

Cristiano de Jesus Correia

**Estudo dos efeitos da solução salina hipertônica nas
alterações microcirculatórias e no desenvolvimento
do processo inflamatório 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

Correia, Cristiano de Jesus

Estudo dos efeitos da solução salina hipertônica nas alterações microcirculatórias e no desenvolvimento do processo inflamatório em modelo de morte encefálica em ratos / Cristiano de Jesus Correia. -- 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.Microcirculação 4.Interações leucócito- endotélio 5.Óxido nítrico sintase
endotelial 6.Endotelina-1 7.Inflamação 8.Ratos Wistar

USP/FM/DBD-466/17

Dedicatória

“A verdadeira felicidade está na própria casa, entre as alegrias da família”

Leon Tolstói

A JOÃO OLIVIO CORREIA (JOÃO BINÉ) (*in memoriam*), meu querido, amado e estimado avô, pilar de minha educação familiar, exemplo de competência, honestidade e generosidade. Sua trajetória de vida me guiam e fortalecem todos os dias. Saudades.

A OSVALDO MARIO CORREIA (VARDO BINÉ) (*in memoriam*), meu querido e amado tio, minha referência de paternidade quando criança. Homem que me ensinou disciplina, compromisso, valorizar as coisas simples da vida, e principalmente, ter o respeito familiar, extremamente ausentes nos dias de hoje. Sua trajetória de vida me guiam e fortalecem todos os dias. Saudades.

À CAROLINA REGUERA, minha querida e amada esposa, alma gêmea que DEUS me proporcionou encontrar, exatamente, em um momento tenebroso de minha vida. Então, você foi luz em meio a escuridão. Obrigado por acreditar em mim, justamente quando ninguém mais acreditava. Hoje, esta tese existe graças a você. Te Amo.

À VALENTINA REGUERA CORREIA, mais clara certeza de que o Amor gera maravilhosos frutos. Suas simples e pequenas ações de criança, como um sorriso ou doces abraços, mas principalmente, quando ouço você dizer: “Te Amo Papai”, me fazem sempre estar em busca de me tornar um ser humano melhor. Te Amo Nininha.

Agradecimentos Especiais

Primeiramente a DEUS e NOSSA SENHORA por toda a graça derramada sobre minha vida, por todo sempre. Amém.

Ao PROFESSOR DR. LUIZ FELIPE PINHO MOREIRA por ter me aceito como orientando, afinal, nem todos dão esta oportunidade a funcionários. Este duplo vínculo, por vezes nos fez soltar fagulhas. Mas estas fagulhas, serviram para acender ainda mais, toda minha admiração e respeito por esta pessoa. Por muitas vezes, este chefe foi muito mais amigo. E por outras, o orientador foi muito mais “paizão”. Suas conversas e orientações me ajudaram muito no crescimento pessoal e profissional. Muito obrigado.

À PROFESSORA DR.^a PAULINA SANNOMIYA, mulher que, impregnada em si, carrega o dom de ensinar. Nela, está o verdadeiro sentido da palavra “Professora”. Sou uma pessoa abençoada, por trabalhar ao lado dela, durante muitos anos. Meus agradecimentos vão muito além da ajuda primordial na confecção e desenvolvimento desta tese, pois, por muitas vezes, ela me orientou no seguimento da vida. Diz o ditado que: “se conselho fosse bom, não se dava, vendia”, se assim fosse, eu teria com ela uma enorme dívida, pois os conselhos dados pela professora não foram apenas bons, mas perfeitos e essenciais para o crescimento da minha vida. Muito obrigado.

À PROFESSORA DR.^a LISETE RIBEIRO TEIXEIRA, sou muito feliz e abençoado por tê-la não apenas como companheira de trabalho, mas também como verdadeira amiga. Gratidão por todo o carinho dispensado a mim e também a minha família. Sua luz e bondade nos cativam. Muito obrigado.

Aos PROFESSORES DOUTORES FRANCISCO GARCIA SOREANO e MARCOS NOYUKI SAMANO, membros da banca de qualificação, por todas as sugestões construtivas fornecidas para o melhoramento desta tese. Muito obrigado.

Agradecimientos

À IVONE APARECIDA CORREIA, minha querida Mãe. Em nossa caminhada juntos, muitas vivências duras. Nossa vinda para São Paulo não foi fácil e a permanência, menos ainda. Graças aos nossos esforços, celebraremos um título de Doutor (Quem diria, hein?) e através de nossos laços de sangue, saiba que para sempre, existirá Amor. Obrigado Mãe.

Ao meu “PAldrasto” CICERO JOSÉ DA SILVA, por me acolher como um verdadeiro filho e me ensinar valores morais e familiares. Homem de Fé e Sabedoria ímpares. Nunca esquecerei de quando, após um dia árduo de trabalho, sentou-se comigo por várias vezes, apenas para ensinar a tabuada. Minha sincera Gratidão. Meu muito obrigado.

Ao meu sogro RAUL REGUERA e minha sogra MARIA ZILDA REGUERA, pela acolhida e carinho a mim dispensados, além de toda a ajuda fornecida. Muito obrigado.

À EUNICE DE OLIVEIRA VIEIRA, a qual considero como “mãe de coração”. Aquela que me enxergou, me acolheu e desejou que durante toda a minha caminhada, desde criança até hoje, existisse o melhor. Faltam palavras para descrever seus bons sentimentos e agradecer tudo o que fez e faz. À você TIA NICE, toda minha gratidão. Meu muito obrigado.

À toda minha (grande) família que de alguma forma torce (ou torceram) e emanam energias positivas. Não citarei nomes, pois todos são especiais e em algum momento foram partes fundamentais para que eu chegasse até aqui.

A todos os meus queridos Amigos. Amigos de infância de São Paulo e Manoel Ribas, Amigos do Colégio Agrícola, Amigos de bairro, Amigos de juventude, da faculdade, das baladas, enfim, Amigos que a vida me trouxe até hoje. Alguns ainda perto, outros distantes ou ainda os que partiram. Amigos são família que Deus nos permite escolher e sou muito grato a todas as escolhas que Ele me proporcionou. Á vocês, minha sincera Gratidão.

À DR.^a ANA CRISTINA BREITHAUPT FALOPPA, por toda ajuda dada para o desenvolvimento desta tese. Muito obrigado.

À DR.^a PRISCILA OLIVEIRA DE CARVALHO, por toda ajuda no processamento e análise de RT-PCR das amostras desta tese. Muito obrigado.

Ao aluno de doutorado ROBERTO ARMSTRONG JR. Sua ajuda no desenvolvimento deste trabalho foi de suma importância. Agradeço também, pela oportunidade de estendermos nossos laços para muito além do âmbito profissional. Muito obrigado, amigo.

À RAFAELA GARCIA FERREIRA SOARES, aluna de iniciação científica, por toda a ajuda no desenvolvimento de um outro braço deste trabalho. Muito obrigado.

Ao aluno de doutorado RAPHAEL DOS SANTOS COUTINHO E SILVA, pela ajuda em outro braço deste projeto e pelas discussões muito além do âmbito profissional. Quer saber sobre séries de TV? Só perguntar a ele! Muito obrigado.

À aluna de Doutorado FERNANDA YAMAMOTO, pela ajuda e discussões não só referentes a esta tese. Muito obrigado.

À aluna de Doutorado ROBERTA FIGUEIREDO, pela ajuda e discussões não só referentes a esta tese. Muito obrigado.

Ao DR. PAULO THALES ROCHA DE SOUSA. Esta pessoa que aprendi a conviver e a gostar muito, é um ser humano inteligente e engraçado. Fantástico por natureza. Sou muito feliz por nossa amizade ter ultrapassado as esferas profissionais. Muito obrigado, amigo.

Ao DR. ISAAC AZEVEDO SILVA. Falar desta maravilhosa e fantástica pessoa, que DEUS em sua infinita sabedoria trouxe a minha vida e meu convívio, é falar sobre como o reflexo desse mesmo DEUS é visto em cada palavra, ações

e caminhada do Isaac, que nos preenche, incentiva e fortalece pelos exemplos e pela amizade. Verdadeiro irmão do coração. Obrigado, meu irmão! Você é parte de onde chego hoje. Minha gratidão a ti e também a toda sua família.

Ao SR. ANTONIO AZEVEDO SILVA. Sim! Pai do DR. ISAAC, meu irmão de coração! Assim, Sr. ANTONIO me recebeu como a um filho. Seus exemplos de coragem, sabedoria e fé, colaboraram para meu crescimento pessoal e profissional. Saudades de nossas conversas. Muito obrigado.

AO DR. ISMAEL GUARDA e sua esposa DR. ^a RENATA SAAD GUARDA, por todo o carinho dispensado, sempre. Por toda amizade que tem por mim e minha família. Vocês são exemplos de profissionais capacitados e também exemplo de família pautada em Amor, Respeito, Cuidado e Dedicção. Á vocês, minha gratidão. Meu muito obrigado.

Ao DR. FERNANDO LUIZ ZANONI, por todos estes anos de convivência, por me fazer rir em muitos momentos, compartilhar conhecimentos e assuntos que muitas vezes vão além do âmbito profissional. Muito obrigado.

Ao DR. RAFAEL SIMAS, por sua ajuda no desenvolvimento deste projeto. Além das conversas sobre cervejas artesanais, pelo respeito adquirido ao longo do caminho, dentre outras mil coisas. Muito obrigado.

À DR.^a LAURA MENEGAT, pelas conversas e discussões em âmbito profissional e pessoal. Muito obrigado.

Ao DR. DANIEL MARCELO SILVA MAGALHÃES, pelas inúmeras discussões em meio a almoços ou regado a cervejas, muito obrigado por toda ajuda.

Ao DR. LEONARDO PESSOA CAVALCANTE, por todas as conversas, discussões e principalmente os mimos trazidos diretamente da Amazônia, muito obrigado.

À DR.^a SUELI GOMES FERREIRA, colega de trabalho. Muito obrigado por toda ajuda e discussões.

Ao funcionário SERGIO SALES. Saiba que, através de seu correto trabalho, o desenvolvimento da pesquisa neste laboratório pode acontecer, pois você é quem cuida de nossa matéria prima, nossos animais. Muito obrigado.

Aos amigos da divisão de experimentação, pela acolhida e apoio. Obrigado a todos vocês.

À toda equipe de pós-graduação da cirurgia torácica, pela ajuda em toda esta trajetória acadêmica. Meninas, Muito obrigado.

À todas as pessoas que passaram pelo LIM 11. De alguma forma, vocês ajudaram e colaboraram para meu desenvolvimento e crescimento. Muito obrigado.

Ao INSTITUTO DO CORAÇÃO, por ter acreditado em mim desde 1996. Muito obrigado.

À fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo aporte financeiro.

Epígrafe

“Muitas vezes uma pequena oferta produz grandes efeitos”

Lucius Annaeus Seneca

DOE ÓRGÃOS

Normatização Adotada

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

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

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

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

Sumário

Lista de abreviaturas

Lista de símbolos

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Abstract

1	Introdução	1
1.1	Aspectos Gerais	2
1.2	Morte Encefálica	2
1.3	Solução Salina Hipertônica	6
2	Objetivos	10
2.1	Objetivo Principal	11
2.2	Objetivos Específicos	11
3	Métodos	12
3.1	Animais.....	13
3.2	Grupos e tratamentos	13
3.3	Delineamento Experimental	14
3.4	Anestesia e Modelo de morte encefálica	14
3.5	Análises de gases no sangue, eletrólitos, lactato e contagens de células sanguíneas	15
3.6	Microscopia intravital in situ de mesentério e análise do fluxo sanguíneo	16
3.7	Análises imuno-histoquímicas	17
3.8	Extração de RNA total, síntese de cDNA e PCR quantitativo em tempo real	19
3.9	Concentrações séricas de citocinas e corticosterona	20
3.10	Eutanásia e Descartes dos Animais.....	20
3.11	Análise estatística	21

4	Resultados	22
4.1	Parâmetros Hemodinâmicos, Gasometria Arterial, Eletrólitos, Níveis de Lactato e Valores de Hematócrito	23
4.2	Perfusão mesentérica, fluxo sanguíneo e expressão de óxido nítrico sintase endotelial e endotelina-1.....	24
4.3	Avaliação das interações leucócito-endotélio e expressão das moléculas de adesão na microcirculação mesentérica	26
4.4	Contagem de células do sangue	28
4.5	Concentração sérica de citocinas, quimiocina e corticosterona.....	29
5	Discussão	30
6	Conclusões	36
7	Anexos	38
8	Referências	40

Listas

ABTO:	Associação Brasileira de Transplantes de Órgãos
ACTH:	hormônio adrenocorticotrófico
AEC:	3-amino etil carbazol
BSA:	Albumina de soro bovino
CD:	Cluster of differentiation
CO:	Controle
CT:	Limiar do ciclo
eNOS:	Síntese de óxido nítrico endotelial
EPM:	Erro padrão da média
et al:	e outros
FAPESP:	Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo
FiO ₂ :	Fração inspirada de oxigênio
FO:	Falso operado
ICAM:	Molécula de adesão intercelular
IL:	Interleucina
kg:	quilograma
MIV:	Microscopia intravital
ME:	Morte Encefálica
min:	minutos
ml:	Mililitro
NaCl:	Cloreto de sódio
PAM:	Pressão arterial média
PBS:	Solução salina tamponada com fosfato

PCR:	Reação em cadeia da polimerase
SH:	Solução hipertônica
TBST:	Tris salina tamponada com tween 20
TNF:	Fator de necrose tumoral

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

Figura 1 - Pressão Arterial Média	23
Figura 2 - Porcentagem de pequenos vasos perfundidos (a), fluxo sanguíneo (b) na microcirculação mesentérica e fotomicrografias (c).....	24
Figura 3 - Quantificação da expressão gênica de eNOS e endotelina-1 (a, c) e expressão proteica (b, d)	23
Figura 4 - Imuno-histoquímica para expressão proteica de P-selectina (a, b) e ICAM-1 (c, d) nos microvasos mesentéricos	27

Tabela 1 - Interações leucócito-endotélio na microcirculação mesentérica 26

Tabela 2 - Contagem de células do sangue..... 28

Tabela 3 - Dosagens de citocinas, quimiocinas e corticosterona no soro..... 29

Resumo

Correia CJ. *Estudo dos efeitos da solução salina hipertônica nas alterações microcirculatórias e no desenvolvimento do processo inflamatório em um modelo de morte encefálica em ratos* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

INTRODUÇÃO: A morte encefálica (ME) induz instabilidade hemodinâmica com hipoperfusão microcirculatória, desencadeando inflamação e disfunção de órgãos. **OBJETIVO:** Este estudo teve como objetivo investigar os efeitos da solução salina hipertônica (SH) 7,5% na evolução da resposta inflamatória no tecido mesentérico de ratos submetidos à ME. **MÉTODOS:** Ratos Wistar machos foram anestesiados e ventilados mecanicamente. A ME foi induzida pela insuflação rápida de um balão posicionado na cavidade intracraniana (Fogart 4F). Os ratos foram divididos aleatoriamente em: 1) Falso-operado, ratos submetidos aos procedimentos cirúrgicos e trepanação (FO, n=17); 2) Controle, ratos tratados com solução salina isotônica (NaCl 0,9%, 4 mL/kg) imediatamente após ME (CO, n=17); 3) Solução hipertônica 1, ratos tratados com solução hipertônica (NaCl 7,5%, 4 mL/kg) imediatamente após ME (SH₁, n=17); 4) Solução hipertônica 60, ratos tratados com solução hipertônica 60 min após ME (SH₆₀, n=17). Três horas após a indução da ME ou o término do procedimento cirúrgico para os animais do grupo FO, foram coletados os seguintes dados: (a) perfusão mesentérica, fluxo sanguíneo e interações leucócito-endotélio no mesentério, pela técnica de microscopia intravital; (b) expressão de proteínas de óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), endotelina-1, P-selectina e molécula de adesão intercelular (ICAM)-1, por imunohistoquímica; (c) expressão gênica de eNOS e endotelina-1, por reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR); (d) concentrações séricas de citocinas, quimiocinas e corticosterona por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA). **RESULTADOS:** Todos os grupos submetidos a ME apresentaram um comportamento semelhante da pressão arterial, sendo observado um pico hipertensivo, seguido de período de hipotensão, logo após a insuflação do cateter intra-craniano. A proporção de pequenos vasos perfundidos foi diminuída no grupo CO (46%) em comparação com FO (74%, $p=0,0039$). A SH foi capaz de restaurar a proporção de vasos perfundidos (SH₁=71%, $p=0,0018$). Não houve diferenças no fluxo sanguíneo mesentérico entre os grupos. A expressão proteica de eNOS aumentou significativamente em ratos com SH (SH₁ e SH₆₀, $p=0,0002$) em comparação ao grupo CO. Resultados semelhantes foram observados em relação à endotelina-1 ($p<0,0001$). Não houve diferenças na expressão gênica de eNOS e endotelina-1. O aumento no número de leucócitos “rollers” ($p=0,0015$) e migrados ($p=0,0063$) foi observado no grupo CO em comparação com FO. Ratos com SH demonstraram redução significativa em todos os parâmetros da interação leucócito-endotélio. Com relação às moléculas de adesão, a expressão de ICAM-1 estava elevada no grupo CO em comparação com o FO, enquanto que o tratamento com SH diminuiu a expressão de ICAM-1 (SH₁ e SH₆₀, $p=0,0002$). **CONCLUSÕES:** O emprego da solução salina hipertônica melhorou a perfusão mesentérica, influenciou positivamente o metabolismo do óxido nítrico e reduziu a inflamação no mesentério, com diminuição da adesão e migração leucocitária, em ratos submetidos a ME.

Descritores: morte encefálica; solução salina hipertônica; microcirculação; interações leucócito-endotélio; óxido nítrico sintase endotelial; endotelina-1; inflamação; ratos Wistar.

Abstract

Correia CJ. *Study of hypertonic saline solution effects on microcirculatory alterations and development of the inflammatory process in a rat brain death model* [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2017.

BACKGROUND: Brain death (BD) induces hemodynamic instability with microcirculatory hypoperfusion leading to increased organ inflammation and dysfunction. **OBJECTIVE:** To investigate the effects of 7.5% hypertonic saline solution (HS) on the course of the inflammatory response in rats submitted to BD. **METHODS:** Male Wistar rats were anesthetized and mechanically ventilated. BD was induced by rapid inflation of intracranial balloon catheter (Fogart 4F). Rats were randomly divided in: 1) Sham-operated, rats submitted only to trepanation (SH, n=17); 2) Control, rats treated with normal saline solution (NaCl 0.9%, 4 mL/kg) immediately after BD (CO, n=17); 3) Hypertonic solution 1, rats treated with hypertonic solution (NaCl 7.5%, 4 mL/kg) immediately after BD (HS₁, n=17); 4) Hypertonic solution 60, rats treated with hypertonic solution 60 min after BD (HS₆₀, n=17). Hundred eighty minutes thereafter the following experiments were performed: (a) mesenteric perfusion, blood flow, and leukocyte-endothelial interactions, by intravital microscopy; (b) protein expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS), endothelin-1, P-selectin, and intercellular cell adhesion molecule (ICAM)-1, by immunohistochemistry; (c) gene expression of eNOS, and endothelin-1, by real-time polymerase chain reaction (PCR); (d) serum concentrations of cytokines, chemokines and corticosterone by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **RESULTS:** All BD groups presented similar hypertensive peak followed by hypotension. The proportion of perfused small vessels was decreased in CO group (46%) compared to SH (74%, p=0.0039). HS was able to restore the proportion of perfused vessels (HS₁=71%, p=0.0018). There were no differences in mesenteric blood flow between groups. eNOS protein expression significantly increased in rats given HS (HS₁, and HS₆₀, p=0.0002). Similar results were observed regarding endothelin-1 (p<0.0001). There were no differences in eNOS and endothelin-1 gene expression. Increased numbers of rolling (p=0.0015) and migrated (p=0.0063) leukocytes were observed in CO group compared to SH. Rats given HS demonstrated an overall reduction in leukocyte-endothelial interactions. Levels of ICAM-1 increased in CO group compared to SH, and decreased in HS-treated groups (p=0.0002). **CONCLUSIONS:** Hypertonic saline improves mesenteric perfusion, increased eNOS and endothelin-1 protein expression, and reduced inflammation by decreasing leukocyte adhesion and migration in BD rats.

Descriptors: brain death; saline solution, hypertonic; microcirculation; leukocyte-endothelium interactions; endothelial nitric oxide synthase; endothelin-1; inflammation; Wistar, rats.

1 Introdução

1.1 Aspectos Gerais

O transplante de órgãos é considerado o tratamento de escolha para inúmeras enfermidades, mas a carência de doadores ainda é um obstáculo para a sua efetivação. Nos últimos anos, o Brasil tem apresentado crescimento no número de doadores disponíveis para transplante, entretanto, a necessidade continua a ser maior do que o número de transplantes realizados. Segundo dados da Associação Brasileira de Transplantes de Órgãos (ABTO) em 2016, a maioria dos órgãos para transplante provém de doadores em Morte Encefálica (ME), mas apenas 29.35% tornaram-se efetivos, deixando de se utilizar 45.34% dos casos por falta de manutenção adequada e 25.31% por recusa familiar.

Diversos estudos têm sido realizados com objetivo de analisar as diferentes intervenções que possam levar a um melhor aproveitamento dos órgãos doados. Evidências experimentais e clínicas vêm ressaltando a influência da ME sobre a viabilidade dos órgãos a serem doados, demonstrando que, com uma manutenção adequada de pacientes em ME, pode-se aumentar o número e a qualidade dos órgãos a serem captados para o transplante ⁽¹⁻⁴⁾.

1.2 Morte Encefálica

A ME pode ser instalada por inúmeras causas como o traumatismo craniano, falta de oxigenação cerebral, parada cardiorrespiratória e aumento da pressão intracraniana. A apresentação clínica da ME é representada por

mudanças na pressão arterial (hipertensão e hipotensão), distúrbios eletrolíticos e hormonais. 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)⁽⁵⁾. Após o reflexo de Cushing falhar no reestabelecimento da perfusão cerebral há a formação de zonas isquêmicas devido à baixa perfusão cerebral. Com isso, desencadeia-se uma ativação parassimpática que resulta em bradicardia progressiva e hipotensão. À medida que a lesão evolui, ocorre a destruição do centro vagal cardiomotor, abolindo a atividade parassimpática. Desse modo, a estimulação simpática deixa de sofrer a contra regulação do sistema parassimpático e se estabelece a tempestade autonômica (descarga de catecolaminas), caracterizada por taquicardia e hipertensão. Por fim, ocorre a diminuição da atividade simpática, resultando em instabilidade hemodinâmica exacerbada pela hipovolemia, perda de regulação vascular periférica e vasodilatação^(6,7). A hipotensão e o baixo débito cardíaco iniciam um ciclo de baixa perfusão sistêmica e estas perturbações hemodinâmicas contribuem com a disfunção da microcirculação, comprometendo a viabilidade dos órgãos destinados ao transplante⁽⁶⁾.

A interrupção do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal desencadeado pela ME leva à queda do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH)⁽⁸⁾, responsável pela síntese de outros hormônios como os glicocorticoides. Glicocorticoides endógenos têm um papel importante no controle fisiológico da mobilização de neutrófilos e na ativação das células endoteliais, regulando as expressões de moléculas de adesão de ambas as células⁽⁹⁾. Por este motivo, o aumento da ativação das células endoteliais desencadeadas pela ME pode estar

diretamente relacionado à diminuição da concentração de corticosterona ⁽¹⁰⁾. Entretanto, a terapia hormonal com reposição de glicocorticoides traz evidências conflitantes a respeito de sua utilização ⁽¹¹⁾.

No desenvolvimento dos processos inflamatórios, a ativação das células endoteliais e a alteração no comportamento do fluxo sanguíneo leva ao deslocamento dos leucócitos da zona axial para a periferia do vaso; há aumento da interação leucócito-endotélio e este passa a rolar sobre o endotélio com velocidade menor que a dos eritrócitos (*rolling behavior*). Essa situação expressa a resultante de duas forças: a força de adesão à parede vascular e a força de arraste do fluxo sanguíneo. Um aumento na força de adesão depende de alterações estruturais das moléculas responsáveis pela interação do leucócito com a célula endotelial. A célula endotelial ativada exibe um aumento na expressão de moléculas de adesão da família das selectinas (E-selectina e P-selectina), ⁽¹²⁾ as quais, interagindo com moléculas específicas no leucócito (glicoconjugados) são os elementos responsáveis pelo *rolling behavior*, processo que precede a aderência dos leucócitos e sua mobilização para o tecido perivascular ⁽⁹⁾. Durante a resposta inflamatória ocorre aumento na expressão de beta-2 integrinas (complexo CD11/CD18) no leucócito, as quais interagem com as superfamílias de imunoglobulinas moléculas de adesão intercelular (ICAM-1, ICAM-2), das células endoteliais ⁽¹³⁾. Mediadores inflamatórios, como o fator de ativação plaquetária, ou citocinas, como fator de necrose tumoral (TNF) - α , determinam aumentos significativos na expressão e conformação dessas moléculas, na superfície das células, resultando em aumento da capacidade adesiva. Portanto, o recrutamento dos leucócitos para o sítio de lesão depende do reconhecimento sequencial de moléculas de

adesão expressas pelo leucócito e pela célula endotelial ^(14,15). A correta avaliação das moléculas de adesão e sua expressão durante a ativação do sistema imune permite a relação entre inflamação e o comprometimento da microcirculação nos órgãos acometidos pelo processo inflamatório.

Por ser um dos primeiros órgãos a ser acometido nos processos inflamatórios sistêmicos e pela facilidade de estudo da sua microcirculação em relação a outros órgãos, o mesentério tornou-se uma das principais ferramentas de estudo da microcirculação e das alterações da interação leucócito-endotélio. A técnica de microscopia intravital (MIV) nos fornece uma visão, *in vivo e in situ*, dos eventos fundamentais que ocorrem nos leitos microcirculatórios, permitindo a observação direta e em tempo real do fluxo nos microvasos (arteríolas, vênulas e capilares), distinguindo o tráfego de diferentes elementos circulantes, como glóbulos vermelhos e leucócitos ^(10,16-20).

O comprometimento da microcirculação após a ME tem sido descrito em diversos órgãos. Okamoto et al.(1998, 2000) descreveram que a homeostase do hormônio antidiurético (ADH) e a microcirculação hepática estão prejudicadas após a ME, levando ao comprometimento da função hepática. Obermaier et al. (2004) demonstraram efeitos significativos da ME sobre a perfusão do tecido pancreático, com diminuição da perfusão capilar, aumento da interação leucócito-endotélio nas vênulas pós-capilares e sinais de pancreatite. Simas et al. (2012 a/b) descrevem que a ME induz hipoperfusão da microcirculação mesentérica e aumento da interação leucócito-endotélio concomitante com a elevação da expressão de moléculas de adesão. Estas alterações estão associadas ao aumento da inflamação local e à disfunção de diversos órgãos, em especial ao comprometimento do coração e do pulmão.

Neste sentido, dados ainda não publicados de nosso laboratório, demonstram efeito semelhante da ME em relação a microcirculação pulmonar, confirmando o caráter sistêmico destas alterações.

A ativação do sistema imune desencadeada pela ME, a partir das alterações da microcirculação, leva ao aumento na expressão de mediadores inflamatórios, incluindo citocinas e quimiocinas ^(24,25) e a ampliação do infiltrado celular inflamatório ⁽²⁶⁾. Apesar das alterações do comportamento circulatório decorrentes da ME, a tempestade autonômica não parece ser o elemento responsável pelas alterações inflamatórias e pelo comprometimento da microcirculação observados nos diversos órgãos e tecidos, não tendo sido demonstrados benefícios com o emprego de terapêuticas relacionadas ao seu controle ou supressão ^(19,27).

O atual conhecimento sobre as alterações microcirculatórias ocorridas durante o processo de ME nos faz sugerir outras intervenções que possam melhorar o padrão de resposta desencadeada por esse processo. Entre essas intervenções, a solução salina hipertônica pode ser empregada com o objetivo de controlar a hipotensão observada após a ocorrência da tempestade autonômica e de atuar na modulação da resposta inflamatória.

1.3 Solução Salina Hipertônica

O maior interesse no estudo da solução hipertônica surge no ano de 1980 com a publicação de Velasco et al.(1980), onde os autores demonstraram que a infusão de solução hipertônica a 7,5% recupera os

parâmetros hemodinâmicos após o choque hemorrágico. Posteriormente, além das propriedades hemodinâmicas, foram demonstrados efeitos benéficos desta solução na rede microcirculatória e características anti-inflamatórias, que ampliaram as possibilidades de sua utilização ⁽²⁹⁻³¹⁾.

Estudos propõem a utilização de pequenos volumes (4ml/kg) de solução hipertônica a 7,5% para o tratamento do choque circulatório e do choque séptico ^(30,31), condições frequentes em politrauma, cujo desfecho pode ser a ME. Com relação a outros expansores de volume, o uso da solução hipertônica apresenta algumas vantagens, como por exemplo, a necessidade de menos volume do que as outras soluções, facilitando sua rápida administração e seus efeitos hemodinâmicos quase instantâneos. Uma vez administrada, ela rapidamente cria um potente gradiente osmótico transcapilar que resulta em movimento de água do interstício, células endoteliais e hemácias, para dentro do vaso, aumentando assim a pré-carga e a contratilidade cardíaca, levando também ao aumento da perfusão tecidual periférica e do consumo de oxigênio, através principalmente da vasodilatação de arteríolas pré-capilares ⁽³¹⁾.

Mas os seus benefícios vão além da esfera hemodinâmica, tendo se verificado que propriedades anti-inflamatórias atuam sobre a ativação de células polimorfonucleares, diminuindo sua citotoxicidade e a liberação de íons superóxidos e de elastase, componentes importantes da fisiopatologia da disfunção de órgãos associada ao trauma. Existem também evidências, *in vivo* e *in vitro*, que sugerem a redução na expressão de moléculas de adesão no endotélio e em neutrófilos, alterando positivamente a interação leucócito-endotélio ^(29,32). Neste sentido, o emprego da solução hipertônica tem sido

capaz de modular a disfunção microcirculatória em diferentes enfermidades. Nakagawa et al.(2015) demonstraram que a solução hipertônica atenua os distúrbios da microcirculação mesentérica e minimiza significativamente a inflamação pulmonar em modelo choque hemorrágico seguido por sepse. Já Zaroni et al.(2013) evidenciaram que o tratamento com solução hipertônica seguido por enterectomia reduz a disfunção da microcirculação mesentérica e translocação bacteriana intestinal, atenuando os danos local e sistêmico, em um modelo de obstrução intestinal. A solução hipertônica tem sido utilizada também em casos de trauma encefálico, buscando reduzir a pressão intracraniana e o edema cerebral, característico dessa condição. Estudos sobre os efeitos da solução hipertônica na microcirculação cerebral, evidenciaram limitação da inflamação local em modelo de lesão traumática cerebral em ratos, além de demonstrar aumento no diâmetro dos vasos cerebrais e diminuição na adesão endotelial de leucócitos ⁽³⁴⁾. Dostal et al.(2015) também evidenciaram melhor preservação da perfusão da microcirculação cerebral após tratamento com solução hipertônica.

Finalmente, efeitos positivos do emprego da solução hipertônica também têm sido demonstrados no processo de isquemia e reperfusão de órgãos transplantados. Badiwala et al.(2009), utilizando porcos saudáveis como doadores, mostraram que a solução hipertônica foi capaz de atenuar a disfunção miocárdica do enxerto, melhorar a função hemodinâmica sistêmica e preservar a função cardíaca após o transplante. Entretanto, há apenas um estudo utilizando a solução hipertônica em pacientes com ME, visando a manutenção do comportamento hemodinâmico. Neste estudo, Sztark et al.(1995) observaram melhora no débito cardíaco e na oferta de oxigênio. Com relação

aos efeitos da solução hipertônica sobre a disfunção da microcirculação e do comprometimento inflamatório desencadeados pela ME não existem estudos na literatura.

Em vista do exposto, neste estudo investigamos os efeitos da solução salina hipertônica (NaCl 7,5%) na microcirculação mesentérica e no desenvolvimento do processo inflamatório em ratos submetidos à morte encefálica.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Principal

Investigar os efeitos da solução salina hipertônica (7,5%) na microcirculação mesentérica e no desenvolvimento do processo inflamatório em modelo de morte encefálica em ratos.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o comprometimento da microcirculação mesentérica;
- Avaliar as alterações biomoleculares no endotélio vascular do mesentério;
- Avaliar marcadores de resposta inflamatória sistêmica e no tecido mesentérico.

3 Métodos

3.1 Animais

Este estudo foi realizado no Laboratório de Investigação Médica (LIM) -11 da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, com apoio financeiro da FAPESP 2012/19841-2. Os animais foram manipulados de acordo com as diretrizes do *National Institutes of Health* (1985) para o cuidado, manipulação e utilização de animais de laboratório. Foram utilizados 68 ratos Wistar machos, provenientes do biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, após aprovação do Comitê de Ética (CEUA) SDC 0346/12, pesando entre 250 e 350 g (2 a 3 meses de idade). Os animais foram mantidos a $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, período de claro e escuro de 12 h, sem restrições a ingestão de água e ração.

3.2 Grupos e tratamentos

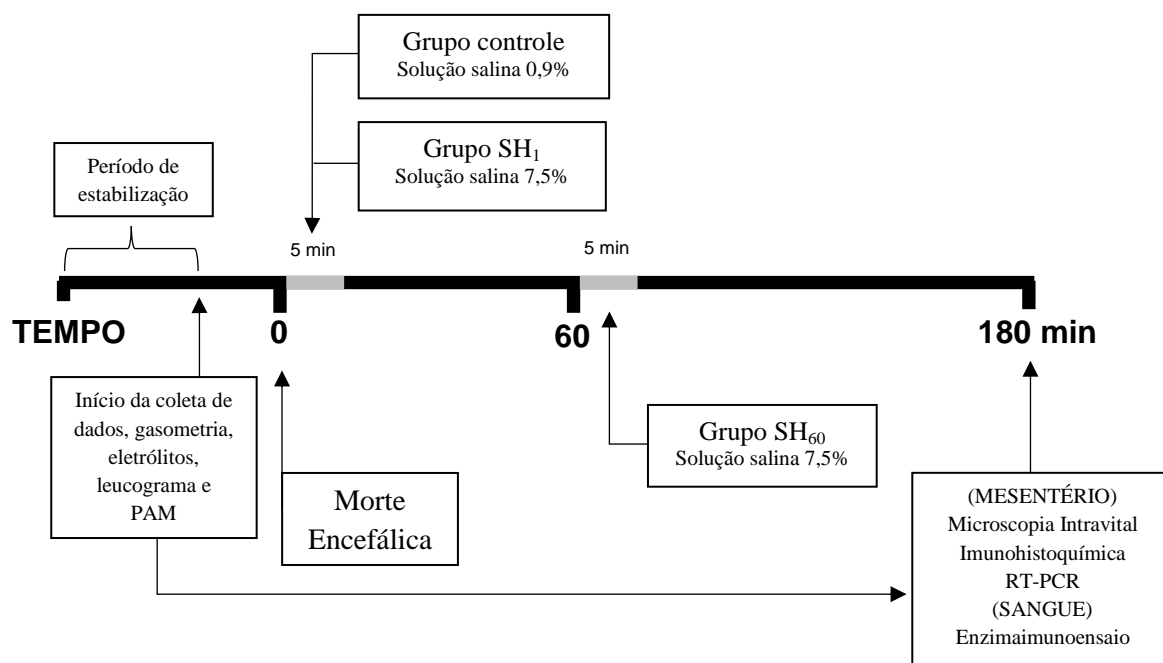
Os ratos foram divididos aleatoriamente em quatro grupos:

- (1) Falso operado - ratos submetidos aos procedimentos cirúrgicos incluindo trepanação, mas sem introdução do cateter (FO, n=17);
- (2) Controle - ratos tratados com solução salina normal (NaCl 0,9%, 4 mL/kg/5min) imediatamente após ME (CO, n=17);
- (3) Solução Hipertônica 1 - ratos tratados com solução salina hipertônica (NaCl 7,5%, 4mL/kg/5min) imediatamente após ME (SH₁, n=17);

- (4) Solução Hipertônica 60 - ratos tratados com solução salina hipertônica (NaCl 7,5%, 4 mL/kg/5min) 60 min após ME (SH₆₀, n=17).

Os animais foram avaliados 180 min após a indução de ME.

3.3 Delineamento Experimental



3.4 Anestesia e Modelo de morte encefálica

Todos os animais foram anestesiados em uma câmara de acrílico fechada com isoflurano (5%); posteriormente foram intubados e mantidos em ventilação mecânica (Harvard Apparatus, Holliston, MA, EUA) com 100% de

FiO₂ (volume corrente 10 mL/Kg, 70 ciclos/min), com 2% de isoflurano. A veia jugular foi canulada para infusão contínua de solução salina a 0,9% (2 mL/h) para minimizar a desidratação. A artéria carótida foi canulada para monitoramento da pressão arterial e retirada de amostras de sangue. A indução de ME foi realizada como descrito anteriormente por Simas et al.(2012). Resumidamente, um cateter balão (Fogart[®] 4-French, Edwards Lifesciences LLC - Irvine, CA, EUA) foi introduzido na cavidade intracraniana, através de uma pequena perfuração e rapidamente inflado com 0,5 mL de solução salina; após confirmação da ME a anestesia foi imediatamente interrompida. A ME foi confirmada pela presença de pico hipertensivo da pressão arterial média (PAM), midríase, apneia e ausência de reflexos.

3.5 Análises de gases no sangue, eletrólitos, lactato e contagens de células sanguíneas

As análises foram realizadas em amostras de sangue arterial obtidas no momento basal (0 min) e 180 min após a indução da ME, utilizando um analisador de gases (Radiometer Medical, Copenhagen, Dinamarca). As contagens das células sanguíneas, glóbulos brancos (linfócitos), glóbulos vermelhos (eritrócitos) e as contagens de plaquetas foram determinadas em amostras de sangue obtidas a partir da ponta da cauda cortada em um analisador hematológico (2800 veterinário, Mindray, Shenzhen, China) nos mesmos tempos da gasometria.

3.6 Microscopia intravital in situ de mesentério e análise do fluxo sanguíneo

A avaliação da microcirculação mesentérica por microscopia intravital foi realizada conforme descrito por Simas et al.(2012). Resumidamente, após uma incisão abdominal na linha média, o íleo distal e o mesentério foram expostos para a observação *in vivo* da microcirculação. O mesentério foi mantido com uma solução de *Krebs-Henseleit* aquecida (37°C) saturada com uma mistura de gases (95% de N₂ e 5% de CO₂). Uma câmera (AxioCam HSc, Carl Zeiss München-Hallbergmos, Alemanha) foi conectada a um microscópio triocular (AxioPlan 2, Carl Zeiss), e as análises foram realizadas usando um software de imagem-computador (Axiovision 4.8, Carl Zeiss). A densidade de pequenos vasos perfundidos (<30 µm de diâmetro) foi analisada em cinco campos selecionados para cada animal usando um microscópio com objetiva 10x e foi selecionado uma área de 1 mm² na tela do computador. O fluxo em cada vaso foi classificado como contínuo ou intermitente/ausente. As interações leucócito-endotélio foram avaliadas em cinco vênulas pós-capilares (20-30 µm de diâmetro) para cada animal usando um microscópio com objetiva 40x. O número de leucócitos rolantes foi determinado como o número médio de células que interagem com o endotélio por 3 min. Os leucócitos considerados como aderidos foram os que permaneceram estacionados no endotélio por mais de 30s e foram contados em um segmento de 100 µm do vaso. O número de leucócitos que se acumulam no tecido conjuntivo adjacente a uma vênula pós-capilar selecionada, foi determinado em uma área padrão de 5.000 µm².

Foram examinados três campos para cada microvaso. Determinou-se o fluxo sanguíneo na microcirculação mesentérica *in situ* e *in vivo* pela utilização de probe (MNP110XP Fine Needle Probe) de 25 mm de extensão e 0.48 mm de diâmetro acoplado a fluxômetro a laser (IN191 Laser Doppler Flowmetry, AD Instruments, Colorado Springs, CO, EUA). O sinal captado é proporcional ao fluxo de células sanguíneas através da microvasculatura. Portanto, a perfusão microvascular é o produto da velocidade média das células sanguíneas e do número médio de células sanguíneas presentes no tecido sob incidência do laser. Os sinais são registrados como unidades de perfusão sanguínea ⁽³⁸⁾.

3.7 Análises imuno-histoquímicas

Os animais foram exsanguinados pela aorta abdominal seguido pela remoção do mesentério; este foi imerso em hexano, congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C. Foram realizados cortes em série do mesentério (8 µm), posteriormente fixados em acetona fria durante 10 min e permeabilizados com solução salina tamponada com TRIS Tween-20 (TBST) e Triton X-100, seguida por bloqueio de sítios inespecíficos com tampão SuperBlock (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA). Os cortes foram incubados durante 1h a 37°C com anticorpos primários: P-selectina anti-humana (1:40; CD62P; R & D Systems, Minneapolis, MN, EUA), anti-óxido nítrico sintase endotelial (eNOS; 1: 100; Abcam, Cambridge, MA, EUA), ou anti-endotelina-1 (1: 100; Abcam). Os anticorpos primários foram diluídos em solução TBST contendo 1% de albumina de soro bovino (BSA). Após enxaguar as lâminas, a

peroxidase endógena foi bloqueada (2% de solução de peróxido de hidrogênio) durante 15min à temperatura ambiente. Uma vez enxaguados, os cortes foram incubados com anticorpos secundários anti-rato ou anti-coelho que são Gs de imunoglobulina ligados a peroxidase de Horseradich (1: 200; Millipore, Billerica, MA, EUA) durante 2 h a 37 ° C. Após a lavagem com TBST, as lâminas foram incubadas com solução de substrato de 3-amino-9-etilcarbazole (AEC) durante 5 a 10 min e contra-coradas com hematoxilina de Mayer. As amostras de controle negativo foram incubadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS). Para a detecção de molécula de adesão intercelular (ICAM) -1, utilizou-se um anticorpo monoclonal ICAM-1 anti-rato conjugado com biotina (CD54; Cedarlane, Burlington, NC, EUA) diluído 1:40 em solução TBST contendo 1% de BSA durante 1h a 37°C. As lâminas foram lavadas com TBST, incubadas com 1:200 de estreptavidina-fluoresceína (Amersham Pharmacia Biotech, Londres, Reino Unido), durante 2h a 37°C. Após a lavagem com TBST, as lâminas foram tratadas com meio de montagem Vectashield contendo iodeto de propídio (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) para preservar a fluorescência.

As imagens de vasos mesentéricos foram adquiridas com uma câmera digital (DSRi1, Nikon, Tóquio, Japão) conectada a um microscópio (Nikon). As amostras foram analisadas usando um software de imagem-computador (software NIS-Elements BR, Nikon). Os resultados são apresentados como a área corada/total vaso (corante AEC) ou como intensidade média de fluorescência (ICAM-1).

3.8 Extração de RNA total, síntese de cDNA e PCR quantitativo em tempo real

O RNA total foi extraído de tecidos congelados (mesentério) usando um *kit RNeasy Plus Mini* (Qiagen GmbH, Hilden, Alemanha). Avaliação, purificação e quantificação do RNA foram realizados através da medição da absorbância a 260 e 280nm, em Nanodrop 2000, instrumento espectrofotômetro (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EUA). As medidas com variação entre 1,8 e 2,0 foram consideradas satisfatórias para os padrões de pureza. Uma transcrição reversa de alta capacidade foi realizada para produzir cDNA de uma única cadeia. A primeira vertente do cDNA foi sintetizada a partir de 50ng de RNA total utilizando o Kit de síntese de cDNA SuperScript VILO (Invitrogen by Life Technology, Carlsbad, CA, EUA), de acordo com as especificações do fabricante. O cDNA resultante foi diluído (1:3) com tampão TRIS-EDTA e armazenado a -20°C antes da análise.

As quantificações para expressão dos genes de eNOS (Rn02132634_s1) e endotelin-1 (Rn00561129_m1) foram determinados por RT-PCR utilizando o sistema de detecção TaqMan. As reações foram executadas no sistema de PCR em tempo real StepOnePlus (Applied Biosystems Life Technology, Carlsbad, CA, EUA). As misturas de amplificação Taqman (12µL) continham 5,4µL de cDNA diluído com 6µL de TaqMan Universal PCR Master Mix e 0,6µL de 20x Custom Taqman Gene Expression Assays (Applied Biosystems Life Technology) seguindo as condições do ciclo: 50°C por 2min, desnaturação inicial a 95°C durante 10min e 40 ciclos a 95°C durante 15s e 60°C durante

1min. Todas as reações foram realizadas em duplicatas e a média entre elas foi utilizada. Para cada amostra, os valores CT dos genes alvo foram normalizados. O valor usado para demonstrar a expressão relativa dos genes alvo foi calculado utilizando a expressão $2^{-\Delta\Delta CT}$ previamente descrita por Livak and Schmittgen (2001). Para a normalização foram utilizados GAPDH ou β -Actina.

3.9 Concentrações séricas de citocinas e corticosterona

As amostras de sangue obtidas a partir da aorta abdominal foram centrifugadas (500 x g, 25°C) e as concentrações séricas de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 foram medidas pela técnica de enzimaímmunoensaio (ELISA) em kits (*R&D Systems*) e conforme recomendado pelo protocolo do fabricante. As concentrações séricas de corticosterona foram determinadas usando um kit ELISA (*Cayman Chemical*, Ann Arbor, MI, EUA) de acordo com as especificações do fabricante.

3.10 Eutanásia e Descartes dos Animais

Ao final dos 180 minutos os animais foram eutanasiados por exsanguinação através da aorta abdominal para coleta de plasma e de outros órgãos; a seguir, os animais foram armazenados em câmara fria no laboratório, até serem retirados por empresa responsável e serem incinerados.

3.11 Análise estatística

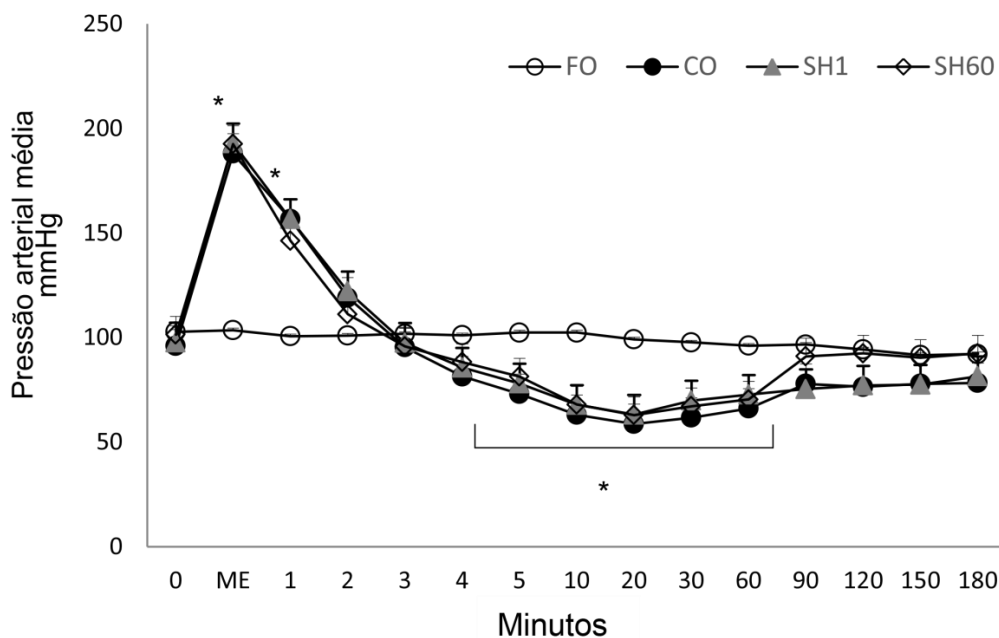
Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) ou mediana e intervalos de confiança. Os dados foram analisados por análise de variância de um ou de dois fatores (ANOVA), seguidos por testes de Dunnet ou Bonferroni para comparações entre os grupos FO e de tratamento versus o grupo controle. Para análises não paramétricas utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn para comparações entre os grupos FO e de tratamento versus o grupo controle. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. As análises estatísticas foram conduzidas utilizando *GraphPad Prism Software v.6*.

4 Resultados

4.1 Parâmetros Hemodinâmicos, Gasometria Arterial, Eletrólitos, Níveis de Lactato e Valores de Hematócrito

Os animais submetidos a ME exibiram aumento significativo na PAM, imediatamente após a insuflação do balão. Em seguida, houve queda para valores muito abaixo da linha basal e com subsequente elevação para valores próximos ao grupo FO 60 minutos após ME. Apenas animais do grupo FO, não demonstraram mudança na PAM. Não houve diferença entre os grupos após os 60 minutos de indução da ME (Figura 1).

Não houve diferenças significativas nos gases de sangue arterial, lactato e hematócrito no início do estudo e aos 180 minutos após a indução da ME (dados anexos). Ao final dos experimentos os grupos tratados com solução hipertônica sofreram aumento significativo no sódio plasmático em relação ao basal (SH₁ 152,3±2,1; 159,0±0,8 mmol/L) e (SH₆₀ 150,1±1,1; 157,6±1,0 mmol/L).

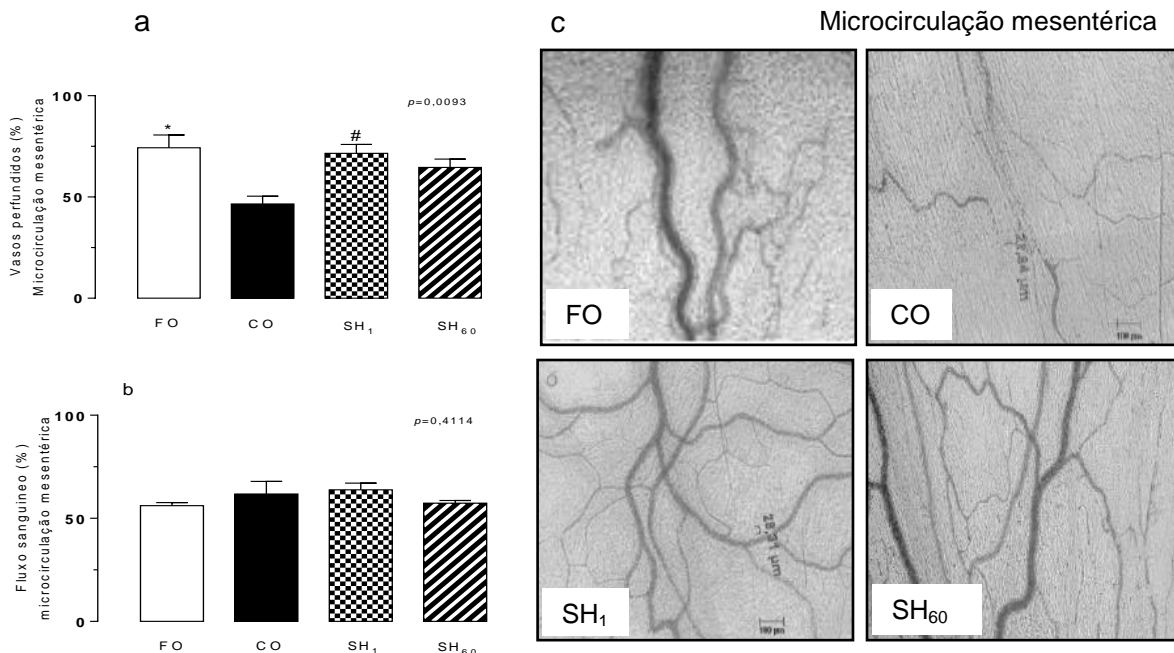


FO = grupo falso operado (n=13); CO = grupo controle (n=15); SH₁ = grupo salina hipertônica imediatamente após a ME (n=13); SH₆₀ = grupo salina hipertônica 60 min após ME (n=17). Os valores representam a média ± EPM. * $p < 0,05$ versus FO.

Figura 1 - Pressão Arterial Média

4.2 Perfusão mesentérica, fluxo sanguíneo e expressão de óxido nítrico sintase endotelial e endotelina-1

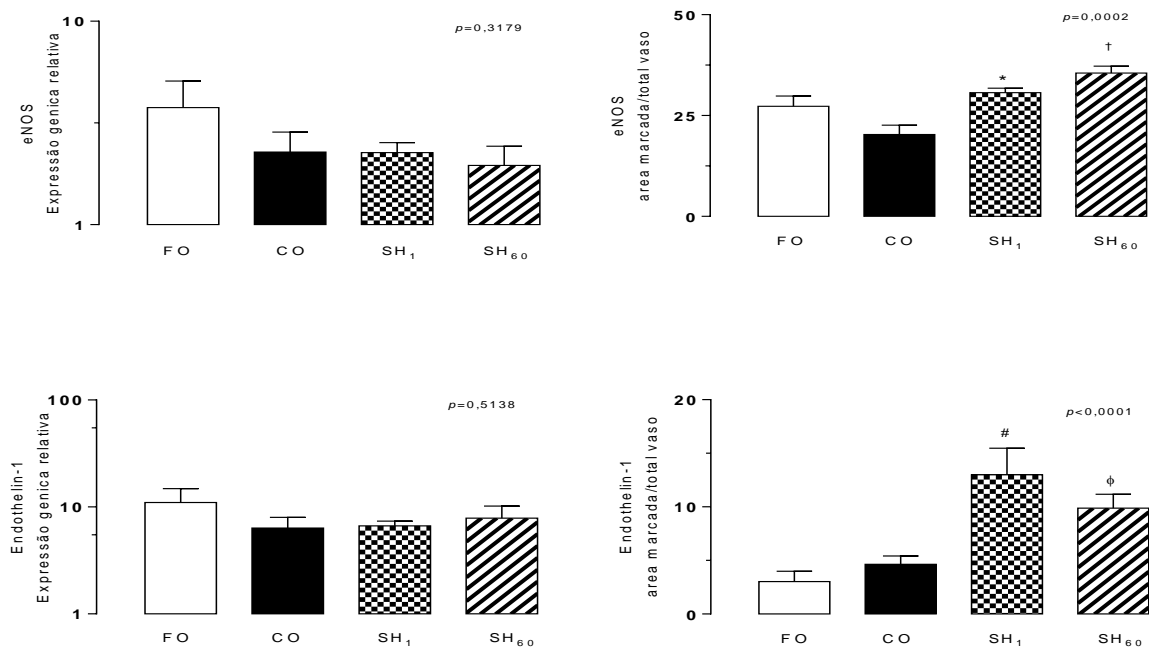
Conforme ilustrado na Figura 2a, o grupo CO mostrou uma diminuição significativa na proporção de pequenos vasos perfundidos (<30 μm de diâmetro), quando comparado ao grupo FO (CO=46%; FO=74%). A solução hipertônica foi capaz de restaurar a proporção de pequenos vasos perfundidos em ratos tratados imediatamente após ME (SH₁=71%). Não houve diferenças no fluxo sanguíneo mesentérico entre os grupos (Fig. 2b). As fotomicrografias representativas estão incluídas na Figura 2c.



FO = grupo falso operado (n=12); CO = grupo controle (n=16); SH₁ = grupo salina hipertônica imediatamente após a ME (n=5); SH₆₀ = grupo salina hipertônica 60 min após ME (n=5). Os valores representam a média \pm EPM. **p*=0,0039 FO versus CO; #*p*=0,00184 SH₁ versus CO.

Figura 2 - Porcentagem de pequenos vasos perfundidos (a), fluxo sanguíneo (b) na microcirculação mesentérica e fotomicrografias (c)

As análises da expressão gênica de eNOS e endotelina-1 não apresentaram diferenças entre os grupos conforme ilustrado nas Figuras 3a e 3c, respectivamente. Em contraste, a expressão proteica para eNOS aumentou significativamente em ratos tratados com solução hipertônica, imediatamente após ME (SH₁) ou 60 minutos depois (SH₆₀), em comparação com os valores do grupo CO (Fig. 3b). Resultados semelhantes foram observados quanto à expressão proteica de endotelina-1 em microvasos do mesentério (Fig. 3d).



FO = grupo falso operado; CO = grupo controle; SH₁ = grupo salina hipertônica imediatamente após a ME; SH₆₀ = grupo salina hipertônica 60 min após ME. Os valores representam a média \pm EPM de 8 a 10 animais por grupo em relação aos valores de ratos *naïves* (PCR em tempo real), 03 amostras por rato com 04 ratos por grupo (imuno-histoquímica). eNOS: * $p=0,0058$ SH₁ versus CO; † $p<0,0001$ SH₆₀ versus CO. Endothelin-1: # $p<0,0001$ SH₁ versus CO; φ $p=0,0037$ SH₆₀ versus CO.

Figura 3 - Quantificação da expressão gênica de eNOS e endotelina-1 (a, c) e expressão de proteica (b, d)

4.3 Avaliação das interações leucócito-endotélio e expressão das moléculas de adesão na microcirculação mesentérica

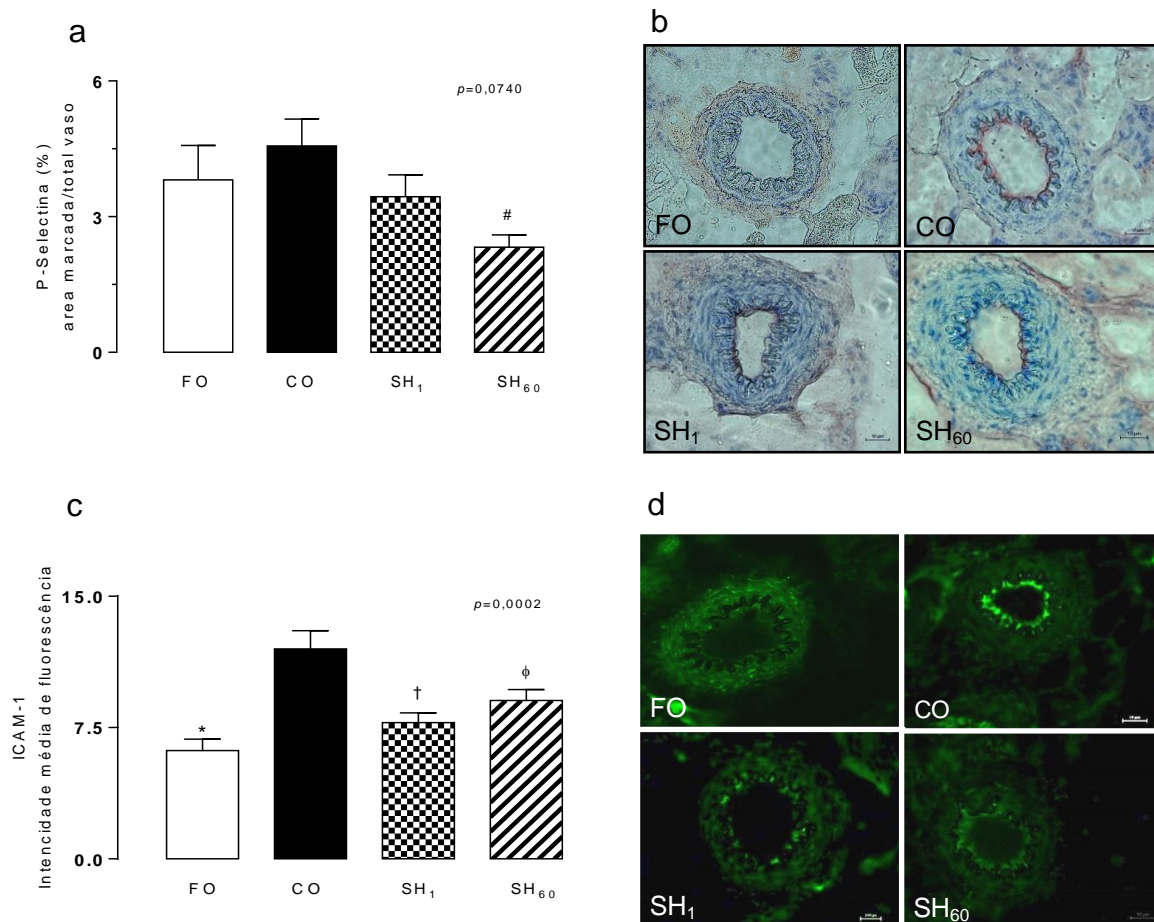
Conforme resumido na Tabela 1, as interações leucócito-endotélio foram analisadas em vênulas pós-capilares com diâmetros semelhantes entre os grupos. Relativamente aos valores observados no grupo FO, os ratos submetidos a ME e tratados com solução salina isotônica (CO) exibiram um aumento no número de células rolantes e leucócitos migrados. Em contrapartida, ratos tratados com solução hipertônica imediatamente após ME (SH₁) mostraram uma redução geral nas interações leucócito-endotélio, incluindo números de leucócitos rolantes, aderidos e migrados. Quando o tratamento foi administrado 60 minutos após o início da ME (SH₆₀), os animais exibiram um número reduzido de leucócitos rolantes e migrados em relação ao grupo CO (Tabela 1).

Tabela 1 - Interações leucócito-endotélio na microcirculação mesentérica

	FO	CO	SH ₁	SH ₆₀	Valor-p
Diâmetro do vaso (µm)	21,3±1,7	21,9±1,8	21,3±2,0	21,2±2,0	0,6341
Rolantes leucócitos/3min	51,0±4,0*	133,0±12,0	84,0±16,0 [#]	42,0±6,0 [†]	0,0001
Aderidos leucócitos/100µm comprimento vênula	2,9±0,2	4,2±0,4	2,5±0,5 [#]	3,6±0,3	0,0254
Migrados leucócitos/5,000µm ²	2,3±0,2*	3,4±0,1	2,3±0,1 [#]	2,4±0,2 [†]	0,0034

FO = grupo falso operado (n=5); CO = grupo controle (n=10); SH₁ = grupo salina hipertônica imediatamente após a ME (n=9); SH₆₀ = grupo salina hipertônica 60 min após ME (n=5). Os valores representam a média ± EPM. FO versus CO: leucócitos rolantes *p=0,0015 e células migradas *p=0,0063; SH₁ versus CO: leucócitos rolantes [#]p=0,0250, células aderidas [#]p=0,0031 e células migradas [#]p=0,0085; SH₆₀ versus CO: leucócitos rolantes [†]p=0,0004 e células migradas [†]p=0,0152.

Em relação à expressão de moléculas de adesão endotelial, observou-se redução da expressão de P-selectina em microvasos mesentéricos no grupo SH₆₀ em comparação com o grupo CO (Fig. 4a). A expressão de ICAM-1 no endotélio aumentou significativamente em ratos submetidos a ME e tratados com solução salina normal (CO). Em contraste, os ratos tratados com solução hipertônica expressaram menos ICAM-1, como observado em ambos os grupos SH₁ e SH₆₀ (Fig. 4c). As fotomicrográficas representativas são apresentadas nas Figuras 4b e 4d.



FO = grupo falso operado; CO = grupo controle; SH₁ = grupo salina hipertônica imediatamente após a ME; SH₆₀ = grupo salina hipertônica 60 min após ME. Os valores representam a média ± EPM para 03 amostras por animal e 04 ratos por grupo. P-selectina: #*p* = 0,0299 SH₆₀ versus CO. ICAM-1: **p* < 0,0001 FO versus CO; †*p* = 0,0010 SH₁ versus CO; ϕ *p* = 0,0089 SH₆₀ versus NS.

Figura 4 - Imuno-histoquímica para expressão proteica de P-selectina (a, b) e ICAM-1 (c, d) nos microvasos mesentéricos

4.4 Contagem de células do sangue

Conforme resumido na Tabela 2, não houve diferenças nas contagens de leucócitos totais e diferenciais no momento basal entre os grupos. Um aumento nos leucócitos totais foi observado em ratos FO 180 min após trepanação, devido ao aumento dos números de granulócitos. Em contraste, não houve alteração na contagem total de leucócitos nos grupos submetidos à ME, tratados com salina normal ou solução hipertônica. Observou-se uma redução significativa na contagem de linfócitos nos grupos submetidos à ME, sem alteração nos números de granulócitos nos grupos CO e SH₆₀; já o grupo SH₁ apresentou aumentos significativos na contagem de granulócitos. Além disso, observou-se uma redução significativa no número de plaquetas nos grupos submetidos à ME, tratados com salina normal ou solução hipertônica. Não foram observadas alterações nas contagens de eritrócitos entre os grupos (Tabela 2).

Tabela 2 - Contagem de células do sangue

		Leucócitos				Plaquetas x10 ³ /mm ³	Eritrócitos x10 ⁶ /mm ³
		Total	Linfócitos	Monócitos	Granulócitos		
FO	basal	19,7 ± 1,6	11,5 ± 0,8	0,8 ± 0,1	7,4 ± 0,8	1319 ± 79	8,2 ± 0,3
	180min	37,5 ± 4,8 ^{#*}	8,5 ± 1,2	1,6 ± 0,2	28,9 ± 4,0 ^{#*}	1129 ± 77	7,3 ± 0,3
CO	basal	16,2 ± 1,1	9,3 ± 0,6	0,6 ± 0,1	6,4 ± 0,6	1258 ± 57	8,0 ± 0,2
	180min	16,8 ± 1,1	5,9 ± 0,4 [#]	0,5 ± 0,1	10,4 ± 0,9	887 ± 58 [#]	8,0 ± 0,2
SH ₁	basal	19,0 ± 1,6	11,0 ± 0,9	0,6 ± 0,1	7,4 ± 1,0	1293 ± 45	8,5 ± 0,2
	180min	21,7 ± 1,3	5,8 ± 0,2 [#]	0,7 ± 0,1	15,2 ± 1,3 [#]	933 ± 46 [#]	8,0 ± 0,2
SH ₆₀	basal	19,8 ± 1,7	10,7 ± 0,6	0,7 ± 0,1	8,4 ± 1,2	1371 ± 81	8,2 ± 0,1
	180min	17,5 ± 1,6	5,6 ± 0,6 [#]	0,5 ± 0,1	11,4 ± 1,2	1064 ± 54 [#]	7,7 ± 0,2

FO = grupo falso operado (n=10); CO = grupo controle (n=14); SH₁ = grupo salina hipertônica imediatamente após a ME (n=13); SH₆₀ = grupo salina hipertônica 60 min após ME (n=17). Os valores representam a média ± EPM. [#]p<0,05 versus valores basais; *p<0,05 FO versus outros grupos aos 180 minutos.

4.5 Concentração sérica de citocinas, quimiocina e corticosterona

Observou-se um aumento significativo na concentração sérica de TNF- α no grupo CO em comparação com o grupo FO; não houve alterações nas concentrações de IL-1 β , IL-10 e CINC-1 entre os grupos (Tabela 3). Em relação aos valores alcançados no grupo FO, as concentrações séricas de corticosterona foram marcadamente reduzidos nos grupos submetidos à ME. (Tabela 3).

Tabela 3 - Dosagens de citocinas, quimiocinas e corticosterona no soro

	FO	CO	SH ₁	SH ₆₀	Valor-p
TNF- α (pg/mL)	4,6 (3-19)	25,2 (5-280)*	17,9 (7-70)	14,1 (4-31)	0,030
IL-1 β (pg/mL)	0 (0-63)	0 (0-340)	0 (0-178)	2,7 (0-27)	0,750
IL-10 (pg/mL)	0 (0-21)	0,28 (0-209)	0 (0-105)	31 (0-66)	0,103
CINC-1 (pg/mL)	211 (158-466)	309 (74-640)	257 (120-350)	228 (132-306)	0,817
Corticosterona (pg/mL)	1440 (957-5000)	151 (50-653)*	164 (55-561)*	288 (36-889)*	0,0009

FO = grupo falso operado (n=8); CO = grupo controle (n=7); SH₁ = grupo salina hipertônica imediatamente após a ME (n=7); SH₆₀ = grupo salina hipertônica 60 min após ME (n=7). Os valores representam a mediana e o intervalo de confiança. * $p < 0,05$ versus FO.

5 Discussão

Estudos que buscam melhorar a qualidade dos órgãos para o transplante, por meio da manutenção adequada de potenciais doadores, desempenham um importante papel na tentativa de reduzir a distância entre a necessidade e o número de transplantes realizados. O presente estudo buscou avaliar os efeitos da solução salina hipertônica na microcirculação mesentérica após a ME. Os resultados obtidos evidenciaram efeitos benéficos da solução hipertônica nos animais submetidos a ME, sendo capaz de melhorar a perfusão da microcirculação mesentérica, aumentar a expressão proteica de componentes do metabolismo do óxido nítrico e reduzir a inflamação no tecido mesentérico pela diminuição da interação leucócito-endotélio. Os efeitos observados, cuja ocorrência nos diversos órgãos e tecidos pode ter níveis variáveis de expressão, representam uma perspectiva positiva para a melhor preservação dos órgãos em potenciais doadores em ME.

Os valores de PAM e fluxo sanguíneo mesentérico não apresentaram alterações significativas com o uso da solução hipertônica durante 180 min após a ME. A capacidade de expansão volêmica da solução hipertônica não produziu efeito na PAM, provavelmente pela ausência de vasoconstricção reflexa, a qual é regulada pela estimulação neural. Entretanto, o tratamento com solução hipertônica mostrou-se eficaz em reestabelecer a perfusão da microcirculação mesentérica, principalmente em animais tratados precocemente. Os animais tratados tardiamente apresentaram aumento na perfusão, mas sem significância estatística, dados que corroboram com os relatos prévios na presença de choque hemorrágico ou sépsis ^(29,40,41).

O comprometimento da perfusão microcirculatória após a ME apresentado neste estudo, soma-se aos dados descritos anteriormente em

fígado, pâncreas e mesentério ^(10,22,23). Neste sentido, o período de baixa perfusão desencadeada pela ME pode gerar edema sobre as células endoteliais e eritrócitos, resultando em maior viscosidade e resistência hidráulica. A administração de solução hipertônica, por sua vez, resulta no aumento da pressão oncótica e da força osmótica no plasma. Esta mudança de fluido tem importantes consequências hemodinâmicas sobre a microcirculação, como melhora da viscosidade sanguínea, melhora do fluxo sanguíneo, diminuição de edema de células endoteliais e eritrócitos, levando a recuperação do lúmen vascular e restauro da flexibilidade dos eritrócitos, facilitando assim, sua passagem através da rede microcirculatória ⁽³¹⁾. A solução hipertônica também atua diminuindo a formação de agregados leucócito-plaquetários ⁽²⁹⁾, que podem estar relacionados ao comprometimento do fluxo na rede microcirculatória.

Na tentativa de entender o comprometimento da microcirculação, procuramos investigar possíveis mecanismos envolvidos. Para tanto, avaliamos as expressões proteica e gênica de eNOS, molécula sintetizada pelas células endoteliais, responsável pela geração de NO vascular, atuando principalmente como vasodilatador. Também foram avaliados os peptídeos da endotelina-1, que promovem constrição dos vasos sanguíneos e estão armazenados nos corpos de Weibel-Palade. O equilíbrio entre estas duas moléculas representa papel fundamental na homeostase vascular. Conforme dados apresentados neste estudo, a ME não alterou as expressões gênica e proteica para ambas as moléculas, levantando-se a hipótese de que este não parece ser o mecanismo envolvido no comprometimento da perfusão após a ME. Entretanto, os animais tratados com solução hipertônica apresentaram aumento

significativo na expressão proteica de eNOS e endotelina-1, demonstrando efeitos positivos de sua administração com relação ao metabolismo do óxido nítrico. Estes efeitos com relação à perfusão da microcirculação mesentérica podem estar ligados ao mecanismo de regulação destas moléculas. Molnár et al.(2011) demonstraram aumento concomitante das moléculas de eNOS e endotelina-1 após o tratamento com solução hipertônica, sugerindo que o efeito benéfico dela sobre a circulação é dependente do metabolismo do óxido nítrico. Bourque et al.(2011) sugerem que o equilíbrio entre as moléculas de eNOS e endotelina-1 é crítico para a função vascular e o seu desequilíbrio pode determinar o aparecimento de doenças cardiovasculares.

Na presença da ME, estudos a respeito da interação leucócito-endotélio demonstram que ela leva ao aumento da expressão das glicoproteínas nas células endoteliais, como P-selectina e ICAM-1, e conseqüentemente a maior ativação celular (10,44). Recentemente, Menegat et al.(2017) descreveram que leucócitos na medula óssea não apresentam expressão das glicoproteínas após a ME, demonstrando a ausência de ativação celular em nível sistêmico. Como a expansão de volume gerada pela solução hipertônica dentro do espaço intravascular pode gerar o aumento da força de arraste, diminuindo assim o deslocamento dos leucócitos da zona axial para a periferia do vaso, pode levar a conseqüente diminuição da ativação celular em nível local, pelo menor contato entre as células leucocitárias e endoteliais, situação corroborada pelos dados apresentados neste estudo.

Outro aspecto importante se refere a interrupção do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal desencadeado pela ME, que leva à queda do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) ⁽⁸⁾, responsável pela síntese de outros hormônios

como glicocorticoides. Estes hormônios desempenham um importante papel na ativação das células endoteliais, regulando a expressão de moléculas de adesão, como ICAM-1 e ICAM-2 ⁽⁹⁾. Neste sentido, o aumento da ativação das células endoteliais desencadeadas pela ME pode estar diretamente relacionado à diminuição da concentração de corticosterona e ao aumento de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α . No presente estudo, todos os animais submetidos a ME apresentaram queda significativa na concentração de corticosterona, corroborando com os dados de Simas et al. (2012).

Ainda com relação à interação leucócito-endotélio, aumento da ativação das células endoteliais e distúrbios da microcirculação podem gerar a marginação dos leucócitos, que passam a rolar sobre a superfície da parede do vaso interagindo com as células endoteliais por meio das selectinas (E e P) ⁽¹²⁾. Posteriormente, permitem uma firme adesão entre os ligantes do leucócito (CD18/CD11) e os receptores da superfamília de imunoglobulinas (ICAM-1, ICAM-2) sobre as células endoteliais ⁽¹³⁾, finalizando com a migração de células para os tecidos. Com relação à ME, os dados apresentados demonstram o aumento das interações leucócito-endotélio, confirmado pelo aumento no número de leucócitos rolantes e leucócitos migrados, acompanhados por intensificação da expressão de ICAM-1 e aumento na concentração de TNF- α . Em contraste à resposta desencadeada pela ME, o tratamento com solução hipertônica, demonstrou ser eficaz em diminuir a expressão de ICAM-1, reduzindo, assim, o número de leucócitos rolantes e migrados. Os dados apresentados neste trabalho ainda evidenciam que o tratamento precoce com solução hipertônica foi capaz de diminuir o número de leucócitos aderidos. Este achado aparentemente não está relacionado ao aumento do número de

leucócitos circulantes, uma vez que o grupo FO apresentou leucocitose, principalmente devido à neutrofilia, também apresentada pelo grupo SH₁. Além disso, os dados deste estudo mostraram que animais tratados com solução hipertônica não apresentaram diferenças na concentração de TNF- α em relação ao grupo FO.

Quanto à preservação da função dos diversos órgãos e tecidos, o aumento da migração celular está diretamente relacionado a ocorrência de disfunção orgânica. Acredita-se que essa inapropriada interação leucócito-endotélio promova a liberação de proteases, radicais livres de oxigênio, contribuindo para lesão da microvasculatura e edema tecidual ⁽²⁹⁾. Neste sentido, a solução salina hipertônica tem sido eficaz na modulação da disfunção da microcirculação e na preservação funcional em animais submetidos à obstrução intestinal, diminuindo a expressão de P-selectina, ICAM-1 e a interação leucócito-endotélio, com consequente melhoria da sobrevida ⁽³³⁾.

Diante dos dados apresentados, foi possível se demonstrar que a solução salina hipertônica a 7.5% é capaz de melhorar a perfusão tecidual e de modular a ativação das células endoteliais após a ME. Tendo em vista que ela foi capaz de influenciar significativamente a resposta inflamatória, mesmo quando administrada tardiamente, abre-se uma perspectiva importante para incorporação de seu uso no cuidado dos potenciais doadores, melhorando a qualidade e a quantidade de órgãos a serem captados para transplante.

6 Conclusões

Com base nos resultados obtidos, é possível concluir que a administração de solução hipertônica após a indução da ME em ratos:

- Melhora a perfusão da microcirculação mesentérica, sem alterar o fluxo sanguíneo sistêmico e regional;
- Altera positivamente o metabolismo do óxido nítrico;
- Reduz a interação leucócito-endotélio, com diminuição da expressão das moléculas de adesão endotelial, resultando em menor migração celular para o tecido mesentérico;
- Não altera significativamente as concentrações séricas de citocinas inflamatórias.

7 Anexos

Tabela da gases sanguíneos, ácido base, potássio e lactato

		FO	CO	SH₁	SH₆₀
pH	Basal	7,48 ± 0,01	7,49 ± 0,02	7,50 ± 0,01	7,53 ± 0,02
	180min	7,30 ± 0,02	7,39 ± 0,03	7,35 ± 0,03	7,34 ± 0,04
pCO ₂ (mmHg)	Basal	27 ± 1,1	25 ± 1,5	25 ± 0,7	22 ± 1,9
	180min	38 ± 2,6	35 ± 3,9	38 ± 3,3	39 ± 5,7
pO ₂ (mmHg)	Basal	294,1 ± 36,0	311,5 ± 23,6	261,1 ± 32,3	330,3 ± 31,4
	180min	280,3 ± 22,0	278,4 ± 28,1	272,6 ± 35,4	257,3 ± 23,7
HCO ₃ (mmol/L)	Basal	19,7 ± 0,5	18,4 ± 0,7	19,5 ± 0,6	18,0 ± 0,6
	180min	17,9 ± 0,7	19,6 ± 0,9	19,7 ± 0,8	18,8 ± 1,0
ABEe (mmol/L)	Basal	-2,0 ± 0,5	-3,0 ± 0,9	-1,7 ± 0,7	-2,4 ± 0,3
	180min	-7,4 ± 0,5	-4,3 ± 0,7	-4,9 ± 0,6	-6,0 ± 0,4
Potássio (mmol/L)	Basal	3,5 ± 0,1	3,8 ± 0,2	3,9 ± 0,3	3,6 ± 0,1
	180min	4,3 ± 0,2	4,3 ± 0,2	4,1 ± 0,1	4,2 ± 0,1
Lactato (mmol/L)	Basal	2,5 ± 0,2	3,1 ± 0,2	2,9 ± 0,3	3,6 ± 0,3
	180min	2,9 ± 0,3	1,8 ± 0,4	1,3 ± 0,2	1,5 ± 0,2

8 Referências

Associação Brasileira de Transplantes de Órgãos.
<http://www.abto.org.br/abtov03/default.aspx?mn=476&c=0&s=157&pop=true>.

1. López-Navidad A, Caballero F, Guirado L, Solá R. The medical-nursing team specialized in the maintenance of the brain-dead heart-beating organ donor exclusively dedicated to caring for the donor reduces donor loss from asystolia to zero. *Transplant Proc.* 2002;34(1):20–2.
2. Youn TS, Greer DM. Brain death and management of a potential organ donor in the intensive care unit. *Crit Care Clin. Elsevier Inc;* 2014;30(4):813–31.
3. Kotloff RM, Blosser S, Fulda GJ, Malinoski D, Ahya VN, Angel L, et al. Management of the Potential Organ Donor in the ICU. *Crit Care Med.* 2015;43(6):1291–325.
4. Westphal GA, Coll E, de Souza RL, Wagner S, Montemezzo A, Cani de Souza FC, et al. Positive impact of a clinical goal-directed protocol on reducing cardiac arrests during potential brain-dead donor maintenance. *Crit Care. Critical Care;* 2016;20:323.
5. Fodstad H, Patrick KJ, Michael B. History of the cushing reflex. *Neurosurgery.* 2006;59(5):1132–7.
6. Tuttle-Newhall JE, Collins BH, Kuo PC, Schoeder R. Organ donation and treatment of the multi-organ donor. *Curr Probl Surg.* 2003;40(5):266–310.
7. Audibert G, Charpentier C, Seguin-Devaux C, Charretier P-A, 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.
8. Chen EP, Bittner HB, Kendall SW, Trigt VP. Hormonal and hemodynamic changes in a validated animal model of brain death.No Title. *Crit Care Med.* 1996;24(8):1352–9.
9. Cavalcanti DMH, Lotufo CMC, Borelli P, Ferreira ZS, Markus RP, Farsky SHP. Endogenous glucocorticoids control neutrophil mobilization from bone marrow to blood and tissues in non-inflammatory conditions. *Br J Pharmacol.* 2007;152(8):1291–300.
10. Simas R, Sannomiya P, Cruz JWMC, Correia C de 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.
11. Pinsard M, Ragot S, Mertes P, Bleichner J, 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.
12. Bevilacqua MP, Nelson RM. Selectins. *J Clin Invest.* 1993;91(2):379–87.

13. Etzioni A. Integrins - The glue of life. *Lancet*. 1999;353(9150):341–3.
14. Rosen SD. Ligands for L-Selectin: Homing, Inflammation, and Beyond. *Annu Rev Immunol*. 2004;22(1):129–56.
15. Mayadas TN, Cullere X. Neutrophil $\beta 2$ integrins: Moderators of life or death decisions. *Trends Immunol*. 2005;26(7):388–95.
16. Torres Filho IP, Contaifer Junior D, Garcia S, Torres LN. Effects of hypertonic saline solution on mesenteric microcirculation. *Shock*. 2001;15(5):353–9.
17. Nakagawa NK, Cruz RJ, Aikawa P, Correia CJ, Cruz JWMC, Mauad T, et al. Pentoxifylline attenuates leukocyte-endothelial interactions in a two-hit model of shock and sepsis. *J Surg Res*. 2015;193(1):421–8.
18. Nakagawa NK, Nogueira RA, Correia CJ, Shiwa SR, Costa Cruz JWM, Poli de Figueiredo LF, et al. Leukocyte-Endothelium Interactions After Hemorrhagic Shock/Reperfusion and Cecal Ligation/Puncture. *Shock*. 2006;26(2):180–6.
19. 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.
20. Alsaigh T. In vivo analysis of intestinal permeability following hemorrhagic shock. *World J Crit Care Med*. 2015;4(4):287.
21. Okamoto S, Corso C, Nolte D, Rascher W, Thiery J, Yamaoka Y, et al. Impact of brain death on hormonal homeostasis and hepatic microcirculation of transplant organ donors. *Transpl Int*. 1998;11 Suppl 1:S404-407.
22. Okamoto S, Yamamoto Y, Yamaoka Y, Messmer K. Liver transplants from brain-dead donors: Microcirculation and histomorphology. *Transplant Proc*. 2000;32(2):327.
23. Obermaier R, von Dobschuetz E, Keck T, Hopp H-H, Drognitz O, Schareck W, et al. Brain death impairs pancreatic microcirculation. *Am J Transplant*. 2003 Feb;4(2):210–5.
24. Skrabal CA, Thompson LO, Potapov E V., 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.
25. Vassilios AS, Wigfield CH, Kirby JA, Dark JH. The hemodynamic mechanisms of lung injury and systemic inflammatory response following brain death in the transplant donor. *Am J Transplant*. 2005;5(4 I):684–93.

26. Koudstaal LG, 'T Hart NA, Van Den Berg A, Olinga P, Van Goor H, Ploeg RJ, et al. Brain death causes structural and inflammatory changes in donor intestine. *Transplant Proc.* 2005;37(1):448–9.
27. Silva IA, Correia CJ, Simas R, Correia CDJ, Cruz JWMC, Ferreira SG, et al. Inhibition of autonomic storm by epidural anesthesia does not influence cardiac inflammatory response after brain death in rats. *Transplant Proc. Elsevier Inc.*; 2012;44(7):2213–8.
28. Velasco I, Pontieri V, Rocha e Silva M, Lopes O. Hyperosmotic NaCl and severe hemorrhagic shock. *Am J Physiol.* 1980;239(5):H664-73.
29. Pascual JL, Khwaja K a, Chaudhury P, Christou N V. Hypertonic saline and the microcirculation. *J Trauma.* 2003;54(5 Suppl):S133–40.
30. Rocha-e-Silva M, Poli de Figueiredo LF. Small volume hypertonic resuscitation of circulatory shock. *Clinics.* 2005;60(2):159–72.
31. Poli-de-Figueiredo LF, Cruz RJJ, Sannomiya P, Rocha-E-Silva M. Mechanisms of action of hypertonic saline resuscitation in severe sepsis and septic shock. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.* 2006;6(2):201–6.
32. Shukla A, Hashiguchi N, Chen Y, Coimbra R, Hoyt DB, Junger WG. Review Article Osmotic regulation of cell function and possible clinical applications. *Shock.* 2004;21(5):391–400.
33. Zanoni FL, Costa Cruz JWM, Martins JO, Benabou S, Vicente Greco K, Ramos Moreno AC, et al. Hypertonic saline solution reduces mesenteric microcirculatory dysfunctions and bacterial translocation in a rat model of strangulated small bowel obstruction. *Shock.* 2013;40(1):35–44.
34. White H, Cook D, Venkatesh B. The use of hypertonic saline for treating intracranial hypertension after traumatic brain injury. *Anesth Analg.* 2006;102(6):1836–46.
35. Dostal P, Schreiberova J, Dostalova V, Dostalova V, Tyll T, Paral J, et al. Effects of hypertonic saline and mannitol on cortical cerebral microcirculation in a rabbit craniotomy model. *BMC Anesthesiol. BMC Anesthesiology*; 2015;15(1):88.
36. Badiwala M V., 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(SUPPL. 1):206–15.
37. Sztark F, Tentillier E, Thicoipé M, Gékière JP, Lassié P, Petitjean ME, et al. Use of Hypertonic Saline Solution in the Resuscitation of Brains-Dead. *Transpl Proc.* 1995;27(4):2473.

38. Rocha de Sousa PT, Breithaupt-Faloppa AC, Correia C de J, Simao RR, Ferreira SG, Fiorelli AI, et al. 17β -Estradiol prevents mesenteric injury induced by occlusion of the proximal descending aorta in male rats. *J Vasc Surg. Society for Vascular Surgery*; 2017;(1):1–10.
39. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-CT} Method. *Methods*. 2001;25:402–8.
40. Assadi A, Desebbe O, Rimmelé T, Florence A, Goudable J, Chassard D, et al. Small-volume hypertonic saline/pentastarch improves ileal mucosal microcirculation in experimental peritonitis. *Infect Dis Rep*. 2012;4(1):77–83.
41. Wu C, Chan K, Cheng Y, Yeh Y, Chien C. Effects of different types of fluid resuscitation for hemorrhagic shock on splanchnic organ microcirculation and renal reactive oxygen species formation. *Crit care. Critical Care*; 2015;19(1):434.
42. Molnár G, Csonka E, Vass A, Boros M, Kaszaki J. Circulatory consequences of reduced endogenous nitric oxide production during small-volume resuscitation. *Acta Physiol Hung*. 2011;98(4):393–408.
43. Bourque SL, Davidge ST, Adams MA. The interaction between endothelin-1 and nitric oxide in the vasculature: new perspectives. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol*. 2011;300(6).
44. Yamagami K, Hutter J, Yamamoto Y, Schauer RJ, Enders G, Leiderer R, et al. Synergistic effects of brain death and liver steatosis on the hepatic microcirculation. *Transplantation*. 2005;80(4):500–5.
45. Menegat L, Simas R, Caliman JM, Zanoni FL, Jacysyn JF, da Silva LFF, et al. Evidence of bone marrow downregulation in brain-dead rats. *Int J Exp Pathol*. 2017;98(3):158–65.