

ISAAC AZEVEDO SILVA

**Avaliação dos efeitos da anestesia peridural
torácica sobre as alterações miocárdicas
associadas à morte encefálica: estudo
experimental**

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

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Silva, Isaac Azevedo

Avaliação dos efeitos da anestesia peridural torácica sobre as alterações miocárdicas associadas à morte encefálica : estudo experimental / Isaac Azevedo Silva. -- São Paulo, 2013.

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.Sistema nervoso autônomo 3.Anestesia peridural 4.Bloqueio nervoso autônomo 5.Miocardite/fisiopatologia 6.Ratos Wistar

Dedicatória

Ao meu pai,

Antonio Floriano da Silva, homem de fé e coragem, que me ensinou que o
temor a Deus e a determinação valem muito mais que as riquezas.

Agradecimentos

Jamais estaria aqui se não fossem a capacidade, a dedicação, a paciência, a orientação e os cuidados do maior mestre que a ciência me apresentou: Prof. Dr. Luiz Felipe Pinho Moreira.

Muito obrigado!

À Profa. Dra. Paulina Sannomiya:

não há como retribuir tamanho empenho e inestimável contribuição na elaboração deste trabalho.

À Dra. Mara Regina G. Moreira pelo apoio e pelas palavras de encorajamento, quando tudo não passava de um sonho distante.

Ao Dr. Anderson Benício que me incendiou e me incentivou a buscar uma lacuna no conhecimento e a testar um modelo, do qual sairia esta tese.

Ao Prof. Dr. Arlindo Almeida Riso, que por inúmeras vezes me ouviu e orientou, tanto para a profissão quanto para a vida.

Aos Profs. Drs. Noedir Stolf, Paulo Cardozo e Paulina Sannomiya, cujas observações no exame de qualificação muito contribuíram para o aprimoramento deste estudo.

Aos professores e colegas do programa de pós-graduação em Cirurgia Torácica e Cardiovascular. Especialmente ao “*Prof.*” Gustavo Ieno Judas.

Aos professores do Colégio João Calvino e do Polivalente (E. E. Pe. José Maria de Man), em Coronel Fabriciano, MG. Especialmente à minha primeira professora, *Tia* Maria José.

Aos meus professores do CEFET-MG e da UFMG, em Belo Horizonte, MG.

A um funcionário desconhecido, do CEFET-MG, que respondeu àquela carta e abriu-me um belo horizonte.

À Sueli Gomes Ferreira, cujas mãos diligentemente trabalharam para que um rascunho com ideias se transformasse em um projeto de pesquisa.

Sou um privilegiado! Além de todo o aprendizado e um título de doutor, encontrei um amigo, como diriam, “*quase irmão*”: Cristiano de Jesus Correia. Um cirurgião habilidoso, um pouco temperamental! Sua contribuição a este

trabalho é imensurável. Pessoa muito querida, bem como sua digníssima Carolina Reguera Correia.

Ao Dr. José Walber Miranda Costa Cruz, inesquecível pela alegria e irreverência, mas principalmente pela presteza em sacrificar feriados para socorrer um aluno interestadual.

Ao Dr. Fernando Luiz Zandoni pelo trabalho desempenhado com precisão nas dosagens por ELISA.

Ao Prof. Dr. Luiz Fernando Ferraz da Silva “*Burns*” e ao aluno Diogo Kogiso pelo socorro na histologia.

Ao Sérgio, responsável pelo bem estar de nossos *Rattus norvegicus*.

À Leila Areco nossa alegre secretária do LIM 11.

À equipe do LIM-11: Clebson “*Kiko*”, Diogo, Dani, Maurício, Thales, Ismael, Antonio e Ana.

À Juliana Lattari Sobrinho que, por desempenhar com tamanha dedicação suas funções, fez muito mais que o esperado e evitou que eu enfrentasse inúmeros aborrecimentos.

Às meninas da pós, Neusa, Eva e Tatiane.

Às meninas da “*sala do Mago*”, Sandra, Raquel e Euridice.

Um agradecimento especial e em dose dupla: Rafael SIMAS e Laura Menegat, espero, em breve, Laura Menegat Simas. O casal mais divertido que conheço. Penso que nunca houve na história um doutorado como o nosso. Nesses últimos dias, principalmente, mal sabíamos quando estávamos trabalhando em uma ou em outra tese. Não teria conseguido concluir esse curso sem a ajuda de vocês. Muito obrigado por me receberem como alguém da família e cuidarem para que eu me sentisse à vontade, por trabalharem para que eu ficasse alimentado (e muito bem alimentado) e, sobretudo, acordado. “*Houston*”, fumaça branca!

Aos Drs. Jackson Brandão Lopes e Luiz Renato Dias Daroz que não apenas me abriram as portas da Cirurgia Cardíaca, mas também ofereceram precioso suporte para que eu concluísse o doutorado.

À fabulosa equipe da Coeur, Raquel, Elza, Ivani, Ronan e Maria Amélia.

Aos colegas e colaboradores do Hospital Márcio Cunha, Ipatinga-MG.
Especialmente da UCO.

Aos colegas e colaboradores do Hospital São Lucas de Governador Valadares-MG.

Ao Dr. Elson Borges Lima, meu amigo e companheiro de lutas desde os áridos tempos do início de nossa jornada e que, por ouvir a Cláudia, abriu-me as portas para uma excelente oportunidade. Mais que isso, me emprestou o carro, a casa e ainda sentiu-se culpado por não estar me ajudando o bastante!

À Cláudia, pela brilhante ideia de me convidar. Ao Sr. Elson, dona Ana e Vanessa, vocês nem imaginam o quanto lhes sou grato.

Ao Dr. Ricardo Barros Corso, sócio, amigo e grande incentivador. Acredita mais em meu potencial que eu mesmo. Pessoa de alma ímpar, capaz de se esforçar, a qualquer custo, para favorecer o sucesso alheio. Desdobrava-se no trabalho, para que eu pudesse me ausentar e estudar. MUITÍSSIMO obrigado!

À Theo Corso, nossa multifuncional gerente da Cardiovascular Associados, pessoa tão eficiente, bem disposta e prestativa, que é uma honra trabalhar a seu lado.

Às meninas da Cardiovascular Associados, Elda e Alessandra, que facilitam meu dia, lembram-me do que não posso esquecer e sempre providenciam aquele cafezinho!

À Dra. Aline Hamilton Goulart, sangue novo no grupo.

Aos perfusionistas, Denise, Letycia, Mateus e Henrique, quarteto fantástico.

Às instrumentadoras, Sirlene, Ingrid e Simone, as incansáveis.

Ao Dr. Cláudio Mares Guia, o Claudão, por assumir meus plantões, possibilitando minhas ausências.

À família Moreira: Moreira, Jelza e Sofia. Desde as provas de residência, sempre conosco: hospedagem, traslado e passeios turísticos inclusos. Ao Moreira, por esse coração mole disfarçado de “*dr. House*”, não engana ninguém! À Jelza, pelo cuidado com a Andréia, suas gestações e nossos rebentos. À Sofia, por nossos passeios no parque Villa Lobos e pelos inúmeros empréstimos do quarto. Muito obrigado! Vocês são demais!

Aos Neublum: Felipe, Ana, Manuela, Davi, Joaquim e de vez em quando, seu Augusto e dona Guilhermina. Não há como retribuir tamanho carinho comigo.

Ao Felipe, pela amizade sincera. É bom ter alguém pra desabafar, mesmo que em alta madrugada! À Ana pelo cuidado, alegria contagiante e conselhos inesquecíveis.

Aos Gadelha: Raphael, Fabíola, Rafinha e Guigão. Obrigado por me permitir fazer parte da história de vocês, por não medirem esforços para me receber, pela alegria em servir, pela consultoria automobilística, pelo passeio de kombi e por amarem tanto nosso sonho de Edificar Novos Lares.

Aos pastores Jonas Neves e Paulo Falçarela, demais pastores e amados irmãos da Igreja Batista do Povo, São Paulo. Obrigado pela confiança depositada.

Aos pastores Árlen, Éder e Dailva, e aos amados irmãos da Igreja Batista O Caminho, Governador Valadares-MG, pelo carinhoso cuidado.

Ao pastor Antonio Geraldo Pereira (Toninho) e toda família Plenitude. Obrigado pelo apoio nas decisões difíceis, pela orientação precisa, compreensão pelas ausências e cuidado Pleno.

Aos pastores Ciro e Lara, por terem sido usados por Deus para nos orientar, instruir, realizarem nosso casamento e nos encaminhar ao grupo do Enéas.

Ao Enéas, à Elis e à Rebecca, família de Deus! Obrigado por permanecerem me amando, mesmo conhecendo meus defeitos. Por favor, nunca desistam de mim. Elis, não se sinta velha só por ter um filho com quase 40. Rebecca, lamento, mas eu é que sou o primogênito.

Ao pastor Marco Túlio e à Alessandra, por terem nos orientado a buscar as coisas mais excelentes.

À Igreja Luz e Vida, Newark, NJ-USA. Obrigado pelas orações, inclusive para que os ratos sobrevivessem o período necessário.

À Marlene, que também clamou pelos ratinhos e não se esquece de mim em suas orações.

Ao Sabino e aos amigos de muuuito tempo, que sempre acreditaram em mim e torcem pelo meu sucesso (Maguinha, Cláudia, Val, Suinane, Angélica, Idelmar, Garretson, Frederico, Éder, Waldomiro, Samuel, Bodão, Washington, Ronaldo, Agnaldo).

Ao Aleandro, guerreiro de Deus, obrigado por ter insistido em meu discipulado. O céu agradece!

Ao Enoque, Marlene, Elaine e o mala do Edmilson. Obrigado por me considerarem tanto.

Ao Prof. João José OTIRON, pelo precioso apoio no trabalho de revisão, mas principalmente pela amizade e exemplo de vida, fé e superação.

Aos Silva. Conseguimos! Como diria a Vovó: pisamos na cabeça da “*serepente*”. À Lourdinha, que ao contemplar o meu sucesso, alegra-se e anima-se, para enfrentar com disposição e alegria, as inúmeras adversidades da vida. À nossa Luci, exemplo de garra e de submissão a Deus.

Aos Azevedo. É uma honra fazer parte deste clã. Esse troféu é nosso. Lutar, lutar, lutar; com muita raça e orgulho pra vencer! Ninguém pode com essa galera!

Aos meus avós, Levindo e Dodita; Dedé e Margarida; hoje, do outro lado da vida. Gente de uma vida tão dura e tão escassa que só imaginar um momento como esse seria declarada loucura.

À minha sogra, que se preocupa comigo como uma mãe, cuida para que tudo esteja em ordem e eu tenha tranquilidade para estudar.

Aos meus irmãos, Filipe, o José, amigo que eu jamais deveria ter abandonado no Vale; Israel, continue firme, sua vitória está bem perto; Cris, acredito plenamente em sua capacidade, vá em frente; Nanda, é tão bom tê-la bem perto e poder presenciar sua ascensão profissional; Isaias, o *Man*, atenta para o ministério que recebestes do Senhor para que o cumpras. *Truks “R” us!*

Às minhas queridas cunhadas, Jussara, Flaviane e Cleude, obrigado por cuidarem de meus irmãos (tenham paciência com esses caras!) e me abençoarem com lindos sobrinhos.

Aos meus sobrinhos, Sarinha, Aninha, Débora, Gabriel, Joshua e Mariana. Sigam o exemplo desse seu tio lindão (e “humilde”)!

À tia Sandra, que nos brindou recentemente com um curto período de sua adorável presença. Muito obrigado. Não estaria aqui, se não fossem suas intermináveis horas de trabalho, totalmente dedicadas aos sobrinhos. Essa vitória também é sua!

À minha mãe Cremilda. Obrigado por ter investido sua força, saúde e juventude num menino magro e estourado que apareceu para dar adeus ao amigo e, graças a você, acabou dando as boas-vindas ao sucesso.

À minha mãe, Vera, pelo dom da vida. Obrigado por sua simplicidade e disposição. Mesmo não entendendo para que tanto estudo, pediu a Deus por esse filho obcecado. Quando a pesquisa emperrou, clamou a Deus pelos ratinhos. Mãe, a resposta chegou. Obrigado por tudo!

Pai, queria poder passar mais tempo com você. Te admiro demais. Talvez você não se lembre do dia em que me explicou o que era ser um PhD. Seus olhos brilhavam tanto que eu pensei: um dia eu vou ser isso daí! Valeu!

À Isabel, delícia do papai. Muito obrigado pela doçura e carinho. Obrigado por compreender as inúmeras vezes em que o papai deixou de brincar com você, porque precisava estudar. Te amo, Florzinha! A Isabel chegou aqui, ela chegou para ficar, trazendo alegria e enchendo nosso lar...

Ao André, gatão do papai. Filhão, você tem uma energia exuberante, irradia disposição. Obrigado por brincar sozinho muitas vezes, porque o papai não podia lhe dar atenção. O papai ama você! O André é especial, não existe outro igual, ele é inteligente, obediente ele é sensacional!

À minha Andréia, amor da minha vida. Mulher virtuosa, que eu achei. Obrigado pela cumplicidade. Pelo amor. Por nossos lindos filhos. Por abrir mão de seus sonhos, em favor dos meus. Por compreender minhas ausências, impaciência, angústias e meu mal humor. Só você sabe o preço dessa conquista e, com certeza, pagou a maior parcela desta fatura. Obrigado por me amar e me fazer tão feliz. Te amo, minha Flor!

Ao único digno de toda honra, toda glória e todo louvor, o eterno e soberano:
Deus!

Epígrafe

“O temor do SENHOR é o princípio da sabedoria”

Provérbios 9.10

Normatização adotada

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

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

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

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

Sumário**Dedicatória****Agradecimentos****Epígrafe****Normatização adotada****Sumário****Resumo****Summary**

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1 OBJETIVO GERAL	4
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
3. ASPECTOS RELEVANTES DA LITERATURA	5
3.1 TRANSPLANTE CARDÍACO	5
3.2 MORTE ENCEFÁLICA	9
3.3 ANESTESIA PERIDURAL	12
4. MÉTODOS.....	14
4.1 PROTOCOLO EXPERIMENTAL	14
4.2 ANESTESIA E PREPARO CIRÚRGICO.....	16

4.3 INDUÇÃO DA MORTE ENCEFÁLICA.....	17
4.4 BLOQUEIO PERIDURAL	18
4.5 LEUCOGRAMA.....	18
4.6 COLETA DE MATERIAL.....	19
4.7 ELISA E IMUNOHISTOQUÍMICA	19
4.7.1 ELISA para $TNF-\alpha$ e $IL-1\beta$	19
4.7.2 Expressão de moléculas de adesão no tecido cardíaco	20
4.7.3 Expressão de moléculas apoptóticas.....	21
4.7.4 Alfa-actina.....	22
4.8 ESTUDO HISTOLÓGICO	23
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	23
5. RESULTADOS	24
5.1 PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA.....	24
5.2 LEUCÓCITOS TOTAIS	25
5.3 MOLÉCULAS DE ADESÃO	26
5.4 $TNF-\alpha$ E INTERLEUCINA- 1β NO SORO	27
5.5 $TNF-\alpha$ E $IL-1\beta$ NO TECIDO CARDÍACO	28
5.6 AVALIAÇÃO DE APOPTOSE NO TECIDO CARDÍACO	28
5.7 DOSAGEM DE α -ACTINA	30
5.8 ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	31

6. DISCUSSÃO	32
7. CONCLUSÕES	39
8. REFERÊNCIAS	40

Apêndice

Resumo

SILVA I.A. *Avaliação dos efeitos da anestesia peridural torácica sobre as alterações miocárdicas associadas à morte encefálica: estudo experimental* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

INTRODUÇÃO: Atualmente, a maior limitação ao transplante cardíaco, em todo o mundo, é a escassez de doadores cujo número está sempre aquém do número de pacientes portadores de doença cardíaca terminal, e esse hiato fica ainda maior pelo fato de cerca de 25 % dos corações doados não serem utilizados, por estarem acometidos por acentuada disfunção. A descarga catecolaminérgica associada à morte encefálica poderia ser um dos elementos implicados nesta disfunção. Assim, intervenções terapêuticas com intuito de minimizar o exacerbado estímulo simpático visam, em última instância, ampliar a oferta de órgãos para o transplante. OBJETIVOS: Investigar a hipótese de que a anestesia peridural torácica seja capaz de bloquear a tempestade autonômica inerente à morte encefálica por hipertensão intracraniana aguda, minimizando as alterações hemodinâmicas, reduzindo a resposta inflamatória e, por conseguinte, melhorando a condição do enxerto. MÉTODOS: Ratos *Wistar* machos (250-350 g) anestesiados (isoflurano 5 %) e monitorados continuamente para o registro da pressão arterial média foram submetidos à inserção de cateter no espaço peridural em nível torácico e, em seguida, submetidos à morte encefálica por hipertensão intracraniana aguda pela

insuflação de um cateter de Fogarty[®] introduzido por trepanação. Os animais (n = 28) foram alocados em 4 grupos: grupo salina - infusão de 20 µL de solução salina pelo cateter peridural antes da indução da morte encefálica; grupo bupi-pré - infusão de 20 µL de solução de bupivacaína a 0,5 % pelo cateter peridural, antes da indução da morte encefálica; grupo bupi-20 - infusão de 20 µL de solução de bupivacaína a 0,5 % pelo cateter peridural 20 minutos após a indução da morte encefálica; grupo bupi-60 - infusão de 20 µL de solução de bupivacaína a 0,5 % pelo cateter peridural 60 minutos após a indução da morte encefálica. Após 6 horas os animais foram submetidos à eutanásia por exsanguinação. Foram realizadas dosagens séricas e no tecido cardíaco das citocinas interleucina (IL)-1 β e fator de necrose tumoral (TNF)- α pelo método de ELISA. As moléculas de adesão endoteliais, *vascular adhesion molecule* (VCAM)-1 e *intercellular adhesion molecule* (ICAM)-1, proteínas envolvidas no processo de apoptose, Bcl-2 e caspase-3, e a α -actina foram avaliadas no tecido miocárdico por técnica imunohistoquímica. Cortes longitudinais do coração foram corados com hematoxilina/eosina e avaliados quanto à presença de edema, infiltrado leucocitário e congestão vascular. Contagens totais de leucócitos circulantes foram realizadas antes da indução da morte encefálica e 3 e 6 horas após. RESULTADOS: Logo após a insuflação do cateter de Fogarty[®] todos animais evoluíram com sinais clínicos de morte encefálica: midríase bilateral fixa e ausência de reflexo corneano. O aumento súbito e efêmero da pressão arterial foi observado em todos os animais, à exceção do grupo que recebeu a bupivacaína previamente à indução da morte encefálica (grupo bupi-pré) ($p < 0,05$). Houve acentuada e progressiva leucopenia em todos os grupos. As citocinas IL-1 β , TNF- α , tanto no

soro quanto no miocárdio, não apresentaram diferenças significativas entre os grupos. As moléculas de adesão VCAM-1 e ICAM-1, as proteínas Bcl-2 e caspase-3, a α -actina, bem como a análise histológica do miocárdio não apresentaram diferenças significativas entre os grupos. **CONCLUSÕES:** A anestesia peridural torácica foi efetiva em bloquear o pico hipertensivo associado à morte encefálica. Contudo, tal bloqueio não se correlacionou a alterações na concentração de citocinas, expressão de moléculas de adesão, expressão de proteínas envolvidas com o processo apoptótico e α -actina, e alterações histológicas e do leucograma. Portanto, a tempestade autonômica não parecer ser a responsável pela ativação da resposta inflamatória e, em última instância, pela disfunção miocárdica associada à morte encefálica.

Descritores: Morte encefálica; Sistema nervoso autônomo; Anestesia peridural; Bloqueio nervoso autônomo; Miocardite/fisiopatologia; Ratos, Wistar.

Summary

SILVA I.A. *Assessment of the effects of thoracic epidural anesthesia on myocardial changes associated with brain death: an experimental study* [Thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2013.

BACKGROUND: Currently, the main limitation to cardiac transplantation, worldwide, is the shortage of donors whose number is always smaller than the number of patients with terminal heart disease, and this gap is even greater because about 25 % of donated hearts are not used due to severe dysfunction of unknown cause. Brain-death associated catecholaminergic storm may be implicated in this dysfunction. Thus, therapeutic interventions aiming to reduce the sympathetic stimulation result, ultimately, in an increase in the number of organs for transplantation. OBJECTIVES: To investigate the hypothesis that thoracic epidural anesthesia is capable of blocking the sympathetic discharge inherent to brain death, by acute intracranial hypertension, minimizing hemodynamic changes, and reducing the inflammatory response improving, therefore, the graft outcome. METHODS: Male *Wistar* rats (250 - 350 g) anesthetized (5 % isoflurane) and continuously monitored to record mean arterial pressure, underwent insertion of a catheter into the epidural space, at the thoracic level. Brain death was induced by acute intracranial hypertension by inflating an intracranially inserted Fogarty catheter. The animals (n = 28)

were divided into 4 groups: saline group - infusion of 20 μ L of saline through the epidural catheter before induction of brain death; pre-bup group - infusion of 20 μ L of bupivacaine through epidural catheter before induction of brain death; bup-20 group - infusion of 20 μ L of bupivacaine through epidural catheter 20 min after induction of brain death; bup-60 group - infusion of 20 μ L of bupivacaine through epidural catheter 60 min after induction of brain death. After 6 h the animals were exsanguinated. Serum and cardiac tissue concentrations of cytokines, interleukin (IL)-1 β and tumor necrosis factor (TNF)- α , were performed by ELISA. The endothelial adhesion molecules, vascular adhesion molecule (VCAM)-1 and intercellular adhesion molecule (ICAM)-1, proteins involved in apoptosis, Bcl-2 and caspase-3, and α -actin were evaluated in myocardial tissue by immunohistochemistry. Longitudinal sections of the heart were stained with hematoxylin/eosin and evaluated for the presence of edema, vascular congestion and leukocyte infiltration. White blood cell counts were obtained prior to induction of brain death, 3 and 6 h thereafter. RESULTS: Clinical signs of brain death, fixed dilated pupils and absence of corneal reflex, were observed immediately after catheter insuflation. The sudden increase in mean arterial pressure was observed in all animals except in those receiving bupivacaine prior to brain death induction (pre-bup) ($p < 0.05$). There was a marked and progressive leukopenia in all groups. Cytokine levels, IL-1 β and TNF- α , in serum and cardiac tissue, showed no significant differences among groups. Adhesion molecules, VCAM-1 and ICAM-1, the proteins, Bcl-2, caspase-3 and α -actin, and the histological analysis of the myocardium showed no significant differences among groups. CONCLUSIONS: The thoracic epidural anesthesia was effective to block the hypertensive peak associated

with brain death. However, this blockage does not correlate to changes in the levels of cytokines, expression of adhesion molecules and expression of apoptosis-linked proteins, and α -actin. Furthermore, no changes in histological analysis and white blood cell counts were observed. The autonomic storm does not seem to be responsible for the activation of the inflammatory response and, ultimately, for the myocardial dysfunction associated with brain death.

Descriptors: Brain death; Autonomic nervous system; Epidural anesthesia; Autonomic nerve block; Myocarditis/physiopathology; Rats, Wistar.

1. Introdução

Nos últimos anos tem sido observado um crescimento no número de pacientes portadores de insuficiência cardíaca em todo mundo¹, sendo esta síndrome uma importante causa de morbidade e mortalidade. Muito se progrediu no conhecimento dessa afecção, bem como no seu tratamento. Entretanto, a insuficiência cardíaca terminal constitui-se em quadro de difícil manejo, com acentuado impacto na qualidade de vida de seus portadores, os quais são submetidos a repetidas internações hospitalares e apresentam sobrevida média não superior a cinco anos¹. Para esse grupo de pacientes, a melhor alternativa é o transplante cardíaco¹⁻³. Segundo a Associação Internacional para o Transplante de Coração e Pulmão (*International Society for Heart and Lung Transplantation*), até 2012, foram realizados mais de 104.000 transplantes cardíacos em todo o mundo, com uma sobrevida média de 10 anos⁴.

As taxas de sucesso vêm progredindo graças ao melhor entendimento do manejo de doadores, bem como ao aprimoramento dos cuidados perioperatórios, desenvolvimento de novas drogas e diferentes modalidades de imunossupressão^{5,6}. Contudo, a escassez de doadores é a maior limitação atual ao transplante cardíaco^{1,2,7,8}.

Corações utilizados para transplante vêm de pacientes em morte encefálica, um estado que se estabelece após a cessação irreversível de todas as funções cerebrais. Todavia, na medida em que os processos cerebrais se

interrompem, uma imensa gama de alterações fisiológicas^{9,10} se inicia, de modo que, aproximadamente, 20 a 25 % dos potenciais doadores são descartados¹¹⁻¹⁵.

Uma vez que a morte encefálica é o ponto de partida para um novo doador de coração¹⁶ e, ao mesmo tempo, as alterações por ela induzidas, tais como a deterioração hemodinâmica^{17,18}, mudanças metabólicas^{19,20}, da coagulação²¹ e hormonais^{20,22,23}, podem tornar inviável a utilização do órgão, a melhor elucidação dos mecanismos fisiopatológicos²⁴, que se seguem à morte encefálica, poderá oferecer alternativas de manejo clínico do potencial doador e a consequente expansão do número de aloenxertos viáveis^{2,25}.

No advento da morte encefálica por hipertensão intracraniana aguda, instala-se a tempestade autonômica¹⁰, uma exacerbada ativação simpática, caracterizada por taquicardia e hipertensão. Nesse período, a concentração sérica de catecolaminas pode atingir valores muito elevados, com relatos de aumentos superiores a 1.000 vezes¹⁶. Além do mais, alterações imunológicas^{26,27}, a liberação de citocinas e expressão aumentada de moléculas de adesão²⁸ culminam em inflamação sistêmica^{10,27}. Embora essa complexa interação morte encefálica e disfunção miocárdica ainda não esteja totalmente esclarecida^{2,21,29,30,31}, acredita-se que a liberação de catecolaminas³² ocupe um papel central nesse processo, seja por efeito intrínseco nos cardiomiócitos^{33,34}, seja pelas alterações hemodinâmicas ou pela associação de ambos³⁵.

Em cirurgias de grande porte e no trauma, há importante ativação do sistema simpático, a qual provoca diversas alterações cardiovasculares, tais

como: aumento do inotropismo, do débito cardíaco e da resistência vascular periférica³⁶, podendo culminar em isquemia miocárdica³⁷. Como o uso de anestésicos locais pela via peridural, sobretudo no seguimento torácico, propicia importante simpatectomia transitória³⁸⁻⁴², esta modalidade anestésica tem sido utilizada com o intuito de diminuir os efeitos deletérios da ativação simpática exacerbada, reduzindo a morbidade cirúrgica^{39,43}.

Visto que a morte encefálica é acompanhada de intensa ativação simpática e provoca diversas alterações inflamatórias, a anestesia peridural torácica poderia, ao modular a descarga simpática, proporcionar melhor controle hemodinâmico e da resposta inflamatória.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos do bloqueio simpático obtido com a anestesia peridural torácica nas alterações da resposta inflamatória e do tecido miocárdico em ratos submetidos à morte encefálica.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar, em ratos submetidos à morte encefálica, os efeitos da anestesia peridural torácica:

- no comportamento hemodinâmico;
- no comportamento da resposta leucocitária;
- na expressão de marcadores da resposta inflamatória sistêmica e no tecido cardíaco;
- na histologia cardíaca.

3. Aspectos relevantes da literatura

3.1 *Transplante Cardíaco*

A história do transplante cardíaco remonta aos estudos de Carrel e Guthrie no início do século XX, quando um coração de um cão foi transplantado para a região cervical de outro cão⁴⁴. Aproximadamente quatro décadas depois, Demikhov realizou o primeiro transplante cardíaco ortotópico e demonstrou que um aloenxerto poderia gerar débito cardíaco eficaz no organismo do animal transplantado⁴⁵. Lower, Dong e Shumway publicaram em 1965 os resultados de seus experimentos, cujos animais ultrapassaram a marca dos trinta dias de sobrevida pós-transplante cardíaco⁴⁶. Em seres humanos, o primeiro transplante cardíaco foi realizado em 1967 e, embora o paciente tenha sobrevivido apenas 18 dias, uma verdadeira explosão de transplantes cardíacos ocorreu em todo o mundo. Contudo, a falta de conhecimento de um adequado manejo da imunossupressão propiciava uma sequência de insucessos⁴⁵.

Os primeiros protocolos de imunossupressão no transplante cardíaco baseavam-se, sobretudo, na experiência do transplante renal e consistiam num esquema de globulina policlonal antitímócitos, prednisona e azatioprina⁴⁷. Esse esquema, dada a sua inespecificidade, levava à supressão da resposta imune

do paciente, permitindo uma alta incidência de infecções oportunistas. Tal fato, aliado à inexistência de um método acurado de diagnóstico de rejeição, tornava a condução do transplantado cardíaco um verdadeiro desafio com uma sobrevida em um ano não superior a 50 %.

Nesse contexto, dois importantes eventos marcaram o transplante cardíaco na década de 1970. Na Universidade de Stanford, em 1972, foi implementada a biópsia endomiocárdica⁴⁷. Desse modo foi possível estabelecer um método histopatológico de diagnóstico de rejeição o que, por conseguinte, facilitou o manejo dos imunossupressores. Na segunda metade da década de 1970, foi obtida a ciclosporina, a partir de um extrato fúngico⁴⁸. Essa droga, diferente das anteriores, apresentava efeito imunossupressor mais seletivo atuando, preferencialmente, contra linfócitos T, sem produzir depressão da medula óssea. Seu mecanismo de ação envolve a inibição da calcineurina, uma espécie de segundo mensageiro do complexo de histocompatibilidade de classe II, cuja via final é a proliferação celular⁴⁹. Com a instituição dessas duas inovações, o grupo da Universidade de Stanford conseguiu elevar a sobrevida em um ano para índices em torno dos 80 %⁴⁹.

Embora os resultados no transplante fossem incontestáveis com o uso da ciclosporina, diversos eram os efeitos colaterais da droga, dentre os quais: hipertensão arterial, nefro e neurotoxicidade, diabetes, linfoma de células B, além de alterações cosméticas, tais como o hirsutismo e a hiperplasia gengival⁴⁸. Obtido de extrato de *Streptomyces tsukabaensis*, o tacrolimus é fármaco com mecanismo de ação e resultados semelhantes aos da

ciclosporina⁴⁸, porém, com menor incidência de hipertensão arterial e alterações cosméticas⁴⁹.

O micofenolato de mofetila (MMF), substância responsável pela inibição da síntese *de novo* das purinas, atua como droga antiproliferativa. Comparado à azatioprina, outro antiproliferativo, o MMF reduziu os episódios de rejeição e a mortalidade⁴⁹.

Uma vez que a IL-2 interage com o receptor na membrana dos linfócitos T, desencadeia-se um sinal de estímulo à proliferação celular. Dois fármacos, o sirolimus e o everolimus, são capazes de interromper esse sinal. Dentre os efeitos adversos dessas substâncias, destacam-se a nefrotoxicidade, hipertensão, hiperlipemia e leucopenia⁴⁹. Em estudo comparativo entre sirolimus e azatioprina, ambos combinados com ciclosporina e esteroides, Keogh et al⁵⁰ observaram menor incidência de doença vascular do enxerto no grupo tratado com sirolimus. Tal achado reveste-se de importância, visto ser a estenose coronariana a via final da doença vascular do enxerto, uma condição com acentuado impacto na sobrevida do paciente transplantado do coração.

Outro aspecto relevante na imunossupressão é a terapia de indução, a qual consiste numa alternativa para pacientes com elevado risco para rejeição ou com limitação ao uso dos inibidores da calcineurina, seja pela presença de disfunção renal ou pelo risco de desenvolvê-la. A terapia de indução produz uma intensa imunossupressão perioperatória pelo uso de agentes linfólíticos, anticorpos anti-CD3, globulinas antitimócitos ou antagonistas dos receptores de IL-2. Contudo, pacientes submetidos a essa modalidade apresentam maior propensão a complicações infecciosas⁴⁹.

Segundo dados da Associação Internacional para o Transplante de Coração e Pulmão, a terapia de indução de imunossupressão vem sendo menos usada na atualidade e, quando esta se faz necessária, os antagonistas dos receptores da IL-2 são os mais utilizados. Entre os inibidores da calcineurina, o tacrolimus tem sido preferido à ciclosporina. Para a inibição do ciclo celular, a azatioprina tem sido preterida em favor do micofenolato de mofetila. Sirolimos e everolimus são pouco utilizados no primeiro ano pós-transplante. Contudo, seu uso aumenta com o passar do tempo atingindo 20 % dos pacientes com cinco anos pós-transplante. O uso da prednisona vem, gradualmente, diminuindo⁴. Com a evolução da terapia imunossupressora, a disponibilidade de doadores tornou-se a maior barreira para o transplante cardíaco^{1,2,5,6,8}.

Quanto à etiologia da insuficiência cardíaca, levantamentos relativos ao período de 2006 a 2011 identificaram que 54 % dos transplantes cardíacos em adultos ocorreram em decorrência de cardiomiopatias não isquêmicas, seguidos de cardiomiopatias isquêmicas com 37 %. Doenças congênitas e valvares responderam por 6 %⁴.

A mortalidade após o primeiro ano do transplante tem se mantido relativamente constante nos últimos vinte anos. A mediana de sobrevida dos transplantados do coração, numa coorte de mais de 96.000 pacientes, foi de 10 anos⁴.

3.2 Morte encefálica

No contexto do transplante de órgãos, o doador é um indivíduo previamente hígido, que foi acometido por um evento agudo, na maioria das vezes, um trauma como acidente de trânsito, queda, agressão por projétil de arma de fogo, dentre outros, ou ainda um grave acidente cerebrovascular. A evolução das lesões, provocadas por um desses eventos, pode culminar com a morte encefálica do paciente, quase sempre por hipertensão intracraniana. Por esta razão, a hipertensão encefálica ocupa lugar de destaque no advento da morte encefálica, principalmente no contexto do transplante de órgãos. Em termos fisiopatológicos, a hipertensão encefálica leva à isquemia cérebro-espinhal, cuja evolução dá-se no sentido craniocaudal, de forma a iniciar-se no cérebro, avançar pelo mesencéfalo, depois pela ponte, bulbo e finalmente pela medula⁵¹. Há, então, uma progressiva e inexorável perda da função do sistema nervoso central, com estreita manifestação sistêmica estereotipada, sobretudo na respiração e nos parâmetros cardiovasculares. Inicialmente, em virtude de ativação parassimpática reflexa, há bradicardia que se associa a alterações ventilatórias à medida que zonas mesencefálicas de controle respiratório são atingidas⁵². Com a progressão caudal da lesão nervosa, o centro vagal cardiomotor, de localização mais distal, é destruído ficando abolida a atividade parassimpática. O resultado é uma maciça atuação do sistema simpático sem a habitual contrarregulação⁵². Seguindo-se a esse imenso surto catecolaminérgico, há um período de acentuada redução na descarga

simpática com consequente instabilidade hemodinâmica exacerbada pela perda do tônus vascular periférico^{53,54}.

A interrupção da atividade encefálica, entretanto, não se limita a produzir alterações hemodinâmicas. Há, também, ativação do sistema imune^{55,56} e alterações metabólicas, as quais influenciarão o desempenho dos órgãos, uma vez transplantados^{27,57}. Demonstrou-se que pâncreas de ratos submetidos à morte encefálica, quando comparados a pâncreas de animais controle, apresentavam menor perfusão capilar e maior interação leucócito-endotélio além de sinais histológicos de pancreatite²². Observou-se, em cães²⁰, que a morte encefálica, por hipertensão intracraniana, cursava com acentuada variação nas concentrações plasmáticas de ACTH (hormônio adrenocorticotrófico), vasopressina, glucagon e cortisol, além dos hormônios tireoidianos triiodotironina e tiroxina (T3 e T4).

O coração, quando comparado a outros órgãos, parece sofrer mais intensamente a influência das alterações fisiopatológicas desencadeadas pela morte encefálica. Enquanto nos demais órgãos observa-se que os enxertos, oriundos de doadores em morte encefálica apresentam apenas um desempenho funcional inferior, frente aos de doações inter-vivos⁵⁸, para o coração, a morte encefálica, por vezes, inviabiliza o transplante¹¹⁻¹⁵, em virtude de grave disfunção miocárdica. Embora os mecanismos dessa disfunção não estejam plenamente esclarecidos^{2,21,29-31,59}, a estreita relação entre o coração e as aminas vasoativas faz com que a descarga catecolaminérgica seja apontada como o principal responsável pela disfunção cardíaca^{32,34,35,59}. Desse modo, há relatos de simpatectomia cirúrgica⁶⁰, uso de bloqueadores simpáticos

periféricos⁶¹ e, ainda, a combinação de drogas de ação central e periférica⁵⁹, sempre objetivando um controle sobre a descarga de aminas vasoativas com consequente proteção da função cardiovascular. Quanto aos mecanismos pelos quais a descarga simpática atua de forma deletéria sobre a fisiologia cardíaca, estudos experimentais apontam para a dessensibilização dos receptores beta adrenérgicos¹ e para o desequilíbrio entre oferta e demanda de oxigênio⁶¹.

Entretanto, a atuação da morte encefálica sobre o coração não se limita aos casos de disfunção extrema. Mesmo nas situações em que o órgão apresenta-se adequado ao transplante, a morte encefálica correlaciona-se à maior incidência de episódios de rejeição tanto aguda²⁷ quanto crônica⁶².

3.3 Anestesia peridural

As fibras pré-ganglionares simpáticas originam-se na região intermédio-lateral dos doze segmentos torácicos, bem como dos três primeiros segmentos lombares da medula espinhal e deixam a medula acompanhadas de fibras motoras, dirigindo-se aos gânglios paravertebrais³⁹. Sua constituição, fibras mielinizadas e de fino calibre (aproximadamente 3 μm)⁶³, as torna muito susceptíveis à ação dos anestésicos locais. Os primeiros quatro ou cinco segmentos torácicos originam fibras pré-ganglionares para formar os gânglios cervicais superiores, médios, e gânglio estrelado, que fornecem inervação simpática para o segmento cefálico, pescoço, membros superiores, coração e pulmões^{39,43}.

Os anestésicos locais bloqueiam o impulso nervoso pela inibição da permeabilidade ao sódio⁶⁴, impedindo a despolarização celular⁶⁵. Pela via epidural, essas drogas propiciam excelente analgesia em cirurgias torácicas e abdominais. Além do mais, há um efeito simpaticolítico transitório, com implicações na fisiologia de diversos órgãos tais como: coração, pulmão, rins, glândulas supra-renais e outros^{39,40,43}.

Dentre os diversos anestésicos locais disponíveis, a bupivacaína, de ampla aceitação clínica, desde sua introdução no início dos anos 1960⁶⁶, é o anestésico local de longa duração com o qual os outros são comparados^{66,67}. Quimicamente, a bupivacaína pertence à classe das amino-amidas⁶⁵ e consiste de uma mistura racêmica de dois enantiômeros^{68,69}. Quando no espaço

peridural torácico, a bupivacaína, por propiciar uma simpatectomia química⁴³, pode apresentar efeito protetor sobre o enxerto no advento da morte encefálica.

4. Métodos

Foram utilizados ratos *Wistar*, machos, pesando entre 250 e 350 g, fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cirurgia Cardiovascular e Fisiopatologia da Circulação (LIM-11). Todos os animais foram mantidos em ambiente controlado para temperatura (23 ± 2 °C), umidade e exposição à luz, com ciclo claro/escuro de 12 horas, e livre acesso à ração e água.

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob nº. SDC 3247/08163.

Os experimentos foram realizados em conformidade com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. (disponíveis em www.cobea.org.br)

4.1 Protocolo experimental

Foram utilizados 28 ratos *Wistar* machos, distribuídos em 4 grupos, de acordo com o momento de indução do bloqueio peridural (Fig. 1):

- (1) grupo salina - infusão de 20 μ L de solução salina pelo cateter peridural, antes da indução da morte encefálica;
- (2) grupo bupi-pré - infusão de 20 μ L de solução de bupivacaína a 0,5 % pelo cateter peridural, antes da indução da morte encefálica;
- (3) grupo bupi-20 - infusão de 20 μ L de solução de bupivacaína a 0,5 % pelo cateter peridural, 20 minutos após a indução da morte encefálica;
- (4) grupo bupi-60 - infusão de 20 μ L de solução de bupivacaína a 0,5 % pelo cateter peridural, 60 minutos após a indução da morte encefálica.

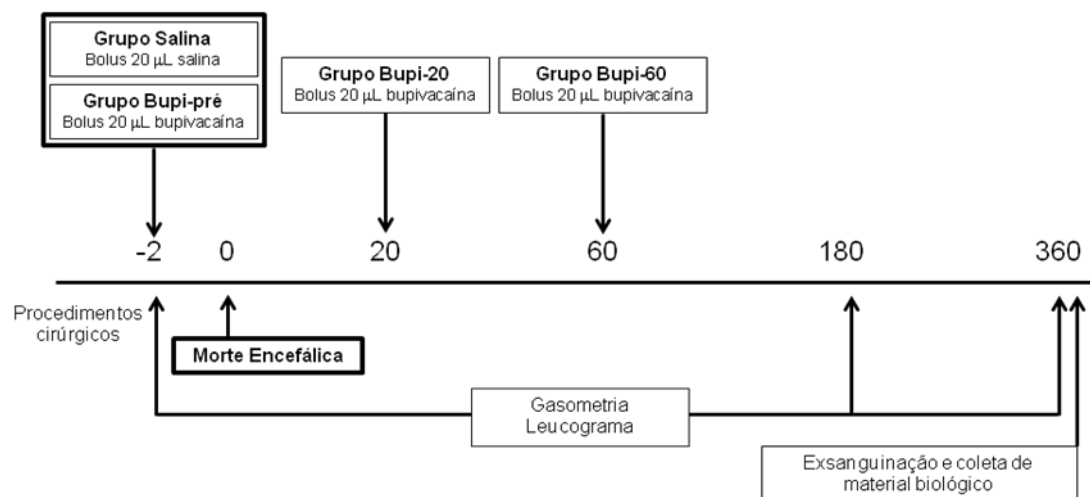


Figura 1. Esquema do protocolo experimental.

4.2 Anestesia e preparo cirúrgico

A anestesia foi induzida em câmara fechada, com mistura de oxigênio 100 % e isoflurano a 5 %, realizada por sistema de anestesia (Harvard Apparatus, Inc, Holliston, MA, USA), seguida de intubação orotraqueal com jelco 16 G (BD Insyte, Juiz de Fora, MG, Brasil) e mantido em ventilação mecânica, através de ventilador para pequenos animais (Harvard 683, Harvard Apparatus Inc., Holliston, MA, USA). O plano anestésico foi mantido com isoflurano a 2 %. A ventilação foi realizada com FiO_2 de 100 %, com volume corrente de 10 mL/kg e 70 ciclos/min.

Os animais foram colocados em decúbito dorsal e submetidos à antissepsia da região cervical ventral com iodopovidine, seguido de tricotomia. Foram realizadas a dissecação e a cateterização da artéria carótida e da veia jugular com cateter polietileno PE50.

O cateter colocado na artéria carótida foi conectado a um transdutor de pressão (P23XL - Viggo-Spectramed Inc., Oxnard, CA, USA), ligado a um sistema multicanal de aquisição de dados biológicos (Acqknowledge – Biopac Systems Inc., Goleta, CA, USA). Com esse sistema, foram registrados os dados de pressão arterial média (PAM) ao longo do experimento. Através da artéria carótida também foram coletadas amostras de sangue para a determinação dos parâmetros pH, pCO_2 , pO_2 , BE, HCO_3^- , Na^+ , K^+ e lactato (Radiometer ABL 555 - Radiometer Medical, Copenhagen, Denmark).

Através da veia jugular, foi realizada a infusão contínua de solução fisiológica a uma velocidade de 2 mL/h utilizando-se bomba de infusão contínua (Harvard Apparatus Inc., Holliston, MA, USA).

As medidas hemodinâmicas foram realizadas continuamente desde a inserção do cateter na artéria carótida até o término do procedimento que se deu após 6 horas de morte encefálica.

4.3 Indução da morte encefálica

Após intubação orotraqueal e cateterização dos vasos cervicais, os animais foram colocados em decúbito ventral para realização de trepanação. Uma incisão longitudinal de, aproximadamente, 1 cm foi realizada para exposição da calota craniana. Com o uso de uma broca motorizada, procedeu-se a perfuração óssea da cabeça. Foi introduzido um cateter Fogarty® 4 F (Edwards Lifescience LLC, Irvine, CA, USA) no espaço intracraniano. A morte encefálica foi induzida pela rápida insuflação de 500 µL de solução de cloreto de sódio a 0,9 % no cateter de Fogarty® e foi confirmada por midríase bilateral fixa e ausência de reflexo corneano⁷⁰. Uma vez confirmada a morte encefálica, interrompeu-se a oferta do anestésico e os animais foram mantidos em ventilação mecânica com oxigênio a 100 %. A cada período de 30 minutos, os animais foram reavaliados, quanto aos sinais de morte encefálica (midríase paralítica e ausência de reflexo corneano).

4.4 Bloqueio peridural

Ao término da instrumentação da calota craniana, os animais, ainda em decúbito ventral, foram colocados sobre um pequeno coxim, previamente montado com compressas de gases, afim de que se obtivesse uma curvatura convexa da coluna vertebral na região da transição toracolombar. Foram realizadas antissepsia do dorso, tricotomia e incisão mediana longitudinal de, aproximadamente, 2 cm para exposição da coluna vertebral entre as vértebras T11 e L1. Com a curvatura das vértebras, foi possível introduzir um cateter PE10 no espaço peridural. O cateter fora previamente preenchido pela solução a ser infundida, salina ou bupivacaína a 0,5 % sem vasoconstritor (Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., São Paulo, SP, Brasil). A localização do cateter foi confirmada após a eutanásia.

4.5 Leucograma

Através de punção na cauda dos animais, obtiveram-se amostras de sangue (20 μ L), as quais foram diluídas em solução de Turk (1:20) para a quantificação do número total de leucócitos em câmara de Neubauer, em microscópio óptico em aumento de 400x.

4.6 Coleta de material

Os animais foram submetidos à eutanásia por exsanguinação da aorta abdominal. Amostras de soro foram obtidas a partir da centrifugação do sangue a 1300 *xg*, por 15 minutos, à temperatura ambiente, e alíquotas (500 μ L) do sobrenadante foram armazenadas à -80 °C para posteriores dosagens. Os corações foram excisados e seccionados em duas partes semelhantes ao longo de seu maior eixo. Uma das partes foi armazenada à -80 °C e a outra foi fixada em formaldeído a 10 %.

4.7 ELISA e imunohistoquímica

A quantificação de IL-1 β , TNF- α foi realizada pelo método de enzima-imunoensaio (ELISA). A semi-quantificação de α -actina, ICAM-1, VCAM-1, Bcl-2 e caspase-3, no tecido cardíaco, foi realizada através de imunohistoquímica.

4.7.1 ELISA para TNF- α e IL-1 β

TNF- α e IL-1 β foram quantificadas pela técnica de enzima-imunoensaio (ELISA) no soro e no tecido cardíaco. Para a mensuração no soro, foram utilizadas as alíquotas previamente coletadas. Para o tecido cardíaco, amostras congeladas foram maceradas e ressuspensas em solução tampão fosfato salina (PBS), seguida de centrifugação a 1.500 *xg* por 15 minutos a 4 °C. As

concentrações teciduais foram determinadas a partir do sobrenadante. Utilizou-se o *kit* Quantikine® (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA) a 450 nm e os resultados foram expressos em pg/mL, para as concentrações séricas e em pg/g, para as concentrações no tecido. Animais *naïve* foram utilizados para a quantificação dos níveis basais das referidas citocinas.

4.7.2 Expressão de moléculas de adesão no tecido cardíaco

Das amostras congeladas de tecido cardíaco, cortes seriados, de 6 µm de espessura, foram fixados em acetona gelada por 10 min, para detecção de ICAM-1 e VCAM-1. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com solução tampão (SuperBlock Buffer, Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) por 12 h a 4 °C. Para a imunodeteção de ICAM-1 e VCAM-1, foram utilizados o anticorpo monoclonal anti-ICAM-1 de rato (Abcam Inc., Cambridge, MA, USA) ou o anticorpo monoclonal anti-VCAM-1 de camundongo (Abcam Inc., Cambridge, MA, USA), previamente conjugados à biotina e diluídos na proporção de 1:50 em solução tampão fosfato salina (PBS) contendo 0,3 % de Tween-20. Após a incubação por 12 horas a 4 °C, os cortes foram lavados sucessivamente com PBS e, na sequência, foram incubados por 1 hora à temperatura ambiente com o complexo estreptavidina-fluoresceína (Amersham Pharmacia Biotech, London, UK) diluído em PBS na proporção de 1:200. Após lavar as lâminas com PBS, as amostras foram recobertas com solução de iodeto de propídio (Vector, Burlingame, CA, USA) para preservação da fluorescência. A análise foi realizada através de sistema de aquisição de

imagens com câmera digital CoolSNAP-Pro (Nikon, Tokyo, Japan), acoplada a microscópio de fluorescência (Nikon, Tokyo, Japan) e as imagens foram analisadas com software Image-Pro Plus 4.1 (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA). Os resultados foram expressos em intensidade média de fluorescência.

4.7.3 Expressão de moléculas apoptóticas

Das amostras congeladas de tecido cardíaco, cortes seriados de 6 µm de espessura, foram fixados em acetona gelada durante 10 minutos e estocados a -20 °C para processamento posterior. O processamento incluiu o bloqueio da peroxidase endógena com PBS e H₂O₂ a 3 %. Em seguida, os sítios inespecíficos foram bloqueados pela incubação dos cortes em solução tampão livre de biotina (Super Block Blocking Buffer, Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA), por período de 16 horas a 4 °C. Anticorpos policlonais anti-caspase-3 (Abcam Inc., Cambridge, MA, USA) e anti-Bcl-2 (Abcam Inc., Cambridge, MA, USA), previamente conjugados a biotina, diluídos em PBS com Tween-20 a 0,3 % na proporção de 1:50 e sobrepostos aos cortes para incubação por 16 horas a 4 °C. Em seguida, as amostras foram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente com estreptavidina diluída em PBS na proporção de 1:500. A revelação do complexo antígeno-anticorpo foi realizada pela aplicação de solução 3,3'-diaminobenzidina (DAB) a 60 % por 1 minutos, seguido de contra-coloração com hematoxilina a 10 % por 2 minutos, desidratação dos cortes por imersão em soluções crescentes de etanol,

diafanização por imersão em xilol, e recobertos por bálsamo do Canadá e lamínulas. Os cortes foram avaliados em sistema de análise de imagens com auxílio do software Axiovision, versão 4.7.2. (Carl Zeiss Inc., München-Hallbergmos, Germany). Os resultados foram expressos em porcentagem de células positivas.

4.7.4 Alfa-actina

Amostras de tecido cardíaco foram fixadas em formol, incluídas em parafina e submetidas a cortes seriados de 5 µm colocados sobre lâminas silanizadas (Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA). Em seguida, a parafina foi removida por imersão em xilol, à temperatura ambiente. Os cortes foram hidratados por imersão em soluções de concentrações decrescentes (100°, 95° e 70°) de álcool, seguido de lavagens em água. Realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena com água oxigenada a 20 volumes, seguido por lavagens em água. Para o bloqueio das proteínas inespecíficas, foi utilizado Protein Block (Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA) por 10 minutos à temperatura ambiente. Os cortes foram incubados com o anticorpo anti- α -actina, diluído conforme especificações do fabricante (Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA), por 40 minutos a temperatura ambiente em câmara úmida. Após lavagem em PBS, adicionou-se o polímero (Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA), seguido de incubação, por 60 minutos. A revelação foi obtida por DAB, seguido por contra-coloração com hematoxilina, desidratação dos tecidos por imersão em soluções crescentes de

etanol e diafanização por imersão em xilol. Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias de coloração.

4.8 Estudo histológico

Amostras de tecido cardíaco, fixadas em formalina a 10 %, foram incluídas em parafina e submetidas a cortes de 4 µm de espessura para estudo histológico, utilizando-se a técnica de coloração hematoxilina-eosina. Avaliou-se a presença de edema, congestão vascular e infiltrado leucocitário. As análises foram realizadas por dois pesquisadores independentes que utilizaram o seguinte escore de intensidade das observações: 0 – ausente, 1 – leve, 2 – moderado, 3 – intenso.

4.9 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados com o emprego do programa estatístico Graphpad Prism 5.2 e os resultados das variáveis de distribuição normal foram expressos como média $\pm$ erro-padrão da média (EPM), enquanto as variáveis categóricas foram expressas em mediana e variação máxima e mínima. Para a comparação dos diversos parâmetros entre os grupos foi empregado o método de Análise de Variância (ANOVA) de Duplo Fator, controlado pelo teste de homogeneidade de Levene, seguido do teste de Bonferroni. O nível de significância considerado foi de 0,05.

5. Resultados

Todos os animais evoluíram com morte encefálica após insuflação do cateter de Fogarty[®] mantendo-se as alterações, midríase bilateral fixa e ausência de reflexo corneano, até a eutanásia. Não houve diferença com significância estatística entre os grupos em nenhum dos parâmetros bioquímicos avaliados por gasometria (pH, pCO₂, pO₂, BE, HCO₃⁻, Na⁺, K⁺ e lactato).

5.1 Pressão arterial média

A Figura 2 ilustra os valores da pressão arterial média dos animais. Após a insuflação do balonete do cateter de Fogarty[®], os animais, que não receberam pré-tratamento com bupivacaína, evoluíram com acentuado pico hipertensivo de curta duração. O grupo de animais que recebeu infusão de 20 µL de bupivacaína pelo cateter de peridural antes da indução da morte encefálica (grupo bupi-pré) não apresentou pico hipertensivo (PAM tempo 0: 73,5 ± 5,8 mm Hg versus PAM pico ME: 93,4 ± 9,4 mm Hg $p>0,05$).

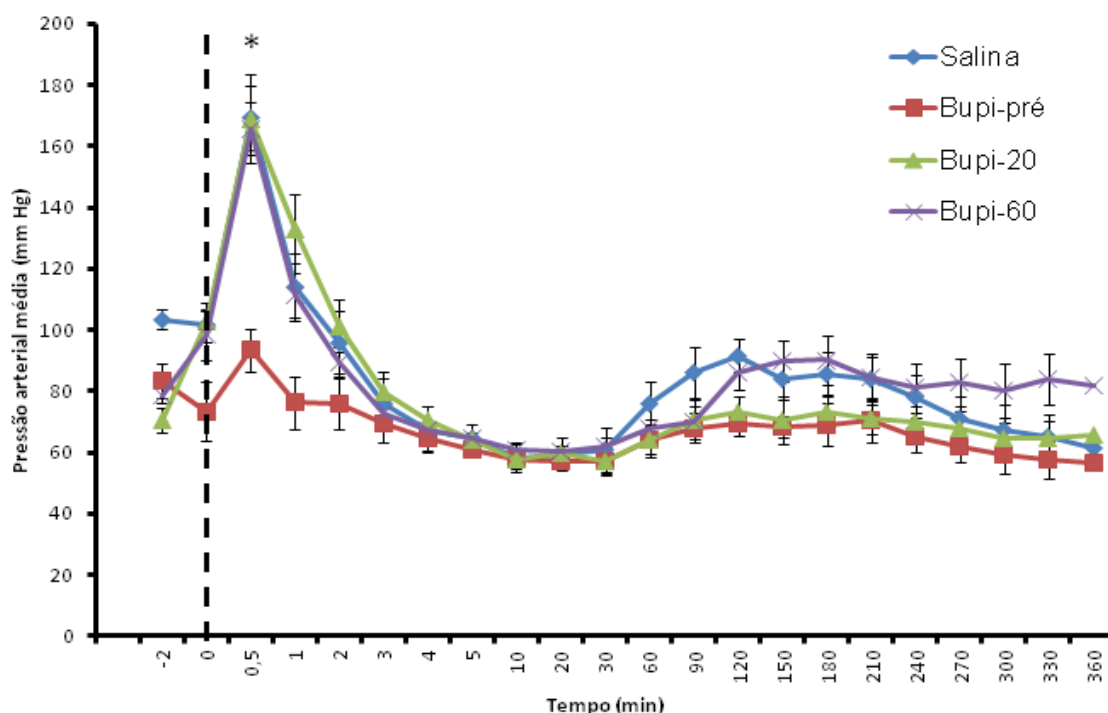


Figura 2. Pressão arterial média de ratos submetidos à morte encefálica, tratados com solução salina (Salina), bupivacaína a 0,5 % antes da indução (Bupi-pré), 20 e 60 min após a indução da morte encefálica (Bupi-20 e Bupi-60, respectivamente). A linha tracejada indica o momento de insuflação do cateter no espaço intracraniano. Os valores representam a média $\pm$ EPM de 7 animais/grupo. * $p < 0,05$.

5.2 Leucócitos totais

Conforme ilustrado na Figura 3, verificou-se a ocorrência de leucopenia decorridas 3 e 6 horas após a indução da morte encefálica por comparação com os valores basais ($p < 0,05$). Porém, na comparação entre os grupos, não houve diferença estatisticamente significativa.

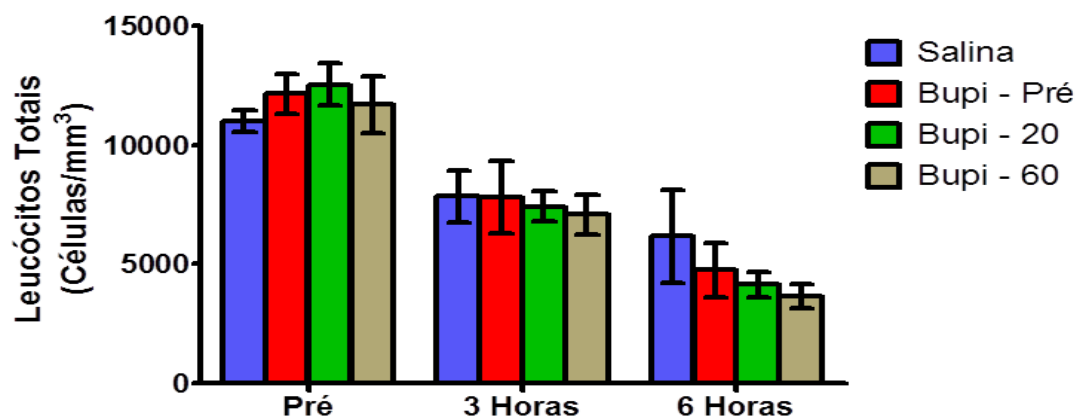


Figura 3. Número de leucócitos totais circulantes obtidos antes da realização dos procedimentos cirúrgicos (Pré) e 3 e 6h após a indução da morte encefálica. Os animais foram tratados com solução salina (Salina), bupivacaína a 0,5 % antes da indução (Bup-pré), 20 e 60 min após a indução da morte encefálica (Bup-20 e Bup-60, respectivamente). Os dados representam média $\pm$ EPM de 7 animais/grupo.

5.3 Moléculas de adesão

Através da análise imunohistoquímica, foi possível avaliar a expressão das moléculas de adesão, ICAM-1 e VCAM-1, no endotélio do tecido cardíaco. Contudo, na comparação entre os grupos, não foi encontrada diferença com significado estatístico. A Figura 4 corresponde à representação gráfica das médias de intensidade de fluorescência de VCAM-1 e ICAM-1.

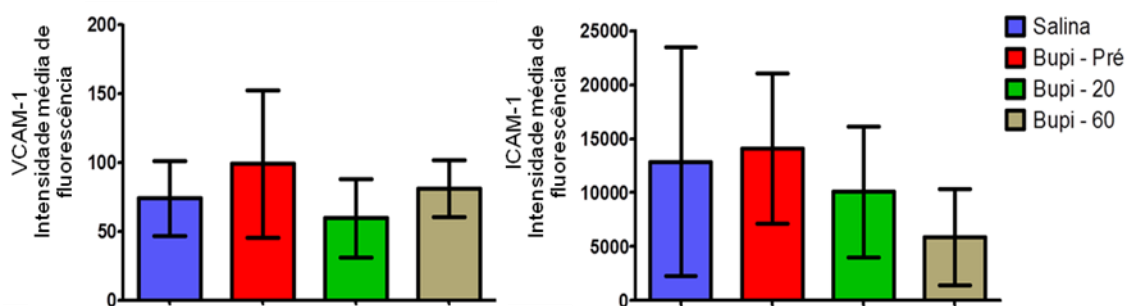


Figura 4. Expressão de VCAM-1 e ICAM-1 no tecido miocárdico de ratos submetidos à morte encefálica, tratados com solução salina (Salina), bupivacaína a 0,5 % antes da indução (Bupi-pré), 20 e 60 min após a indução da morte encefálica (Bupi-20 e Bupi-60, respectivamente). Os dados representam média $\pm$ EPM de 7 animais/grupo.

5.4 *TNF- α* e *Interleucina 1 β* no soro

A quantificação sérica das citocinas TNF- α e IL-1 β demonstrou a presença de valores elevados em todos os grupos não havendo diferença entre eles. A representação gráfica das médias das concentrações séricas dessas moléculas, em pg/mL, é apresentada na Figura 5. As concentrações séricas dessas citocinas, em animais não operados, ficaram abaixo dos limites de detecção do ensaio.

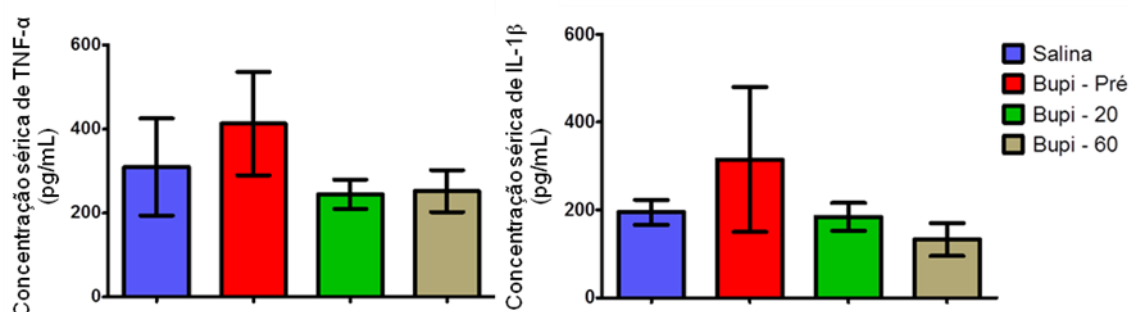


Figura 5. Determinação da concentração sérica de TNF- α e IL-1 β em ratos submetidos à morte encefálica, tratados com solução salina (Salina), bupivacaína a 0,5 % antes da indução (Bupi-pré), 20 e 60 min após a indução da morte encefálica (Bupi-20 e Bupi-60, respectivamente). Os testes realizados com ratos não operados não registraram níveis detectáveis pelo ensaio. Os dados representam média $\pm$ EPM de 7 animais/grupo.

5.5 TNF- α e IL-1 β no tecido cardíaco

A Figura 6 representa as médias das concentrações miocárdicas de TNF- α e IL-1 β em pg/g de tecido. Não houve diferença estatística entre os grupos. As concentrações teciduais dessas citocinas, em animais não operados, ficaram abaixo do limite de detecção do ensaio.

5.6 Avaliação de apoptose no tecido cardíaco

A Figura 7 ilustra o número de células positivas para caspase-3 e Bcl-2. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

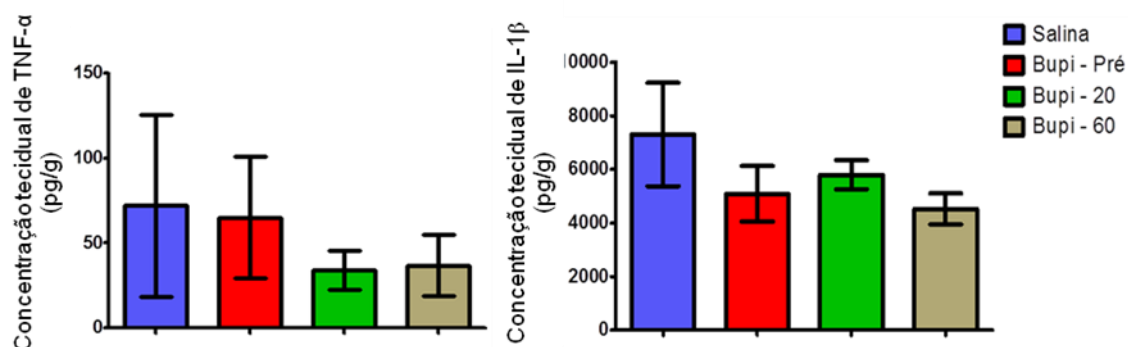


Figura 6. Determinação das concentrações de TNF- α e IL-1 β no tecido miocárdico em ratos submetidos à morte encefálica, tratados com solução salina (Salina), bupivacaína a 0,5 % antes da indução (Bupi-pré), 20 e 60 min após a indução da morte encefálica (Bupi-20 e Bupi-60, respectivamente). Os testes realizados com ratos não operados não registraram níveis detectáveis pelo ensaio. Os dados representam média $\pm$ EPM de 7 animais/grupo.

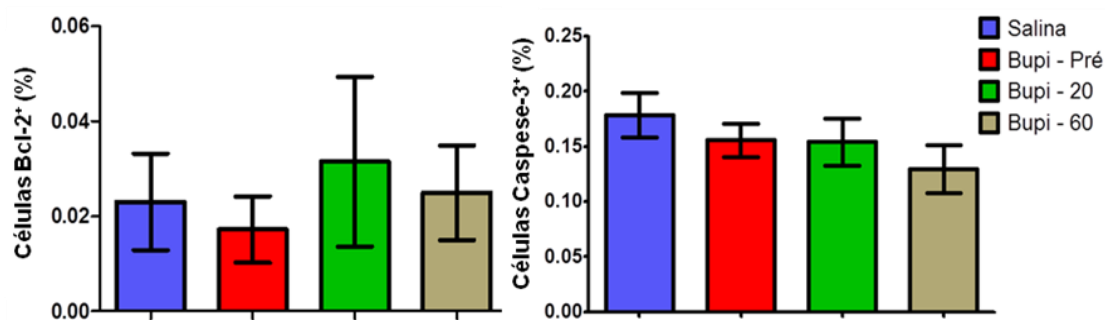


Figura 7. Expressão de Bcl-2 e caspase-3 no tecido miocárdico de ratos submetidos à morte encefálica, tratados com solução salina (Salina), bupivacaína a 0,5 % antes da indução (Bupi-pré), 20 e 60 min após a indução da morte encefálica (Bupi-20 e Bupi-60, respectivamente). Os dados representam média $\pm$ EPM de 7 animais/grupo.

5.7 Dosagem de α -actina

A expressão miocárdica de α -actina está representada na Figura 8. Não houve diferença estatística entre os grupos.

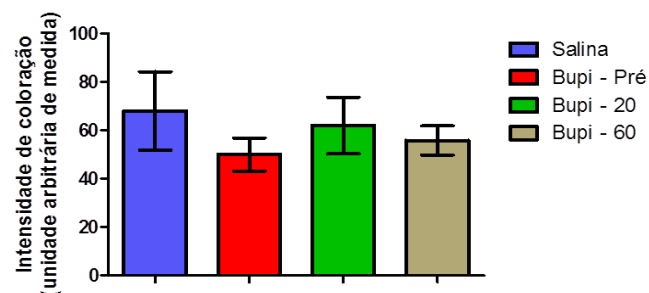


Figura 8. Expressão de α -actina no tecido miocárdico de ratos submetidos à morte encefálica, tratados com solução salina (Salina), bupivacaína a 0,5 % antes da indução (Bupi-pré), 20 e 60 min após a indução da morte encefálica (Bupi-20 e Bupi-60, respectivamente). Os dados representam a média $\pm$ EPM de 7 animais/grupo.

5.8 Análise histológica

A avaliação de cortes de corações corados pela hematoxilina/eosina, quanto a edema, congestão vascular e infiltrado leucocitário, demonstrou não haver diferença entre os tratamentos. Os dados encontram-se resumidos na Tabela 1.

Tabela 1. Análise histológica do tecido miocárdico

	Salina	Bupi-pré	Bupi-20	Bupi-60
Congestão Vascular	1 (1-2)	1 (1-2)	1 (1-2)	1 (0-2)
Infiltrado Leucocitário	1 (0-3)	1 (0-2)	1 (0-2)	1 (0-2)
Edema	1 (1-2)	1,5 (0-2)	1 (0-2)	1 (0-3)

Animais tratados com solução salina ou bupivacaína a 0,5 % antes da indução da morte encefálica (Salina e Bupi-pré, respectivamente) e 20 min ou 60 min após a indução da morte encefálica (Bupi-20 e Bupi-60, respectivamente). A análise baseou-se nos escores de intensidade das observações: 0 – ausente, 1 – leve, 2 – moderado, 3 – intenso. Os dados representam a mediana (valor mínimo – valor máximo) de 7 animais/grupo.

6. Discussão

A crescente demanda por órgãos para transplante justifica os esforços na busca pela otimização da oferta de enxertos. Neste estudo, ratos submetidos à morte encefálica foram mecanicamente ventilados e monitorados por período de 6 horas. Foi possível se observar que a morte encefálica foi responsável pela ativação inflamatória sistêmica, bem como por alterações no tecido cardíaco, levando também à leucopenia. A inibição da resposta adrenérgica, com o emprego da anestesia peridural torácica, mesmo quando aboliu o pico hipertensivo, não interferiu nas alterações desencadeadas pela morte encefálica.

No modelo experimental empregado neste estudo obteve-se êxito na indução da morte encefálica. Imediatamente após a insuflação do cateter de Fogarty[®], os ratos apresentaram midríase bilateral fixa e ausência de reflexo corneano^{20,56,70}, mantendo-se essas manifestações clínicas inalteradas até a eutanásia. Além disso, os animais apresentaram as evidências clínicas do surto hiperdinâmico, à exceção daqueles do grupo bupi-pré. A escolha de um modelo de súbita instalação da hipertensão intracraniana, em detrimento de desenhos de hipertensão encefálica gradual⁷¹, justifica-se pela exuberância das alterações hemodinâmicas, permitindo a aplicação e avaliação de um bloqueio simpático. O tempo de manutenção em morte encefálica de 6 horas está de acordo com o encontrado na literatura, isto é, de 3 a 7 horas^{16,17,19,20,23,29,53,59}.

A análise dos resultados obtidos demonstrou a inibição do surto hiperdinâmico^{18,59,61} nos animais, cuja anestesia peridural torácica foi instituída antes da indução da morte encefálica. Uma vez que foi inibida a tempestade autonômica, clássica manifestação clínica da súbita instalação da morte encefálica⁷², causada pela descarga catecolaminérgica⁷³, conclui-se que os animais do grupo em questão estavam sob efeito simpaticolítico³⁸⁻⁴², resultado da ação da bupivacaína aplicada no espaço peridural. Embora outros estudos tenham sido realizados, com o intuito de inibir a manifestação hiperdinâmica da morte encefálica, este estudo foi pioneiro no uso de anestesia peridural. A escolha da bupivacaína baseou-se no fato de essa droga servir de referência na comparação com anestésicos locais de longa duração^{66,67}.

Seguin *et al*⁶¹ administraram labetalol, um bloqueador α e β adrenérgico, e observaram a inibição do surto hemodinâmico. Yeh *et al*⁵⁹ também bloquearam a tempestade autonômica ao utilizarem uma combinação de três drogas: xilazina, um agonista α -2, capaz de bloquear a descarga simpática central; acetilpromazina, uma droga capaz de efetuar bloqueio α -1 periférico e dopaminérgico central; e ketamina, um agonista N-metil-D-aspartato, a qual diminui as concentrações séricas de noradrenalina e adrenalina⁷⁴. Ojeda-Rivero *et al*⁷⁵, ao utilizarem propranolol, um β -bloqueador, aboliram o surto hiperdinâmico da morte encefálica por hipertensão intracraniana em coelhos. Por outro lado, Novitzky *et al*⁶⁰ realizaram procedimentos cirúrgicos, dentre eles a ressecção bilateral do gânglio estrelado e o autotransplante cardíaco, mas não puderam impedir as manifestações hemodinâmicas da morte encefálica. Esses estudos, no entanto, não avaliaram a influência do bloqueio autonômica

na resposta inflamatória, tendo se concentrado no estudo das alterações hemodinâmicas e miocárdicas^{59-61,75}.

A resposta celular do enxerto⁹ envolve uma série de sinalizadores bioquímicos, incluindo-se as citocinas⁷⁶, moléculas de adesão^{21,77}, e moléculas pró e anti-apoptóticas⁷⁸. A IL-1 β em conjunto com o TNF- α ^{15,17,79} induz a ativação do endotélio, resultando na expressão de moléculas de adesão, as quais regulam as interações leucócito-endotélio^{80,81}. Os dados desta pesquisa demonstraram que as concentrações séricas e cardíacas de TNF- α e IL-1 β elevaram-se nos animais de todos os grupos. Isso indica aumento da atividade inflamatória e, como os grupos apresentaram comportamento semelhante, conclui-se que a abolição do surto hiperdinâmico, pela anestesia peridural torácica, não influenciou na ativação da cascata inflamatória.

Glicoproteínas de adesão, expressas na superfície dos leucócitos e células endoteliais, apresentam importante papel no acúmulo de leucócitos no tecido perivascular^{22,82}. Glicoproteínas do complexo CD11/CD18, expressas nos leucócitos, interagem com seus ligantes, tais como VCAM-1^{17,83,84} e ICAM-1^{17,83-85} nas células endoteliais, mediando a adesão e migração leucocitária^{86,87}. Estudos demonstraram que a morte encefálica aumenta a expressão de moléculas de adesão no fígado⁸⁸⁻⁹⁰, rim⁹¹, mesentério⁹², pulmão⁹³ e coração⁹⁴. No presente estudo, foi possível observar que o bloqueio peridural não alterou o padrão de expressão das moléculas de adesão, ICAM-1 e VCAM-1, no tecido cardíaco. Portanto, a resposta inflamatória relacionada à morte encefálica^{6,28} mensurada pela expressão de moléculas de adesão^{9,95} e citoninas^{11,79} não foi influenciada pela inibição do surto catecolaminérgico,

apesar de ter sido observado, nitidamente, o bloqueio simpático no grupo tratado com bupivacaína antes da indução da hipertensão intracraniana. Isso sugere que o mecanismo responsável pelo desencadeamento da resposta inflamatória no advento da morte encefálica, por hipertensão intracraniana, não parece ser o surto hiperdinâmico.

Neste estudo, a avaliação do processo apoptótico, através de dois efetores antagônicos a caspase-3^{11,78,96,97}, pró-apoptótica, e a Bcl-2^{78,97}, anti-apoptótica, demonstrou uma baixa expressão de ambas as moléculas no miocárdio dos animais de todos os grupos, não havendo diferença entre eles. Birks et al¹¹, avaliando a pró-caspase-3 e produtos de clivagem da caspase-3 em corações de doadores, observaram uma maior expressão dessas moléculas nos órgãos rejeitados para o transplante. Perez López et al⁷⁸ observaram aumento da ordem de sete vezes na expressão da caspase-3, mas não encontraram diferença na avaliação da Bcl-2 em corações de pacientes em morte encefálica, apontando para um acelerado processo pró-apoptótico. Como os estudos de Birks et al¹¹ e Perez López et al⁷⁸ foram realizados em pacientes, pode-se considerar que a baixa expressão de Bcl-2 e caspase-3, possa se relacionar à espécie estudada.

Os cardiomiócitos são células diferenciadas que perderam a capacidade replicativa. Assim, o coração encontra na hipertrofia seu mecanismo adaptativo de resposta à sobrecarga^{72,98,99}. O estresse mecânico e altas concentrações de catecolaminas, presentes na morte encefálica, implicam em estímulo anabólico para os cardiomiócitos⁹⁹. No presente estudo não foram encontradas

diferenças nas dosagens de α -actina entre os grupos. Portanto, o bloqueio simpático parece não alterar os mecanismos adaptativos cardíacos.

Quanto à avaliação histológica do miocárdio, foram utilizados cortes longitudinais, corados por hematoxilina-eosina, avaliando-se a presença de congestão vascular, edema e infiltrado leucocitário, graduando-se os achados em uma escala de escores segundo estudo anterior de nosso grupo¹⁰⁰. Poucas foram as alterações encontradas e, quando presentes, elas se distribuíram de forma semelhante entre os grupos. Resultados similares foram observados por Wilhelm et al²⁷. Herijgers et al¹⁴ também não encontraram alterações estruturais, mesmo à microscopia eletrônica, 4 horas após a indução de morte encefálica em ratos. Por outro lado, Yeh et al⁵⁹ e Ojeda-Rivero et al⁷⁵ observaram alterações histológicas em modelo de morte encefálica em coelhos. Novitzky et al¹⁰¹, avaliando 22 corações humanos, doados para transplante, encontraram alterações ultra-estruturais em cerca de 25 % deles. Entretanto, mais relevante que as comparações com outros autores, o fato de não terem sido encontradas diferenças entre os grupos do presente estudo indica que o comportamento histológico, ao menos neste modelo, foi independente do surto hiperdinâmico.

Considerando-se que os animais de todos os grupos exibiram leucopenia progressiva, conclui-se que a abolição da tempestade autonômica, pela anestesia peridural torácica, não teve implicação no número total de glóbulos brancos circulantes. A leucopenia associada à morte encefálica foi registrada em estudos anteriores^{92,102}. No decorrer do processo inflamatório, a transmigração de glóbulos brancos acompanha-se de pronta reposição celular

pela medula óssea, inclusive com a liberação de células jovens¹⁰³. Por outro lado, a morte encefálica parece exercer um efeito supressor sobre os mecanismos hematopoiéticos. Atualmente, estudos estão sendo realizados pelo nosso grupo avaliando os processos de mobilização, ativação e apoptose das células da medula óssea.

Como os resultados deste estudo demonstraram que a inibição da tempestade autonômica pelo bloqueio peridural torácico, embora tenha sido efetiva em conter o pico hipertensivo, não alterou a resposta inflamatória associada à morte encefálica, outros mecanismos devem estar envolvidos. Simas et al⁹² avaliaram o mesentério, por microscopia intravital, e observaram importante redução da perfusão microvascular, em modelo de morte encefálica, chamando a atenção para a importância do comprometimento da microcirculação na gênese da resposta inflamatória. Em outro estudo, ainda não publicado, nosso grupo avaliou os efeitos do bloqueio simpático na microcirculação em modelo de morte encefálica e, apesar da melhora hemodinâmica obtida, os animais evoluíram com hipoperfusão mesentérica e manutenção das alterações inflamatórias. Tais observações sugerem que o comprometimento da microcirculação seja um dos elementos responsáveis pelo aumento da resposta inflamatória na morte encefálica. Corroboram com nossos achados as observações em modelos de choque séptico, nos quais a hipoperfusão microvascular relacionou-se com a ativação inflamatória¹⁰⁴.

Outro provável mecanismo envolvido no aumento da atividade inflamatória da morte encefálica é a redução das concentrações séricas de corticosterona. Esse hormônio é um importante modulador da resposta

inflamatória¹⁰⁵ e suas concentrações séricas estão diminuídas no contexto da morte encefálica pela interrupção do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal^{92,106,107}. A quebra da barreira hematoencefálica, ao permitir a livre circulação das substâncias presentes no sistema nervoso central, também pode estar relacionada à ativação inflamatória decorrente da morte encefálica.

As limitações do estudo incluem aquelas inerentes a modelos experimentais, tais como: peculiaridades espécie-específicas e condições controladas quando da indução do evento a ser estudado, no caso a morte encefálica. Outro importante fator a ser considerado é o momento da administração da bupivacaína. Em condições clínicas não é possível prever-se a morte encefálica, principalmente por se tratar de evento catastrófico e inesperado. Outro ponto a ser considerado é o tempo de 6 h de observação após a indução de morte encefálica, visto ser um período reduzido frente às condições habitualmente encontradas na prática clínica. Por outro lado, os animais não receberam nenhum suporte hemodinâmico, diferindo da prática médica de se administrar vasopressores a pacientes com instabilidade hemodinâmica.

7. Conclusões

O bloqueio simpático obtido com a anestesia peridural torácica não modificou as alterações da resposta inflamatória e do tecido miocárdico observadas em ratos submetidos à morte encefálica.

A anestesia peridural torácica, quando utilizada previamente à indução da morte encefálica, foi efetiva em bloquear o surto hiperdinâmico, alterando o comportamento da pressão arterial.

Não houve modificação no comportamento da resposta leucocitária, na expressão de marcadores da resposta inflamatória sistêmica e miocárdica, e no padrão histológico cardíaco com o emprego da anestesia peridural torácica neste modelo experimental.

8. Referências

1. Pandalai PK, Lyons JM, Duffy JY, McLean KM, Wagner CJ, Merrill WH, Pearl JM, Akhter SA. Role of the β -adrenergic receptor kinase in myocardial dysfunction after brain death. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2005;130(4):1183-9.
2. Barklin A. Systemic inflammation in the brain-dead organ donor. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2009;53(4):425-35.
3. Siepe M, Martin J, Sarai K, Sommer P, Schlensak C, Beyersdorf F. Twenty-four hours postoperative results after orthotopic cardiac transplantation in swine. *J Card Surg*. 2007;22(4):287-94.
4. Stehlik J, Edwards LB, Kucheryavaya AY, Benden C, Christie JD, Dipchand AI, Dobbels F, Kirk R, Rahmel AO, Hertz MI; International Society of Heart and Lung Transplantation. The registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: 29th official adult heart transplant report - 2012. *J Heart Lung Transplant*. 2012;31(10):1052-64.
5. Pratschke J, Neuhaus P, Tullius SG. What can be learned from brain-death models? *Transpl Int*. 2005;18(1):15-21.

6. Kusaka M, Kuroyanagi Y, Kowa H, Nagaoka K, Mori T, Yamada K, Shiroki R, Kurahashi H, Hoshinaga K. Genomewide expression profiles of rat model renal isografts from brain dead donors. *Transplantation*. 2007;83(1):62-70.
7. Salim A, Martin M, Brown C, Rhee P, Demetriades D, Belzberg H. The effect of a protocol of aggressive donor management: Implications for the national organ donor shortage. *J Trauma*. 2006;61(2):429-33.
8. Mascia L, Mastromauro I, Viberti S, Vincenzi M, Zanella M. Management to optimize organ procurement in brain dead donors. *Minerva Anesthesiol*. 2009;75(3):125-33.
9. Koudstaal LG, 't Hart NA, Ottens PJ, van den Berg A, Ploeg RJ, van Goor H, Leuvenink HG. Brain death induces inflammation in the donor intestine. *Transplantation*. 2008;86(1):148-54.
10. Apostolakis E, Parissis H, Dougenis D. Brain death and donor heart dysfunction: implications in cardiac transplantation. *J Card Surg*. 2010;25(1):98-106.
11. Birks EJ, Yacoub MH, Burton PS, Owen V, Pomerance A, O'Halloran A, Banner NR, Khaghani A, Latif N. Activation of apoptotic and inflammatory pathways in dysfunctional donor hearts. *Transplantation*. 2000;70(10):1498-506.
12. Wagner FD, Jonitz B, Potapov EV, Qedra N, Wegscheider K, Abraham K, Ivanitskaia EA, Loebe M, Hetzer R. Procalcitonin, a donor-specific predictor of early graft failure-related mortality after heart transplantation. *Circulation*. 2001;104(12 Suppl 1):I192-6.

13. Potapov EV, Wagner FD, Loebe M, Ivanitskaia EA, Müller C, Sodian R, Jonitz B, Hetzer R. Elevated donor cardiac troponin T and procalcitonin indicate two independent mechanisms of early graft failure after heart transplantation. *Int J Cardiol.* 2003;92(2-3):163-7.
14. Herijgers P, Borgers M, Flameng W. The effect of brain death on cardiovascular function in rats. Part I. Is the heart damaged? *Cardiovasc Res.* 1998;38(1):98-106.
15. Birks EJ, Burton PB, Owen V, Mullen AJ, Hunt D, Banner NR, Barton PJ, Yacoub MH. Elevated tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in myocardium and serum of malfunctioning donor hearts. *Circulation.* 2000;102(19 Suppl 3):III352-8.
16. Shivalkar B, Van Loon J, Wieland W, Tjandra-Maga TB, Borgers M, Plets C, Flameng W. Variable effects of explosive or gradual increase of intracranial pressure on myocardial structure and function. *Circulation.* 1993;87(1):230-9.
17. Segel LD, vonHaag DW, Zhang J, Follette DM. Selective overexpression of inflammatory molecules in hearts from brain-dead rats. *J Heart Lung Transplant.* 2002;21(7):804-11.
18. Galiñanes M, Hearse DJ. Brain-death-induced cardiac contractile dysfunction: studies of possible neurohormonal and blood-borne mediators. *J Mol Cell Cardiol.* 1994;26(4):481-98.
19. Wilhelm MJ, Pratschke J, Beato F, Taal M, Laskowski IA, Paz DM, Schmid C, Hancock WW, Scheld HH, Tilney NL. Activation of proinflammatory mediators in heart transplants from brain-dead donors:

- evidence from a model of chronic rat cardiac allograft rejection. *Transplant Proc.* 2002;34(6):2359-60.
20. Bittner HB, Kendall SW, Chen EP, Van Trigt P. Endocrine changes and metabolic responses in a validated canine brain death model. *J Crit Care.* 1995;10(2):56-63.
21. Atkinson C, Varela JC, Tomlinson S. Complement-dependent inflammation and injury in a murine model of brain dead donor hearts. *Circ Res.* 2009;105(11):1094-101.
22. Obermaier R, von Dobschuetz E, Keck T, Hopp HH, Drognitz O, Schareck W, Hopt UT, Benz S. Brain death impairs pancreatic microcirculation. *Am J Transplant.* 2004;4(2):210-5.
23. Okamoto S, Corso CO, Kondo T, Leiderer R, Rascher W, Yamamoto Y, Yamaoka Y, Messmer K. Changes in hepatic microcirculation and histomorphology in brain-dead organ donors: an experimental study in rats. *Eur J Surg.* 1999;165(8):759-66.
24. Arab D, Yahia AM, Qureshi AI. Cardiovascular manifestations of acute intracranial lesions: pathophysiology, manifestations, and treatment. *J Intensive Care Med.* 2003;18(3):119-29.
25. Stoica SC, Goddard M, Large SR. The endothelium in clinical cardiac transplantation. *Ann Thorac Surg.* 2002;73(3):1002-8.
26. Skrabal CA, Thompson LO, Potapov EV, Southard RE, Joyce DL, Youker KA, Noon GP, Loebe M. Organ-specific regulation of pro-

- inflammatory molecules in heart, lung, and kidney following brain death. *J Surg Res.* 2005;123(1):118-25.
27. Wilhelm MJ, Pratschke J, Beato F, Taal M, Kusaka M, Hancock WW, Tilney NL. Activation of the heart by donor brain death accelerates acute rejection after transplantation. *Circulation.* 2000;102(19):2426-33.
28. Hoeger S, Gottmann U, Liu Z, Schnuelle P, Birck R, Braun C, van der Woude FJ, Yard BA. Dopamine treatment in brain-dead rats mediates anti-inflammatory effects: the role of hemodynamic stabilization and D-receptor stimulation. *Transpl Int.* 2007;20(9):790-9.
29. Szabó G, Soós P, Heger U, Mander S, Buhmann V, Bährle S, Kohl B, Hagl S. L-arginine improves endothelial and myocardial function after brain death. *Transplantation.* 2006;82(1):108-12.
30. Berman M, Ali A, Ashley E, Freed D, Clarke K, Tsui S, Parameshwar J, Large S. Is stress cardiomyopathy the underlying cause of ventricular dysfunction associated with brain death? *J Heart Lung Transplant.* 2010;29(9):957-65.
31. Oto T, Calderone A, Li Z, Rosenfeldt FL, Pepe S. p38 Mitogen-activated protein kinase inhibition reduces inflammatory cytokines in a brain-dead transplant donor animal model. *Heart Lung Circ.* 2009;18(6):393-400.
32. Baroldi G, Di Pasquale G, Silver MD, Pinelli G, Lusa AM, Fineschi V. Type and extent of myocardial injury related to brain damage and its significance in heart transplantation: a morphometric study. *J Heart Lung Transplant.* 1997;16(10):994-1000.

33. Todd GL, Baroldi G, Pieper GM, Clayton FC, Eliot RS. Experimental catecholamine-induced myocardial necrosis. I. Morphology, quantification and regional distribution of acute contraction band lesions. *J Mol Cell Cardiol.* 1985;17(4):317-38.
34. Kolin A, Norris JW. Myocardial damage from acute cerebral lesions. *Stroke.* 1984;15(6):990-3.
35. Samuels MA. The brain-heart connection. *Circulation.* 2007;116(1):77-84.
36. Meissner A, Rolf N, Van Aken H. Thoracic epidural anesthesia and the patient with heart disease: benefits, risks, and controversies. *Anesth Analg.* 1997;85(3):517-28.
37. Moraca RJ, Sheldon DG, Thirlby RC. The role of epidural anesthesia and analgesia in surgical practice. *Ann Surg.* 2003;238(5):663-73.
38. Freise H, Anthonsen S, Fischer LG, Van Aken HK, Sielenkämper AW. Continuous thoracic epidural anesthesia induces segmental sympathetic block in the awake rat. *Anesth Analg.* 2005;100(1):255-62.
39. Ulke ZS, Sentürk M. Non-analgesic effects of thoracic epidural anesthesia. *Agri.* 2007;19(2):6-12.
40. Pöpping DM, Elia N, Marret E, Remy C, Tramèr MR. Protective effects of epidural analgesia on pulmonary complications after abdominal and thoracic surgery: a meta-analysis. *Arch Surg.* 2008 Oct;143(10):990-9.

- 41.Daudel F, Ertmer C, Stubbe HD, Lange M, Pulina R, Bone HG, Sielenkämper AW, Van Aken H, Westphal M. Hemodynamic effects of thoracic epidural analgesia in ovine hyperdynamic endotoxemia. *Reg Anesth Pain Med.* 2007;32(4):311-6.
- 42.Svircevic V, van Dijk D, Nierich AP, Passier MP, Kalkman CJ, van der Heijden GJ, Bax L. Meta-analysis of thoracic epidural anesthesia versus general anesthesia for cardiac surgery. *Anesthesiology.* 2011;114(2):271-82.
- 43.Clemente A, Carli F. The physiological effects of thoracic epidural anesthesia and analgesia on the cardiovascular, respiratory and gastrointestinal systems. *Minerva Anesthesiol.* 2008 Oct;74(10):549-63.
- 44.Patterson C, Patterson KB. The history of heart transplantation. *Am J Med Sci.* 1997;314(3):190-7.
- 45.DiBardino DJ. The history and development of cardiac transplantation. *Tex Heart Inst J.* 1999;26(3):198-205.
- 46.Lower RR, Dong Jr E, Shumway NE. Suppression of rejection crises in the cardiac homograft. *Ann Thorac Surg.* 1965;1(5):645-49.
- 47.Deuse T, Haddad F, Pham M, Hunt S, Valantine H, Bates MJ, Mallidi HR, Oyer PE, Robbins RC, Reitz BA. Twenty-year survivors of heart transplantation at Stanford University. *Am J Transplant.* 2008;8(9):1769-74.
- 48.Starzl TE. History of clinical transplantation. *World J Surg.* 2000;24(7):759-82.

49. Kobashigawa JA, Patel JK. Immunosuppression for heart transplantation: where are we now? *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2006;3(4):203-12.
50. Keogh A, Richardson M, Ruygrok P, Spratt P, Galbraith A, O'Driscoll G, Macdonald P, Esmore D, Muller D, Faddy S. Sirolimus in de novo heart transplant recipients reduces acute rejection and prevents coronary artery disease at 2 years: a randomized clinical trial. *Circulation*. 2004;110(17):2694-700.
51. Schrader H, Hall C, Zwetnow NN. Effects of prolonged supratentorial mass expansion on regional blood flow and cardiovascular parameters during the Cushing response. *Acta Neurol Scand*. 1985;72(3):283-94.
52. Audibert G, Charpentier C, Seguin-Devaux C, Charretier PA, Grégoire H, Devaux Y, Perrier JF, Longrois D, Mertes PM. Improvement of donor myocardial function after treatment of autonomic storm during brain death. *Transplantation*. 2006;82(8):1031-6.
53. Chiari P, Hadour G, Michel P, Piriou V, Rodriguez C, Budat C, Ovize M, Jegaden O, Lehot JJ, Ferrera R. Biphasic response after brain death induction: prominent part of catecholamines release in this phenomenon. *J Heart Lung Transplant*. 2000;19(7):675-82.
54. Kutsogiannis DJ, Pagliarello G, Doig C, Ross H, Shemie SD. Medical management to optimize donor organ potential: review of the literature. *Can J Anaesth*. 2006;53(8):820-30.

55. Kang CH, Anraku M, Cypel M, Sato M, Yeung J, Gharib SA, Pierre AF, de Perrot M, Waddell TK, Liu M, Keshavjee S. Transcriptional signatures in donor lungs from donation after cardiac death vs after brain death: a functional pathway analysis. *J Heart Lung Transplant*. 2011;30(3):289-98.
56. Takada M, Nadeau KC, Hancock WW, Mackenzie HS, Shaw GD, Waaga AM, Chandraker A, Sayegh MH, Tilney NL. Effects of explosive brain death on cytokine activation of peripheral organs in the rat. *Transplantation*. 1998;65(12):1533-42.
57. Fisher AJ, Donnelly SC, Hirani N, Burdick MD, Strieter RM, Dark JH, Corris PA. Enhanced pulmonary inflammation in organ donors following fatal non-traumatic brain injury. *Lancet*. 1999;353(9162):1412-3.
58. Floerchinger B, Oberhuber R, Tullius SG. Effects of brain death on organ quality and transplant outcome. *Transplant Rev (Orlando)*. 2012 ;26(2):54-9.
59. Yeh T Jr, Wechsler AS, Graham L, Loesser KE, Sica DA, Wolfe L, Jakoi ER. Central sympathetic blockade ameliorates brain death-induced cardiotoxicity and associated changes in myocardial gene expression. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2002;124(6):1087-98.
60. Novitzky D, Wicomb WN, Cooper DK, Rose AG, Reichart B. Prevention of myocardial injury during brain death by total cardiac sympathectomy in the Chacma baboon. *Ann Thorac Surg*. 1986;41(5):520-4.

61. Seguin C, Devaux Y, Grosjean S, Siaghy EM, Mairose P, Zannad F, de Talancé N, Ungureanu-Longrois D, Mertes PM. Evidence of functional myocardial ischemia associated with myocardial dysfunction in brain-dead pigs. *Circulation*. 2001;104(12 Suppl 1):I197-201.
62. Anyanwu AC, Banner NR, Mitchell AG, Khaghani A, Yacoub MH. Low incidence and severity of transplant-associated coronary artery disease in heart transplants from live donors. *J Heart Lung Transplant*. 2003;22(3):281-6.
63. Fox SI. *Fisiologia Humana*. Tradução de Marcos Ikeda. 7a ed. Barueri, SP: Manole; 2007. Cap.9, p. 216-35: O sistema nervoso autônomo.
64. Hollmann MW, Durieux ME. Local anesthetics and the inflammatory response: a new therapeutic indication? *Anesthesiology*. 2000;93(3):858-75.
65. Heavner JE. Local anesthetics. *Curr Opin Anaesthesiol*. 2007;20(4):336-42.
66. Mather LE, Chang DH. Cardiotoxicity with modern local anaesthetics: is there a safer choice? *Drugs*. 2001;61(3):333-42.
67. Buckenmaier CC 3rd, Bleckner LL. Anaesthetic agents for advanced regional anaesthesia: a North American perspective. *Drugs*. 2005;65(6):745-59.

68. Kanai Y, Tateyama S, Nakamura T, Kasaba T, Takasaki M. Effects of levobupivacaine, bupivacaine, and ropivacaine on tail-flick response and motor function in rats following epidural or intrathecal administration. *Reg Anesth Pain Med*. 1999;24(5):444-52.
69. Leone S, Di Cianni S, Casati A, Fanelli G. Pharmacology, toxicology, and clinical use of new long acting local anesthetics, ropivacaine and levobupivacaine. *Acta Biomed*. 2008;79(2):92-105.
70. Neyrinck AP, Van De Wauwer C, Geudens N, Rega FR, Verleden GM, Wouters P, Lerut TE, Van Raemdonck DE. Comparative study of donor lung injury in heart-beating versus non-heart-beating donors. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2006;30(4):628-36.
71. Kolkert JL, 't Hart NA, van Dijk A, Ottens PJ, Ploeg RJ, Leuvenink HG. The gradual onset brain death model: a relevant model to study organ donation and its consequences on the outcome after transplantation. *Lab Anim*. 2007;41(3):363-71.
72. Yeh T Jr, Wechsler AS, Graham LJ, Loesser KE, Sica DA, Wolfe L, Jakoi ER. Acute brain death alters left ventricular myocardial gene expression. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1999;117(2):365-74.
73. Szabó G, Hackert T, Sebening C, Melnitchuk S, Vahl CF, Hagl S. Role of neural and humoral factors in hyperdynamic reaction and cardiac dysfunction following brain death. *J Heart Lung Transplant*. 2000;19(7):683-93.

74. Hoffman WE, Pelligrino D, Werner C, Kochs E, Albrecht RF, Schulte am Esch J. Ketamine decreases plasma catecholamines and improves outcome from incomplete cerebral ischemia in rats. *Anesthesiology*. 1992;76(5):755-62.
75. Ojeda-Rivero R, Hernández-Fernández A, Domínguez-Roldán JM, Calderón E, Ruiz M, Lage E, Ordoñez-Fernández A. Experimental treatment with beta blockers of hemodynamic and myocardial changes in organ donors. *Transplant Proc*. 2002;34(1):185-6.
76. Frangogiannis NG, Youker KA, Rossen RD, Gwechenberger M, Lindsey MH, Mendoza LH, Michael LH, Ballantyne CM, Smith CW, Entman ML. Cytokines and the microcirculation in ischemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol*. 1998;30(12):2567-76.
77. Golias C, Tsoutsis E, Matziridis A, Makridis P, Batistatou A, Charalabopoulos K. Review. Leukocyte and endothelial cell adhesion molecules in inflammation focusing on inflammatory heart disease. *In Vivo*. 2007;21(5):757-69.
78. Pérez López S, Vázquez Moreno N, Escudero Augusto D, Astudillo González A, Álvarez Menéndez F, Goyache Goñi F, Otero Hernández J. A molecular approach to apoptosis in the human heart during brain death. *Transplantation*. 2008;86(7):977-82.
79. Birks EJ, Owen VJ, Burton PB, Bishop AE, Banner NR, Khaghani A, Polak JM, Yacoub MH. Tumor necrosis factor-alpha is expressed in donor heart and predicts right ventricular failure after human heart transplantation. *Circulation*. 2000;102(3):326-31.

80. Collins T, Read MA, Neish AS, Whitley MZ, Thanos D, Maniatis T. Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J*. 1995;9(10):899-909.
81. McHale JF, Harari OA, Marshall D, Haskard DO. Vascular endothelial cell expression of ICAM-1 and VCAM-1 at the onset of eliciting contact hypersensitivity in mice: evidence for a dominant role of TNF-alpha. *J Immunol*. 1999;162(3):1648-55.
82. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade update. *Nat Rev Immunol*. 2007;7:678-89.
83. Ley K. Molecular mechanisms of leukocyte recruitment in the inflammatory process. *Cardiovasc Res*. 1996;32(4):733-42.
84. van der Hoeven JA, Ploeg RJ, Postema F, Molema I, de Vos P, Girbes AR, van Suylichem PT, van Schilfgaarde R, Ter Horst GJ. Induction of organ dysfunction and up-regulation of inflammatory markers in the liver and kidneys of hypotensive brain dead rats: a model to study marginal organ donors. *Transplantation*. 1999;68(12):1884-90.
85. Lawson C, Wolf S. ICAM-1 signaling in endothelial cells. *Pharmacol Rep*. 2009;61(1):22-32.
86. von Andrian UH, Chambers JD, McEvoy LM, Bargatze RF, Arfors KE, Butcher EC. Two-step model of leukocyte-endothelial cell interaction in inflammation: distinct roles for LECAM-1 and the leukocyte beta 2 integrins in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991;88:7538-42.

87. Von Andrian UH, Hansell P, Chambers JD, Berger EM, Torres Filho I, Butcher EC, et al. L-selectin functions required for beta 2-integrin-mediated neutrophil adhesion at physiological shear rates in vivo. *Am J Physiol*. 1992;263:H1034-44.
88. 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. *Transplant*. 2005;80:500-505.
89. van Der Hoeven JA, Ter Horst GJ, Molema G, de Vos P, Girbes AR, Postema F, et al. Effects of brain death and hemodynamic status on function and immunologic activation of the potential donor liver in the rat. *Ann Surg*. 2000;232:804-13.
90. Itabashi K, Ito Y, Takahashi T, Ishii K, Sato K, Kakita A. Protective effects of urinary trypsin inhibitor (UTI) on hepatic microvascular in hypotensive brain-dead rats. *Eur Surg Res*. 2002;34:330-8.
91. van der Hoeven JA, Molema G, Ter Horst GJ, Freund RL, Wiersema J, van Schilfgaarde R, et al. Relationship between duration of brain death and hemodynamic (in)stability on progressive dysfunction and increased immunologic activation of donor kidneys. *Kidney Int*. 2003;64:1874-82.
92. Simas R, Sannomiya P, Cruz JW, Correia Cde J, Zanoni FL, Kase M, Menegat L, Silva IA, Moreira LF. Paradoxical effects of brain death and associated trauma on rat mesenteric microcirculation: an intravital microscopic study. *Clinics (Sao Paulo)*. 2012;67(1):69-75.

93. Zhou H, Ding W, Cui X, Pan P, Zhang B, Li W. Carbon monoxide inhalation ameliorates conditions of lung grafts from brain death donors. *Chin Med J (Engl)*. 2008;121:1411-9.
94. McLean KM, Duffy JY, Pandalai PK, Lyons JM, Bulcao CF, Wagner CJ, Akhter SA, Pearl JM. Glucocorticoids alter the balance between pro- and anti-inflammatory mediators in the myocardium in a porcine model of brain death. *J Heart Lung Transplant*. 2007;26(1):78-84.
95. Koudstaal LG, 't Hart NA, van den Berg A, Olinga P, van Goor H, Ploeg RJ, Leuvenink HG. Brain death causes structural and inflammatory changes in donor intestine. *Transplant Proc*. 2005;37(1):448-9.
96. Masri C, Chandrashekhara Y. Apoptosis: a potentially reversible, metastable state of the heart. *Heart Fail Rev*. 2008;13(2):175-9.
97. Movassagh M, Foo RS. Simplified apoptotic cascades. *Heart Fail Rev*. 2008;13(2):111-9.
98. Schaub MC, Hefti MA, Harder BA, Eppenberger HM. Various hypertrophic stimuli induce distinct phenotypes in cardiomyocytes. *J Mol Med (Berl)*. 1997;75(11-12):901-20.
99. Hefti MA, Harder BA, Eppenberger HM, Schaub MC. Signaling pathways in cardiac myocyte hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol*. 1997;29(11):2873-92.
100. Simas R, Kogiso DH, Correia Cde J, Silva LF, Silva IA, Cruz JW, Sannomiya P, Moreira LF. Influence of brain death and associated trauma on solid organ histological characteristics. *Acta Cir Bras*. 2012;27(7):465-70.

101. Novitzky D, Rhodin J, Cooper DK, Ye Y, Min KW, DeBault L. Ultrastructure changes associated with brain death in the human donor heart. *Transpl Int*. 1997;10(1):24-32.
102. Takada M, Toyama H, Tanaka T, Suzuki Y, Kuroda Y. Augmentation of interleukin-10 in pancreatic islets after brain death. *Transplant Proc*. 2004;36(5):1534-6.
103. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia celular e molecular*. Tradução de Claudia Reali e outros. 6a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008. Cap. 3, p. 47-71: Células e tecidos do sistema imunológico adquirido.
104. Semeraro N, Ammollo CT, Semeraro F, Colucci M. Sepsis, thrombosis and organ dysfunction. *Thromb Res*. 2012;129(3):290-5.
105. Garcia-Leme J, Farsky SP. Hormonal control of inflammatory responses. *Mediators Inflamm*. 1993;2(3):181-98.
106. Pratschke J, Wilhelm MJ, Kusaka M, Basker M, Cooper DK, Hancock WW, Tilney NL. Brain death and its influence on donor organ quality and outcome after transplantation. *Transplantation*. 1999;67(3):343-8.
107. Wilhelm MJ, Pratschke J, Laskowski IA, Paz DM, Tilney NL. Brain death and its impact on the donor heart-lessons from animal models. *J Heart Lung Transplant*. 2000;19(5):414-8.

Apêndices



Inhibition of Autonomic Storm by Epidural Anesthesia Does Not Influence Cardiac Inflammatory Response After Brain Death in Rats

I.A. Silva, C.J. Correia, R. Simas, C.d.J. Correia, J.W.M.C. Cruz, S.G. Ferreira, F.L. Zanoni, L. Menegat, P. Sannomiya, and L.F.P. Moreira

ABSTRACT

Background. After brain death (BD) donors usually experience cardiac dysfunction, which is responsible for a considerable number of unused organs. Causes of this cardiac dysfunction are not fully understood. Some authors argue that autonomic storm with severe hemodynamic instability leads to inflammatory activation and myocardial dysfunction.

Objectives. To investigate the hypothesis that thoracic epidural anesthesia blocks autonomic storm and improves graft condition by reducing the inflammatory response.

Methods. Twenty-eight male Wistar rats (250–350 g) allocated to four groups received saline or bupivacaine via an epidural catheter at various times in relation to brain-death induction. Brain death was induced by a sudden increase in intracranial pressure by rapid inflation of a balloon catheter in the extradural space. Blood gases, electrolytes, and lactate analyses were performed at time zero, and 3 and 6 hours. Blood leukocytes were counted at 0 and 6 hours. After 6 hours of BD, we performed euthanasia to measure vascular adhesion molecule (VCAM)-1, intracellular adhesion molecule (ICAM)-1, interleukin (IL)-1 β , tumor necrosis factor (TNF)- α , Bcl-2 and caspase-3 on cardiac tissue.

Results. Thoracic epidural anesthesia was effective to block the autonomic storm with a significant difference in mean arterial pressure between the untreated (saline) and the bupivacaine group before BD ($P < .05$). However, no significant difference was observed for the expressions of VCAM-1, ICAM-1, TNF- α , IL-1 β , Bcl-2, and caspase-3 ($P > .05$).

Conclusion. Autonomic storm did not seem to be responsible for the inflammatory changes associated with BD; thoracic epidural anesthesia did not modify the expression of inflammatory mediators although it effectively blocked the autonomic storm.

NOWADAYS, AN IMPORTANT BARRIER to cardiac transplantation is the donor scarcity.^{1–3} After brain death (BD), donors experience a variety of cardiac derangements. In some cases, they are so pronounced as to preclude the use of these hearts for transplantation.^{4–8}

The so-called “autonomic storm”⁹ is usually seen with BD. It is marked by a catecholamine surge; the concentrations of norepinephrine and epinephrine increase 100- to 1000-fold above normal values.^{9,10} Clinically, marked tachycardia and hypertension documented for few minutes are replaced by vasoplegia and hypotension.^{11,12} We hypothesized that abolishing autonomic storm would reduce the

inflammatory response after BD in cardiac allografts precluding exclusion of organs as unsuitable for transplantation. In the present study, we used thoracic epidural anes-

From the Laboratory of Cardiovascular Surgery, Heart Institute (InCor) of São Paulo University Medical School, São Paulo, Brazil.

Funded by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Address reprint requests to Isaac Azevedo Silva, Av Dr Arnaldo, 455, Zip code: 01246-903, São Paulo—SP, Brazil. E-mail: isaacazevedo@yahoo.com

thesia (TEA) with bupivacaine, a local anesthetic that produces a reversible sympathectomy,^{13,14} to inhibit autonomic storm in a rat model of BD.

MATERIALS AND METHODS

Animals and Surgical Procedures

The experimental protocol was approved by our Animal Subject Committee. All animals received humane care in compliance with the "Guide for Care and Use of Laboratory Animals" (prepared by the Institute of Laboratory Animal Resources, National Research Council, and published by the National Academy Press, revised 1996).³²

Twenty-eight male Wistar rats, weighting 250 to 350 g, were allocated to four groups: group 1 (saline group) received an infusion of 20 μ L of saline solution to the epidural space prior to group 2 (pre-bup), 20 μ L of bupivacaine prior to group 3 (bup-20), 20 μ L of bupivacaine 20 minutes after; and group 4 (bup-60), 20 μ L of bupivacaine 60 minutes after BD induction.

Animals were anesthetized in a chamber with 5% isoflurane, intubated and ventilated with a rodent ventilator (Harvard Apparatus, model 683, USA) at a 10 mL/kg, tidal volume and 70 breaths/min frequency. They were maintained by inhalation of 2% isoflurane until BD induction. The carotid artery was cannulated for continuous blood pressure monitoring and blood sampling. Another jugular venous line was used for continuous saline infusion (2 mL/h). No intravenous drugs were administered.

BD Model and Thoracic Epidural Anesthesia

A Fogarty 4-French catheter (Baxter Health Care, Deerfield, Ill, USA) was placed into the intracranial cavity of rats through a drilled parietal burr hole. The balloon catheter was rapidly inflated with 0.5 mL of saline to increased the intracranial pressure until BD, which was confirmed via maximal pupil dilatation, an absence of reflexes, and a drop in mean arterial pressure (MAP). Anesthesia was stopped after BD confirmation. Through an incision over T11–L1 vertebrae and angulation of column a polyethylen catheter 10 catheter placed into epidural space was advanced to the T5 level.

All animals were maintained for 6 hours. Thereafter, they were exsanguinated via the abdominal aorta, and the heart removed, immersed in hexane, and frozen with liquid nitrogen. Blood samples obtained from the abdominal aorta were centrifuged (1500g, 25°C) and plasma stored at -80°C for subsequent analyses.

Measurements

Blood gases, electrolytes, lactate, hematocrit, and white blood cell counts. Blood gases, electrolytes, and lactate analyses were performed on blood samples obtained from the carotid artery at baseline (0 minutes) as well as at 3 and 6 hours after the surgical procedures using a gas analyzer (Radiometer ABL 555, Radiometer Medical, Denmark). Hematocrit and white blood cell counts were performed in blood samples obtained from the cut tip of the tail at the baseline and 6 hours. Hematocrit was measured by microcapillary tube centrifugation. Total white blood cell counts were determined using a Neubauer chamber.

Tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β . Quantification of interleukin (IL)-1 β and tumor necrosis factor (TNF)- α on cardiac tissue and serum was performed by enzyme-linked immunosorbent assays using the Quantikine kit (R & D Systems Inc., Minneapolis, Min, USA) in compliance with the manufacturer's recommenda-

tions. Cytokine basal reference values were obtained from three naive rats.

Intercellular adhesion molecule-1 and vascular adhesion molecule-1. Quantification of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 and vascular adhesion molecule (VCAM)-1 in heart tissue was performed by immunohistochemistry. Frozen samples of serial 6- μ m-thick sections of heart tissue were fixed in cold acetone for 10 minutes. The nonspecific sites were blocked with buffer (Super-Block Buffer, Pierce Biotechnology, Rockford, Ill, USA) for 12 hours at 4°C . For immunodetection of ICAM-1 and VCAM-1, monoclonal antibodies anti-rat ICAM-1 (Abcam Inc, Cambridge, Mass, USA) or anti-mouse VCAM-1 (Abcam Inc), which were previously conjugated to biotin were diluted 1:50 in phosphate-buffer saline (PBS) containing 0.3% Tween-20. After incubation for 12 hours at 4°C , sections washed successively with PBS were sequentially incubated for 1 hour at room temperature with streptavidin-fluorescein complex (Amersham Pharmacia Biotech, London, UK) diluted in PBS at 1:200. After washing the slides with PBS, samples were coated with a solution of propidium iodide (Vector, Burlingame, Calif, USA) to preserve fluorescence. The analysis was performed using an image acquisition system with CoolSNAP-Pro digital camera (Nikon, Tokyo, Japan) coupled to a fluorescence microscope (Nikon, Tokyo, Japan). Images were analyzed with software Image-Pro Plus 4.1 (Media Cybernetics, Bethesda, Md, USA). Results were expressed as mean fluorescence intensity.

Bcl-2 and caspase-3. Frozen heart tissue samples fixed in cold acetone for 10 minutes were used to measure Bcl-2 and caspase-3. After blocking endogenous peroxidase with phosphate buffered saline (PBS) and H_2O_2 nonspecific sites were blocked by incubation in biotin-free buffer (Super Block Blocking Buffer, Pierce Biotechnology, Rockford, Ill, USA). For immunodetection of caspase-3 and Bcl-2, samples were incubated for 16 hours at 4°C with rabbit polyclonal antibodies anti-caspase 3 (Abcam Inc) or anti-Bcl-2 (Abcam Inc) that were previously conjugated with biotin and diluted (1:50) in PBS with 0.3% tween-20. Samples were incubated for 1 hour at room temperature with streptavidin diluted in PBS (1:500), developed with 3,3'-diaminobenzidine, and counterstained with hematoxylin. After dehydration by immersion in solutions of increasing ethanol concentrations and diaphanization by immersion in xylene, samples were covered with Canada's balsam. The image analysis employed in a system using Axiovision software, version 4.7.2. (Carl Zeiss Inc, Hallbergmoos-München, Germany). Results were expressed as the percentage of positively stained cells per five fields of 5000 μm^2 each.

Statistical Analysis

Data were analyzed using the GraphpadPrism 5.2 statistical program. Results were expressed as mean values $\pm$ standard errors of the means. To compare means between groups we employed the two-way analysis of variance, controlled by Levene's test of homogeneity, followed by Bonferroni's test. The level of significance was set at .05.

RESULTS

MAP, Blood Gas, Electrolytes, Lactate, Hematocrit, and Leukocyte Counts

BD induction was associated with a sudden increase in MAP over the first minute following catheter inflation. However the hemodynamic alterations were not seen among the pre-bup group, namely animals that received a

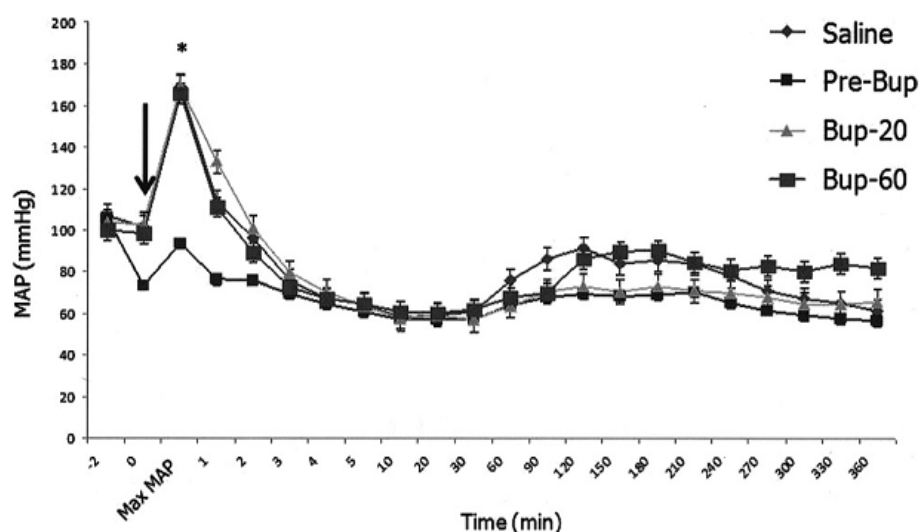


Fig 1. Mean arterial pressure (MAP) of brain-dead rats treated with saline, bupivacaine before brain death induction (pre-bup), and bupivacaine after 20 and 60 minutes (bup-20 and bup-60, respectively). Arrow represents induction of brain death. The peak after brain-death induction is statistically significant. Note that pre-bup group had no peak. The data are presented as the mean $\pm$ standard error of the mean.

bolus of bupivacaine before BD induction, suggesting inhibition of sympathetic release (Fig 1).

Blood gases, electrolytes, lactate, and hematocrit analysis did not show significant differences among the groups (data not shown). Comparing total leukocyte counts at basal and 6 hours, leukopenia was noted in all groups, without a significant difference among the groups. In contrast, statistical significance was reached when each group was analyzed at basal versus 6 hours, Fig 2 shows the mean values of total leukocyte counts.

TNF- α and IL-1 β

An intense local and systemic inflammatory response was evidenced by high levels of serum and cardiac TNF- α and IL-1 β versus their concentrations among naïve animals, which were below detection values. Significant differences were not observed among the groups (Fig 3) confirming the

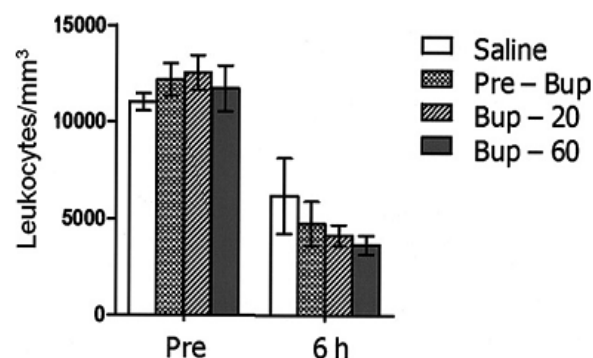


Fig 2. Number of total white blood cell counts obtained before (pre) and 6 hours after brain death. Brain-dead rats were treated with saline, bupivacaine before brain death induction (pre-bup), and bupivacaine after 20 and 60 min (bup-20 and bup-60, respectively). The data are presented as mean $\pm$ standard error of the mean.

hypothesis that a pronounced inflammatory response took place associated with BD.

Immunohistochemistry of Cardiac Tissue

Fig 4, shows expression of adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 in the heart did not differ among the groups. Apoptosis was evaluated in the myocardium by the expression of caspase-3 and Bcl-2, which are pro-apoptotic and anti-apoptotic molecules respectively. As illustrated in Fig 5, there were no differences in the expression of either molecule among the groups.

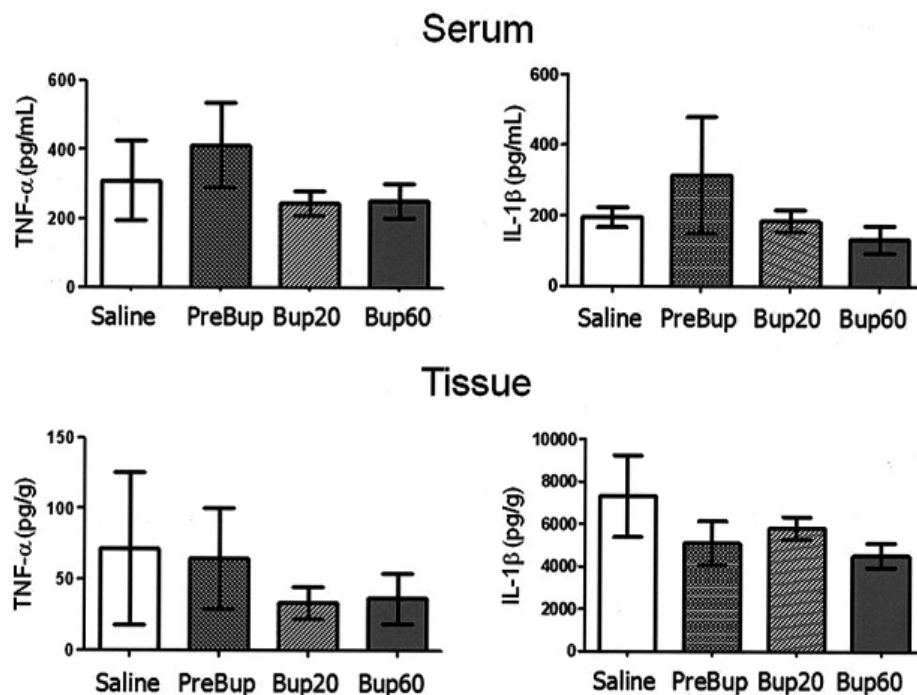
DISCUSSION

Numerous studies have evaluated the role of BD on graft outcomes in experimental and clinical studies. Acute evaluation of human BD has shown catecholamine levels above normal values immediately after the BD event. Increased inflammatory responses and apoptosis have been observed in various organs.¹⁵⁻¹⁷ In a rodent model of heart transplantation, a longer duration of BD led to increased leukocyte infiltration and expression of adhesion molecules on the endothelial cells of the transplanted graft, thereby resulting in accelerated acute rejection.¹⁸

Previous results reports by our group¹⁹ demonstrated important inflammatory activation in a rat BD model, showing classical hemodynamic alterations soon after balloon catheter inflation. In the present study, TEA was used in a rat BD model in an attempt to attenuate the hemodynamic alterations that are triggered by the catecholamine storm.

Since the donor scarcity³ is an emerging problem in the entire world, understanding causes of graft failure and interventions to render grafts more likely to be viable are important endeavors. Our data showed that all but one group evolved with a high mean arterial peak pressure soon after the Fogarty catheter insufflation leading to BD induction, namely the group receiving TEA with bupivacaine

Fig 3. Enzyme-linked immunosorbent assay of cytokines in the serum and cardiac tissue after 6 hours of brain-death induction. Brain-dead rats were treated with saline, bupivacaine before brain-death induction (pre-bup), and bupivacaine after 20 and 60 min (bup-20 and bup-60, respectively). The data are presented as the mean $\pm$ standard error of the mean. The reference values obtained from normal rats were below the limit of detection of the assay. IL, interleukin; TNF, tumor necrosis factor.



before BD induction. TEA obtained a chemical sympathectomy precluding the hemodynamic derangements usually seen with acute BD. Similar results have been reported using administration of intravenous drugs like propranolol,²⁰ xylazine,²¹ and labetalol.²² Another way to achieve a sympathectomy surgically in baboons has been reported by Novitzky et al.¹² However, their animals showed a classical hypertensive crisis indicating that the surgical procedure was not sufficient to block the autonomic storm.

Studies investigating the relationship between BD and the activation of peripheral organs have demonstrated that cytokines act as signaling molecules during the inflammatory process.¹⁵ Pro-inflammatory cytokines, such as TNF- α and IL-1 β , induce endothelial activation resulting in leukocyte interactions with adhesion molecules expressed on the cell surface.^{23,24} Their data demonstrated TNF- α and IL-1 β to be highly expressed in all animals, either in serum or in the myocardium, indicating an intense inflammatory activity

in all groups, suggesting that the autonomic storm was not linked to cytokine release. There was no difference among the groups.

Studying the mesentery, our group¹⁹ reported increased ICAM-1 expression triggered by BD consistent with other studies performed in various organs.^{25–29} Herein, the abolition of the autonomic storm by TEA did not change the expression of adhesion molecules on cardiac endothelial cells.

Apoptosis is another mechanism measured in our BD model. The data presented herein showed that the number of caspase-3 and Bcl-2-positive cells did not differ among the groups. Birks et al.³⁰ measured pro-caspase-3 and cleavage products of caspase-3 levels in BD human hearts that had been used versus discarded for transplantation observing a high expression among grafts considered unsuitable for transplantation due to poor pretransplant function.

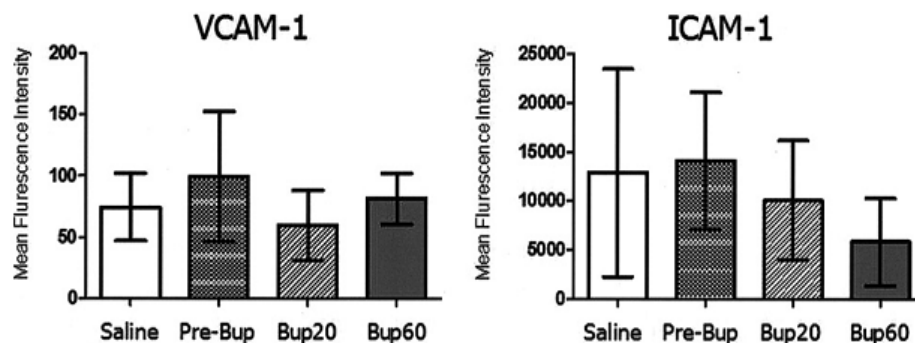


Fig 4. Expression levels of vascular adhesion molecule (VCAM)-1 and intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 in the cardiac tissue in brain dead rats treated with saline, bupivacaine before brain death induction (pre-bup), and 20 or 30 minutes thereafter (bup-20 and bup-60, respectively). The data are presented as mean $\pm$ standard error of the mean.

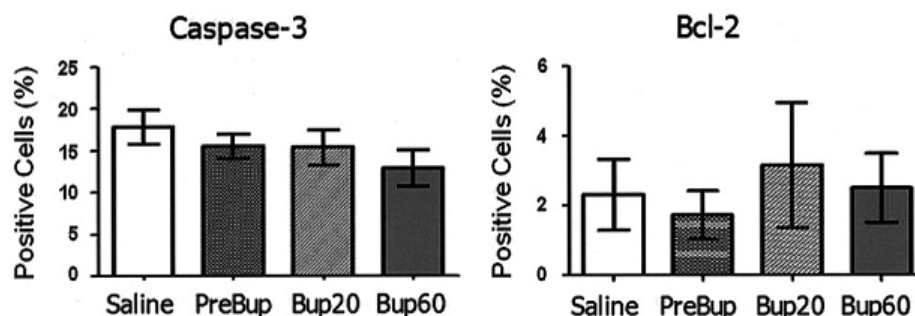


Fig 5. Expression of pro- and anti-apoptotic molecules (caspase-3 and Bcl-2, respectively) in the myocardium. Brain-dead rats were treated with saline, bupivacaine before brain-death induction (pre-bup), and bupivacaine after 20 and 60 minutes (bup-20 and bup-60, respectively). The data are presented as mean $\pm$ standard error of the mean.

The number of white blood cells was significantly reduced 6 hours after BD in all animals, including those that had inhibited hemodynamic storm. Thus the reduced number of leukocytes, at least in this BD model, was not a sympathetic-dependent mechanism, since animals with hemodynamic changes after BD induction showed the same evolution. The reduction in blood leukocyte counts among BD rats agreed with previously reported results.^{19,31}

In conclusion, we demonstrated that it was possible to block the hemodynamic derangements associated with acute BD by TEA with bupivacaine. However, TEA did not influence the inflammatory response associated with BD in cardiac tissue at 6 hours thereafter. Furthermore, BD was associated with reduced white blood cell counts, irrespective of the autonomic storm. Finally, the hemodynamic effects of autonomic storm associated with acute BD seemed to not be responsible for the subsequent development of the inflammatory response. Therefore, further studies are needed to elucidate the mechanisms responsible for inflammation and myocardial dysfunction among BD patients.

REFERENCES

- Pandalai PK, Lyons JM, Duffy JY et al: Role of the β -adrenergic receptor kinase in myocardial dysfunction after brain death. *J Thorac Cardiovasc Surg* 130:1183, 2005
- Siepe M, Martin J, Sarai K, et al: Twenty-four hours postoperative results after orthotopic cardiac transplantation in swine. *J Card Surg* 22:287, 2007
- Mascia L, Mastromauro I, Viberti S, et al: Management to optimize organ procurement in brain dead donors. *Minerva Anesthesiol* 75:125, 2009
- Apostolakis E, Parissis H, Dougenis D: Brain death and donor heart dysfunction: implications in cardiac transplantation. *J Card Surg* 25:98, 2010
- Birks EJ, Yacoub MH, Burton PS, et al: Activation of apoptotic and inflammatory pathways in dysfunctional donor hearts. *Transplantation* 70:1498, 2000
- Wagner FD, Jonitz B, Potapov EV, et al: Procalcitonin, a donor-specific predictor of early graft failure-related mortality after heart transplantation. *Circulation* 104(12 suppl):I192, 2001
- Potapov EV, Wagner FD, Loebe M, et al: Elevated donor cardiac troponin T and procalcitonin indicate two independent mechanisms of early graft failure after heart transplantation. *Int J Cardiol* 92:163, 2003
- Segel LD, von Haag DW, Zhang J, et al: Selective overexpression of inflammatory molecules in heart from brain-dead rats. *J Heart Lung Transplant* 21:804, 2002
- Shivalkar B, Van Loon J, Wieland W, et al: Variable effects of explosive or gradual increase of intracranial pressure on myocardial structure and function. *Circulation* 87:230, 1993
- Wilhelm MJ, Pratschke J, Beato F, et al: Activation of proinflammatory mediators in heart transplants from brain-dead donors: evidence from a model of chronic rat cardiac allograft rejection. *Transplant Proc* 34:2359, 2002
- Kutsogiannis DJ, Pagliarello G, Doig C, et al: Medical management to optimize donor organ potential: review of the literature. *Can J Anaesth* 53:820, 2006
- Novitzky D, Wicomb WN, Cooper DK, et al: Prevention of myocardial injury during brain death by total cardiac sympathectomy in the Chacma baboon. *Ann Thorac Surg* 41:520, 1986
- Hollmann MW, Durieux ME: Local anesthetics and the inflammatory response: a new therapeutic indication? *Anesthesiology* 93:858, 2000
- Heavner JE: Local anesthetics. *Curr Opin Anaesthesiol* 20:336, 2007
- Barklin A: Systemic inflammation in the brain-dead organ donor. *Acta Anaesthesiol Scand* 53:425, 2009
- Barklin A, Larsson A, Vestergaard C, et al: Does brain death induce a pro-inflammatory response at the organ level in a porcine model? *Acta Anaesthesiol Scand* 52:621, 2008
- Lopez SP, Hernandez JO, Moreno NV, et al: Brain death effects on catecholamine levels and subsequent cardiac damage assessed in organ donors. *J Heart Lung Transplant* 28:815, 2009
- Wilhelm MJ, Pratschke J, Beato F, et al: Activation of the heart by donor brain death accelerates acute rejection after transplantation. *Circulation* 102:2426, 2000
- Simas R, Sannomiya P, Cruz JWMC, et al: Paradoxical effects of brain death and associated trauma on rat mesenteric microcirculation: an intravital microscopic study. *Clinics (Sao Paulo)* 67:69, 2012
- Skrabal CA, Thompson LO, Potapov EV, et al: Organ-specific regulation of pro-inflammatory molecules in heart, lung, and kidney following brain death. *J Surg Res* 123:118, 2005
- Yeh T Jr, Wechsler AS, Graham L, et al: Central sympathetic blockade ameliorates brain death-induced cardiotoxicity and associated changes in myocardial gene expression. *J Thorac Cardiovasc Surg* 124:1087, 2002
- Seguin C, Devaux Y, Grosjean S, et al: Evidence of functional myocardial ischemia associated with myocardial dysfunction in brain-dead pigs. *Circulation* 104(12 suppl 1):I197, 2001
- Collins T, Read MA, Neish AZ, et al: Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecule: NFkappa B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J* 9:899, 1995

24. McHale JF, Harari OA, Marshall D, et al: Vascular endothelial cell expression of ICAM-1 and VCAM-1 at the onset of eliciting contact hypersensitivity in mice: evidence for a dominant role of TNF- α . *J Immunol* 162:1648, 1999
25. Yamagami K, Hutter J, Yamamoto Y, et al: Synergistic effects of brain death and liver steatosis on the hepatic microcirculation. *Transplant* 80:500, 2005
26. van Der Hoeven JA, Ter Horst GJ, Molema G, et al: Effects of brain death and hemodynamic status on function and immunologic activation of the potential donor liver in the rat. *Ann Surg* 232:804, 2000
27. Itabashi K, Ito Y, Takahashi T, et al: Protective effects of urinary trypsin inhibitor (UTI) on hepatic microvascular in hypotensive brain-dead rats. *Eur Surg Res* 34:330, 2002
28. van der Hoeven JA, Molema G, Ter Horst GJ, et al: Relationship between duration of brain death and hemodynamic (in)stability on progressive dysfunction and increased immunologic activation of donor kidneys. *Kidney Int* 64:1874, 2003
29. Zhou H, Ding W, Cui X, et al: Carbon monoxide inhalation ameliorates conditions of lung grafts from brain death donors. *Chin Med J (Engl)* 121:1411, 2008
30. Birks EJ, Yacoub MH, Burton PS, et al: Activation of apoptotic and inflammatory pathways in dysfunctional donor hearts. *Transplantation* 70:1498, 2000
31. Takada M, Toyama H, Tanaka T, et al: Augmentation of interleukin-10 in pancreatic islets after brain death. *Transplant Proc* 36:1534, 2004
32. Institute of Laboratory Animal Resources, National Research Council: Guide for Care and Use of Laboratory Animals. National Academy Press, Available from: <http://grants.nih.gov/grants/olaw/Guide-for-the-Care-and-Use-of-Laboratory-Animals.pdf>

Epílogo

“Porque dEle, e por meio dEle, e para Ele são todas as coisas. A Ele, pois, a glória eternamente. Amém!”

Romanos 11.36