circ Shock*. 1991;35(2):109-16.
102. Ogino R. Effects of hypertonic saline and dextran 70 on cardiac diastolic function after hemorrhagic shock. *J Surg Res*. 2002;107(1):27-36.
103. Novitzky D, Wicomb WN, Cooper DK, Rose AG, Reichart B. Prevention of myocardial injury during brain death by total cardiac sympathectomy in the Chacma baboon. *Ann Thorac Surg*. 1986;41(5):520-4.
104. Silva IA, Correia CJ, Simas R, Cruz JW, Ferreira SG, Zanoni FL, et al. Inhibition of autonomic storm by epidural anesthesia does not influence cardiac inflammatory response after brain death in rats. *Transplant Proc*. 2012 ;44(7):2213-8. doi: 10.1016/j.transproceed.2012.07.108. Erratum in: *Transplant Proc*. 2012 Nov;44(9):2893. Correia, C D J [removed].
105. Belhaj A, Dewachter L, Rorive S, Rimmelink M, Weynand B, Melot C, et al. Roles of inflammation and apoptosis in experimental brain death-induced right ventricular failure. *J Heart Lung Transplant*. 2016. pii: S1053-2498(16)30139-5.

106. Doria C. Interleukin-6 plasma level in organ donors influences outcome for recipients of organ transplantation: is it clinically relevant? *Crit Care Med.* 2008;36(6):1971.
107. Danobeitia JS, Hanson MS, Chlebeck P, Park E, Sperger JM, Schwarznau A, et al. Donor Pretreatment With IL-1 Receptor Antagonist Attenuates Inflammation and Improves Functional Potency in Islets From Brain-Dead Nonhuman Primates. *Cell Transplant.* 2015;24(9):1863-77.
108. Chen Y, Bao Y, Zhang J, Woehrle T, Sumi Y, Ledderose S, et al. Inhibition of Neutrophils by Hypertonic Saline Involves Pannexin-1, CD39, CD73, and Other Ectonucleotidases. *Shock.* 2015;44(3):221-7.
109. Pascual JL, Ferri LE, Seely AJ, Campisi G, Chaudhury P, Giannias B, et al. Hypertonic saline resuscitation of hemorrhagic shock diminishes neutrophil rolling and adherence to endothelium and reduces in vivo vascular leakage. *Ann Surg.* 2002;236(5):634-42. Erratum in: *Ann Surg.* 2003 Jan;237(1):148.
110. Oreopoulos GD, Hamilton J, Rizoli SB, Fan J, Lu Z, Li YH, et al. In vivo and in vitro modulation of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 expression by hypertonicity. *Shock.* 2000;14(3):409-14.