

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO**

GUILHERME NAVES DE LIMA ALVES

**TERAPIAS DE MANUTENÇÃO NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA DA MORTE
ENCEFÁLICA – MODELO EXPERIMENTAL EM COELHOS**

**CURITIBA
2019**

GUILHERME NAVES DE LIMA ALVES

**TERAPIAS DE MANUTENÇÃO NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA DA MORTE
ENCEFÁLICA – MODELO EXPERIMENTAL EM COELHOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
da Saúde da Pontifícia Universidade
Católica do Paraná, como requisito parcial
à obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Cesar Guarita
Souza.

**CURITIBA
2019**

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central
Edilene de Oliveira dos Santos CRB 9 / 1636

A474t
2019

Alves, Guilherme Naves de Lima

Terapias de manutenção na resposta inflamatória da morte encefálica :
modelo experimental em coelhos / Guilherme Naves de Lima Alves ; orientador,
Luiz Cesar Guarita Souza. -- 2019
38 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná,
Curitiba, 2019
Inclui bibliografias

1. Transplante de órgãos e tecidos, etc. – Inflamação. 2. Morte cerebral. 3.
Doação de órgãos, tecidos, etc. I. Guarita Souza, Luiz Cesar.
II. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde. III. Título.

CDD 20. ed. – 617.75



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Escola de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

**ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE EXAME DE DISSERTAÇÃO DO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE EM NÍVEL
DE MESTRADO DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ.**

Aos 20 dias do mês de novembro de 2019 às 12:00, realizou-se a sessão pública de Defesa de Dissertação "Terapias de Manutenção na Resposta Inflamatória da Morte Encefálica– Modelo Experimental em Coelhos" apresentado por **Guilherme Naves de Lima Alves** para obtenção do título de mestre; Área de concentração: Medicina e áreas afins.

A banca examinadora foi composta pelos seguintes membros:

MEMBROS DA BANCA	ASSINATURA
Prof. Dr. Luiz César Guarita Souza – Presidente (PUCPR)	
Profa. Dra. Vanessa Santos Sotomaior (PUCPR)	
Prof. Dr. Gustavo Carvalho (Hospital de Clínicas)	

De acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora deliberou sobre os conceitos a serem distribuídos e que foram os seguintes:

Prof. Dr. Luiz César Guarita Souza

Conceito:

APROVADO

Profa. Dra. Vanessa Santos Sotomaior

Conceito:

APROVADO

Prof. Dr. Gustavo Carvalho

Conceito:

APROVADO

Parecer Final:

APROVADO

Observações da Banca Examinadora:

Prof. Dr. Luiz César Guarita Souza
Presidente da Banca Examinadora

Profa. Dra. Cristina Pellegrino Baena
Coordenadora do PPGCS-PUCPR

À minha amada Tayná Padilha Miranda.
Aos meus pais, minha irmã e aos meus familiares e amigos.

AGRADECIMENTOS

Ao Pai Celestial, pela vida, pela capacidade e pela possibilidade de trilhar este caminho de constante evolução. Muito obrigado pelas oportunidades que surgem em meu caminho.

À minha namorada, Tayná Padilha Miranda, por sua parceria e companheirismo incondicionais, sem você e seu apoio este trabalho não seria possível.

À minha família, em especial aos meus pais Adriana e Heitor e a minha irmã Júlia, por sempre me motivarem a ser melhor. Além, é claro, dos meus sogros Sérgio Antônio Alves Miranda e Sandra Mara Padilha Miranda e Taynara Padilha Miranda por sempre estarem ao meu lado.

À Professora Dra. Luana Alves Tannous pelo apoio e parceria durante a realização deste Projeto, bem como a Rafael Luiz Pinto e Tatiana Badotti pelo auxílio durante a fase de experimento.

Ao amigo/irmão Raul Nishi Pigatto por sempre estar disponível e dedicar incontáveis horas de trabalho neste estudo.

Ao Professor Dr. Sérgio Luiz Rocha, por ceder o Laboratório de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental para realização do experimento, como pela confiança e por todos os ensinamentos e técnicas compartilhadas durante a minha primeira pesquisa científica. Esta oportunidade me abriu diversas portas e despertou minha paixão pela cirurgia experimental, e sem dúvidas levarei seu exemplo de rigor ético e respeito com uso de animais por toda vida.

Ao amigo Misael Gomes Barbosa pelo empenho durante a realização do experimento e por se dedicar totalmente em tudo que faz. Sempre serei grato pelas diversas oportunidades apresentadas durante todos esses anos, pela amizade e confiança. Muito obrigado.

Ao Laboratório de Patologia da PUCPR, em especial à Professora Dra. Lúcia de Noronha pela concessão do espaço e dos kits de reagentes para imunoistoquímica, além da conferência de fixação das lâminas; à Caroline Buzatta Vaz de Paula pelo auxílio durante a realização do TMA e na confecção das lâminas de imunoistoquímica; à Ana Paula C. Martins pelo auxílio na confecção das lâminas histológicas e a Seigo Nagashima por sua dedicação e paciência durante a digitalização das lâminas e no meu treinamento para manipulação dos softwares de análise histológica e imunoistoquímica.

À Professora Dra. Cassiana Maria Garcez Ramos, por seu apoio e ensinamentos, principalmente nas fases iniciais deste Projeto.

À equipe de veterinários que realizaram os procedimentos anestésicos, em especial à Professora Dra. Celina Tie Nishimori Duque e à Andressa Vieira.

Ao Professor Dr. Carlos Alberto Mayora Aita, responsável técnico pelo laboratório Diagnósticos do Brasil, e à funcionária Karla Kroker, pelo auxílio durante a análise dos marcadores inflamatórios séricos.

Aos amigos Amaury Ramon Sauvesuk, Glauco de Souza Fonseca, Mathias Diogo Mattuela, Matheus Boer Casonato e Mariana Prado Komada por serem minha segunda família.

A Fernando Todt Carbonieri, pela sua amizade, confiança e constante referência, e é claro, à toda equipe da Academia Médica pelos constantes ensinamentos e pelo belo trabalho realizado em prol da Medicina Brasileira.

Ao BEPiD / Apple Developer Academy e ao Professor Dr. Fábio Vinicius Binder por terem me agraciado com uma das experiências mais transformadoras de toda minha vida. Meu muito obrigado também ao Professor Maicris Fernandes e a todos professores, monitores e colegas de turma que me auxiliaram durante esta jornada.

Ao hiPUC e aos professores Professor Dr. Marcelo Pilonetto, Dr. Robson Capasso, Dr. Ravi Pamnani, Dr. Eric Sokol e Dr. Robert Chang pela oportunidade de me unir a pessoas tão brilhantes em busca de um propósito nobre. Obrigado.

À Professora Dra. Marcia Olandoski e à Rafaela Bernardelli por compartilharem de modo tão genuíno seus conhecimentos em estatística.

Ao núcleo de pesquisas da PUCPR, em especial às professoras Dra. Cleybe H. Vieira (Coordenadora da Iniciação Científica da PUCPR) e Dra. Paula Cristina Trevilatto (Pró-Reitora de Pesquisa e Pós-Graduação) pela oportunidade de realizar este Projeto como bolsista PIBIC Master.

À Pontifícia Universidade Católica do Paraná, por ter sido minha segunda casa nos últimos seis anos, e ter me agraciado com amigos que levarei para vida toda e pelas diversas oportunidades ofertadas durante minha vida acadêmica. Muito obrigado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – PPGCS e à Professora Dra. Cristina Pellegrino Baena por todo suporte e estrutura disponibilizados durante a realização deste Mestrado. Aos meus colegas de programa pelos conselhos, apontamentos, críticas e sugestões, vocês foram essenciais para lapidação deste Projeto. Meu muito obrigado também à Jane Fabia Domênica e a Paula Maira Nascimento por toda ajuda e paciência durante minha permanência no programa.

E por fim, um agradecimento especial ao meu orientador Professor Dr. Luiz César Guarita Souza, grande exemplo de médico, cirurgião e pesquisador, pela constante orientação, confiança e amizade durante a realização deste Trabalho. Seus conselhos e apontamentos me tornaram um pesquisador mais eficiente e um médico melhor. Muito obrigado.

“Arrisque-se! Toda vida é um risco. O homem que vai mais longe é geralmente aquele que está disposto a fazer e a ousar. O barco da 'segurança' nunca vai muito além da margem.”

Dale Carnegie

RESUMO

Introdução: a Morte Encefálica (ME) é consequência de um processo de lesão encefálica grave que resulta em isquemia sistêmica, iniciando uma cascata inflamatória com aumento de lactato, interleucinas 6 (IL-6) e 10 (IL-10), fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e outros marcadores inflamatórios. Pacientes em ME são candidatos à doação de órgãos, fato que torna importante a compreensão do processo fisiopatológico deste evento, bem como a instituição de condutas adequadas a fim de manter o potencial doador. Sabe-se que, a ME isoladamente é um fator de risco para pior prognóstico pós-transplante, tendo em vista que, receptores de doadores vivos apresentam menores taxas de complicações quando comparados a doadores em ME. Acredita-se, atualmente, que a base dessa manutenção seja o controle e a estabilidade hemodinâmica. **Objetivos:** analisar o padrão de resposta inflamatória sérica e *in situ* em coelhos submetidos à morte encefálica e correlacionar com as diferentes propostas terapêuticas utilizadas. **Materiais e Método:** Vinte coelhos machos Nova Zelândia foram divididos em 4 grupos (n=5): *sham* (craniotomia + sedação), controle (indução de ME + infusão de cristaloides), suporte básico (ME + infusão de cristaloides e noradrenalina (NA)), suporte avançado (ME + infusão de cristaloides + vasopressina + levotiroxina + metilprednisolona + NA). Os animais foram acompanhados por quatro horas com monitorização contínua e coleta de sangue nos momentos: indução anestésica e 4 horas após a ME para análise sérica da IL-6 e TNF α . Após o término do estudo, coração, pulmões, fígado e rins foram retirados e analisados utilizando imunoistoquímica (IL-6 e IL-10, TNF α e antígeno leucocitário humano (HLA)). **Resultados:** Na avaliação dos marcadores inflamatórios séricos, IL-6 e TNF α não houve diferença com significância estatística em nenhum dos parâmetros avaliados (p=0,47 e p=0,86). Na análise dos marcadores inflamatórios *in situ*, houve diferença estatística na comparação entre os animais do grupo *sham* e suporte básico nas lâminas de coração em relação aos marcadores IL-6 (p=0,047) e TNF α (p=0,005), tendo os animais do grupo *sham* apresentado valores médios inferiores ao suporte básico. Os demais marcadores e órgãos não apresentaram diferença estatística em suas comparações. **Conclusão:** Neste estudo, a estratégia de manejo clínico de suporte avançado não demonstrou menor reação inflamatória sérica e *in situ* quando comparada a outras modalidades de manutenção do potencial doador. Observou-se que, os animais do grupo suporte básico apresentaram níveis mais elevados de marcadores inflamatórios quando comparados ao grupo *sham*, demonstrando que o emprego de manejo clínico pautado no uso de solução fisiológica pode ser superior ao uso de drogas vasoativas.

Palavras-chave: Morte Encefálica. Potencial Doador de Órgãos. Transplante. Inflamação.

ABSTRACT

Introduction: brain death (BD) is a consequence of a severe brain injury process that results in systemic ischemia, initiating an inflammatory cascade with increased lactate, interleukin 6 (IL-6) and interleukin 10 (IL-10), tumor necrosis factor alpha (TNF α) and other inflammatory markers. Patients in brain death (BD) are candidates for organ donation, fact that makes important to understand the pathophysiological process of this event, as well as the establishment of appropriate conducts in order to maintain the potential donor. Brain death itself is known to be a risk factor for worse post-transplant prognosis, considering that receptors of living-donors have lower complication rates when compared to brain-death donors. Currently, it is believed that the basis of the maintenance is control and hemodynamic stability. **Objectives:** To analyze the pattern of serum and *in situ* inflammatory response in rabbits submitted to brain death and correlate them with the different therapeutic proposals used in each group. **Materials and Method:** Twenty male New Zealand rabbits were divided into 4 groups (n=5): *sham* (craniotomy + sedation), control (BD induction + crystalloid infusion), basic support (BD + crystalloid infusion and noradrenaline (NA)), advanced support (BD + crystalloid infusion + vasopressin + levothyroxine + methylprednisolone + NA). The animals were followed for four hours with continuous monitoring and blood collection at moments at the time: anesthetic induction and 4 hours after BD for serum analysis of interleukin 6 and TNF α (TNF α). After completion of the study, heart, lungs, liver and kidneys were removed and analyzed using immunohistochemistry (Interleukins 6 and 10, TNF α and HLA). **Results:** In the evaluation of serum inflammatory markers IL-6 and TNF α there was no statistically significant difference in any of the evaluated parameters (p=0,47 and p=0,86). In the analysis of *in situ* inflammatory markers, there was a statistical difference in the comparison between the animals of *sham* group and basic support in heart slides in relation to IL-6 (p=0,047) and TNF α (p=0,005) markers, however *sham* group presented lower mean values than basic support group. Other markers and organs showed no statistical difference in their comparisons. **Conclusions:** In this study, the strategy of advanced clinical management support did not show a lower serum and *in situ* inflammatory reaction when compared to other modalities of potential donor maintenance. Animals from basic support group presented higher levels of inflammatory markers when compared to *sham* group, demonstrating that clinical management based on the use of physiological can be superior to vasoactive drugs.

Keywords: Brain death. Potential organ donor. Transplant. Inflammation

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Posicionamento do animal para intubação

Figura 02: Inserção do cateter Fogarty® 4 F

Figura 03: Imunoistoquímica em tecidos cardíaco, pulmonar, renal e hepático.

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Análise comparativa dos valores séricos de IL-6

Tabela 02: Análise comparativa dos valores séricos de TNFa

Tabela 03: Painel imunoistoquímico do coração

Tabela 04: Painel imunoistoquímico do fígado, pulmão e rim

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 01: Variação dos níveis de Interleucina 6 durante o estudo

Gráfico 02: Variação dos níveis de TNF alfa durante o estudo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 JUSTIFICATIVA.....	3
3 OBJETIVOS	4
3.1. OBJETIVO GERAL	4
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
3.3. HIPÓTESE	4
4 REVISÃO DE LITERATURA	5
4.1. MORTE ENCEFÁLICA.....	5
4.2. DOAÇÃO E TRANSPLANTE DE ÓRGÃOS	6
4.3. REPERCUSSÕES DA MORTE ENCEFÁLICA.....	7
5 ARTIGO.....	10
6 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	29
6.1. LIMITAÇÕES DO ESTUDO	29
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30

1 INTRODUÇÃO

A evolução da Medicina, durante o último século, trouxe avanços esperados há centenas de anos, dentre esses o Transplante de Órgãos (TO) e tecidos, uma das mais revolucionárias descobertas da época. Todos os anos de pesquisa e trabalho de diversos cientistas em todo mundo culminaram nos primeiros transplantes de órgãos bem-sucedidos em humanos, na década de 1950. Com esse feito, o curso natural de várias doenças estaria prestes a se modificar e isso alteraria drasticamente o modo como os seres humanos encarariam seus conceitos de corpo, vida e morte ¹⁻³.

Na década seguinte, os pesquisadores perceberam que apenas o transplante in vivo não seria suficiente para suprir as demandas dos pacientes. Essa necessidade levou a busca por soluções, não só para os problemas relacionados à quantidade, como também à variedade de órgãos a serem transplantados, sendo que, até aquele momento, o único transplante realizado era o renal com doadores vivos. Dessa forma, alguns cirurgiões passaram a realizarem transplantes com doadores falecidos, porém, com taxas de insucesso extremamente elevadas. De modo paralelo, surgiu de forma controversa no meio científico o conceito de Morte Encefálica (ME), mudando drasticamente a disponibilidade de órgãos para transplante ^{1,2}.

A ME é consequência de um processo de lesão encefálica grave que culmina em isquemia sistêmica, gerando processo inflamatório e aumento de lactato, interleucinas; fator de necrose tumoral alfa (TNF α); proteína C reativa (PCR) e procalcitonina. Uma vez que, os pacientes em ME são candidatos à doação de órgãos, a compreensão do processo fisiopatológico desse evento, bem como a instituição de condutas adequadas, a fim de manter o potencial doador se tornam extremamente importantes.⁴

Há poucas informações disponíveis sobre como estabelecer uma terapêutica para manter o potencial doador e orientações formais são escassas ^{1,5,6}. Acredita-se, porém, que o potencial doador seja mantido com a estabilidade hemodinâmica, reposição hormonal tireoidiana e de corticoides; ventilação mecânica, manejo da glicemia e de possíveis infecções ou arritmias. A comprovação de que tais medidas possam controlar a resposta inflamatória e proteger os órgãos a serem doados seria um estímulo ao emprego delas à beira do leito ^{4,7,8}

Mesmo com o aumento no número de potenciais doadores notificados, doadores efetivos e até mesmo de transplantes efetivos nos últimos 7 anos, a discrepância entre a oferta e demanda continua sendo um grande problema de saúde pública ^{4,9}. Apenas no Brasil, em 2018, mais de 33.000 pacientes aguardavam na fila de espera para TO; nesse mesmo ano foram realizados pouco mais de 8.500 TO em todo país, sendo que destes, mais de 85% foram provenientes de doadores em Morte Encefálica ⁹.

Dessa forma, existe a necessidade de se esclarecer a resposta inflamatória nas diversas modalidades de cuidados aos pacientes em morte encefálica e potenciais doadores de órgãos e, além disso, definir a melhor estratégia para aperfeiçoar o processo de cuidados na doação e transplante de órgãos, já que não existem na literatura estudos que contemplem esse assunto ¹⁰⁻¹².

2 JUSTIFICATIVA

A escassez de informações na Literatura Científica sobre o protocolo ideal de manutenção do potencial doador de órgãos e o grande problema de saúde pública, ilustrado pelo insuficiente número de órgãos a serem doados, demonstram a necessidade de esclarecer as repercussões inflamatórias nas diversas modalidades de cuidados aos pacientes em Morte Encefálica e potenciais doadores de órgãos, bem como definir a melhor estratégia para aperfeiçoar o processo de cuidados na doação e transplante de órgãos.

3 OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Comparar as alterações inflamatórias causadas pela indução de Morte Encefálica em animais submetidos a diferentes terapias de manutenção.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos são:

- a) Verificar a resposta inflamatória sérica em animais submetidos à morte encefálica e comparar com os animais que receberam terapia de manutenção
- b) Comparar as repercussões inflamatórias *in situ* nos órgãos-alvo (rins, fígado, coração e pulmões) entre as diferentes modalidades de terapia de manutenção.

3.3. HIPÓTESE

O controle hemodinâmico mais abrangente resulta em uma menor resposta inflamatória sérica e *in situ*.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1. MORTE ENCEFÁLICA

A primeira definição aceita de ME surgiu em Boston no ano de 1968, quando um Comitê *ad hoc* da Universidade de Harvard, criou o termo ME e o definiu como “abolição da função do encéfalo, tronco e frequentemente medula espinhal”. Além destes critérios, o Comitê acrescentou medidas de controle, a fim de evitar fatores de confusão, como uso de drogas sedativas e alterações de temperatura ^{1,3,13}.

O artigo original gerado por este Comitê também foi uma das primeiras publicações na história a questionar o conceito de ME no seu sentido legal, e utilizando dois exemplos de processos julgados, pouco tempo antes de sua publicação, demonstrou o quanto eram discrepantes e subjetivas as definições de morte, reafirmando a importância de se estabelecer de forma criteriosa e clara a definição da ME e por consequência critérios para emissão do atestado de óbito legal ¹³.

No Brasil, essa definição foi utilizada por muitos anos, quando em 1997 a Resolução 1480/97 do Conselho Federal de Medicina (CFM), definiu ME como parada total e irreversível das funções encefálicas, de causa conhecida e constatada de modo indiscutível, caracterizada por coma aperceptivo, com ausência de resposta motora supra espinhal e apneia ¹⁴.

Em 2002, Wijdicks avaliou dados sobre ME em 80 (42%) países dos 189, até então, registrados na Organização das Nações Unidas (ONU). Em seu estudo, dos 80 países avaliados, apenas 55 (69%) apresentavam alguma norma oficial ou lei específica para ME, enquanto cerca de 70 países possuíam algum tipo de diretriz ou código de prática para ser aplicado frente ao paciente em ME ¹⁵.

Neste mesmo estudo, um fator que apresentava claramente uma discordância entre as diretrizes adotadas era a quantidade de médicos necessários para o diagnóstico da Morte Encefálica, sendo que em 31 países (44%) apenas um médico seria suficiente para firmar o diagnóstico, seguido por 24 países (34%) onde seriam necessários ao menos dois médicos para o diagnóstico e 11 diretrizes (16%), onde seriam necessários de dois a quatro médicos para efetuar o diagnóstico, sendo que quatro diretrizes não especificavam este número ¹⁵.

Em 2017, aproximadamente 15 anos após o estudo publicado por Wijdicks, o CFM acrescentou em sua resolução que, obrigatoriamente, a lesão encefálica apresentada deveria ser de causa conhecida, irreversível e capaz de causar ME. Além disso, não poderiam estar presentes fatores tratáveis que confundiriam o seu diagnóstico e seria necessário um período mínimo de observação para a constatação da morte, que variava de acordo com a faixa etária do paciente. O CFM também definiu que, o protocolo de ME deveria ser obrigatoriamente realizado por dois médicos treinados, sem qualquer tipo de benefício secundário ou vínculos com serviços de transplantes¹⁶.

Essas atualizações permitiram a evolução e modernização da notificação do potencial doador no país, fato extremamente importante, visto que, a grande maioria dos transplantes realizados no mundo provém de enxertos de doadores em ME, sendo necessário, portanto, reconhecer e confirmar o diagnóstico da ME o mais brevemente possível¹⁷⁻²⁰.

4.2. DOAÇÃO E TRANSPLANTE DE ÓRGÃOS

Em todo o mundo, governos, organizações e associações se unem para melhorar o atual cenário das filas de transplante. Ainda sim, existe uma grande desproporção entre a lista de pacientes que necessitam de transplante de órgãos e a disponibilidade desses para doação. Esse problema tem um caráter global e gravemente impactante, dessa forma, a Organização Mundial de Saúde (OMS) publicou um estudo demonstrando que, em 2015, menos de 10% da necessidade global de transplantes foi atendida, apesar de terem sido realizados 126.670 transplantes de órgãos sólidos em todo o mundo^{10,21}.

Nesse contexto, depara-se com uma série de fatores que criam barreiras ao transplante de órgãos no Brasil e no mundo, como falta de padronização de protocolos para o diagnóstico de morte cerebral; falta de reconhecimento dessa condição pelos próprios médicos e equipes de saúde; existência de tráfico de órgãos; comunicação inadequada entre equipe de assistência e família e a falha na manutenção clínica do potencial doador^{7,8,22,23}. Todos esses fatores contribuem de forma direta ou indireta para o aumento do número de dias de internamento, custos com o tratamento e, principalmente, para o aumento de taxas de rejeição^{11,24,25}.

Ainda assim, o Brasil possui, atualmente, um dos maiores serviços públicos de transplante do mundo, contando com diversos hospitais e centros de alta complexidade; apoio aéreo das forças armadas e convênios com companhias aéreas para transporte e remoção de órgãos e pacientes; laboratórios de alta performance integrados e um sistema de ambulatórios especializados com disponibilização gratuita de medicamentos para os pacientes transplantados ²⁶.

4.3. REPERCUSSÕES DA MORTE ENCEFÁLICA

Como relatado anteriormente, desde o início das pesquisas com transplantes, sabe-se que a ME por si só é fator de risco para disfunções orgânicas no pré-transplante, reduzindo drasticamente as taxas de sucesso do procedimento em pacientes receptores de doadores cadavéricos. Isso ocorre pela cascata de eventos e processos que se iniciam após uma lesão neurológica grave. Esses eventos provocam a chamada “tempestade autonômica”, caracterizada por hipertensão intracraniana e hipertensão sistêmica grave. Esse fenômeno é conhecido como resposta de Cushing e consiste da tríade composta por herniação cerebral, bradicardia transitória e instabilidade hemodinâmica; essa última associada à falência múltipla de órgãos e uma intensa atividade inflamatória sistêmica ^{4,5,25,27}.

Murugan *et al.* realizaram um estudo entre 2006 e 2007, no qual vinte e um pacientes declarados como potenciais doadores tiveram suas funções hemodinâmicas e inflamatórias acompanhadas (TNFa, IL-6 e IL-10). Os marcadores inflamatórios eram avaliados em dois momentos, depois de quatro horas após a declaração do potencial doador e a segunda coleta imediatamente antes da cirurgia para captação. Após a análise dos dados foi observado que, os pacientes que eram responsivos a volume apresentavam níveis séricos mais elevados das citocinas avaliadas. Os autores também constataram que, os pacientes que apresentaram essa maior responsividade a volume e, por consequência uma maior hipovolemia, doaram menos órgãos que os pacientes que mantiveram um melhor controle hemodinâmico. Com esses dados em mãos, puderam afirmar que, a hipovolemia estaria associada a uma maior atividade inflamatória e consequente redução no número de órgãos doados ²⁸.

O principal desafio na manutenção do potencial doador é a instabilidade hemodinâmica, dividida didaticamente em dois momentos. O primeiro é caracterizado como fase hipertensiva, que ocorre pela grande liberação de catecolaminas após a agressão cerebral, na tentativa de melhorar o fluxo sanguíneo para o encéfalo. Essas catecolaminas provocam vasoconstrição periférica, diminuindo a oferta de oxigênio aos órgãos e iniciando um quadro de acidose metabólica. Entretanto, a tempestade adrenérgica não consegue se sustentar por muito tempo, e então, a segunda fase se instala por meio de hipotensão gerada por uma vasodilatação reflexa. Os baixos níveis de catecolaminas levam a um baixo débito cardíaco, que passa a ser o responsável pela hipóxia, piorando o quadro de acidose. A agressão causada pelos baixos níveis de oxigênio e a redução do pH desencadeiam uma resposta inflamatória^{17,29,30}.

A resposta inflamatória, por sua vez, segue uma cascata, com a liberação de diversas citocinas, tais quais interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), interleucina-10 (IL-10), TNF α e outros mediadores, como a proteína C reativa (PCR) e procalcitonina, além do aumento de moléculas de adesão celular e infiltração leucocitária nos órgãos. Não existe uma sequência bem definida dessa cascata inflamatória, porém, tem sido proposto que a IL-6 e o TNF α tenham funções predominantes e sejam os principais mediadores inflamatórios da ME. Essa complexa rede de processos de agressão aos órgãos também conta com um fator metabólico, causado pelos baixos níveis séricos de hormônio tireoidiano (T3) e de corticosteroides, que colaboram para o aumento da resposta inflamatória sistêmica e pioram o quadro de instabilidade hemodinâmica^{6,17,31-34}.

Um dos estudos que comprovam o papel importante da reposição hormonal na ME foi realizado por Hing *et al.* Em seu experimento, 22 porcos foram divididos em 2 grupos: grupo controle (GC) e grupo reposição hormonal (RH). Todos os animais receberam a indução da ME e na sequência, após a estabilização clínica pós-ME, os animais do grupo RH foram mantidos com o suporte básico (fluidos e noradrenalina), além de reposição hormonal com hormônio tireoidiano, corticoides, insulina e vasopressina, enquanto os animais do GC receberam apenas o suporte básico. Após avaliações seriadas divididas entre a indução da ME, 3 e 6 horas após a ME, os autores conseguiram observar que no período final do experimento o grupo RH apresentou um uso menor de noradrenalina, como também níveis mais elevados de Pressão Arterial Média (PAM) e uma melhor contratilidade cardíaca. Ficando claro,

portanto, que no modelo experimental utilizando a reposição hormonal houve associação com melhor controle hemodinâmico e melhora na função cardíaca.

Além desses mecanismos, recentemente foi descoberto uma nova cascata iniciada a nível molecular que resulta em uma maciça liberação de substâncias que elevam os níveis de estresse oxidativo, e assim, aumentam ainda mais a liberação de citocinas inflamatórias ¹².

Wang *et al.* demonstraram em um estudo experimental com camundongos que proteínas dissulfeto isomerasas (PDIs) como a PDIA3, estariam diretamente ligadas à ativação e modulação de respostas inflamatórias na lesão encefálica, além de possuírem papel importante no mecanismo de apoptose celular e estresse oxidativo. Além disso, o estudo evidenciou que a supressão do PDIA3 foi capaz de atenuar a resposta inflamatória e a liberação de espécies reativas de oxigênio ¹².

Atualmente é comprovado que, a uniformização de condutas no manejo do potencial doador resulta em maior quantidade de órgãos disponíveis para doação, menores taxas de complicações pós-transplante e melhor desfecho. Tem sido proposto que esses resultados tenham relação com uma ação anti-inflamatória proporcionada pelo efeito conjunto de ventilação mecânica protetora, controle hemodinâmico adequado e uso de terapia hormonal combinada ^{4,17,35-37}.

O objetivo principal da terapia de manutenção é justamente controlar os danos causados pela instabilidade hemodinâmica e deficiência hormonal, que são os principais agentes agravantes da resposta inflamatória. Os poucos estudos disponíveis sobre o tema recomendam o uso de vasodilatadores (para hipertensão arterial grave), reposição volêmica com solução salina isotônica para hipotensão, vasopressores como a vasopressina (potente vasoconstritor da musculatura lisa vascular) nos casos de hipotensão refratária, tratamento de arritmias, reposição de hormônio tireoidiano e corticoides. Além disso, sugerem tratamento precoce de infecções, uso de ventilação mecânica protetora, prevenção de diabetes *insipidus* e controle agressivo da glicemia. Todas essas medidas visam reduzir os danos causados pela hipoperfusão dos órgãos e pela atividade inflamatória, e consequentemente, melhorar a condição do órgão a ser transplantado ^{4,17,31,36,37}.

5 ARTIGO

TERAPIA DE MANUTENÇÃO EM MORTE ENCEFÁLICA NÃO REDUZ A RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM MODELO EXPERIMENTAL EM COELHOS

Guilherme Naves de Lima Alves¹, Sergio Ossamu Ioshii¹, Luana Alves Tannous¹, Raul Nishi Pigatto¹, Rafael Luiz Pinto¹, Katherine Athayde Teixeira de Carvalho², Júlio Cesar Francisco³ e Luiz Cesar Guarita-Souza¹.

¹ PPGCS / Escola de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), – R. Imaculada Conceição, 1155 – Curitiba, Paraná, Brasil.

² Departamento de Terapia Celular e Biotecnologia em Medicina Regenerativa, Instituto Pelé e Faculdades Pequeno Príncipe, – Ave. Silva Jardim, 1632 – Curitiba, Paraná, Brasil.

³ Universidade Positivo (UP), – R. Professor Pedro Viriato Parigot de Souza, 5300 - Campo Comprido, Curitiba, Paraná, Brasil.

* Correspondência: Guilherme Naves, navesguilherme@icloud.com; Tel.: +55 (41) 99794-4404 R. Imaculada Conceição, 1155, Laboratório de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental – Bloco Verde, CEP 80.215-901 – Curitiba, Paraná, Brasil.

Introdução: A Morte Encefálica (ME) é consequência de um processo de lesão encefálica grave que resulta em isquemia sistêmica, iniciando uma cascata inflamatória com aumento de lactato, interleucinas 6 (IL-6) e 10 (IL-10), fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e outros marcadores inflamatórios. Pacientes em ME são candidatos à doação de órgãos, fato que torna importante a compreensão do processo fisiopatológico deste evento, bem como a instituição de condutas adequadas, a fim de manter o potencial doador. Sabe-se que, a ME isoladamente é um fator de risco para pior prognóstico pós-transplante, tendo em vista que, receptores de doadores vivos apresentam menores taxas de complicações quando comparados a doadores em ME. Acredita-se, atualmente, que a base dessa manutenção seja o controle e a estabilidade hemodinâmica. **Objetivos:** Analisar o padrão de resposta inflamatória sérica e *in situ* em coelhos submetidos à morte encefálica e correlacionar com as diferentes propostas terapêuticas utilizadas. **Materiais e Método:** Vinte coelhos machos Nova Zelândia foram divididos em 4 grupos (n=5): sham (craniotomia + sedação), controle (indução de ME + infusão de cristaloides), suporte básico (ME + infusão de cristaloides e noradrenalina (NA)), suporte avançado (ME + infusão de cristaloides + vasopressina + levotiroxina + metilprednisolona + NA). Os animais foram acompanhados por quatro horas com monitorização contínua e coleta de sangue nos momentos: indução anestésica e 4 horas após a ME para análise sérica da IL-6 e TNF α . Após o término do estudo, coração, pulmões, fígado e rins foram retirados e analisados utilizando imunoistoquímica (IL-6 e IL-10, TNF α e antígeno leucocitário humano (HLA)). **Resultados:** Na avaliação dos marcadores inflamatórios séricos, IL-6 e TNF α não houve diferença com significância estatística em nenhum dos parâmetros avaliados (p=0,47 e p=0,86). Na análise dos marcadores inflamatórios *in situ*, houve diferença estatística na comparação entre os animais do grupo sham e suporte básico nas lâminas de coração em relação aos marcadores IL-6 (p=0,047) e TNF α (p=0,005), tendo os animais do grupo sham apresentado valores médios inferiores ao suporte básico. Os demais marcadores e órgãos não apresentaram diferença estatística em suas comparações. **Conclusão:** Nesse estudo, a estratégia de manejo clínico de suporte avançado não demonstrou menor reação inflamatória sérica e *in situ* quando comparada a outras modalidades de manutenção do potencial doador. Observou-se que, os animais do grupo suporte básico apresentaram níveis mais elevados de marcadores inflamatórios; quando comparados ao grupo sham, demonstrando que, o emprego de manejo clínico pautado no uso de solução fisiológica pode ser superior ao uso de drogas vasoativas.

Palavras-chave: Morte encefálica. Potencial doador de órgãos. Transplante. Inflamação.

1. INTRODUÇÃO

A evolução da Medicina, durante o último século, trouxe avanços esperados há centenas de anos. Dentre esses avanços, o Transplante de Órgãos (TO) e tecidos foram uma das mais revolucionárias descobertas do último século. Todos os anos de pesquisa e trabalho de diversos cientistas em todo mundo culminaram nos primeiros transplantes de órgãos bem-sucedidos em humanos, na década de 1950. Com esse feito, o curso natural de várias doenças estaria prestes a se modificar, e isso alteraria drasticamente o modo como os seres humanos encarariam seus conceitos de corpo, vida e morte ¹⁻³.

Na década seguinte, os pesquisadores perceberam que apenas o transplante *in vivo* não seria suficiente para suprir as demandas dos pacientes. Essa necessidade levou a busca por soluções, não só para problemas relacionados à quantidade, como também à variedade de órgãos a serem transplantados, sendo que, até aquele momento, o único transplante realizado era o renal com doadores vivos. Dessa forma, cirurgias passaram a realizar transplantes com doadores falecidos, porém, com taxas de insucesso extremamente elevadas. De modo paralelo, surgiu de forma controversa no meio científico o conceito de Morte Encefálica (ME), possibilitando uma mudança drástica na disponibilidade de órgãos para transplante ^{1,2}.

A ME é consequência de um processo de lesão encefálica grave que culmina em isquemia sistêmica, gerando processo inflamatório e aumento de lactato, interleucinas; fator de necrose tumoral alfa (TNF); proteína C reativa (PCR) e procalcitonina. Uma vez que, os pacientes em ME são candidatos à doação de órgãos, a compreensão do processo fisiopatológico desse evento, bem como a instituição de condutas adequadas, a fim de manter o potencial doador se tornam extremamente importantes.

Há poucas informações disponíveis sobre como estabelecer uma terapêutica adequada para manter o potencial doador, além disso, orientações formais são escassas ^{1,5,6}. Acredita-se, porém, que o potencial doador seja mantido com a estabilidade hemodinâmica, reposição hormonal tireoidiana e de corticoides; ventilação mecânica, manejo da glicemia e de possíveis infecções ou arritmias. A comprovação de que tais medidas possam controlar a resposta inflamatória e proteger os órgãos a serem doados seria um estímulo ao emprego delas à beira do leito ^{4,7,8}.

Mesmo com o aumento no número de potenciais doadores notificados, doadores efetivos e até mesmo de transplantes efetivos nos últimos 7 anos, a discrepância entre a oferta e demanda continua sendo um grande problema de saúde pública ^{4,9}. Apenas no Brasil, em 2018, mais de 33.000 pacientes aguardavam na fila de espera para TO; nesse mesmo ano foram realizados pouco mais de 8.500 TO em todo país, sendo que destes, mais de 85% foram provenientes de doadores em morte encefálica ⁹.

Dessa forma, é clara a necessidade de se esclarecer a resposta inflamatória nas diversas modalidades de cuidados aos pacientes em morte encefálica e potenciais doadores de órgãos e, além disso, definir a melhor estratégia para aperfeiçoar o processo de cuidados na doação e transplante de órgãos, já que não existem na literatura estudos que contemplem esse assunto ¹⁰⁻¹².

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Comparar as alterações inflamatórias causadas pela indução de Morte Encefálica em animais submetidos a diferentes terapias de manutenção.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos do trabalho são:

- a) Verificar a resposta inflamatória sérica em animais submetidos à Morte Encefálica e comparar com os animais que receberam terapia de manutenção; e
- b) Comparar as repercussões inflamatórias *in situ* nos órgãos-alvo (rins, fígado, coração e pulmões) entre as diferentes modalidades de terapia de manutenção.

2.3. HIPÓTESE

Acredita-se que o controle hemodinâmico mais abrangente resulte em uma menor resposta inflamatória sérica e *in situ*.

3. MATERIAIS E MÉTODO

3.1. ANIMAIS E PROCEDIMENTOS ÉTICOS

Foram utilizados 20 coelhos machos, da linhagem Nova Zelândia, com peso entre 4 e 5 Kg e aproximadamente 5 meses de idade. Os procedimentos cirúrgicos foram executados de acordo com os princípios éticos para experimentação em animais instituídos pela Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008. O estudo foi realizado após a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob o número 01153-2017 (Anexo 01). Em todas as fases do Trabalho foram utilizadas as normas e recomendações do *guideline* para estudos em animais ARRIVE ³⁸.

Os animais foram transferidos por via terrestre ao Laboratório de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental, cerca de 12 horas antes do início do experimento cirúrgico. Durante esse período, os coelhos foram mantidos em um ciclo de noite/dia de 12 horas, em ambiente com controle de ruídos, temperatura de 22°C e 60% de umidade, em gaiolas próprias e individuais. Os animais foram alimentados com ração padronizada e água *ad libitum* até 12 horas antes da indução anestésica.

3.2. GRUPOS

Os 20 animais foram numerados aleatoriamente e divididos por sorteio em 4 grupos (n=5):

- Grupo *sham*: anestesia + intubação/ventilação + craniotomia + infusão de cloreto de sódio 0,9% em *bolus* caso hipotensão (limite 40mg/Kg);
- Grupo controle: anestesia + intubação/ventilação + craniotomia + indução da ME + infusão de cloreto de sódio 0,9% em *bolus* caso hipotensão (limite 40mg/Kg);
- Grupo suporte básico: anestesia + intubação/ventilação + craniotomia + indução da ME + infusão de cloreto de sódio 0,9% em *bolus* caso hipotensão (limite 40mg/Kg) + infusão contínua de noradrenalina 0,05–2 mcg/Kg/min se instabilidade hemodinâmica;
- Grupo suporte avançado: anestesia + intubação/ventilação + craniotomia + indução da ME + infusão de cloreto de sódio 0,9% em *bolus* caso hipotensão (limite 40mg/Kg) + infusão contínua de vasopressina 0,04 U/h após primeiro bolus de cloreto de sódio 0,9% + metilprednisolona (15 mg/kg) + levotiroxina

(4 mg/kg) + noradrenalina 0,05–2 mcg/kg/min em caso de instabilidade hemodinâmica refratária;

3.3. PROCEDIMENTOS

A anestesia foi induzida com quetamina 35 mg/kg e xilazina 5 mg/kg, seguida de intubação orotraqueal com videolaringoscópio e ventilação mecânica (Figura 01). A analgesia foi realizada com dipirona endovenosa (500mg/ml) 25mg/kg. Todos os animais foram ventilados na modalidade pressão controlada utilizando um ventilador Puritan Bennett LP Achieva PS Ventilator®, com pressão de pico inspiratório de 20 cm H₂O, fração inspirada de oxigênio (FIO₂) de 100%, frequência respiratória de 50 ciclos/min e pressão positiva expiratória final (PEEP) de 8 cmH₂O³⁹.



Figura 01. Posicionamento do animal para intubação orotraqueal.

Duas veias periféricas foram puncionadas nos membros inferiores e a artéria média da orelha foi canulada para monitorização contínua da pressão arterial.

Todos os animais foram submetidos à anestesia local com 2ml de Lidocaína 2% antes da trepanação cirúrgica. O procedimento para indução da ME foi realizado nos grupos controle, suporte básico e suporte avançado (Figura 02), com a inserção de um cateter Fogarty® 4 F (Edwards Lifescience LLC, Irvine, CA, USA) pelo orifício da craniotomia. A indução da ME ocorreu pela rápida insuflação do cateter com 3 ml de ar ⁴⁰.

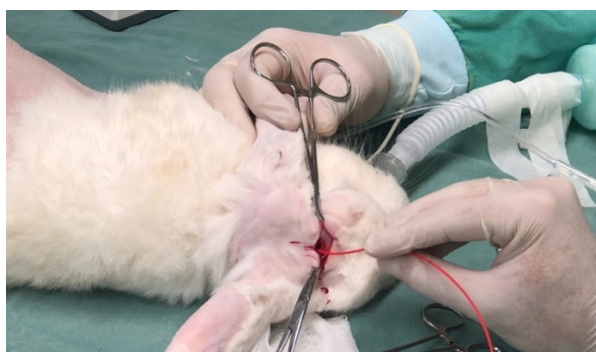


Figura 02. Pinças hemostáticas afastando pele para inserção do cateter Fogarty® 4 F no local da trepanação cirúrgica.

A ME foi confirmada por meio da observação de pico hipertensivo, ausência de reflexo corneano e midríase bilateral fixa⁴⁰.

Após a indução da ME, a anestesia foi suspensa nos grupos controle, suporte básico e suporte avançado. Os animais do grupo *sham* receberam doses extras de anestésico e analgésico para manutenção do plano anestésico ao longo de todo o tempo de avaliação.

Para evitar hipotermia, os animais foram aquecidos, com colchão térmico e compressas quentes, nas patas e orelhas. Todos receberam infusão das medicações de acordo com o previsto para cada grupo.

Os coelhos foram mantidos sob observação e monitorização clínica, com controle da Pressão Arterial Média (PAM), Frequência Cardíaca (FC), saturação de oxigênio (SatO₂) e temperatura retal por 4 horas. O alvo mínimo definido da pressão arterial média (PAM) foi de 65 mm/Hg. Após esse período, foi realizada a eutanásia com sobredose anestésica (tiopental sódio endovenoso, na dose de 150 mg/kg). Os órgãos foram retirados e armazenados, em solução de formol 10%, para posterior análise imunoistoquímica.

3.4. ANÁLISE LABORATORIAL

As coletas de sangue para análise das citocinas inflamatórias (IL-6 e TNFa) foram realizadas em dois momentos: imediatamente após a indução anestésica e 4 horas após ME. Foram coletados 1 ml de sangue arterial periférico por amostra. Todas as amostras foram centrifugadas, separando o plasma do soro. O plasma foi

acomodado em recipiente individual, identificado e armazenado a -80°C . Quarenta dias após o término do estudo experimental, as amostras de plasma foram descongeladas para análise simultânea dos níveis de IL-6 e TNF α . Os kits de ELISA utilizados foram específicos para coelhos (Cloud-Clone Corp® SEA079Rb e Cloud-Clone Corp® SEA133Rb). A análise foi executada pelo laboratório Diagnósticos do Brasil (São José dos Pinhais – PR), por uma profissional especializada na metodologia.

3.5. ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA

Os órgãos foram retirados em bloco, fotografados e armazenados em recipientes com formol 10%. Depois de adequada fixação, as peças foram cortadas com lâmina de microtomia e emblocadas em blocos de parafina. Lâminas histológicas de fragmentos de fígado, rins, coração e pulmão foram preparadas com corante de Hematoxilina-Eosina (HE).

As lâminas com HE foram utilizadas para marcação de áreas de interesse com auxílio de um médico patologista. Após a marcação, foi realizada comparação da lâmina em HE e os blocos de parafina originais para demarcação da área de corte alvo.

Para realizar o corte nos blocos de parafina, foi utilizada uma broca trefina para osso de aço inoxidável de 5.0 mm de diâmetro (Neodent®, Curitiba, PR, Brasil) acoplada a um sistema de alta rotação. Foram extraídas amostras individuais de cada bloco de parafina e armazenadas em um recipiente tabelado.

Posteriormente, foi realizado o arranjo em matriz de amostras teciduais ou *tissue microarray* (TMA). Foi preparado um bloco de TMA para cada órgão e aplicados reagentes imunoistoquímicos de IL-6, IL-10, TNF α e antígeno leucocitário humano (HLA) nas lâminas produzidas. As lâminas com imunoistoquímica foram digitalizadas e fragmentadas em imagens no formato “TIFF”, medindo 1600 *pixels* por 1200, com utilização do *software* ZEISS ZEN *Blue Edition*.

Após a fragmentação, foram selecionadas 20 imagens de cada órgão, de cada animal, para cada um dos 4 marcadores avaliados, obtendo-se um total aproximado de 6400 fragmentos. Para leitura dos fragmentos foram utilizadas máscaras elaboradas com auxílio de um médico patologista. Utilizando o *software* Image-Pro

Plus, foi realizada a leitura das imagens e o armazenamento dos valores obtidos em tabelas; divididas de acordo com o órgão e o tipo de reagente utilizado. Após a análise de todos os fragmentos, os dados foram agrupados em uma planilha no *software* Microsoft Excel versão 16.3 para análise estatística.

3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a comparação entre grupos, foi aplicado o teste ANOVA *One Way* + teste Pos Hoc de Scheffe nas variáveis que apresentaram normalidade e homogeneidade de variâncias. Os parâmetros que não preencheram esses critérios foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal Wallis (KW). Foi realizada a comparação pareada nas variáveis que apresentaram $p < 0,05$ (nível de significância estipulado - 5%). Como foram realizadas comparações múltiplas, utilizou-se o teste de Bonferroni para correção dos níveis de significância. As análises estatísticas foram realizadas com o *software* IBM SPSS Statistics versão 22.0.

4. RESULTADOS

Um animal do grupo controle (B1) apresentou parada cardíaca por instabilidade hemodinâmica na terceira hora da observação e todos os seus dados foram excluídos das análises.

4.2. MARCADORES SÉRICOS

Para avaliar a variação (delta) dos marcadores séricos inflamatórios durante o experimento, subtraiu-se dos valores desses marcadores 4 horas pós-ME, os seus respectivos valores no momento pós-indução anestésica.

O gráfico 01 demonstra as variações dos níveis séricos de IL-6 entre os momentos: pós-indução anestésica e 4 horas após a ME de acordo com cada grupo.

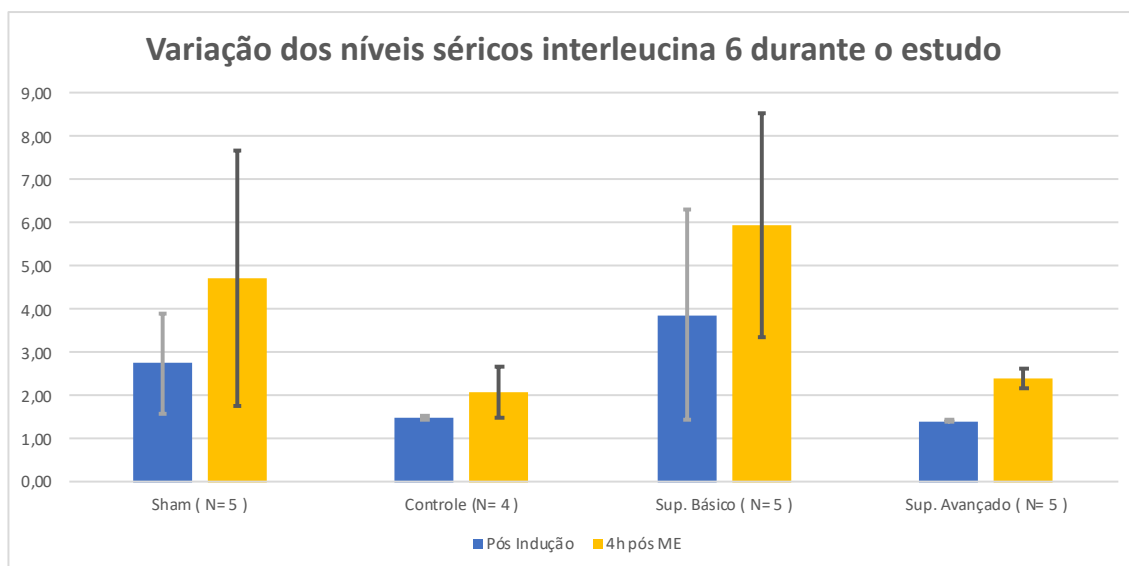


Gráfico 01. Variação IL-6 no estudo demonstrando os valores médios de IL-6 em pg/ml nos grupos *sham*, ME controle, ME suporte básico e ME suporte avançado nos momentos pós-indução anestésica e 4 horas pós-ME.

A tabela 01 demonstra os valores séricos de IL-6 de acordo com o grupo e o momento. Não foi observada diferença significativa entre os grupos.

ANÁLISE PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS INTERLEUCINA 6											
VARIÁVEL	GRUPO	Pré Indução Anestésica				4h pós ME				DELTA %	p VALOR DELTA
		Média	Desvio Padrão	Mediana	AIQ	Média	Desvio Padrão	Mediana	AIQ		
IL-6	Sham (n= 5)	2,75	2,63	1,67	3,22	4,74	6,62	1,67	7,79	72%	0,47
	Controle (n= 4)	1,51	0,09	1,52	0,18	2,08	1,16	1,65	1,94	38%	
	Sup. Básico (n= 5)	3,88	5,40	1,47	6,22	5,93	5,80	2,14	10,64	53%	
	Sup. Avançado (n= 5)	1,42	0,08	1,37	0,14	2,40	0,49	2,67	0,77	69%	

Tabela 01. Análise comparativa dos valores séricos de IL-6. Divisão entre os grupos, demonstrando o valor da média, desvio padrão, mediana e amplitude interquartilica entre os momentos pós-indução – 4h pós-ME. Na coluna Delta % é possível avaliar a variação entre os momentos e na coluna *p* valor delta é apresentado o valor de *p* para comparação global.

O gráfico 02 mostra as variações dos níveis séricos de TNFa entre os momentos pós-indução anestésica e 4 horas pós-ME de acordo com cada grupo.

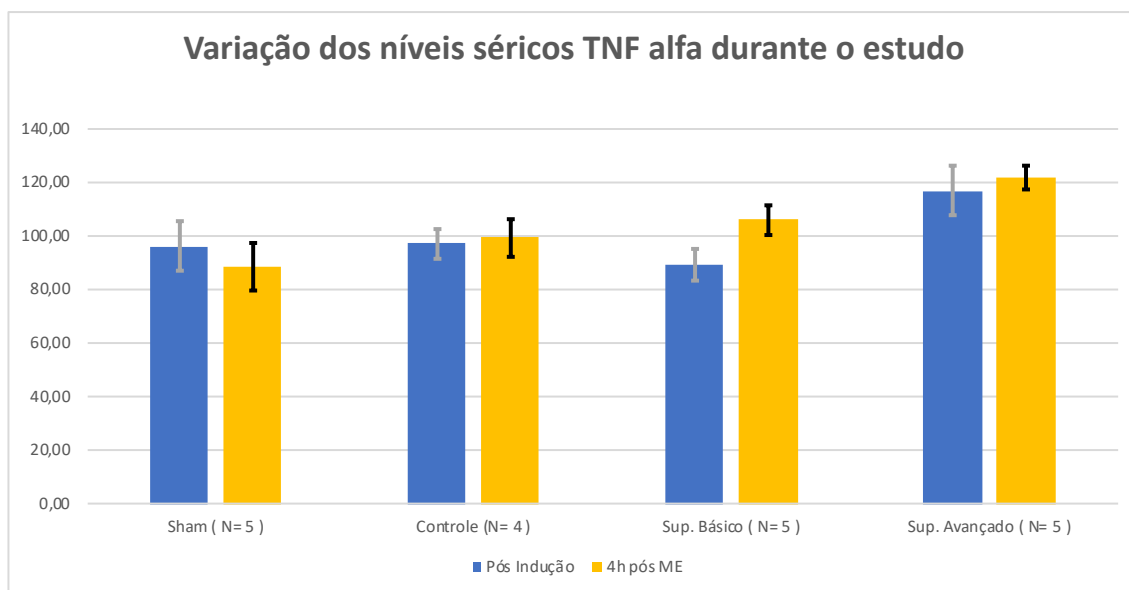


Gráfico 02. Variação TNF x Tempo demonstrando os valores médios de TNF em pg/ml nos grupos *sham*, ME controle, ME suporte básico e ME suporte avançado nos momentos pós-indução anestésica e 4 horas pós-ME.

Na tabela 02 apresentou os valores séricos de TNF de acordo com o grupo e o momento. Não se observa diferença significativa entre os grupos ou entre o delta.

ANÁLISE PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS - TNF ALFA											
VARIÁVEL	GRUPO	PRÉ INDUÇÃO ANESTÉSICA				4 HORAS PÓS MORTE ENCEFÁLICA				DELTA %	p VALOR DELTA
		Média	Desvio Padrão	Mediana	AIQ	Média	Desvio Padrão	Mediana	AIQ		
TNFa	Sham (n= 5)	96,06	20,42	100,90	39,29	88,39	19,08	95,64	28,76	-8%	0,86
	Controle (n= 4)	96,89	11,64	101,79	18,71	99,19	13,98	104,96	22,78	2%	
	Sup. Básico (n= 5)	88,85	13,06	87,34	22,87	105,73	12,88	109,42	19,61	19%	
	Sup. Avançado (n= 5)	116,62	20,60	109,09	35,91	121,68	10,46	120,02	15,94	4%	

Tabela 02. Análise comparativa dos valores séricos de TNF. Divisão entre os grupos, demonstrando o valor da média, desvio padrão, mediana e amplitude interquartilica entre os momentos pós-indução – 4h pós-ME. Na coluna Delta % é possível avaliar a variação entre os momentos e na coluna *p* valor delta é apresentado o valor de *p* para comparação global.

4.3. MARCADORES IMUNOISTOQUÍMICOS

Durante a confecção das lâminas para avaliação dos marcadores imunoistoquímicos, alguns fragmentos dos blocos de TMA se desprenderam total ou parcialmente, resultando em material insuficiente para análise. Portanto, não foi

possível obter os valores dos seguintes animais e parâmetros: B4 (controle): Pulmão (TNF e IL-10) e D4 (suporte avançado): Fígado (TNF, IL-10 e HLA) e Pulmão (TNF).

A tabela 03 contém o painel imunoistoquímico de IL-6, IL-10, TNF e HLA das lâminas de coração de acordo com o grupo. Observa-se diferença significativa quando comparados os valores do grupo *sham* e suporte básico nos marcadores IL-6 e TNF, mesmo após o ajuste de significância, demonstrando níveis mais elevados destes marcadores no grupo suporte básico.

ANÁLISE PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS INSITU										
ÓRGÃO	VARIÁVEL	GRUPO	Pré Indução Anestésica				p VALOR DELTA	COMPARAÇÃO ENTRE GRUPOS		
			Média	Desvio Padrão	Mediana	AIQ				
CORÇÃO	IL-6	Sham (n= 5)	0,212	0,199	0,12	0,38	0,028	A - B	0,993	B - D 0,914
		Controle (n= 4)	0,370	0,190	0,38	0,36		A - C	0,047	C - D 0,259
		Sup. Básico (n= 5)	1,802	1,194	1,69	2,22		A - D	0,764	
		Sup. Avançado (n= 5)	0,750	0,918	0,58	1,42		B - C	0,105	
	TNFa	Sham (n= 5)	0,042	0,041	0,03	0,08	0,01	A - B	1	B - D 1
		Controle (n= 4)	0,133	0,067	0,12	0,13		A - C	0,007	C - D 0,127
		Sup. Básico (n= 5)	1,232	1,262	0,92	1,97		A - D	1	
		Sup. Avançado (n= 5)	0,228	0,345	0,09	0,50		B - C	0,481	
	IL-10	Sham (n= 5)	0,128	0,085	0,15	0,15	0,069			
		Controle (n= 4)	0,150	0,091	0,14	0,18				
		Sup. Básico (n= 5)	1,704	1,526	1,61	2,58				
		Sup. Avançado (n= 5)	0,766	1,025	0,46	1,64				
	HLA	Sham (n= 5)	0,252	0,222	0,38	0,42	0,101			
		Controle (n= 4)	0,145	0,088	0,12	0,16				
		Sup. Básico (n= 5)	1,954	2,450	0,84	3,59				
		Sup. Avançado (n= 5)	0,522	0,468	0,68	91,00				

Tabela 03. Painel imunoistoquímico do coração. Divisão entre os grupos das lâminas de coração de acordo com os marcadores inflamatórios, demonstrando o valor da média global, desvio padrão, mediana e amplitude interquartílica para cada um dos marcadores. Na coluna *p* valor são apresentados os valores de *p* para comparação global. *Nas comparações de IL-6 e TNF, em que foi encontrado $p < 0,05$, foi realizada comparação entre pares com ajuste de significância pelo teste de Bonferroni.

Na figura 3, conseguiu-se visualizar a coloração acastanhada que as lâminas preparadas com imunoistoquímica receberam nos diversos tecidos analisados.

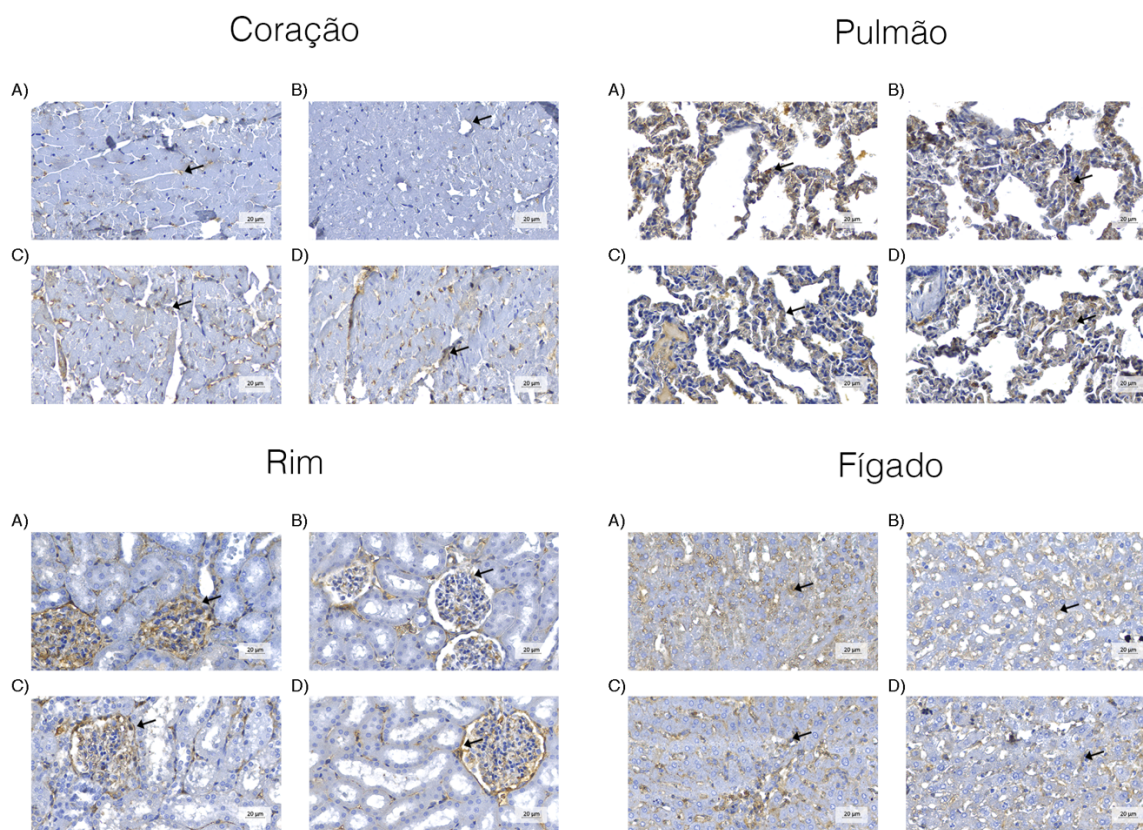


Figura 3. Imunoistoquímica em tecidos cardíaco, pulmonar, renal e hepático. A) Grupo *sham*, B) Grupo controle, C) Grupo suporte básico e D) Grupo suporte avançado (Magnificação original, 200x).

A tabela 04 contém o painel imunoistoquímico de IL-6, IL-10, TNF e HLA das lâminas de fígado, pulmão e rim de acordo com o grupo. Não se observa diferença significativa em nenhuma das variáveis analisadas.

ANALISE PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS INSITU

ÓRGÃO	VARIÁVEL	GRUPO	Pré Indução Anestésica				p VALOR DELTA
			Média	Desvio Padrão	Mediana	AIQ	
FÍGADO	IL-6	Sham (n= 5)	5,54	2,20	6,03	4,19	0,539
		Controle (n= 4)	3,55	3,84	2,10	6,67	
		Sup. Básico (n= 5)	5,60	3,53	3,88	5,53	
		Sup. Avançado (n= 5)	5,03	2,58	3,84	4,76	
	TNFa	Sham (n= 5)	5,34	3,52	5,96	6,37	0,451
		Controle (n= 4)	3,12	3,11	2,21	5,40	
		Sup. Básico (n= 5)	11,35	10,92	13,14	21,70	
		Sup. Avançado (n= 4) *	7,68	1,27	8,17	2,22	
	IL-10	Sham (n= 5)	6,74	3,74	6,26	7,42	0,436
		Controle (n= 4)	3,59	3,22	2,18	5,21	
		Sup. Básico (n= 5)	7,45	5,04	6,85	9,93	
		Sup. Avançado (n= 4) *	4,98	2,48	5,98	4,06	
	HLA	Sham (n= 5)	2,75	2,83	1,93	5,57	0,575
		Controle (n= 4)	0,97	1,53	0,24	2,37	
		Sup. Básico (n= 5)	2,54	2,02	3,11	3,70	
		Sup. Avançado (n= 4) *	0,98	0,46	0,91	0,89	
PULMÃO	IL-6	Sham (n= 5)	6,22	3,53	5,63	7,01	0,744
		Controle (n= 4)	4,89	2,44	5,03	4,51	
		Sup. Básico (n= 5)	5,80	2,62	5,58	4,43	
		Sup. Avançado (n= 5)	4,43	2,44	5,18	4,06	
	TNFa	Sham (n= 5)	5,02	3,07	6,30	5,45	0,228
		Controle (n= 3) *	2,15	0,97	1,59	-	
		Sup. Básico (n= 5)	6,18	3,82	6,18	6,66	
		Sup. Avançado (n= 4) *	2,43	0,51	2,42	0,98	
	IL-10	Sham (n= 5)	7,32	3,80	9,33	7,02	0,497
		Controle (n= 3) *	5,99	1,77	5,78	-	
		Sup. Básico (n= 5)	6,85	3,50	8,53	6,19	
		Sup. Avançado (n= 5)	4,32	2,87	5,37	5,39	
	HLA	Sham (n= 5)	9,03	3,81	11,19	6,06	0,059
		Controle (n= 4)	3,64	2,41	3,35	4,57	
		Sup. Básico (n= 5)	9,73	5,01	11,65	8,29	
		Sup. Avançado (n= 5)	5,09	2,21	6,14	3,77	
RIM	IL-6	Sham (n= 5)	2,15	1,71	1,26	2,75	0,237
		Controle (n= 4)	1,13	0,56	1,10	1,06	
		Sup. Básico (n= 5)	3,12	2,38	1,80	4,47	
		Sup. Avançado (n= 5)	3,28	2,08	3,07	3,93	
	TNFa	Sham (n= 5)	2,34	2,82	1,06	4,72	0,881
		Controle (n= 4)	1,54	1,20	1,38	2,28	
		Sup. Básico (n= 5)	2,67	2,81	1,65	5,36	
		Sup. Avançado (n= 5)	1,88	1,55	2,70	2,89	
	IL-10	Sham (n= 5)	3,66	1,87	2,97	3,35	0,282
		Controle (n= 4)	1,58	0,91	1,56	1,66	
		Sup. Básico (n= 5)	4,45	3,64	3,88	7,23	
		Sup. Avançado (n= 5)	2,93	1,13	3,50	2,02	
	HLA	Sham (n= 5)	1,85	1,96	0,95	3,17	0,82
		Controle (n= 4)	0,80	0,72	0,64	1,35	
		Sup. Básico (n= 5)	2,70	3,74	1,07	5,82	
		Sup. Avançado (n= 5)	0,94	0,51	1,08	0,88	

Tabela 04. Painel imunoistoquímico do fígado, pulmão e rim. Divisão entre os grupos das lâminas de fígado, pulmão e rim de acordo com os marcadores inflamatórios, demonstrando o valor da média global; desvio padrão, valor mínimo; máximo e mediana para cada um dos marcadores. Na coluna *p* valor são apresentados os valores de *p* para comparação global. Como não houve diferença significativa global entre os grupos, não foi realizada a comparação entre pares.

*Grupo teve um animal excluído da análise por ausência ou quantidade insuficiente de material para análise.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou as três principais estratégias de manejo clínico adotadas nas unidades de terapia intensiva, e comparou com os níveis de inflamação sérica (IL-6 e TNF) e *in situ* utilizando reagentes de imunoistoquímica (IL-6, TNF, IL-10 e HLA) em coração, fígado, pulmão e rim.

Diversos aspectos legais e éticos cercam os pacientes em ME, o que torna inviável a realização de grandes estudos envolvendo seres humanos, sendo essa uma das principais justificativas para o uso do modelo experimental nesse trabalho. Outro fator que dificultaria estudos em humanos é a grande discrepância nas condutas e disponibilidade de aparelhos e medicamentos nos centros de terapia intensiva em todo país ²⁵.

Evidências apontam que pacientes em ME em poucas horas enfrentam graves alterações hemodinâmicas, que por sua vez provocam alterações inflamatórias e metabólicas, ocasionando parada cardíaca. Dessa forma, o controle hemodinâmico é um dos principais pilares na manutenção do potencial doador, uma vez que, esse está associado a uma melhor perfusão tecidual e taxas mais elevadas de sucesso em transplantes ^{4,7}.

Ainda sim, em nosso estudo encontrou-se um paradoxo, apesar de não haver diferença estatística significativa; os animais do grupo que recebeu um controle hemodinâmico menos restrito, grupo controle (apenas SF 09%), apresentaram níveis séricos e *in situ* de marcadores inflamatórios inferiores aos demais grupos em morte encefálica, suporte básico (SF 09% + noradrenalina) e suporte avançado (SF 09% + vasopressina + reposição hormonal). Tal fato é incompatível com o que foi observado durante a condução do experimento, pois, apesar de não fazer parte do escopo desse estudo, houve maior dificuldade de manter os animais do grupo controle vivos, durante o período de observação, comprovado pelo óbito precoce do animal B1 por instabilidade hemodinâmica refratária e consequente parada cardiorrespiratória.

Outro fator que, corrobora com a incompatibilidade dos dados obtidos é o fato de estar claro na literatura o papel que o descontrole hemodinâmico gera após o início

da morte encefálica, bem como todas as ativações inflamatórias consequentes a esse descontrole ^{7,19,30}

Algumas hipóteses foram elaboradas na tentativa de explicar esta incoerência nos dados. Em um estudo realizado por Rebolledo *et al.* em 2016, foram avaliados os impactos da velocidade da indução da ME na ativação de cascatas inflamatórias de IL-6 e TNFa. No estudo foram avaliados ratos submetidos a ME com um protocolo semelhante ao do nosso estudo, porém comparando a velocidade de insuflação do cateter entre 2 grupos. Neste estudo ficou comprovado que, a diferença na velocidade da insuflação do cateter levava a repercussões inflamatórias e funcionais piores nos animais em que, o balão era insuflado de modo mais lento ⁴¹.

Em nosso estudo, optou-se pela rápida insuflação, porém a velocidade de insuflação não foi padronizada de forma automatizada, devendo, portanto, ser um fator levado em consideração.

Porém, em um recente estudo experimental com porcos, com modelo fisiologicamente semelhante ao nosso, também avaliou as repercussões da velocidade da indução da ME na recuperação da função renal pós-transplante em dois grupos (ME lenta e ME rápida), utilizando posteriormente os aloenxertos em porcos nefrectomizados. Durante a condução deste estudo, Kerforne *et al.*, diferentemente de Rebolledo *et al.*, observaram que a rápida insuflação do cateter promovia um retorno mais precoce das funções renais, além de apresentar menores taxas de fibrose nos enxertos. Apesar disso, os dois grupos apresentavam iguais intensidades de estresse oxidativo, porém com uma maior ativação inflamatória no grupo com a ME rápida, quando comparada ao grupo ME lenta ⁴².

Essa discrepância de resultados, entre os estudos, pode acontecer devido às diferenças entre os modelos, tanto em relação ao animal utilizado, como também pela metodologia adotada para verificação do melhor desfecho, porém, deixa claro que ainda tem-se muito para avançar em relação aos estudos das vias inflamatórias ativadas durante a ME.

Além disso, uma vez que a velocidade de insuflação do cateter parece ter um importante papel na ativação inflamatória, e que a pressão exercida por este balonete, por sua vez, poderia estar envolvida nesses mecanismos, outras teorias podem ser aventadas utilizando bases fisiológicas, como por exemplo, a interferência do tamanho do crânio do animal, ou até mesmo, os impactos de níveis elevados de

pressão arterial média, uma vez que, eles interferem diretamente na pressão de perfusão cerebral e consequentemente na pressão intracraniana.

Outros autores apresentaram dificuldades para explicar comportamentos aberrantes de citocinas inflamatórias durante o processo de ME, como exemplo Mikhova *et al.*, que em estudo de modelo experimental em porcos, encontrou valores discrepantes na sua avaliação sérica dos níveis de IL-6, associando resultados ao comportamento imprevisível destas citocinas ⁴³.

Um ponto discordante da literatura foi em relação ao benefício estabelecido da administração de corticosteroides em enxertos pulmonares. Foi observado níveis inferiores de citocinas inflamatórias *in situ* em pulmões de animais em ME que receberam doses de metilprednisolona, porém, em nosso estudo não houve benefício com significância estatística nas lâminas de pulmão avaliadas com imunoistoquímica ⁴⁴.

Diante disso, fica claro o benefício que novos estudos envolvendo potenciais vias de ativação inflamatória trariam para definição da inflamação na resposta dos órgãos frente à Morte Encefálica.

Como a presente pesquisa se trata de um estudo inédito, o tamanho amostral foi limitado por questões éticas e acredita-se que, estudos futuros com *n* amostral maior possam ser suficientes para demonstrar diferença estatística, entre as diferentes modalidades terapêuticas de manutenção do potencial doador.

6. CONCLUSÃO

Neste estudo, a estratégia de manejo clínico de suporte avançado não demonstrou menor reação inflamatória sérica e *in situ* quando comparada a outras modalidades de manutenção do potencial doador, tendo os animais do grupo suporte básico apresentado níveis mais elevados de marcadores inflamatórios quando comparados ao grupo *sham*.

7. REFERÊNCIAS

1. Barker CF, Markmann JF. Historical overview of transplantation. Cold Spring Harb. Perspect. Med. 2013;3(4):1–18.
2. Quintin J. Organ transplantation and meaning of life: The quest for self fulfilment. Med. Heal. Care Philos. 2013;16(3):565–574.
3. Youn TS, Greer DM. Brain death and management of a potential organ donor in the intensive care unit. Crit. Care Clin. [Internet]. 2014;30(4):813–831. Available from:

- <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccc.2014.06.010>
4. Westphal GA et al. Diretrizes para manutenção de múltiplos órgãos no potencial doador adulto falecido . Parte III . Recomendações órgãos específicas. 2011;23(47):410–425.
 5. Care I. Systemic inflammation in the brain-dead organ donor. 2009;425–435.
 6. Azarpira N, Nikeghbalian S, Kazemi K, Geramizadeh B, Malekpour Z, Malek-Hosseini SA. Association of increased plasma interleukin-6 and TNF- α levels in donors with the complication rates in liver transplant recipients. *Int. J. Organ Transplant. Med.* 2013;4(1):9–14.
 7. Zaclikevis VR, Cristine M, Bartz M, Wanzuita R, Réa-neto Á, Fiorelli A, et al. Diretrizes para manutenção de múltiplos órgãos no potencial doador adulto falecido . Parte II . Ventilação mecânica , controle endócrino metabólico e aspectos hematológicos e infecciosos. 2011;23(47):269–282.
 8. Peled Y, Kassif Y, Raichlin E, Kogan A, Har-Zahav Y, Nachum E, et al. Improved Long Term Outcomes after Heart Transplantation Utilizing Donors with Traumatic Mode of Brain Death. *J. Hear. Lung Transplant.* 2018;37(4):S324.
 9. Transplantes RB De. Dimensionamento dos Transplantes no Brasil. Assoc. Bras. Transpl. Órgãos. 2018;
 10. WHO. Organ Donation and Transplantation Activities 2015. Glob. Obs. Donation Transplant. 2015;
 11. Bharadwaj S, Tandon P, Gohel TD, Brown J, Steiger E, Kirby DF, et al. Current status of intestinal and multivisceral transplantation. *Gastroenterol. Rep.* [Internet]. 2017;5(January 2017):gow045. Available from: <https://academic.oup.com/gastro/article-lookup/doi/10.1093/gastro/gow045>
 12. Wang W-T, Sun L, Sun C-H. PDIA3-regulated inflammation and oxidative stress contribute to the traumatic brain injury (TBI) in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* [Internet]. 2019 Aug; Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X19316237>
 13. Beecher HK. A Definition of Irreversible Coma. *JAMA* [Internet]. 1968 Aug 5;205(6):337. Available from: <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.1968.03140320031009>
 14. CFM. RESOLUÇÃO CFM nº 1.480/97 - Morte Encefáli. 1997;
 15. Wijdicks EFM. Brain death worldwide: Accepted fact but no global consensus in diagnostic criteria. *Neurology.* 2002;58(1):20–25.
 16. CFM. Resolução Morte Encefálica.pdf. 2017;
 17. Zaclikevis VR, Cristine M, Bartz M, Wanzuita R, Teixeira C, Franke C, et al. Diretrizes para manutenção de múltiplos órgãos no potencial doador adulto falecido . Parte I . Aspectos gerais e suporte hemodinâmico. 2011;23(47):255–268.
 18. RBT. RBT - Dimensionamento dos Transplantes no Brasil e em cada estado. 2017; Available from: <http://www.abto.org.br/abtov03/Upload/file/RBT/2017/rbt-imprensa-leitura-compressed.pdf>
 19. Nakamura MT, Rodio GE, Tchaicka C, Padilha EF, Jorge AC, Duarte PAD. Predictors of Organ Donation Among Patients With Brain Death in the Intensive Care Unit. *Transplant. Proc.* [Internet]. 2018;50(5):1220–1226. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2018.02.069>
 20. Baroncelli F, Alberione MC, Cacciotti V, Artusio D, Vergano M, Livigni S. Blood Lactate

- Concentrations Before and After Withdrawal of Life-Sustaining Treatments in Controlled Donation After Circulatory Death: A Case Report From Italy. *Transplant. Proc.* [Internet]. 2017;49(4):740–742. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2017.02.027>
21. Kandaswamy R, Stock PG, Skeans MA, Gustafson SK, Sleeman EF, Wainright JL, et al. OPTN/SRTR 2011 Annual Data Report: Pancreas. *Am. J. Transplant.* [Internet]. 2013 Jan;13:47–72. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/ajt.12020>
 22. Meirelles Júnior RF, Salvalaggio P, Pacheco-Silva A. Pancreas transplantation: review. *Einstein (São Paulo)* [Internet]. 2015;13(2):305–309. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-45082015000200024&lng=en&tlng=en
 23. Ezekian B, Schroder PM, Freischlag K, Yoon J, Kwun J, Knechtle SJ. Contemporary Strategies and Barriers to Transplantation Tolerance.
 24. Lauro A, Panaro F, Iyer KR. Analyse de l'activité actuelle de transplantation intestinale en Europe et aux États-Unis. *J. Visc. Surg.* [Internet]. 2017;154(2):105–114. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviscsurg.2017.01.007>
 25. Review C. Worldwide Barriers to Organ Donation. 2015;
 26. MS Brasil. Doação de órgãos: Brasil salva número recorde de vidas [Internet]. 2018; Available from: <http://legado.brasil.gov.br/noticias/saude/2018/06/doacao-de-orgaos-brasil-salva-numero-recorde-de-vidas>
 27. Schwarz P, Custódio G, Rheinheimer J, Crispim D, Leitão CB, Rech TH. Brain Death-Induced Inflammatory Activity is Similar to Sepsis-Induced Cytokine Release. *Cell Transplant.* 2018;27(10):1417–1424.
 28. Murugan R, Venkataraman R, Wahed AS, Elder M, Carter M, Madden NJ, et al. Preload responsiveness is associated with increased interleukin-6 and lower organ yield from brain-dead donors. *Crit. Care Med.* 2009;37(8):2387–2393.
 29. Cintra EDEA, Antunes J, Junior M, Castro MDE, Martins EF. Vasopressina e morte encefálica. 2000;58(1):181–187.
 30. Garc C, Dom JM, Gasc ML. IA EN MEDICINA INTENSIVA : TRASPLANTES lica : repercusi
´ Muerte encef a on sobre ´ organos y tejidos. 2009;33(9):434–441.
 31. Laskowitz DT, Grocott H, Hsia a, Copeland KR. Serum markers of cerebral ischemia. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* [Internet]. 1998;7(4):234–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17895090>
 32. Miñambres E, Cemborain A, Sánchez-Velasco P, Gandarillas M, Díaz-Regañón G, Sánchez-González U, et al. Correlation between transcranial interleukin-6 gradient and outcome in patients with acute brain injury. *Crit. Care Med.* 2003;31(3):933–938.
 33. Trautz F, Franke H, Bohnert S, Hammer N, Müller W, Stassart R, et al. Survival-time dependent increase in neuronal IL-6 and astroglial GFAP expression in fatally injured human brain tissue. *Sci. Rep.* [Internet]. 2019;9(1):11771. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41598-019-48145-w>
 34. Sedger LM, McDermott MF. TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants - past, present and future. *Cytokine Growth Factor Rev.* [Internet]. 2014;25(4):453–472. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cytogfr.2014.07.016>
 35. Guilliams K, Wainwright MS. Pathophysiology and Management of Moderate and Severe Traumatic Brain Injury in Children. 2016;31(1):35–45.
 36. Ga F, Ap S, Jw S, Bg H, Rn G. Optimization of donor management goals yields

- increased organ. 2010;76(6).
37. Malinoski DJ, Daly MC, Patel MS, Oley-graybill C, Iii CEF, Salim A. Achieving Donor Management Goals Before Deceased Donor Procurement Is Associated With More Organs Transplanted Per Donor. 2011;71(4).
 38. Kilkenney C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. The ARRIVE Guidelines Checklist Animal Research : Reporting In Vivo Experiments. *Br. J. Pharmacol.* 2010;8(June):8–9.
 39. Fonseca, NM; Goldenberg, S; Gomes, P.O; PAULA LIMA CA. Anestesia em Coelhos. 1996;
 40. Biswas S, Chen E, Bittner H, Duanedavis R, Surgery D. Death Further Promotes Ischemic Reperfusion Injury of the Rabbit Myocardium. 1996;4.
 41. Rebolledo RA, Hoeksma D, Hottenrott CMV, Bodar YJL, Ottens PJ, Wiersema-Buist J, et al. Slow induction of brain death leads to decreased renal function and increased hepatic apoptosis in rats. *J. Transl. Med.* 2016;14(1):1–12.
 42. Kerforne T, Giraud S, Danion J, Thuillier R, Couturier P, Hebrard W, et al. Rapid or Slow Time to Brain Death? Impact on Kidney Graft Injuries in an Allotransplantation Porcine Model. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20(15):3671.
 43. Mikhova KM, Don CW, Laflamme M, Kellum JA, Mulligan MS, Verrier ED, et al. Effect of cytokine hemoabsorption on brain death-induced ventricular dysfunction in a porcine model. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* [Internet]. 2013 Jan;145(1):215–23; discussion 223-4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23127374>
 44. Belhaj A, Dewachter L, Rorive S, Remmelink M, Weynand B, Melot C, et al. Mechanical versus humoral determinants of brain death-induced lung injury. *PLoS One.* 2017;12(7):1–22.

6 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

A literatura sobre modelos experimentais de ME em animais ainda permanece limitada. O método mais utilizado e validado é a insuflação do balão de Foley no espaço subdural, porém algumas ressalvas devem ser consideradas em relação a este modelo, como o fato de não reproduzir os possíveis danos causados pela hemorragia intracraniana, principal causa clínica de ME.

A estratégia de manejo clínico, otimizada, não demonstrou melhor prognóstico em relação aos níveis inflamatórios séricos e *in situ* quando comparada a outras modalidades de manutenção do potencial doador, exceto quando comparados os valores de IL-6 e TNFa nas lâminas de imunohistoquímica de coração entre os animais do grupo *sham* e suporte básico ($p=0,047$ e $p=0,005$ respectivamente), tendo os animais do grupo suporte básico apresentado níveis mais elevados de marcadores inflamatórios quando comparados ao grupo controle, demonstrando que, o emprego de manejo clínico pautado no uso de solução fisiológica em animais com pressão arterial média (PAM) maior que 65 mmHg pode ser superior ao uso de drogas vasoativas, como a noradrenalina.

Como se trata de um estudo inédito e experimental, o tamanho amostral foi limitado por questões éticas e acredita-se que, estudos futuros com n amostrais maiores possam confirmar de fato o impacto de diferentes estratégias de manejo otimizadas na resposta inflamatória e seus eventuais desfechos na melhora do potencial doador.

6.1. LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Acredita-se que o fato de se ter limitado o período de observação em 4 horas (período máximo de sobrevivência desempenhado pelo grupo controle em nosso estudo piloto) possa ter inviabilizado resultados.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Barker CF, Markmann JF. Historical overview of transplantation. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2013;3(4):1–18.
2. Quintin J. Organ transplantation and meaning of life: The quest for self fulfilment. *Med. Heal. Care Philos.* 2013;16(3):565–574.
3. Youn TS, Greer DM. Brain death and management of a potential organ donor in the intensive care unit. *Crit. Care Clin.* [Internet]. 2014;30(4):813–831. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccc.2014.06.010>
4. Westphal GA et al. Diretrizes para manutenção de múltiplos órgãos no potencial doador adulto falecido . Parte III . Recomendações órgãos específicas. 2011;23(47):410–425.
5. Care I. Systemic inflammation in the brain-dead organ donor. 2009;425–435.
6. Azarpira N, Nikeghbalian S, Kazemi K, Geramizadeh B, Malekpour Z, Malek-Hosseini SA. Association of increased plasma interleukin-6 and TNF- α levels in donors with the complication rates in liver transplant recipients. *Int. J. Organ Transplant. Med.* 2013;4(1):9–14.
7. Zaclikevis VR, Cristine M, Bartz M, Wanzuita R, Réa-neto Á, Fiorelli A, et al. Diretrizes para manutenção de múltiplos órgãos no potencial doador adulto falecido . Parte II . Ventilação mecânica , controle endócrino metabólico e aspectos hematológicos e infecciosos. 2011;23(47):269–282.
8. Peled Y, Kassif Y, Raichlin E, Kogan A, Har-Zahav Y, Nachum E, et al. Improved Long Term Outcomes after Heart Transplantation Utilizing Donors with Traumatic Mode of Brain Death. *J. Hear. Lung Transplant.* 2018;37(4):S324.
9. Transplantes RB De. Dimensionamento dos Transplantes no Brasil. Assoc. Bras. Transpl. Órgãos. 2018;
10. WHO. Organ Donation and Transplantation Activities 2015. *Glob. Obs. Donation Transplant.* 2015;
11. Bharadwaj S, Tandon P, Gohel TD, Brown J, Steiger E, Kirby DF, et al. Current status of intestinal and multivisceral transplantation. *Gastroenterol. Rep.* [Internet]. 2017;5(January 2017):gow045. Available from: <https://academic.oup.com/gastro/article-lookup/doi/10.1093/gastro/gow045>
12. Wang W-T, Sun L, Sun C-H. PDIA3-regulated inflammation and oxidative stress

- contribute to the traumatic brain injury (TBI) in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* [Internet]. 2019 Aug; Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X19316237>
13. Beecher HK. A Definition of Irreversible Coma. *JAMA* [Internet]. 1968 Aug 5;205(6):337. Available from: <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.1968.03140320031009>
 14. CFM. RESOLUÇÃO CFM nº 1.480/97 - Morte Encefáli. 1997;
 15. Wijdicks EFM. Brain death worldwide: Accepted fact but no global consensus in diagnostic criteria. *Neurology*. 2002;58(1):20–25.
 16. CFM. Resolução Morte Encefálica.pdf. 2017;
 17. Zaclikevis VR, Cristine M, Bartz M, Wanzuita R, Teixeira C, Franke C, et al. Diretrizes para manutenção de múltiplos órgãos no potencial doador adulto falecido . Parte I . Aspectos gerais e suporte hemodinâmico. 2011;23(47):255–268.
 18. RBT. RBT - Dimensionamento dos Transplantes no Brasil e em cada estado. 2017; Available from: <http://www.abto.org.br/abto03/Upload/file/RBT/2017/rbt-imprensa-leitura-compressed.pdf>
 19. Nakamura MT, Rodio GE, Tchaicka C, Padilha EF, Jorge AC, Duarte PAD. Predictors of Organ Donation Among Patients With Brain Death in the Intensive Care Unit. *Transplant. Proc.* [Internet]. 2018;50(5):1220–1226. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2018.02.069>
 20. Baroncelli F, Alberione MC, Cacciotti V, Artusio D, Vergano M, Livigni S. Blood Lactate Concentrations Before and After Withdrawal of Life-Sustaining Treatments in Controlled Donation After Circulatory Death: A Case Report From Italy. *Transplant. Proc.* [Internet]. 2017;49(4):740–742. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2017.02.027>
 21. Kandaswamy R, Stock PG, Skeans MA, Gustafson SK, Sleeman EF, Wainright JL, et al. OPTN/SRTR 2011 Annual Data Report: Pancreas. *Am. J. Transplant.* [Internet]. 2013 Jan;13:47–72. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/ajt.12020>
 22. Meirelles Júnior RF, Salvalaggio P, Pacheco-Silva A. Pancreas transplantation: review. *Einstein (São Paulo)* [Internet]. 2015;13(2):305–309. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-

- 45082015000200024&lng=en&tlng=en
23. Ezekian B, Schroder PM, Freischlag K, Yoon J, Kwun J, Knechtle SJ. Contemporary Strategies and Barriers to Transplantation Tolerance.
 24. Lauro A, Panaro F, Iyer KR. Analyse de l'activité actuelle de transplantation intestinale en Europe et aux États-Unis. *J. Visc. Surg.* [Internet]. 2017;154(2):105–114. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviscsurg.2017.01.007>
 25. Review C. Worldwide Barriers to Organ Donation. 2015;
 26. MS Brasil. Doação de órgãos: Brasil salva número recorde de vidas [Internet]. 2018;Available from: <http://legado.brasil.gov.br/noticias/saude/2018/06/doacao-de-orgaos-brasil-salva-numero-recorde-de-vidas>
 27. Schwarz P, Custódio G, Rheinheimer J, Crispim D, Leitão CB, Rech TH. Brain Death-Induced Inflammatory Activity is Similar to Sepsis-Induced Cytokine Release. *Cell Transplant.* 2018;27(10):1417–1424.
 28. Murugan R, Venkataraman R, Wahed AS, Elder M, Carter M, Madden NJ, et al. Preload responsiveness is associated with increased interleukin-6 and lower organ yield from brain-dead donors. *Crit. Care Med.* 2009;37(8):2387–2393.
 29. Cintra EDEA, Antunes J, Junior M, Castro MDE, Martins EF. Vasopressina e morte encefálica. 2000;58(1):181–187.
 30. Garc C, Dom JM, Gasc ML. IA EN MEDICINA INTENSIVA : TRASPLANTES lica : repercusi ´ Muerte encef a on sobre ´ organos y tejidos. 2009;33(9):434–441.
 31. Laskowitz DT, Grocott H, Hsia a, Copeland KR. Serum markers of cerebral ischemia. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* [Internet]. 1998;7(4):234–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17895090>
 32. Miñambres E, Cemborain A, Sánchez-Velasco P, Gandarillas M, Díaz-Regañón G, Sánchez-González U, et al. Correlation between transcranial interleukin-6 gradient and outcome in patients with acute brain injury. *Crit. Care Med.* 2003;31(3):933–938.
 33. Trautz F, Franke H, Bohnert S, Hammer N, Müller W, Stassart R, et al. Survival-time dependent increase in neuronal IL-6 and astroglial GFAP expression in fatally injured human brain tissue. *Sci. Rep.* [Internet].

- 2019;9(1):11771. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41598-019-48145-w>
34. Sedger LM, McDermott MF. TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants - past, present and future. *Cytokine Growth Factor Rev.* [Internet]. 2014;25(4):453–472. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cytogfr.2014.07.016>
 35. Guilliams K, Wainwright MS. Pathophysiology and Management of Moderate and Severe Traumatic Brain Injury in Children. 2016;31(1):35–45.
 36. Ga F, Ap S, Jw S, Bg H, Rn G. Optimization of donor management goals yields increased organ. 2010;76(6).
 37. Malinoski DJ, Daly MC, Patel MS, Oley-graybill C, Iii CEF, Salim A. Achieving Donor Management Goals Before Deceased Donor Procurement Is Associated With More Organs Transplanted Per Donor. 2011;71(4).
 38. Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. The ARRIVE Guidelines Checklist Animal Research : Reporting In Vivo Experiments. *Br. J. Pharmacol.* 2010;8(June):8–9.
 39. Fonseca, NM; Goldenberg, S; Gomes, P.O; PAULA LIMA CA. Anestesia em Coelhos. 1996;
 40. Biswas S, Chen E, Bittner H, Duanedavis R, Surgery D. Death Further Promotes Ischemic Reperfusion Injury of the Rabbit Myocardium. 1996;4.
 41. Rebolledo RA, Hoeksma D, Hottenrott CMV, Bodar YJL, Ottens PJ, Wiersema-Buist J, et al. Slow induction of brain death leads to decreased renal function and increased hepatic apoptosis in rats. *J. Transl. Med.* 2016;14(1):1–12.
 42. Kerforne T, Giraud S, Danion J, Thuillier R, Couturier P, Hebrard W, et al. Rapid or Slow Time to Brain Death? Impact on Kidney Graft Injuries in an Allotransplantation Porcine Model. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20(15):3671.
 43. Mikhova KM, Don CW, Laflamme M, Kellum JA, Mulligan MS, Verrier ED, et al. Effect of cytokine hemoadsorption on brain death-induced ventricular dysfunction in a porcine model. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* [Internet]. 2013 Jan;145(1):215–23; discussion 223-4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23127374>
 44. Belhaj A, Dewachter L, Rorive S, Remmelink M, Weynand B, Melot C, et al. Mechanical versus humoral determinants of brain death-induced lung injury.

PLoS One. 2017;12(7):1–22.

ANEXO 01 – APROVAÇÃO CEUA



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação
Comissão de Ética em Pesquisa no Uso de Animais

Curitiba, 19 de abril de 2018.

PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

REGISTRO DO PROJETO: **01153 – Relatório Parcial e liberação para utilização dos animais aprovados no projeto inicial**

TÍTULO DO PROJETO: *EFEITO DA PADRONIZAÇÃO DA TERAPIA DE MANUTENÇÃO SOBRE A RESPOSTA INFLAMATÓRIA SECUNDÁRIA A MORTE ENCEFÁLICA E SUAS REPERCUSÕES SOBRE O PADRÃO HISTOLÓGICO DE ÓRGÃOS ESPECÍFICOS – MODELO EXPERIMENTAL EM COELHO*

PESQUISADOR RESPONSÁVEL

LUANA ALVES TANNOS

EQUIPE DE PESQUISA

Luana Alves Tannos

INSTITUIÇÃO

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

CURSO

Medicina

VIGÊNCIA DO PROJETO	Outubro/2017 a Julho/2019	QUANTIDADE DE ANIMAIS	20
ESPECIE/LINHAGEM	<i>Oryctolagus cuniculus</i> (Coelho Nova Zelândia)	Nº SISBIO (Somente animais de vida livre)	Não se aplica
SEXO	Macho	ATIVIDADES (Somente animais de vida livre)	Não se aplica
IDADE / PESO	5 meses / 4-5 kg	ESPECIE – GRUPO TAXONÔMICOS (de vida livre)	Não se aplica
ORIGEM DO ANIMAL	FEGA	LOCAL (IS) (Somente animais de vida livre)	Não se aplica

O colegiado da CEUA certifica que este protocolo que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794/2018 e Decreto nº 6.899/2009, e com as normas editadas pelo CONCEA e foi **APROVADO** pela CEUA - PUCPR em reunião de colegiado. Se houver mudança do protocolo o pesquisador deve enviar um relatório à CEUA descrevendo de forma clara e sucinta, a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas. Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciar antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por esta CEUA em qualquer tempo.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Sérgio Luiz Rocha

Coordenador

Comissão de Ética no Uso de Animais



Rua Imaculada Conceição, 1155 Prado Velho CEP 80.215-901 Curitiba Paraná Brasil
Telefone: (41) 3271-2292 www.pucpr.br

ANEXO 02 – DADOS PESQUISA – INFLAMATÓRIOS SÉRICOS

IL-6

ANIMAL	IL6_0	IL6_1	IL6_2	IL6_3	DELTA_IL6_0_1	DELTA_IL6_0_2	DELTA_IL6_0_3
A1	7,44	5,25	1,65	1,59	-2,19	-5,79	-5,85
A2	1,81	1,63	1,53	16,57	-0,18	-0,28	14,76
A3	1,53	1,55	1,75	1,63	0,02	0,22	0,1
A4	1,28	1,41	1,61	1,67	0,13	0,33	0,39
A5	1,67	2,06	1,59	2,22	0,39	-0,08	0,55
B2	1,59	1,59	1,81	1,63	0	0,22	0,04
B3	1,57	1,79	1,94	1,67	0,22	0,37	0,1
B4	1,39	1,67	2,28	3,79	0,28	0,89	2,4
B5	1,47	1,41	1,53	1,22	-0,06	0,06	-0,25
C1	1,63	7,9	6,34	10,94	6,27	4,71	9,31
C2	1,47	2,61	1,61	1,51	1,14	0,14	0,04
C3	1,39		6,12	2,14		4,73	0,75
C4	13,54	15,61	14,28	13,46	2,07	0,74	-0,08
C5	1,35	2,47	2,06	1,61	1,12	0,71	0,26
D1	1,37	11,12	5,65	2,67	9,75	4,28	1,3
D2	1,35	1,41	1,47	1,59	0,06	0,12	0,24
D3	1,53	14,64	4,72	2,69	13,11	3,19	1,16
D4	1,37	2,35	2,24	2,3	0,98	0,87	0,93
D5	1,47	19,82	16,42	2,75	18,35	14,95	1,28

TNF

ANIMAL	TNF_0	TNF_1	TNF_2	TNF_3	DELTA_TNF_0_1	DELTA_TNF_0_2	DELTA_TNF_0_3
A1	121,14	111,27	92,68	105,95	-9,87	-28,46	-15,19
A2	77,06	70,23	78,45	56,17	-6,83	1,39	-20,89
A3	107,85	102,97	92,27	95,64	-4,88	-15,58	-12,21
A4	73,36	83,39	79,52	88,24	10,03	6,16	14,88
A5	100,9	92,27	69,9	95,97	-8,63	-31	-4,93
B2	101,74	105,61	100,17	104,54	3,87	-1,57	2,8
B3	104,43	107,74	116,21	108,47	3,31	11,78	4,04
B4	101,85	103,76	106,95	105,38	1,91	5,1	3,53
B5	79,52	79,85	78,29	78,37	0,33	-1,23	-1,15
C1	92,52	81,58	98,11	117,95	-10,94	5,59	25,43
C2	108,81		103,25	109,42		-5,56	0,61
C3	74,34	76,81	85,69	111,27	2,47	11,35	36,93
C4	87,34	87,66	84,13	84,05	0,32	-3,21	-3,29
C5	81,25	98,44	100,22	105,95	17,19	18,97	24,7
D1	106,28	104,26	112,28	108,97	-2,02	6	2,69
D2	94,82	93,83	116,1	122,1	-0,99	21,28	27,28
D3	148,12	144,81	135,67	138,03	-3,31	-12,45	-10,09
D4	109,09	113,24	109,87	120,02	4,15	0,78	10,93
D5	124,79	120,36	117,44	119,29	-4,43	-7,35	-5,5

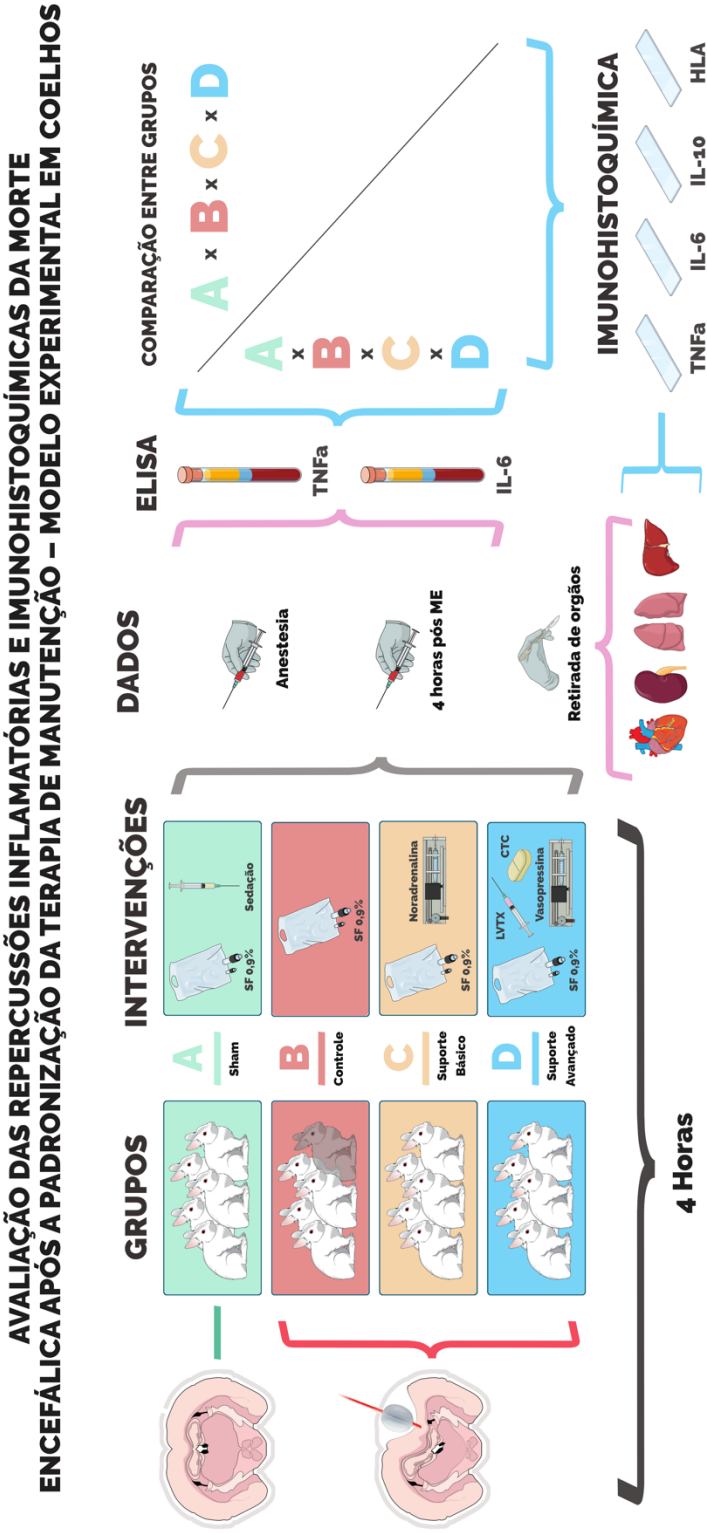
ANEXO 03 – DADOS PESQUISA – INFLAMATÓRIOS INSITU

IMUNOISTOQUÍMICA

ANIMAL	IHL-6C	IHTNF C	IHL-10C	IHLAC	IHL-6F	IHTNF F	IHL-10F	IHLAF	IHL-6L	IHTNF L	IHL-10L	IHLAL	IHL-6R	IHTNF R	IHL-10R	IHLAR
A1	0,08	0,01	0,09	0,00	4,08	0,00	2,59	0,00	2,63	0,26	2,04	2,67	1,21	0,00	2,97	0,30
A2	0,12	0,03	0,15	0,43	2,56	4,01	3,71	0,35	3,09	3,69	4,58	8,25	0,80	0,59	2,57	0,95
A3	0,44	0,08	0,15	0,38	7,04	7,96	10,62	1,93	5,63	7,52	10,04	11,40	2,51	3,10	4,57	2,20
A4	0,41	0,09	0,24	0,43	7,97	8,79	10,53	5,95	9,62	6,30	9,33	11,63	4,99	6,93	6,45	5,12
A5	0,01	0,00	0,01	0,02	6,03	5,96	6,26	5,53	10,12	7,32	10,62	11,19	1,26	1,06	1,75	0,69
B2	0,14	0,14	0,11	0,10	3,08	0,43	2,42	0,27	7,74	1,59	7,87	4,72	1,01	0,78	0,86	0,14
B3	0,30	0,06	0,18	0,07	1,12	2,25	1,95	0,22	5,10	1,59	4,34	1,99	1,20	3,01	2,27	0,89
B4	0,47	0,22	0,26	0,14	0,87	2,18	1,60	0,11	1,77			1,33	0,47	0,37	0,73	0,40
B5	0,57	0,11	0,05	0,27	9,11	7,61	8,39	3,26	4,96	3,28	5,78	6,51	1,82	1,98	2,47	1,77
C1	2,38	0,92	1,91	0,33	3,32	0,06	1,58	0,06	1,76	0,24	1,46	1,44	1,80	0,00	3,88	0,16
C2	0,98	0,40	0,72	0,84	3,20	0,06	3,69	1,04	7,49	6,18	8,53	11,65	1,02	0,49	0,57	0,23
C3	1,69	1,21	1,61	1,85	11,59	22,83	12,16	5,17	8,66	9,08	9,37	13,07	6,10	4,80	8,12	2,94
C4	0,46	0,25	0,15	0,54	3,88	13,14	6,85	3,11	5,53	5,47	5,21	8,77	1,42	1,65	1,39	1,07
C5	3,50	3,38	4,13	6,21	5,99	20,68	12,96	3,33	5,58	9,95	9,67	13,71	5,28	6,42	8,30	9,09
D1	2,31	0,09	2,50	0,99	8,43	8,56	5,98	1,59	5,17	2,52	2,41	6,14	6,11	0,01	3,95	1,60
D2	0,02	0,00	0,01	0,00	3,84	8,55	5,98	1,08	7,25	3,06	7,15	7,02	4,49	3,54	3,50	1,09
D3	0,14	0,02	0,04	0,05	2,18	7,79	1,29	0,52	3,75	2,33	5,37	6,42	0,86	0,45	1,26	0,22
D4	0,58	0,20	0,46	0,68	6,98				5,29		6,36	1,57	3,07	2,70	3,64	1,08
D5	0,70	0,83	0,82	0,89	3,72	5,85	6,70	0,74	0,67	1,82	0,32	4,32	1,89	2,70	2,29	0,71

ANEXO 04 – GRÁFICO RESUMO

GRÁFICO RESUMO DO TRABALHO



Abreviações: SF 0,9% = Solução Fisiológica 0,9%; LVTX= Levotiroxina; CTC= Corticoide; IL= Interleucina; TNFα= Fator de Necrose Tumoral alfa; HLA= Antígeno Leucocitário Humano.
Fonte: Foram utilizadas algumas imagens do site Mind The Graph - Research Version Out(2019) adaptadas posteriormente pelo autor.