

RAFAEL SIMAS

**Estudo das alterações microcirculatórias e
da evolução do processo inflamatório em
modelo de morte encefálica em ratos**

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

Programa de Cirurgia Torácica e Cardiovascular

Orientador: Prof. Dr. Luiz Felipe Pinho Moreira

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Paulina Sannomiya

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

Simas, Rafael

Estudo das alterações microcirculatórias e da evolução do processo inflamatório em modelo de morte encefálica em ratos / Rafael Simas. -- São Paulo, 2013.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Cirurgia Torácica e Cardiovascular.

Orientador: Luiz Felipe Pinho Moreira.

Co-orientadora: Paulina Sannomiya.

Descritores: 1.Morte encefálica 2.Traumatismos encefálicos
3.Microcirculação 4.Inflamação 5.Patologia 6.Ratos Wistar

Dedicatória

Dedico este trabalho às mulheres da minha vida:

Maria Aparecida, Laura, Renata, Roberta e Jaqueline.

O apoio de vocês foi essencial para realização deste sonho.

Obrigado por sonharem comigo...

Amo muito todas vocês!

Agradecimentos

Ao Professor Luiz Felipe Pinho Moreira. Mais do que um excelente professor e pesquisador, um grande amigo. Aprendi muito nesses quatro anos de doutorado, Professor. Quero pedir desculpas pelas falhas que cometi e agradecer pela oportunidade de ter continuado meus estudos sob sua orientação. Espero que a amizade que criamos prossiga e que os futuros trabalhos sejam tão desafiadores quanto os que já realizamos. Muito obrigado, Mestre!

À Professora Paulina Sannomiya. Quem diria, Professora, que aquele simples e-mail que eu enviei em 2008, querendo conhecer seu trabalho, me traria até aqui! Aprendi muito contigo no nosso convívio diário. Ganhei muitas aulas, e fiz uma grande amizade. Muito obrigado, Professora!

Ao Professor José Walber. Nossos experimentos, sempre regados a bom humor, transformaram as ideias em resultados. Já sinto saudades dessa época. Muito obrigado, Walber.

Ao Professor Luiz Fernando Ferraz da Silva, o famoso *Burns*, pela supervisão do meu estágio em docência e por ter ajudado com as análises histológicas.

Ao Professor João Otiron. Obrigado pela ajuda com a complicadíssima língua portuguesa. Espero que eu tenha aprendido alguma coisa.

Ao grande amigo Isaac Azevedo Silva. Obrigado pelas inúmeras aulas, pelos esclarecimentos de última hora, pelos muitos cafés... “*Houston*”, obrigado por tudo! Foi uma honra ter trabalhado contigo.

À equipe do LIM-11: Leila Peralta Areco, Sueli Ferreira e Cristiano Correia. Em especial, ao grande amigo Sérgio Sales. Obrigado pelo enorme apoio, meu amigo.

Aos amigos Fernando Zanoni, Gustavo Judas e Ismael Guarda. Excelentes pesquisadores e amigos melhores ainda.

Aos alunos de iniciação científica: Clebson Ferreira, Diogo Kogiso e Maurício Kase. Obrigado pela dedicação de vocês.

À grande amiga Daniela Janolli. Foi muito bom ter trabalhado contigo... E foi sensacional ter construído essa amizade!

Aos professores Niels Olsen, Sonia Jancar, e Joilson Martins.

Às meninas da secretaria da pós-graduação : Eva, Juliana, Neusa, e Tatiana. Obrigado pela paciência que vocês tiveram comigo nesses quatro anos.

À Universidade de São Paulo (USP) e à Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI) pelas aulas e oportunidades que me proporcionaram.

A todos os professores do curso de Ciências Biológicas da UNIVALI. Em especial André Barreto, André Lima, Darcy Sato, Fernando Tcacenco, Gilmar Zafari, Marcus Adonai, Maria Paula, Maria Verônica, Ricardo Corbetta e Rosana Bella Cruz. De professores a grandes amigos. Muito obrigado!

Aos mestres Ana Angélica Steil e Marcos Luiz Pessatti. O ensinamento de vocês foi muito além da sala de aula. Sem dúvida, vocês estão entre os melhores amigos que Deus me deu.

Aos amigos “de sempre”... Arthur Rausch, Daiane Anzolin, Gustavo Gomes, Luciano Machado, Guilherme Rosini, Vanessa Ginzeli, Tiago Silva. Mal posso esperar pelo nosso próximo encontro. Vocês são demais!

Aos grandes amigos Jaqueline Muniz, Maikel Reck, Marta Antunes, Sérgio Mendes. Vocês tornaram o curso de Biologia ainda mais inesquecível.

À Laura Menegat, minha eterna companheira. Somente uma pessoa tão sensacional poderia suportar o meu mau humor, o meu estresse, a minha ansiedade... Tenho que agradecer a Deus por te ter ao meu lado. E assim será por muitos anos. “Somos anjos zelando um pelo outro”. Eu te amo, *my Flower*... Muito!

À Maria Aparecida Schmitt, minha mãe. Espero que eu tenha consigo recompensar o suor das tuas batalhas. Me desculpe, minha mãe, pelos anos longe de casa. Mesmo longe eu sempre senti tua presença, apoiando cada decisão que eu tomei. Te amo muito!

Ao meu pai, Aldomiro Simas. Sem dúvida o meu melhor amigo! Nossos poucos momentos juntos sempre me fizeram muito feliz. Te amo, meu pai!

Às minhas irmãs, Renata, Roberta e Jaqueline. Como é bom saber que tenho vocês sempre ao meu lado. Fiz o melhor que eu pude, e espero que vocês tenham aprovado minhas escolhas. Amo vocês!

Aos meus cunhados, Nelinho, Alessandro, e Fabrício, e meus sobrinhos, João Pedro, Rafaela e Pietra. Todos sempre me apoiaram... Cada um do seu jeito. Sem dúvida, uma grande família!

À minha tia, Márcia Schmitt. Desde minhas primeiras aulas, como calouro de Biologia, sempre me incentivou. Tivemos excelentes conversas sobre a vida acadêmica, e teremos muitas mais. Muito obrigado, tia.

Aos meus sogros, Stela Maris e Célio. Acreditaram em mim e sempre me apoiaram.

À minha queridíssima Laís Denardin. Tu és única, guria!

Ao meu cunhado e grande parceiro Fausto Menegat.

Ao casal Ana Alice e Sérgio que acompanharam essa minha trajetória, mesmo nós estando tão longe uns dos outros.

À dona Adelaide, Solange, Marina, Eduardo, Édio. Quem diria que eu acharia minha família aqui em São Paulo... Vocês foram muito importantes nessa jornada. Muito obrigado!

A aos bons tempos do Hotel Hollywood, quando fiz meus primeiros amigos em terras paulistanas: Diva, Dora, Genival e Ivan. Vocês, por muito tempo, foram minha família aqui em São Paulo. Muito obrigado, amigos.

À Márcia Regina Miranda. Uma daquelas amizades inesperadas, mas que durará por muito tempo. Muito obrigado pelo apoio desses anos!

Por fim, agradeço a Deus por todos os meus “vinte e tantos anos”. Graças a Ele foi possível chegar até aqui. E com fé, irei ainda mais longe...

Normatização adotada

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

Apresentação de dissertações e teses sob forma de compilação de artigos, aprovado em 16 de setembro de 2011, pela Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Anexo).

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

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

Sumário

Dedicatória

Agradecimentos

Normatização adotada

Sumário

Resumo

Summary

Introdução	1
Morte Encefálica	3
Microcirculação e Recrutamento Leucocitário	6
Objetivos	10
Objetivo geral	10
Objetivos específicos	10
Métodos	11
Grupos Experimentais.....	11
Anestesia e preparação cirúrgica.....	12
Parâmetros hemodinâmicos e gasométricos	12
Leucograma e hematócrito	13
Indução da morte encefálica	14
Microscopia intravital in situ do mesentério.....	14

Expressão de moléculas de adesão na microcirculação mesentérica	15
Análises histopatológicas	16
Dosagens de citocinas, quimiocinas e corticosterona séricas	17
Análise estatística	17
Resultados	19
CLINICS. 2012;67(1):69-75	19
Acta Cirúrgica Brasileira. 2012;27(7):465-70	28
Análise Crítica	35
Conclusões.....	43
Anexos	44
Referências	45

Resumo

Simas R. *Estudo das alterações microcirculatórias e da evolução do processo inflamatório em modelo de morte encefálica em ratos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

INTRODUÇÃO: Estudos indicam que a morte encefálica está associada com alterações hemodinâmicas, hormonais e inflamatórias, comprometendo a viabilidade dos órgãos para o transplante. Porém, é necessário esclarecer quais destas alterações são decorrentes da morte encefálica e quais são devidas ao trauma associado. Este estudo tem por objetivo avaliar a microcirculação mesentérica, quantificar marcadores sistêmicos da resposta inflamatória, e analisar as alterações histopatológicas em ratos submetidos à morte encefálica comparados com ratos falso-operados. **MÉTODOS:** Ratos *Wistar* machos (300 ± 50 g), anestesiados com isoflurano (5-2 %), foram intubados e mecanicamente ventilados (10 mL/kg, 70 ciclos/min). Através de uma trepanação, um cateter Fogarty[®] 4 F foi inserido no espaço intracraniano e rapidamente insuflado com 500 μ L de água para indução da morte encefálica. Após a indução da morte encefálica o anestésico foi retirado e os animais receberam solução salina 0,9 % endovenosa (2 mL/h). Animais falso-operados foram apenas trepanados. Pressão arterial média e frequência cardíaca foram monitoradas ao longo de todo tempo de experimento. Após 30, 180 ou 360 min, foram avaliados os seguintes parâmetros: 1) avaliação da perfusão e interação

leucócito-endotélio na microcirculação mesentérica por técnica de microscopia intravital; 2) expressão de moléculas de adesão endoteliais (P-selectina e ICAM-1) por imunohistoquímica; 3) quantificação das citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6, e IL-10), quimiocinas (CINC-1 e CINC-2) e corticosterona séricas; 4) determinação do leucograma, hematócrito e gasometria; 5) avaliação histológica do coração, pulmão, fígado e rim. RESULTADOS: A morte encefálica resultou em imediato pico hipertensivo seguido de episódio de hipotensão, associado com queda na perfusão mesentérica para aproximadamente 30% de microvasos com fluxo sanguíneo normal ($p<0,0001$). A interação dos leucócitos com o endotélio apresentou um menor número de leucócitos *rollers* ($p<0,0001$), com maior migração leucocitária ($p=0,03$) para o tecido perivascular de ratos com morte encefálica, decorridos 180 min de experimento. A expressão de P-selectina não diferiu entre os grupos, enquanto que ICAM-1 teve sua expressão aumentada na terceira hora após a indução da morte encefálica ($p<0,01$). As concentrações séricas de citocinas e quimiocinas foram iguais entre animais com morte encefálica e falso-operados. Observou-se queda acentuada nos níveis séricos de corticosterona de animais com morte encefálica após 3 h de experimento ($p<0,0001$). O número de leucócitos totais nos animais com morte encefálica foi menor quando comparado com animais falso-operados ($p<0,05$), sendo observado aumento na razão neutrófilo/linfócito, após 3h de experimento, em ambos os grupos. Não foram observadas alterações significativas nos dados gasométricos e hematócrito. A morte encefálica induziu alterações histopatológicas nos quatro órgãos avaliados, sendo observada congestão vascular no coração ($p=0,02$) e pulmão ($p=0,02$), edema alveolar pulmonar ($p=0,001$), infiltrado leucocitário no fígado

($p=0,01$), e edema tubular renal ($p=0,04$). **CONCLUSÕES:** A morte encefálica desencadeou instabilidade hemodinâmica associada com hipoperfusão tecidual, além de queda na concentração de corticosterona endógena, resultando em aumento da expressão de ICAM-1 com maior migração de leucócitos na microcirculação mesentérica, além de leucopenia. Os órgãos sólidos apresentaram maior congestão vascular, sendo que os pulmões foram os órgãos mais comprometidos.

Descritores: Morte encefálica; Traumatismos encefálicos; Microcirculação; Inflamação; Patologia; Ratos, Wistar.

Summary

Simas R. *Study of microcirculatory alterations and evolution of inflammatory process in a brain death rat model* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2013.

BACKGROUND: Studies indicate that brain death is associated with hemodynamic, hormonal and inflammatory alterations, compromising the viability of organs to transplantation. However, it is necessary to clarify which of these alterations are consequences of brain death and which are due to brain death-associated trauma. This study aims to evaluate the mesenteric microcirculation, quantify systemic markers of the inflammatory response, and analyze the histopathological changes in rats submitted to brain death compared with sham operated animals. METHODS: Male *Wistar* rats (300 ± 50 g) anesthetized with isoflurane (5-2 %) were intubated and mechanically ventilated (10 mL/kg, 70 breaths/min). Through trepanation, a Fogarty 4 F catheter was inserted intracranially and quickly inflated with 500 μ L of water to induce brain death. After brain death confirmation, anesthesia was stopped and the animals received 0.9 % saline solution intravenously (2 mL/h). Sham operated animals were just trepanned. Mean arterial blood pressure and heart rate were continuously monitored. After 30, 180 or 360 min, the following parameters were evaluated: 1) perfusion of microvessels and leukocyte-endothelial interactions in the mesenteric microcirculation by intravital

microscopy; 2) expression of endothelial adhesion molecules (P-selectin and ICAM-1) by immunohistochemistry; 3) quantification of serum cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-10), chemokines (CINC-1 and CINC-2), and corticosterone; 4) determination of white blood cell counts, hematocrit, and blood gases; 5) histological assessment of heart, lung, liver, and kidney. RESULTS: Brain death induced an immediate hypertensive peak followed by hypotension associated with a reduction in mesenteric perfusion to 30% of microvessels with normal blood flow ($p<0.0001$). Number of rolling leukocytes was reduced ($p<0.0001$), and migrated leukocytes to perivascular tissue increased after 180 min ($p=0.03$). The expression of P-selectin did not differ between groups, whereas the expression of ICAM-1 was increased 3 h after brain death induction ($p<0.01$). Increased serum concentrations of cytokines and chemokines were observed in both brain death and sham operated rats. Brain death rats showed a decrease in serum corticosterone levels after 3 h ($p<0.0001$). Total white blood cell counts in brain death rats was reduced when compared with sham operated rats ($p<0.05$), associated with an increase in neutrophil/lymphocyte ratio after 3 h in both groups. No significant changes in hematocrit and blood gases were observed. Brain death induced histopathological alterations in the evaluated organs: vascular congestion in the heart and lungs ($p=0.02$), pulmonary alveolar edema ($p=0.001$), leukocyte infiltration in the liver ($p=0.01$), and renal tubular edema ($p=0.04$). CONCLUSIONS: Brain death triggered hemodynamic instability associated with tissue hypoperfusion, and a decrease in the concentration of endogenous corticosterone, resulting in increased expression of ICAM-1 with increased migration of leukocytes at mesenteric microcirculation, associated with a

paradoxical leukopenia. The main histopathological alteration in brain death rats was vascular congestion, and the lungs are the most compromised organs.

Descriptors: Brain death; Brain injuries; Microcirculation; Inflammation; Pathology, Rats, Wistar.

Introdução

O transplante de órgãos é, por muitas vezes, a única terapia possível em diversas doenças em estágio avançado de evolução. Contudo, existe um grande desbalanço entre o número de pacientes em fila de espera por um transplante e o número de doadores de órgãos. De acordo com o Ministério da Saúde, no primeiro semestre de 2012 o Brasil realizou 12.342 procedimentos cirúrgicos de transplantes de órgãos, um crescimento de aproximadamente 13% comparado com o mesmo período do ano de 2011, quando foram realizados 10.905 transplantes em todo o território nacional. O estado de São Paulo destaca-se pelo número de procedimentos realizados no primeiro semestre de 2012, chegando a 4.783 transplantes, seguido por Minas Gerais e Paraná, com 1.111 e 943 transplantes realizados, respectivamente. Nesse período, no entanto, observa-se um reduzido número de transplantes de coração, 108 cirurgias realizadas, e de pulmão, apenas 30. Talvez a principal justificativa para o baixo número de transplantes realizados destes órgãos seja o fato de que apenas pacientes com morte encefálica podem ser considerados como doadores, enquanto que transplantes de rim e fígado podem ser realizados a partir de doadores vivos (fonte: www.saude.gov.br).

Nos últimos anos, o sucesso dos transplantes vem aumentando progressivamente devido à melhor compreensão da falência orgânica, do processo de rejeição e ao desenvolvimento de tratamentos imunossupressivos mais adequados¹. Porém, a morte encefálica continua a ser um elemento

responsável, em grande parte, pelo comprometimento da função dos órgãos, limitando o número de transplantes realizados².

A integridade da microcirculação é fundamental para a adequada oxigenação tecidual e preservação da função do órgão, como observado em pacientes com sepse grave e após o transplante de órgãos^{3, 4}. Nesta situação, a lesão por isquemia e reperfusão reduz a perfusão dos tecidos, agravando a disfunção orgânica⁴. Embora se reconheça a importância da integridade da microcirculação para uma adequada perfusão dos órgãos, poucos trabalhos têm sido realizados com foco nas alterações microcirculatórias decorrentes da morte encefálica.

Morte Encefálica

Em condições normais, o volume do tecido cerebral, o volume sanguíneo e de fluido cerebroespinal, bem como a pressão no interior da cavidade intracraniana, não se alteram. Contudo, algumas situações patológicas, tais como hemorragias, tumores e infecções, aumentam o volume e a pressão intracraniana, podendo levar à morte encefálica⁵.

A partir do trauma inicial até a completa instauração da morte encefálica, uma cascata de eventos se desenvolve afetando todos os órgãos potencialmente transplantáveis. Essa cascata inclui desde o aumento da pressão intracraniana, resultante da lesão cerebral inicial, até as múltiplas alterações sistêmicas desencadeadas pela morte encefálica⁶. Entre as alterações peculiares à morte encefálica está a instabilidade hemodinâmica, o desarranjo hormonal e metabólico, e a resposta inflamatória sistêmica^{2, 5-7}.

A ordem dos eventos fisiopatológicos envolvidos no estabelecimento da morte encefálica envolve, principalmente, a atividade do sistema nervoso simpático e sua contrarregulação pelo sistema nervoso parassimpático. Inicialmente, ocorre ativação parassimpática, após o reflexo de Cushing não obter sucesso em manter a adequada perfusão cerebral, observando-se um quadro de bradicardia e hipertensão, associado com padrões alterados de respiração. À medida que a lesão evolui, ocorre a destruição do centro vagal cardiomotor, abolindo a atividade parassimpática. Desse modo, a estimulação simpática deixa de sofrer a contrarregulação do sistema parassimpático e se

estabelece a tempestade autonômica, caracterizada por taquicardia e hipertensão. Por fim, ocorre a diminuição da atividade simpática, resultando em instabilidade hemodinâmica exacerbada pela hipovolemia, perda de regulação da vasculatura periférica e vasodilatação⁸.

A tempestade autonômica, observada em pacientes com morte encefálica, reflete aumento nas concentrações séricas de catecolaminas em até 1.200 vezes os valores basais⁹. Essa liberação exacerbada de catecolaminas está associada ao episódio de hipertensão, observado durante o estabelecimento da morte encefálica, e ao aumento da resistência vascular sistêmica⁵.

A morte encefálica desencadeia uma série de eventos inflamatórios, os quais incluem a ativação do endotélio microvascular, do sistema complemento, e da coagulação, e demais componentes da resposta imune inata ou adaptativa¹⁰, como o aumento da expressão de moléculas de adesão endoteliais em diversos órgãos, infiltrado leucocitário nos tecidos perivasculares e o aumento das concentrações séricas de diversas citocinas, comprometendo a viabilidade dos órgãos a serem transplantados¹¹.

Diferentes mecanismos, desencadeados pela morte encefálica, atuam de formas distintas na indução da resposta inflamatória sistêmica. Distúrbios metabólicos e hormonais, bem como a tempestade autonômica, levam à isquemia e à inflamação nos diversos órgãos. A liberação de neuropeptídeos e de outros mediadores inflamatórios, a partir da isquemia cerebral, ativa o endotélio contribuindo para a disfunção orgânica². Contudo, pouco se sabe

sobre as alterações microcirculatórias após a morte encefálica, e qual é o papel do trauma associado no desenvolvimento dessas alterações.

Microcirculação e Recrutamento Leucocitário

Um dos primeiros eventos observados no processo inflamatório é a mobilização leucocitária para a periferia dos vasos da microcirculação (diâmetro inferior a 100 μm)^{3, 12, 13}. A adesão e o recrutamento dos leucócitos, para o local da lesão, são mediados por uma sequência de eventos que envolve a expressão de moléculas de adesão celular nos leucócitos e células endoteliais¹²⁻¹⁴. Os primeiros leucócitos recrutados na vigência da lesão tecidual ou infecção são os leucócitos polimorfonucleares, particularmente os neutrófilos, seguidos da migração dos monócitos e linfócitos¹².

Estímulos de natureza química, física ou biológica, são identificados por células do sistema imune inato, como macrófagos, células dendríticas, ou neutrófilos, as quais passam a liberar/produzir mediadores lipídicos, citocinas e quimiocinas, amplificando o recrutamento leucocitário para o local da lesão^{12, 15}.

Nos últimos anos, tem se observado grande avanço na compreensão dos mecanismos envolvidos no processo de recrutamento leucocitário, devido à identificação e à caracterização de moléculas envolvidas na adesão célula-célula e célula-matriz, regulando os diferentes estágios de migração leucocitária. As principais glicoproteínas envolvidas neste processo são: i) a família das selectinas; ii) a família das integrinas; e iii) moléculas da superfamília das imunoglobulinas^{13, 15}.

O processo de recrutamento dos leucócitos inicia-se pelo rolamento sobre o endotélio venular, processo mediado por selectinas e seus ligantes¹⁵.

As selectinas compõem uma família de glicoproteínas transmembrana, constituída de E-, e P-selectina, nas células endoteliais e plaquetas, e L-selectinas, nos leucócitos. Moléculas de P-selectina são expressas constitutivamente e armazenadas em grânulos α , nas plaquetas, e nos corpúsculos de Weibel-Palade, nas células endoteliais. Uma vez estimuladas, as células endoteliais rapidamente expressam as moléculas de P-selectina na superfície, devido à rápida fusão dos corpúsculos de Weibel-Palade à membrana plasmática¹⁶.

Na superfície externa das células endoteliais as selectinas se ligam, transitoriamente, a leucócitos circulantes através da interação com PSGL (*P-selectin glycoprotein ligand*)-1, ESL (*E-selectin ligand*)-1, CD-44 e outras glicoproteínas, presentes na superfície dos leucócitos. Essa interação resulta no que é chamado de rolamento de leucócitos sobre o endotélio, interação considerada de baixa afinidade^{13, 16, 17}. Em condições fisiológicas, a força de arraste do fluxo sanguíneo desloca os leucócitos do endotélio de volta para a circulação. Quando há lesão, os leucócitos, movendo-se pelo endotélio, são ativados por quimiocinas (IL-8, por exemplo), as quais estão ligadas às células endoteliais por glicosaminoglicanos. Essa ativação, mediada por quimiocinas, aumenta a afinidade das integrinas de superfície de leucócitos por seus ligantes na célula endotelial, induzindo a captura e a adesão leucocitária^{15, 18}.

As integrinas constituem uma família de proteínas que funcionam como moléculas de adesão e como receptores capazes de transmitir informações sobre propriedades químicas e mecânicas do entorno da célula. Essas

proteínas encontram-se expressas na superfície do leucócito sob forma inativa, e sua ativação difere dependendo da força de arraste do fluxo sanguíneo¹⁹.

Entre as integrinas envolvidas no processo de captura de leucócitos estão a LFA-1 (*Lymphocyte Function-Associated Antigen-1*, $\alpha_1\beta_2$ -integrina) e VLA-4 (*Very Late Activation Antigen-4*, $\alpha_4\beta_1$ -integrina), por exemplo¹³. Estas integrinas, expressas na superfície de leucócitos, interagem com moléculas de adesão da superfamília das imunoglobulinas, presentes na superfície das células endoteliais, mediando a adesão dos leucócitos ao endotélio venular²⁰.

Moléculas de adesão da superfamília das imunoglobulinas são caracterizadas por apresentarem uma ou mais subunidades homólogas à classe das imunoglobulinas G, fazendo parte deste grupo as moléculas ICAM (*intercellular adhesion molecule*)-1 e VCAM (*vascular cell adhesion molecule*)-1²¹. ICAM-1 possui papel importante no desenvolvimento da resposta imune inata e adaptativa, mediando a migração leucocitária²⁰.

Uma vez ativados e aderidos, os leucócitos iniciam o processo de transmigração para o tecido perivascular. Basicamente esse processo pode se dar de modo paracelular, quando a migração ocorre através de junções entre as células endoteliais, ou de modo transcelular, quando o leucócito atravessa a própria célula endotelial^{15, 22}. Transpondo a camada de células endoteliais, os leucócitos migram para o espaço perivascular, através da membrana basal endotelial e da bainha de pericitos^{13,23}.

Em suma, a resposta celular à lesão compreende a aderência de leucócitos ao endotélio de vênulas pós-capilares (marginação leucocitária), a migração das células aderentes para o exterior do vaso (diapedese), seu

deslocamento no espaço extravascular (quimiotaxia) e subsequente acúmulo no sítio da lesão²⁴.

Objetivos

Objetivo geral

Investigar as alterações microcirculatórias, pela observação direta da microcirculação mesentérica, e a evolução do processo inflamatório em ratos submetidos à morte encefálica.

Objetivos específicos

1. Avaliar parâmetros hemodinâmicos e a perfusão da microcirculação mesentérica;
2. Investigar as interações leucócito-endotélio e a expressão de moléculas de adesão nos microvasos do mesentério;
3. Quantificar marcadores sistêmicos da resposta inflamatória;
4. Avaliar as alterações histopatológicas em órgãos alvo de transplante.

Métodos

O presente estudo foi submetido à Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, protocolado sob nº SDC 3257-09/008. Os animais utilizados foram obtidos junto ao Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e os experimentos foram realizados no Laboratório de Cirurgia Cardiovascular e Fisiopatologia da Circulação (LIM-11) da faculdade supracitada.

Foram utilizados ratos *Wistar*, machos, pesando entre 250 e 350 g, com aproximadamente 10 semanas de idade, mantidos em ambiente com controle de temperatura (23 ± 2 °C), umidade e exposição à luz, com ciclo claro/escuro de 12 h, e acesso livre à alimentação e água.

Grupos Experimentais

Os animais foram divididos em dois grupos experimentais:

1. Ratos submetidos à morte encefálica (ME) através de súbito aumento da pressão intracraniana. Este grupo foi subdividido em três subgrupos: animais que foram avaliados 30 min (ME30), 180 min (ME180), ou 360 min (ME360) após a indução da morte encefálica;

2. Ratos falso-operados (FO) submetidos aos mesmos procedimentos cirúrgicos utilizados para a indução da morte encefálica, porém sem a inserção e insuflação do cateter para aumento da pressão intracraniana. Este grupo foi subdividido em três subgrupos: animais que foram avaliados 30 min (FO30), 180 min (FO180), ou 360 min (FO360) após a conclusão dos procedimentos cirúrgicos.

Anestesia e preparação cirúrgica

A anestesia foi induzida em câmara fechada com isoflurano a 5 %, seguida de intubação e ventilação mecânica através de ventilador para roedores (Harvard Apparatus, Inc., Holliston, MA, USA). O plano anestésico foi mantido com isoflurano a 2 %. A ventilação realizou-se com FiO_2 de 21 % para animais avaliados no tempo 30 min, e 100 % para os animais avaliados nos tempos 180 e 360 min, com volume corrente de 10 mL/kg e 70 ciclos/min. Os animais, colocados em decúbito dorsal, passaram por tricotomia e antisepsia da região cervical ventral, para posterior dissecação e cateterização da artéria carótida e veia jugular.

Parâmetros hemodinâmicos e gasométricos

Através de um cateter colocado na artéria carótida e 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), a pressão arterial média e a frequência cardíaca dos animais foram monitoradas ao longo dos experimentos. Amostras de sangue da artéria carótida foram coletadas para determinação dos parâmetros pH, pCO_2 , pO_2 , HCO_3^- , BE, SO_2 , Na^+ , K^+ , e lactato (Radiometer ABL 555, Radiometer Medical, Copenhagen, Denmark).

Leucograma e hematócrito

No início e fim dos experimentos, amostras, de 20 μ L de sangue, foram obtidas através de punção na cauda dos animais e, subsequentemente, diluídas em solução de Turk (1:20) para a quantificação do número total de leucócitos em câmara de Neubauer. A determinação diferencial dos leucócitos foi realizada em extensão sanguínea corada pelo método Instant Prov[®] (Newprov Produtos para Laboratórios, Pinhais, PR, Brasil). Foram contadas 100 células por lâmina, diferenciando-se os tipos celulares em linfócitos, neutrófilos, monócitos e eosinófilos. Também foram retiradas amostras de sangue da cauda dos animais para determinação do hematócrito. As amostras foram colocadas em tubos capilares e centrifugadas por 5 min em centrífuga específica.

Indução da morte encefálica

Os animais foram colocados em decúbito ventral para a realização da trepanação. Utilizando-se uma broca motorizada, foi realizada a perfuração da calota craniana para posterior inserção de um cateter Fogarty® 4 F (Edwards Lifescience LLC, Irvine, CA, USA). A indução da morte encefálica deu-se através da rápida insuflação do cateter com 500 µL de água destilada, sendo confirmada através da observação de pico hipertensivo, ausência de reflexo corneano e midríase bilateral fixa. Após a indução da morte encefálica, a anestesia foi suspensa e os animais receberam infusão contínua de solução salina 0,9 % através da veia jugular (2 mL/h). Os animais falso-operados foram submetidos à trepanação, porém sem a inserção do cateter. Esses animais não receberam infusão contínua de solução salina e o plano anestésico foi mantido ao longo de todo o tempo de avaliação.

Microscopia intravital in situ do mesentério

A avaliação da microcirculação mesentérica, por técnica de microscopia intravital, foi realizada de acordo com estudos anteriores^{25, 26} 30 ou 180 min após os procedimentos cirúrgicos. Os ratos foram colocados em decúbito dorsal e uma incisão cutânea e muscular no flanco direito foi realizada para a exteriorização do leito vascular mesentérico e observação da microcirculação. Em seguida, os animais foram mantidos em decúbito lateral direito sobre uma placa aquecida a 37 °C e a preparação foi mantida úmida e aquecida por

superfusão com a solução de Krebs-Henseleit (pH 7,2 a 7,4) com a seguinte composição (mM): 113 NaCl, 4,7 KCl, 2,5 CaCl₂.2H₂O, 25 NaHCO₃, 1,1 MgSO₄, 1,1 KH₂PO₄, 5 glicose, saturada com uma mistura de gases (N₂ 95 % e CO₂ 5 %). As interações leucócito-endotélio foram avaliadas em segmentos de vênulas pós-capilares com diâmetros entre 15 e 25 µm. O número de leucócitos que rolam em contato com o endotélio (leucócitos *rollers*) foi determinado durante 10 min de observação. Os leucócitos que permaneceram imóveis em contato com o endotélio por mais de 30 s (leucócitos aderidos) foram determinados em extensão de 100 µm da vênula. O número de leucócitos que migraram para o tecido perivascular (leucócitos migrados) foi determinado em 5.000 µm² de área. O percentual de perfusão da microcirculação mesentérica foi determinado pela quantificação de vasos (<30 µm de diâmetro) com fluxo normal, dividido pelo número total de vasos em uma área de 1,0 mm².

Expressão de moléculas de adesão na microcirculação mesentérica

Animais não avaliados pela técnica de microscopia intravital foram destinados à análise imunohistoquímica para a quantificação de moléculas de adesão celular. Após exsanguinação pela aorta abdominal, o mesentério foi removido, imerso em hexano sob nitrogênio líquido, e armazenado a -80 °C. Cortes seriados do mesentério (8 µm de espessura) foram fixados em acetona gelada por 10 min para posterior detecção de ICAM-1 e P-selectina. 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 P-selectina, foram utilizados o anticorpo monoclonal anti-ICAM-1 de rato (CD54, Seikagaku Co, Tokyo, Japan) ou o anticorpo monoclonal anti-P-selectina humana (CD62P, R&D System Inc., Minneapolis, MN, 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 h a 4 °C, os cortes foram lavados sucessivamente com PBS e, na sequência, incubados por 1 h 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), e as imagens foram analisadas pelo software Image-Pro Plus 4.1 (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA). Os resultados foram expressos em intensidade média de fluorescência.

Análises histopatológicas

Para a análise histopatológica, os animais foram exsanguinados pela aorta abdominal 30, 180, ou 360 min após a conclusão dos procedimentos cirúrgicos. Coração, pulmão, fígado e rim, foram fixados em formalina tamponada a 10 %, incluídos em parafina, e realizados cortes histológicos de

4 µm de espessura, corados com hematoxilina e eosina. As características observadas foram: congestão vascular, infiltrado leucocitário, edema e colapso alveolar. 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.

Dosagens de citocinas, quimiocinas e corticosterona séricas

Ao final dos experimentos, decorridos 30 e 180 min de observação, amostras de sangue, obtidas da aorta abdominal, foram centrifugadas a 1.500 xg por 15 min à temperatura ambiente para a separação do soro. As citocinas fator de necrose tumoral (TNF)- α , interleucina (IL)-1 β , IL-6 e IL-10, e as quimiocinas CINC (*cytokine-induced neutrophil chemoattractant*)-1 e CINC-2, análogas a IL-8 humana, foram quantificadas por enzima-imunoensaio (ELISA) utilizando-se o *kit Duo-set* (R&D Systems). Da mesma forma, a determinação da concentração sérica de corticosterona foi realizada por ELISA, utilizando-se o *Corticosterone EIA Kit* (Cayman Chemical Co, Ann Arbor, MI, USA).

Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o *software* SPSS para Windows, versão 17.0 (SPSS, Chicago, IL, USA). Os dados numéricos foram

considerados de distribuição normal e foram apresentados como média e erro padrão da média. Os parâmetros classificatórios da análise histológica foram apresentados em mediana e variação máxima e mínima. Os parâmetros foram comparados através do modelo de comportamento linear múltiplo, com a avaliação da influência dos fatores grupo e tempo. A análise complementar foi realizada com o emprego do teste *t* de Bonferroni. Foram considerados significativos os valores de $p < 0,05$.

Resultados

CLINICS. 2012;67(1):69-75

Efeitos paradoxais da morte encefálica e do trauma associado na microcirculação mesentérica de ratos: um estudo de microscopia intravital

A avaliação das alterações induzidas pela morte encefálica foi observada em ratos 30 e 180 min após a conclusão dos procedimentos cirúrgicos. Dados hemodinâmicos, comportamento da microcirculação mesentérica, contagens total e diferencial de leucócitos sanguíneos, e marcadores sistêmicos da resposta inflamatória foram obtidos de animais com morte encefálica e comparados com animais falso-operados. Após o súbito aumento da pressão intracraniana, pela insuflação do cateter de Fogarty[®], todos os animais apresentaram instabilidade hemodinâmica, sendo observado, inicialmente, um pico hipertensivo seguido de rápida e persistente hipotensão. Verificou-se significativa hipoperfusão mesentérica já nos primeiros 30 min após a indução da morte encefálica, mantendo-se inalterada até 180 min. O número de leucócitos migrados para o tecido perivascular no mesentério dos ratos com morte encefálica foi maior do que o observado em animais falso-operados, decorridos 180 min de conclusão dos procedimentos cirúrgicos,

coincidindo com o aumento significativo na expressão de ICAM-1 nos vasos da microcirculação mesentérica. Citocinas e quimiocinas séricas apresentaram valores semelhantes em animais de ambos os grupos nos diferentes tempos avaliados, enquanto que a dosagem de corticosterona sérica reduziu-se cerca de 70 %, 180 min após a morte encefálica. Nestes animais, o número de leucócitos totais foi menor, se comparado ao grupo falso-operado, sendo que em ambos os grupos ocorreu inversão da razão neutrófilo/linfócito.

BASIC RESEARCH

Paradoxical effects of brain death and associated trauma on rat mesenteric microcirculation: an intravital microscopic study

Rafael Simas, Paulina Sannomiya, José Walber M. C. Cruz, Cristiano de Jesus Correia, Fernando Luiz Zanoni, Maurício Kase, Laura Menegat, Isaac Azevedo Silva, Luiz Felipe P. Moreira

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Instituto do Coração (InCor), Laboratório de Cirurgia Cardiovascular e Fisiopatologia da Circulação, São Paulo/SP, Brazil.

OBJECTIVE: Experimental findings support clinical evidence that brain death impairs the viability of organs for transplantation, triggering hemodynamic, hormonal, and inflammatory responses. However, several of these events could be consequences of brain death-associated trauma. This study investigated microcirculatory alterations and systemic inflammatory markers in brain-dead rats and the influence of the associated trauma.

METHOD: Brain death was induced using intracranial balloon inflation; sham-operated rats were trepanned only. After 30 or 180 min, the mesenteric microcirculation was observed using intravital microscopy. The expression of P-selectin and ICAM-1 on the endothelium was evaluated using immunohistochemistry. The serum cytokine, chemokine, and corticosterone levels were quantified using enzyme-linked immunosorbent assays. White blood cell counts were also determined.

RESULTS: Brain death resulted in a decrease in the mesenteric perfusion to 30%, a 2.6-fold increase in the expression of ICAM-1 and leukocyte migration at the mesentery, a 70% reduction in the serum corticosterone level and pronounced leukopenia. Similar increases in the cytokine and chemokine levels were seen in the both the experimental and control animals.

CONCLUSION: The data presented in this study suggest that brain death itself induces hypoperfusion in the mesenteric microcirculation that is associated with a pronounced reduction in the endogenous corticosterone level, thereby leading to increased local inflammation and organ dysfunction. These events are paradoxically associated with induced leukopenia after brain damage.

KEYWORDS: Brain death; inflammation; Intravital microscopy; Mesenteric microcirculation.

Simas R, Sannomiya P, Cruz JWM, Correia CJ, Zanoni FL, Kase M, et al. Paradoxical effects of brain death and associated trauma on rat mesenteric microcirculation: an intravital microscopic study. *Clinics*. 2012;67(1):69-75.

Received for publication on November 10, 2011; First review completed on November 12, 2011; Accepted for publication on November 20, 2011

E-mail: biosimas@usp.br

Tel.: 55 11 3061-7178

INTRODUCTION

In most cases, organs for transplantation come from brain-dead donors, which, by itself, interferes with the viability of the donated organ(s) (1). Brain death (BD) triggers a series of hemodynamic, hormonal, and inflammatory effects that have different roles in the organs that may be transplanted (2). The systemic effects of BD include increased expression of adhesion molecules, increased leukocyte infiltration of different organs, and increased serum cytokine levels (1-3). However, it is unclear which of

these events are consequences of BD and which arise from the inflammatory processes triggered by the associated trauma. It is known that brain damage, such as stroke, can induce immunodeficiency, thereby increasing the patient's susceptibility to infection (4). This study aims to characterize the evolution of the inflammatory process in brain-dead rats via intravital microscopy of the mesenteric microcirculation and analysis of systemic markers and to compare the results with those obtained from sham-operated animals followed over time.

MATERIALS AND METHODS

Animal model

Male Wistar rats weighing 250–350 g were used and randomized into four groups: SH30 and SH180, animals operated on without BD induction that were monitored for 30 ($n=14$) or 180 minutes ($n=15$), respectively; and BD30 and BD180, which were animals in which BD was induced

Copyright © 2012 CLINICS – This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

No potential conflict of interest was reported.

and that were monitored for 30 ($n=17$) or 180 minutes ($n=15$), respectively. The animals were evaluated at 30 minutes to determine which features were triggered by the BD itself and at 180 min to follow the evolution of the processes. The experimental protocols were approved by the Animal Subject Committee of the Heart Institute (InCor) of the Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Rats were anesthetized in a chamber with 5% isoflurane, intubated, and ventilated with a rodent ventilator (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) with a tidal volume of 10 ml/kg and a frequency of 70 breaths/min. Sedation of the animals was maintained via continual inhalation of 2% isoflurane. The carotid artery was cannulated for continuous blood pressure monitoring and blood sampling. The jugular vein was cannulated for infusion of saline solution.

Brain death model

A Fogarty-4F catheter (Baxter Health Care, Deerfield, IL, USA) was placed into the intracranial cavity of rats in the BD groups through a drilled parietal burr hole. The balloon catheter was rapidly inflated with 0.5 ml of saline, and the intracranial pressure increased until BD was confirmed via maximal pupil dilatation, apnea, an absence of reflexes, and a drop of the mean arterial pressure (MAP). Anesthesia was stopped after the induction of BD. In the sham group, animals underwent surgery, and the trepanation was performed, but the catheter was not placed into the intracranial cavity. Anesthesia was maintained throughout the experiment for the animals in the sham groups. Brain-dead rats received an infusion of saline solution (2 ml/h) through the jugular vein to minimize dehydration.

Blood gases, electrolyte and lactate levels, hematocrit, and white blood cell counts

Blood gases and electrolyte and lactate levels were measured using blood samples obtained from the carotid artery at baseline (0 min) and 30 or 180 min after the surgical procedures using a gas analyzer (Radiometer ABL 555, Radiometer Medical, Copenhagen, Denmark). The hematocrit and white blood cell counts were determined using blood samples obtained from the cut tip of the tail vein at the same time points. The hematocrit was measured using microcapillary tube centrifugation. Total white blood cell counts were determined using a Neubauer chamber. Differential cell counts were performed on stained films that were visualized using oil immersion microscopy. A total of 100 cells were counted and classified on the basis of normal morphological criteria.

Intravital microscopy of the mesenteric microcirculation

Intravital microscopy of the mesenteric microcirculation was performed as previously described (5). After 30 or 180 minutes, an abdominal midline incision was performed, and the distal ileum and its accompanying mesentery were exposed for *in vivo* microscopic examination of the microcirculation. The animals were maintained on a specially designed stage warmed with circulating water maintained at 37°C. The stage had a transparent platform on which the tissue to be transilluminated was placed. The mesentery was continuously perfused throughout the study period with a warmed (37°C) Krebs-Henseleit solution (113 mmol/l NaCl,

4.7 mmol/l KCl, 2.5 mmol/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 25 mmol/l NaHCO_3 , 1.1 mmol/l MgSO_4 , 1.1 mmol/l KH_2PO_4 , 5 mmol/l glucose, pH 7.2–7.4) that was saturated with a mixture of gases (95% N_2 and 5% CO_2). A color camera (AxioCam HSc, Carl Zeiss, München-Hallbergmos, Germany) was coupled onto a triocular microscope (Axioplan 2, Carl Zeiss), and the microcirculatory variables were analyzed using the Axiovision 4.1 imaging software (Carl Zeiss). The vascular density was analyzed using a 10× light microscopic objective and a 1 mm² area on the computer screen. The type of flow was defined as continuous or intermittent/absent. Vessels were separated into large and small vessels using a cutoff diameter value of 30 μm. Five fields were selected for each animal. To evaluate leukocyte-endothelial interactions, three post-capillary venules, with diameters ranging from 15 to 25 μm, were selected for each animal. The number of rolling leukocytes is presented as the mean number of white blood cells passing a designated line perpendicular to the venular axis per 10 min. The rolling velocity in each vessel was determined as the average velocity of 10 leukocytes that traveled a defined distance in the microvessel. Adherent cells (i.e., leukocytes that remained stationary for more than 30 seconds on the venular endothelium) were counted during a 10-min period in a 100-μm segment of the vessel. The number of leukocytes accumulating in the connective tissue adjacent to the chosen post-capillary venule was determined in a standard area of 5,000 μm².

Immunohistochemistry for P-selectin and ICAM-1

Animals were exsanguinated from the abdominal aorta, and the mesentery was removed, immersed in hexane, and frozen with liquid nitrogen. Serial slices of the mesentery (8 μm) were placed onto glass slides, which were previously coated with organosilane (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA). The samples were fixed in acetone for the immunodetection of both intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 and P-Selectin on the mesenteric microvessels. SuperBlock buffer (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) was used to block non-specific sites. The tissue sections were incubated overnight at 4°C with a biotin-conjugated anti-rat ICAM-1 (CD54) monoclonal antibody (Seikagaku, Tokyo, Japan) or a biotin-conjugated anti-P-selectin monoclonal antibody (CD62P, R&D System, Minneapolis, MN, USA). Both antibodies were diluted 1:50 in phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.3% Tween 20. After washing the slides with PBS, the sections were incubated for 1 h at room temperature with streptavidin-conjugated fluorescein (Amersham Pharmacia Biotech, London, UK) diluted 1:200. After washing the slides with PBS, the samples were treated with Vectashield mounting medium containing propidium iodide (Vector, Burlingame, CA, USA) to preserve the fluorescence. Negative-control samples were incubated with PBS instead of the primary antibody. The system used for image acquisition included a CoolSNAP-Pro Color digital camera (Nikon, Tokyo, Japan) coupled to a triocular fluorescence microscope (Nikon). All images were acquired using Image-Pro Plus software, version 4.1 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). The results are presented as the mean fluorescence intensity.

Serum concentrations of cytokines, chemokines and corticosterone

Blood samples were obtained from the carotid artery of brain-dead rats and sham-treated rats 30 or 180 minutes after the surgical procedures were performed. After

centrifugation (1500×g, 25°C), the serum concentration of tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-10, cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC)-1, CINC-2 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), and corticosterone (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) was determined using enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA), as recommended by the manufacturer.

Statistical analysis

All data are presented as the mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). The overall group differences were compared using a multivariate general linear model with group and time as the factors with a *post hoc* Bonferroni test. A *p*-value of less than 0.05 was considered to be significant. All statistical analyses were performed using SPSS for Windows, version 17.0 (SPSS, Chicago, IL, USA).

RESULTS

Hemodynamic parameters, arterial blood gases, electrolyte and lactate levels, and hematocrits

The induction of BD was associated with a sudden increase in the MAP over the first minute following catheter inflation. This increase was followed by a decrease in the MAP below the baseline level and a subsequent increase to a normal level after one hour. In the SH rats, no differences were observed in the MAP over time (Figure 1). There were no differences in the heart rate between the groups. No differences were observed in the arterial blood gases and electrolyte, lactate and hematocrit values between the BD and SH groups at baseline, 30 min, and 180 min after the surgical procedures (data not shown).

Mesenteric microcirculatory variables

Microvascular perfusion was evaluated 30 and 180 min after brain death. There was a prompt interruption in the perfusion of mesenteric microvessels measuring less than

30 μ m in diameter. The average proportion of perfused small vessels in BD rats was 30% compared to 76% in SH rats. The results are summarized in Table 1. Representative photomicrographs of mesenteric microvessels are shown in Figure 2. To evaluate leukocyte-endothelial interactions in the perfused small vessels, the rolling leukocyte velocity and the number of rolling, adhered and migrated cells were determined 30 and 180 min after the surgical procedures. There were no differences in the rolling leukocyte velocity between BD and SH rats after 30 or 180 min. However, the number of rolling leukocytes in BD rats was significantly reduced 30 min (50%) and 180 min (73%) after surgery compared with the number in SH rats (Table 1). The adhesion of leukocytes to the endothelium was significantly reduced in BD rats only after 180 min. However, despite this reduction, BD rats exhibited an increased number of migrated cells compared with SH rats. This result was accompanied by a pronounced leukopenia, as demonstrated by the blood leukocyte count in BD rats after 180 min. Compared with the 30-min time point, the neutrophil/lymphocyte ratio was significantly increased in both the BD and SH groups at 180 min.

Expression of P-selectin and ICAM-1

As seen in Figure 3A, the expression of P-selectin on the mesenteric microvessels increased above the baseline reference values at 30 min and 180 min; no differences in the expression levels were seen comparing BD and SH rats. In contrast, ICAM-1 expression in the microvessels was significantly increased (2.6-fold) in BD rats compared with SH rats at the 180-min time point (Figure 3C). Representative photomicrographs of the staining for P-selectin and ICAM-1 on the mesenteric microvessels of BD and SH rats are shown in Figures 3B and 3D.

Serum cytokine and chemokine levels

Similar increases were observed in the serum concentrations of TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, CINC-1, and CINC-2 in

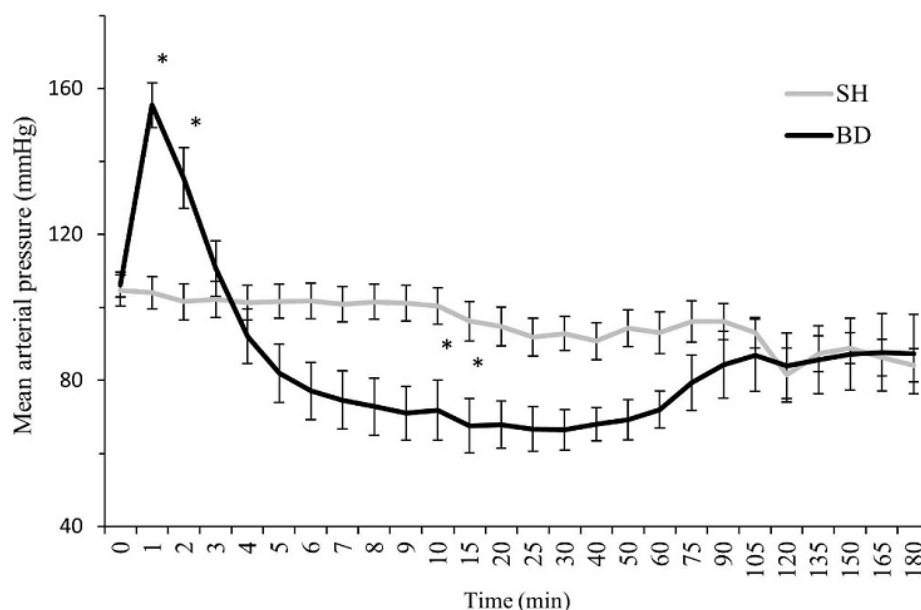


Figure 1 - Mean arterial pressure of brain-dead (BD, *n* = 12) and sham-operated (SH, *n* = 12) rats 180 minutes after the surgical procedure. The animals were monitored over time. The data are presented as the mean $\pm$ SEM. **p* < 0.05 vs. SH.

Table 1 - Intravital microscopy of the rat mesenteric microcirculation.

	BD30	SH30	BD180	SH180	<i>p</i> _{ANOVA}
Perfused Small Vessels (%)	30.2 ± 0.06 [‡]	77.9 ± 0.07	27.9 ± 0.07 [‡]	74.3 ± 0.06	<0.0001
Rolling Leukocytes (10 min)	89 ± 8*	178 ± 24	87 ± 8 [†]	329 ± 24	<0.0001
Rolling Leukocyte Velocity (µm/s)	22.4 ± 2.2	25.9 ± 3.4	33.5 ± 4.6	40.2 ± 8.3	0.40
Adhered Leukocytes (100 µm venule length)	2.2 ± 0.3	2.2 ± 0.5	3.7 ± 1.0*	7.5 ± 0.5	0.06
Migrated Leukocytes (5,000 µm ²)	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.3	2.3 ± 0.3**	1.3 ± 0.3	0.03
Blood Leukocyte Count (mm ³)	6.150 ± 459	8.950 ± 1.074	8.157 ± 866*	11.771 ± 1.122	0.01
Neutrophil/Lymphocyte Ratio	0.17 ± 0.02	0.54 ± 0.17	1.77 ± 0.37 [#]	2.31 ± 0.36 [§]	<0.0001

Brain-dead (BD) and sham-operated (SH) rats were analyzed 30 and 180 minutes after the surgical procedures. The data are presented as the mean ± SEM for 8–12 rats/group.

**p* < 0.05

***p* < 0.01

[†]*p* < 0.001

[‡]*p* < 0.0001, comparing the BD and SH groups at the same time point.

[#]*p* < 0.05 vs. BD30.

[§]*p* < 0.01 vs. SH30.

both the BD and SH groups at 30 min and 180 min after the surgical procedures. The reference values obtained from normal rats were below the limit of detection for the assay. The results are summarized in Table 2.

Serum corticosterone level

Both BD and SH rats exhibited similar increases in the serum corticosterone level at the 30-min time point, as observed in Figure 4. In contrast, the serum corticosterone level in BD rats was reduced to 30% of the value seen in SH rats at the 180-min time point.

DISCUSSION

Numerous studies have been performed to evaluate the role of BD in graft outcomes in both experimental and clinical studies. In acute evaluations of human BD, catecholamine levels were above normal values immediately after the BD event and remained higher after several hours, with increased inflammatory responses and apoptosis being observed in different organ samples (1,6,7). In a rodent model of heart transplantation, a longer duration of BD leads to increased leukocyte infiltration and expression

of adhesion molecules on the endothelial cells of the transplanted graft, thereby resulting in accelerated acute rejection (8). Experimental studies performed in rats also show that prolonged periods of BD result in more extensive damage to the kidneys (9).

The data presented in this study indicate that BD induces an immediate organ hypoperfusion and an increase in the local inflammatory response that is associated with a reduction in the serum corticosterone level and leukopenia. Some of the observed inflammatory events are triggered by BD-associated trauma.

Such factors as polytrauma, hypoxia, and intracranial bleeding can influence the course of the inflammatory process triggered by BD in different organs (1,2). To evaluate the role of BD-associated trauma, matching sham-operated rats were assessed over time. As described previously, BD leads to an increase in the MAP followed by hypotension (6,10), both of which compromise organ perfusion (11). Our study demonstrates that BD-associated trauma did not influence hemodynamic and perfusion parameters, suggesting that all of the observed changes in MAP and mesenteric hypoperfusion were triggered by the BD itself.

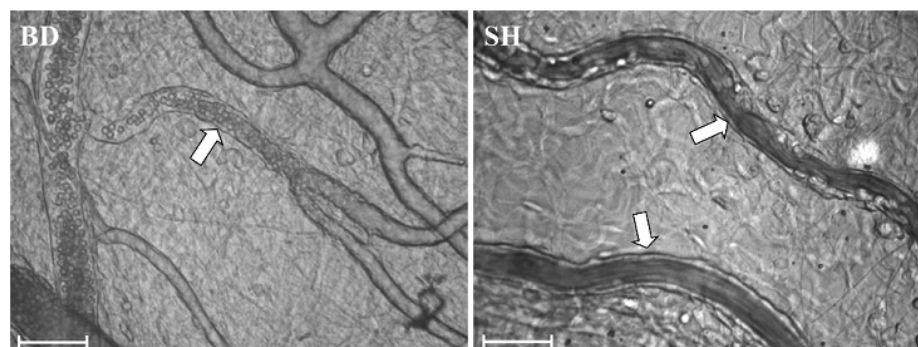


Figure 2 - Photomicrographs of rat mesenteric microvessels. The arrows indicate post-capillary venules in brain-dead (BD) and sham-operated (SH) animals. Bar = 50 µm.

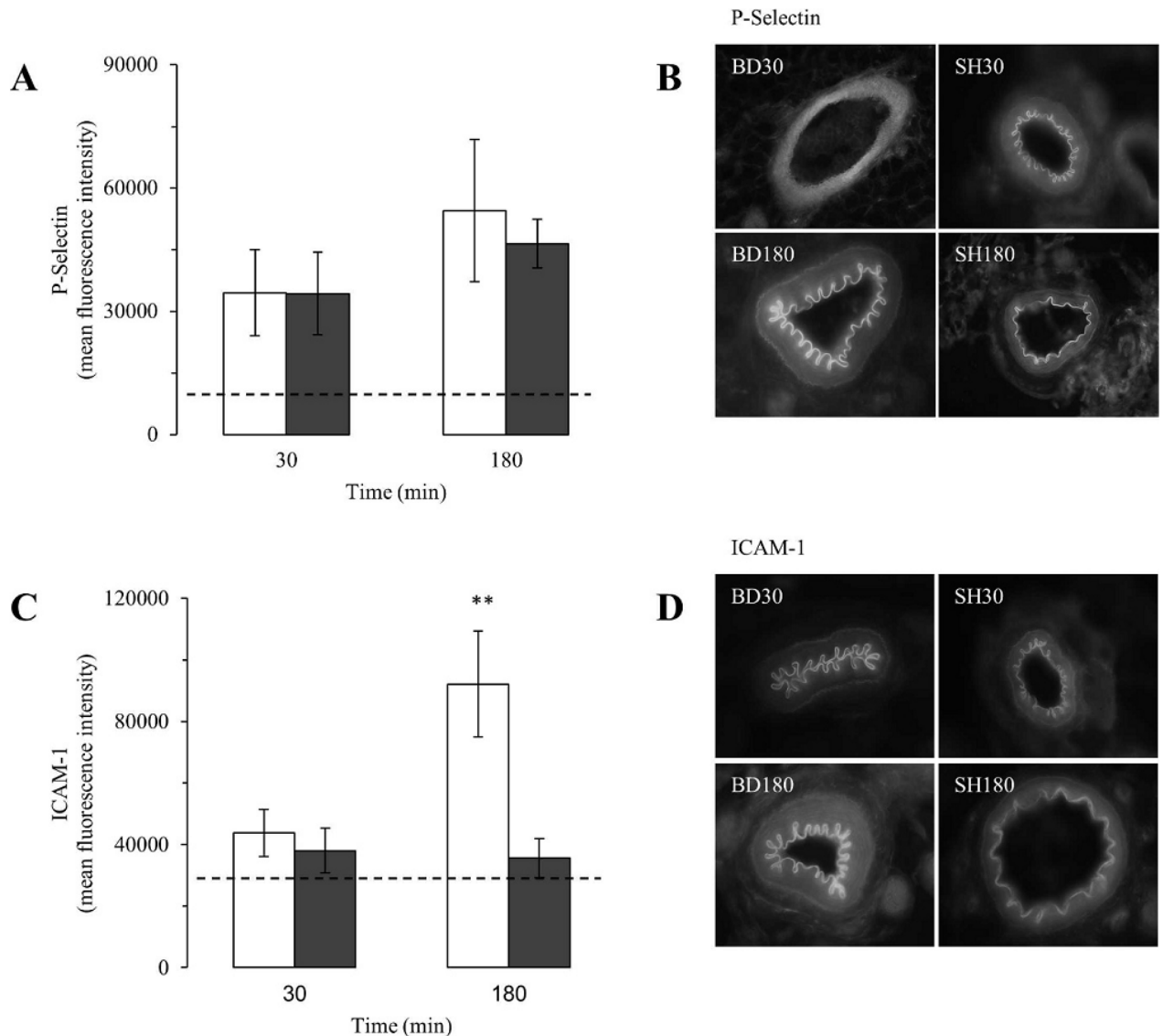


Figure 3 - Expression levels of P-selectin (A and B) and ICAM-1 (C and D) in the mesenteric microvessels in brain-dead (BD, white columns) and sham-operated (SH, gray columns) rats 30 and 180 min after the surgical procedure. The values are presented as the mean $\pm$ SEM for nine samples/rat, three rats/group. The dashed lines indicate the basal values. ANOVA P-selectin $p=0.43$; ICAM-1 $p=0.003$. ** $p<0.01$ vs. SH at the same time point.

Intravital microscopy has been used to assess microcirculation in experimental models, but few studies have used this technique following BD (11,12). In this study, intravital

microscopy was used to evaluate mesenteric perfusion and leukocyte-endothelial interactions in post-capillary venules of BD and SH rats.

Table 2 - Enzyme-linked immunosorbent assay of serum cytokines and chemokines.

	SH30	BD30	SH180	BD180	<i>P</i> ANOVA
TNF- α (pg/mL)	114.5 $\pm$ 22.5	152.3 $\pm$ 36.5	48.7 $\pm$ 12.2	46.6 $\pm$ 13.4	0.45
IL-1 β (pg/mL)	240.7 $\pm$ 21.7	252.4 $\pm$ 22.8	232.4 $\pm$ 19.5	256.5 $\pm$ 22.0	0.41
IL-6 (pg/mL)	165.3 $\pm$ 17.3	239.9 $\pm$ 39.5	272.3 $\pm$ 55.8	295.6 $\pm$ 61.9	0.29
IL-10 (pg/mL)	717.6 $\pm$ 87.9	914.9 $\pm$ 69.4	350.7 $\pm$ 22.7	338.8 $\pm$ 42.1	0.12
CINC-1 (pg/mL)	430.0 $\pm$ 95.5	519.8 $\pm$ 87.4	408.1 $\pm$ 70.8	496.2 $\pm$ 48.9	0.25
CINC-2 (pg/mL)	62.3 $\pm$ 15.6	51.2 $\pm$ 7.9	54.4 $\pm$ 8.1	88.3 $\pm$ 27.6	0.49

Brain-dead (BD) and sham-operated (SH) rats were evaluated 30 and 180 min after the surgical procedures. The data are presented as the mean $\pm$ SEM for 10 rats/group. The reference values obtained from normal rats were below the limit of detection for the assay.

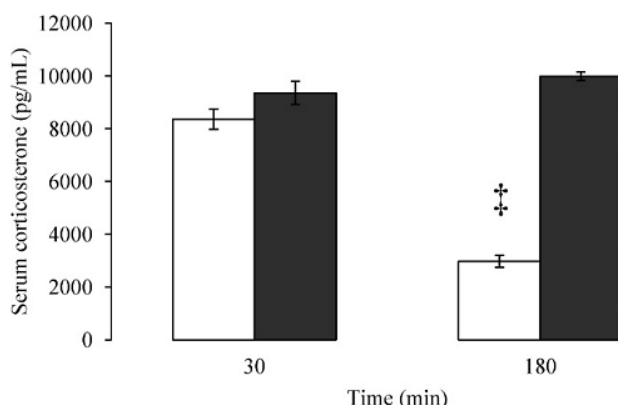


Figure 4 - Enzyme-linked immunosorbent assay for the serum corticosterone level in brain-dead (white columns) and sham-operated (gray columns) rats 30 and 180 minutes after the surgical procedure. The data are presented as the mean $\pm$ SEM for 10 rats/group. ANOVA $p < 0.0001$. † $p < 0.0001$ vs. SH at the same time point.

These data indicate that the proportion of perfused small vessels ($<30 \mu\text{m}$ diameter) was promptly reduced to 30% in the BD rats, whereas perfusion was maintained in the SH rats. As both groups of animals were trepanned, this result suggests that the hypoperfusion of the mesenteric microcirculation was triggered by the BD itself. Decreased organ perfusion following BD has been previously demonstrated. Obermeier et al. (11) described a decrease in the functional capillary density in the pancreatic microcirculation after BD induction in rats using intravital epifluorescence microscopy. In another study, BD induced the deterioration of the rat hepatic microcirculation, including a reduced sinusoidal perfusion rate and sinusoidal diameter (13).

It has been demonstrated that decreased organ perfusion and a progressive inflammatory activation of endothelial cells and leukocytes are observed after BD (9,14-16). In this study, BD rats exhibited a decreased number of rolling leukocytes in the mesenteric microvessels compared to SH rats; however, this reduction was unrelated to the velocity of rolling leukocytes. Both groups of animals presented increases in the number of adherent and migrated leukocytes over time and increased neutrophil/lymphocyte ratios, despite the fact that leukopenia is present in BD rats. In contrast, relative to SH rats, the migration of leukocytes to the perivascular tissue was significantly increased in BD rats after 3 h. These experimental findings agree with the clinical evidence demonstrating that cerebral injury not only leads to brain tissue damage and subsequent local inflammation but also to alterations of the peripheral immune system. It has been demonstrated that stroke induces a rapid lymphocytopenia that is attributed to the apoptosis resulting from the storm of catecholamines and steroids that are immediately released after cerebral ischemia (4,17).

Specific adhesion glycoproteins expressed on the surfaces of leukocytes and endothelial cells play important roles in leukocyte accumulation in a tissue (11,12). Members of the selectin family of cell adhesion molecules are thought to mediate leukocyte rolling along the walls of the microvasculature (18,19). Glycoproteins in the CD11/CD18 complex (β_2 -integrins) expressed on leukocytes interact with ligands, such as ICAM-1, on endothelial cells to

mediate leukocyte adhesion and emigration (20,21). It has been shown that BD enhances the expression of P-selectin (13), and ICAM-1 in the liver (13-15), kidney (9), and lungs (16). The data presented here demonstrated that the expression of P-selectin on mesenteric microvessels increased at 30 min with no further increase at the 180-min time point. However, there were no significant differences between the BD and SH rats. In contrast, ICAM-1 was upregulated in BD rats at 180 min compared to SH rats, indicating that it was responsible for the leukocyte migration to the perivascular tissue.

The capacity of leukocytes to interact with the endothelium depends on the activation of endothelial cells by cytokines, such as TNF- α and IL-1 β . This activation results in the upregulation or de novo synthesis of a variety of chemokines and adhesion molecules, including ICAM-1 (22,23). Studies investigating the relationship between BD and the activation of peripheral organs have demonstrated that cytokines act as signaling molecules during the inflammatory process (1). However, the data presented in this study demonstrates that similar increases in the systemic levels of cytokines (e.g., TNF- α , IL-1 β , IL-6, and IL-10) and chemokines (e.g., CINC-1 and -2, analogs of the IL-8 family in humans) were observed in both BD and SH rats.

The host response to inflammation is the result of several processes that occur both locally at the site of injury and systemically. Whereas some parameters of the inflammatory process triggered by BD, including cytokine release, expression of the endothelial adhesion molecule P-selectin and mobilization of neutrophils, were present in the BD and SH rats in this study, the expression of ICAM-1 and neutrophil migration increased in the BD rats only. It is known that BD impairs the endocrine system and decreases the release of hormones, such as triiodothyronine (T3), thyroxine (T4), cortisol, and antidiuretic hormone, thereby suggesting an interruption along the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (24,25). Interactions among the central nervous system, the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, and components of the innate and adaptive immune system play key roles in the regulation of inflammation (26). Endogenous glucocorticoids, which are secreted in larger amounts at the early stages of an inflammatory reaction, are thought to regulate the initiation and subsequent course of the inflammatory reaction (27). The functions of almost all cellular components of the microcirculation associated with an inflammatory response, including vascular permeability, adhesion molecule expression, and leukocyte extravasation, are affected by glucocorticoids (28). In this regard, the increased levels of ICAM-1 on the mesenteric microvessels of BD rats were associated with a pronounced reduction in the serum corticosterone level. Indeed, dexamethasone reduces the IL-1 β -induced expression of ICAM-1 in the rat mesenteric microvascular bed (29). In addition, the treatment of mice with dexamethasone abolished ICAM-1 induction in intestinal vascular beds during endotoxemia (30).

In conclusion, the data presented in this study suggest that BD itself induces hypoperfusion of the mesenteric microcirculation that is associated with a pronounced reduction in the endogenous corticosterone level, thereby leading to increased local inflammation and organ dysfunction. These events are paradoxically associated with induced leukopenia after brain damage. These data need

to be investigated through further studies, including longer observation times after BD induction.

Funding sources: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Simas R performed the study and wrote the paper. Sannomiya P analyzed the data and wrote the paper. Cruz JWMC provided support with the intravital microscopy and immunohistochemistry. Correia CJ provided surgical support. Zanon FL provided support with the enzyme-linked immunosorbent assays. Kase M provided support with the immunohistochemistry. Menegat L provided support with the white blood cell count determination. Silva IA wrote the paper. Moreira LFP analyzed the data and wrote the paper.

REFERENCES

- Barklin A. Systemic inflammation in the brain-dead organ donor. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2009;53:425-35, doi: 10.1111/j.1399-6576.2008.01879.x.
- Domínguez-Roldán JM, García-Alfaro C, Jimenez-González PI, Hernández-Hazañas F, Castillo MLG, Guerrero JJE. Brain death: reperfusion on the organs and tissues. *Med Intensiva.* 2009;33:434-41, doi: 10.1016/j.medint.2009.03.008.
- Catania A, Lonatti C, Sordi A, Gatti S. Detrimental consequences of brain injury on peripheral cells. *Brain Behav Immun.* 2009;23:877-84, doi: 10.1016/j.bbi.2009.04.006.
- Prass K, Meisel C, Höflich C, Braun J, Halle E, Wolf T, et al. Stroke-induced immunodeficiency promotes spontaneous bacterial infection and is mediated by sympathetic activation reversal by poststroke T helper cell type 1-like immunostimulation. *J Exp Med.* 2003;198:725-36, doi: 10.1084/jem.20021098.
- Nakagawa NK, Nogueira RA, Correia CJ, Shiwa SR, Cruz JWC, Poli de Figueiredo LF, et al. Leukocyte-endothelium interactions after hemorrhagic shock/reperfusion and cecal ligation/puncture: an intravital microscopic study in rat mesentery. *Shock.* 2006;26:180-6, doi: 10.1097/01.shk.0000223133.10254.82.
- Barklin A, Larsson A, Vestergaard C, Koefoed-Nielsen J, Bach A, Nyboe R, et al. Does brain death induce a pro-inflammatory response at the organ level in a porcine model? *Acta Anaesthesiol Scand.* 2008;52:621-7, doi: 10.1111/j.1399-6576.2008.01607.x.
- López SP, Hernández JO, Moreno NV, Augusto ED, Menéndez FA, González AA. Brain Death Effects on Catecholamine Levels and Subsequent Cardiac Damage Assessed in Organ Donors. *J Heart Lung Transplant.* 2009;28:815-20, doi: 10.1016/j.healun.2009.04.021.
- Wilhelm MJ, Pratschke J, Beato F, Taal M, Kusaka M, Hancock WW, et al. Activation of the heart by donor brain death accelerates acute rejection after transplantation. *Circulation.* 2000;102:2426-33, doi: 10.1161/01.CIR.102.19.2426.
- 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, doi: 10.1046/j.1523-1755.2003.00272.x.
- Rostron AJ, Avlonitis VS, Cork DMW, Grenade DS, Kirby JA, Dark JH. Hemodynamic resuscitation with arginine vasopressin reduces lung injury after brain death in the transplant donor. *Transplantation.* 2008;85:597-606, doi: 10.1097/TP.0b013e31816398dd.
- Obermaier R, von Dobschuetz E, Keck T, Hopp HH, Drognitz O, Schareck W, et al. Brain death impairs pancreatic microcirculation. *Am J Transplant.* 2004;4:210-5, doi: 10.1046/j.1600-6143.2003.00317.x.
- 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, doi: 10.1038/nri2156.
- 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, doi: 10.1097/01.tp.0000167723.46580.78.
- 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, doi: 10.1097/0000658-200012000-00009.
- 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, doi: 10.1159/000063074.
- 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.
- Urrea X, Cervera A, Obach V, Climent N, Planas AM, Chamorro A. Monocytes are major players in the prognosis and risk of infection after acute stroke. *Stroke.* 2009;40:1262-8, doi: 10.1161/STROKEAHA.108.532085.
- Ley K, Gaetgens P, Fennie C, Singer MS, Lasky LA, Rosen SD. Lectin-like cell adhesion molecule1 mediates leukocyte rolling in mesenteric venules in vivo. *Blood.* 1991;77:2553-5.
- Lawrence MB, Springer TA. Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell.* 1991;65:859-73, doi: 10.1016/0092-8674(91)90393-D.
- 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, doi: 10.1073/pnas.88.17.7538.
- 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.
- Collins T, Read MA, Neish AZ, Whitley MZ, Thanos D, Maniatis T. Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecule: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J.* 1995;9:899-909.
- 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;162:1648-55.
- Pratschke J, Wilhelm MJ, Kusaka M, Basker M, Cooper DK, Hancock WW, et al. Brain death and its influence on donor organ quality and outcome after transplantation. *Transplantation.* 1999;67:343-8, doi: 10.1097/00007890-199902150-00001.
- 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;19:414-418, doi: 10.1016/S1053-2498(00)00073-5.
- Webster JL, Tonelli L, Sternberg EM. Neuroendocrine regulation of immunity. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:125-63, doi: 10.1146/annurev.immunol.20.082401.104914.
- Garcia-Leme J, Farsky SP. Hormonal control of inflammatory responses. *Mediators Inflamm.* 1993;2:181-98, doi: 10.1155/S0962935193000250.
- Perretti M, Ahluwalia A. The microcirculation and inflammation: site of action for glucocorticoids. *Microcirculation.* 2000;7:147-61, doi: 10.1111/j.1549-8719.2000.tb00117.x.
- Taylor A, Tomlinson A, Salas A, Panés J, Granger DN, Flower RJ, et al. Dexamethasone inhibition of leukocyte adhesion to rat mesenteric postcapillary venules: role of intercellular adhesion molecule 1 and KC. *Gut.* 1999;45:705-12, doi: 10.1136/gut.45.5.705.
- Mori N, Horie Y, Gerritsen ME, Anderson DC, Granger DN. Anti-inflammatory drugs and endothelial cell adhesion molecule expression in murine vascular beds. *Gut.* 1999;44:186-95, doi: 10.1136/gut.44.2.186.

Influência da morte encefálica e do trauma associado nas características histológicas de órgãos sólidos

Alterações hemodinâmicas e fisiopatológicas, induzidas pela morte encefálica, foram avaliadas nos tempos 30, 180 e 360 min. Coração, pulmão, fígado e rim foram analisados por dois patologistas independentes, utilizando-se um escore de intensidade das alterações observadas. Imediatamente após a indução da morte encefálica, pelo aumento repentino da pressão intracraniana, os animais apresentaram um súbito aumento da pressão arterial média, seguido de hipotensão. O coração de animais, com morte encefálica, apresentou significativo aumento na congestão vascular quando comparado ao coração de animais falso-operados. Os pulmões de animais com morte encefálica apresentaram maior escore de congestão vascular, bem como edema alveolar. Foi observado, ainda, leve infiltrado leucocitário no pulmão de animais de ambos os grupos. No fígado dos animais de ambos os grupos experimentais foi observada congestão vascular variando de leve a moderada, e leve edema intracelular. Porém, o infiltrado de leucócitos foi maior nos animais submetidos à morte encefálica. Nos rins, foi observada congestão vascular em ambos os grupos, enquanto que apenas os animais com morte encefálica apresentaram edema tubular.

Influence of brain death and associated trauma on solid organ histological characteristics¹**Influência da morte encefálica e do trauma associado nas características histológicas de órgãos sólidos****Rafael Simas^I, Diogo Haruo Kogiso^{II}, Cristiano de Jesus Correia^{III}, Luiz Fernando Ferraz da Silva^{IV}, Isaac Azevedo Silva^V, José Walber Miranda Costa Cruz^{VI}, Paulina Sannomiya^{VII}, Luiz Felipe Pinho Moreira^{VIII}**^IFellow PhD degree, Postgraduate Program on Thoracic and Cardiovascular Surgery, Medicine School, University of Sao Paulo (USP), Brazil. Interpretation of data, and manuscript writing.^{II}Graduate student, Medicine School, USP, Sao Paulo-SP, Brazil. Performed histological analyses.^{III}Biologist, Department of Cardiopneumology, InCor, Medicine School, USP, Sao Paulo-SP, Brazil. Performed surgical procedures.^{IV}MD, Assistant Professor, Department of Pathology, Medicine School, USP, Sao Paulo-SP, Brazil. Performed histological analyses.^VMD, Fellow PhD degree, Postgraduate Program on Thoracic and Cardiovascular Surgery, Medicine School, USP, Sao Paulo-SP, Brazil. Interpretation of data and manuscript writing.^{VI}PhD, Department of Cardiopneumology, InCor, Medicine School, USP, Sao Paulo-SP, Brazil. Performed surgical support.^{VII}PhD, Associated Professor, Department of Cardiopneumology, InCor, Medicine School, USP, Sao Paulo, Brazil. Study concept and design, interpretation of data, manuscript writing and critical revision.^{VIII}PhD, Associate Professor, Department of Cardiopneumology, InCor, Medicine School, USP, Sao Paulo-SP, Brazil. Study concept and design, interpretation of data, statistical analyses, manuscript writing and critical revision.**ABSTRACT****PURPOSE:** To evaluate histopathological alterations triggered by brain death and associated trauma on different solid organs in rats.**METHODS:** Male Wistar rats (n=37) were anesthetized with isoflurane, intubated and mechanically ventilated. A trepanation was performed and a balloon catheter inserted into intracranial cavity and rapidly inflated with saline to induce brain death. After induction, rats were monitored for 30, 180, and 360 min for hemodynamic parameters and exsanguinated from abdominal aorta. Heart, lung, liver, and kidney were removed and fixed in paraffin to evaluation of histological alterations (H&E). Sham-operated rats were trepanned only and used as control group.**RESULTS:** Brain dead rats showed a hemodynamic instability with hypertensive episode in the first minute after the induction followed by hypotension for approximately 1 h. Histological analyses showed that brain death induces vascular congestion in heart (p<0.05), and lung (p<0.05); lung alveolar edema (p=0.001), kidney tubular edema (p<0.05); and leukocyte infiltration in liver (p<0.05).**CONCLUSIONS:** Brain death induces hemodynamic instability associated with vascular changes in solid organs and compromises most severely the lungs. However, brain death associated trauma triggers important pathophysiological alterations in these organs.**Key words:** Brain Death. Craniocerebral Trauma. Pathology. Rats.**RESUMO****OBJETIVO:** Avaliar as alterações histopatológicas desencadeadas pela morte encefálica e pelo trauma associado em diferentes órgãos sólidos em ratos.**MÉTODOS:** Ratos Wistar machos (n=37) foram anestesiados com isoflurano, entubados e mecanicamente ventilados. Foi realizada trepanação e um cateter foi inserido na cavidade intracraniana e insuflado rapidamente para induzir morte encefálica. Após a indução, os ratos foram monitorados por 30, 180 e 360 min para parâmetros hemodinâmicos e exsanguinados pela aorta abdominal. Coração, pulmão, fígado e rim foram removidos e fixados em parafina para avaliação de alterações histológicas (H&E). Ratos falso-operados foram apenas trepanados e usados como grupo controle.**RESULTADOS:** Ratos com morte encefálica apresentaram instabilidade hemodinâmica com episódio hipertensivo no primeiro minuto após a indução seguido de hipotensão por aproximadamente 1 hora. Análises histológicas demonstraram que a morte encefálica induz congestão vascular no coração (p<0,05) e pulmão (p<0,05); edema alveolar (p=0,001); edema tubular (p<0,05); e infiltrado leucocitário no fígado (p<0,05).**CONCLUSÕES:** A morte encefálica induz instabilidade hemodinâmica associada com mudanças vasculares em órgãos sólidos e compromete mais severamente os pulmões. Contudo, o trauma associado à morte encefálica desencadeia importantes alterações fisiopatológicas naqueles órgãos.**Descritores:** Morte Encefálica. Traumatismos Craniocerebrais. Patologia. Ratos.

Introduction

Brain death (BD) means cessation of all metabolic pathways in central nervous system, but paradoxically, since it installs, a lot of events are triggered on the whole organism and many pathophysiological changes may be seen in different organs¹. As BD patients are the most important source of allografts for transplantation and the scarcity of donors is an increasing problem in the whole world², understanding these alterations will contribute to improving management, optimizing outcomes and providing organs that, without treatment, would be unsuitable for transplantation.

The pathophysiological changes that occur during and after BD include hemodynamic, hormonal and inflammatory events. Moreover, vasoconstriction triggered by catecholamine storm leads to peripheral ischemia impairing the organs perfusion. However, many factors associated with BD which occur before it, such as multi-trauma, hemorrhage and hypoxia can trigger different pathophysiological responses in the organs³⁻⁵.

The present study aims to differentiate the features triggered by BD itself on the principal solid organs commonly used for transplantation in a rodent model, comparing them with sham-operated animals submitted to the same time points of observation.

Methods

Male Wistar rats weighing 250-350g (n=37) were used and randomized into 6 groups: sham-operated rats monitored for 30 (SH30, n=7), 180 (SH180, n=6), and 360 min (SH360, n=5); brain-dead rats monitored for 30 (BD30, n=7), 180 (BD180, n=7), and 360 min (BD360, n=5). The animals were maintained at 23°C $\pm$ 2°C under a cycle of 12 h light/12h darkness and allowed access to food and water *ad libitum* before the experimental procedure. The experimental protocols were approved by the Animal Subject Committee of the Heart Institute (InCor) of the São Paulo University Medical School.

Rats were anesthetized in a chamber with 5% isoflurane, intubated and ventilated with a rodent ventilator (Harvard Apparatus, model 683, USA) with tidal volume of 10 mL/kg, and frequency of 70 breaths/min. The animals were maintained with continuous inhalation of 2% isoflurane. The carotid artery was cannulated for continuous blood pressure monitoring and blood sampling. The jugular vein was cannulated for infusion of saline solution.

Brain death model

Brain death was induced by rapid inflation of a catheter Fogarty-4F (Baxter Health Care Co., USA) with 500 μ L of saline solution, through a drilled parietal burr hole. BD was confirmed by maximal pupil dilatation, apnea, absence of reflex, and drop of mean arterial pressure (MAP). After BD induction the anesthesia was stopped. Sham-operated animals were trepanned only, with no catheter insertion, and the anesthesia was maintained throughout the experiment. BD rats received an infusion of saline solution (2mL/h) through the jugular vein to minimize dehydration.

Histopathological analyses

After 30, 180, or 360 min, animals were exsanguinated from the abdominal aorta, and heart, lung, liver and kidneys were removed, fixed in formalin, and paraffin embedded. Samples were cut into 4 μ m sections, and stained with hematoxylin and eosin (H&E). The following features were evaluated: vascular congestion, leukocyte infiltration, edema, and alveolar collapse. Analyses were performed by two researchers and the score used to measure the intensity of tissue alterations was 0, 1, 2, 3 (absent, slight, moderate, and intense, respectively).

Statistical analyses

All data are presented as median and upper/lower limits. The overall group differences were compared using a multivariate general linear model with group and time as the factors with a post hoc Bonferroni test. A p-value of less than 0.05 was considered to be significant. All statistical analyses were performed using SPSS for Windows, version 17.0 (SPSS, Chicago, IL, USA).

Results

Hemodynamic parameters

All rats submitted to BD induction showed an immediate increase of the mean arterial blood pressure (MAP) in the first minute after catheter inflation, followed by a decrease in that parameter below baseline for approximately 1h (Figure 1). In sham-operated rats no differences were observed in the MAP. There were no significant differences in heart rate between groups. Moreover, no differences were observed in the arterial blood gases, electrolytes, lactate and hematocrit values in among groups (data not shown).

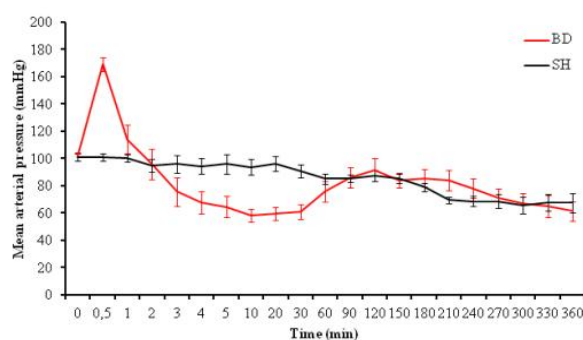


FIGURE 1 - Mean arterial pressure of brain-dead (BD) and sham-operated (SH) rats 360 min after surgical procedures. The animals were monitored over time. The data are presented as the mean $\pm$ SEM.

Histopathological evaluation

All histological parameters evaluated are presented in Table 1. BD rats presented higher level of myocardial vascular congestion at 30, 180, and 360 min compared with sham-operated rats. However, no more significant alterations were observed in this organ after BD induction (Figure 2).

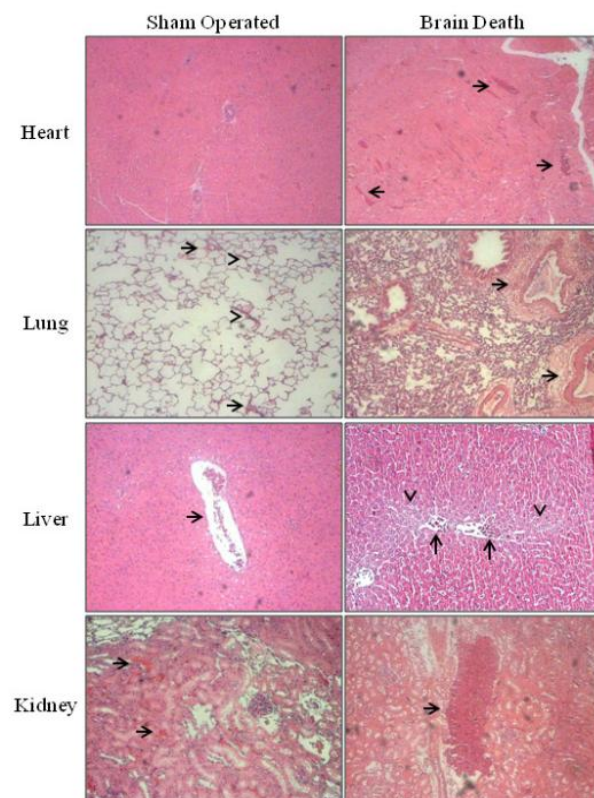


FIGURE 2 - Microphotographs of heart, lung, liver, and kidney from brain-dead (BD) and sham-operated (SH) rats. Arrows indicate vascular congestion in heart (BD), liver (BD and SH), and kidney (BD and SH). Lungs from SH rats presented vascular congestion (arrows) and alveolar thickening (arrowheads). Arrows in BD lungs indicate vascular congestion with leukocyte infiltration. In liver arrowheads indicate leukocyte infiltration (original magnification x400).

TABLE 1 - Histological injury scores.

		Brain Death			Sham-operated			Group p value
		30 min	180 min	360 min	30 min	180 min	360 min	
Heart	Vascular Congestion	1 (2-0)	1 (2-0)	1 (2-1)	0 (1-0)	0 (2-0)	0.5 (2-0)	0.020
	Vascular Congestion	2 (2-1)	1 (2-0)	2 (2-1)	0 (1-0)	1 (2-0)	1 (2-1)	0.017
Lung	Alveolar Edema	1 (3-0)	1 (3-0)	0.5 (2-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0.001
	Leukocyte Infiltration	1 (2-0)	1.5 (3-0)	1 (2-1)	1 (2-0)	1 (2-0)	1 (2-0)	0.134
	Alveolar Collapse	0 (2-0)	0 (2-0)	0 (3-0)	0 (1-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0.056
Liver	Vascular Congestion	2 (2-1)	2 (2-1)	1 (2-1)	1 (2-1)	1 (2-1)	1 (2-1)	0.111
	Intracellular Edema	1.5 (3-0)	1.5 (2-1)	1 (2-1)	1 (2-0)	0.5 (2-0)	1 (2-1)	0.067
	Leukocyte Infiltration	1 (1-0)	0.5 (1-0)	1 (2-0)	0 (0-0)	0 (1-0)	1 (1-0)	0.011
Kidney	Vascular Congestion	2 (2-1)	2 (2-1)	2 (2-1)	1 (2-1)	1 (2-1)	2 (2-1)	0.059
	Tubular Edema	0.5 (1-0)	1 (2-0)	1 (2-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	1 (2-0)	0.039

The score used to measure the intensity of tissue alterations was 0=absent; 1=slight; 2=moderate; 3=intense. Values are presented as median and upper/lower limits for 5-7 rats/group.

In the lungs, vascular congestion was observed from the first 30 min in all groups. This observation was more expressive in BD rats compared with sham-operated rats (Figure 2). Although it was observed a slight to moderate leukocyte infiltration in BD rats, this feature was not statistically different when compared with sham-operated animals (Table 1). Alveolar edema was documented only in BD rats at different time points of observation. Nevertheless, BD rats demonstrated a wide variation in the assessment of alveolar collapse, resulting in no difference when compared with sham groups (Table 1).

Animals submitted to BD show a moderate, but persistent, leukocyte infiltration in the liver, while sham-operated rats did not show this feature (Table 1). Interestingly, intracellular edema and vascular congestion were observed in BD and sham rats with no differences among groups (Figure 2).

In the kidney, BD rats presented more expressive tubular edema than sham-operated rats (Table 1). Kidneys from BD rats presented moderate vascular congestion, whereas sham-operated animals showed slight to moderate levels of this parameter, resulting in no statistical difference among groups (Figure 2).

Discussion

Many studies have been performed to evaluate the role of BD in graft outcomes. However, it remains unclear what is the role of BD-associated trauma in the organs suitable to transplantation.

Data presented herein indicate that BD induces a hypertensive episode with MAP values rising twice compared with baseline. We also observed that vascular alterations were a common issue presented in all experimental groups. However, premature and more pronounced histological alterations were observed in BD rats when compared to sham-operated rats, including heart and lung vascular congestion, lung alveolar edema, kidney tubular edema, and liver leukocyte infiltration.

Recently, our group described alterations in the mesenteric perfusion of BD rats associated with higher expression of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1, and augmentation of leukocyte migration. These findings suggest that the hypoperfusion triggered by BD, as well as leukocyte infiltration, can impair the viability of remote organs. However, the BD-associated trauma was responsible for increases in serum cytokine levels and neutrophil/lymphocyte ratio which suggest activation of the immunologic system, while these parameters were not significantly influenced by BD itself⁶.

Our findings indicate that histological alterations in the heart, although not so pronounced, seem to be associated with BD induction, as documented by a slight, but significant difference on vascular congestion. In a similar model, but using rabbits, Yeh *et al.*⁷ found many histological manifestations in the heart, including cytoplasmic clearing, loss of myofibrillar striations and contraction banding. In a model of gradual onset of brain death in rats, Wilhelm *et al.*⁸ found no morphological alterations in hearts after 6h. Comparing those both publications to our findings, some

degree of discrepancies may have occurred due to methodological differences and species particularities.

Brain death leads to damage in the lung function through hemodynamic, inflammatory, and neurohumoral mechanisms⁹. Pulmonary dysfunctions may be associated with other events not related to BD such as aspiration, pneumonia, contusion, and ventilator-induced injury. However, it is known that BD induces a neurogenic pulmonary edema, which can occur immediately after neurological insult³. In this study, BD rats showed an important alveolar edema, which was observed from 30 min after BD induction, while sham operated animals did not present edema up to three hours of mechanical ventilation. In a different model to evaluate edema, Rostron *et al.*¹⁰ found differences in the lung wet/dry weight ratio two and five hours after BD induction versus sham operated rats. On the other hand, leukocyte infiltration was similar in both conditions at different time points as demonstrated in the present study. Sham-operated rats also presented slight but persistent vascular congestion after 3 hours, although lower than that observed in BD rats. These features indicate that the trauma and the artificial conditions in which patients and animals were maintained can also compromise the lungs, worsening the quality of the organ.

Although kidney and liver transplantation may be performed from living donors, the large patient queues waiting for organ transplantation lead to acceptance of organs from BD donors¹¹. In our study, the liver of BD rats showed higher leukocyte infiltration compared with sham-operated rats. The augmentation of leukocyte migration is in accordance with van der Hoven *et al.*¹². In that study, rats submitted to BD and observed after one and six hours present an increase in adhesion molecules expression, such as VCAM-1 and ICAM-1, and leukocyte migration to the perivascular tissue. Interestingly, our data additionally showed slight to moderate vascular congestion and intracellular edema in sham-operated rats, indicating that the surgical procedures also induced impairment of the hepatic circulation and cellular damage.

In another study on kidney histology, van der Hoven *et al.*¹³ found similar results to those observed previously on liver, suggesting that BD induces a progressive immune activation with higher expression of adhesion molecules and influx of leukocytes to perivascular tissue in the kidney. However, in the present study there were no differences in kidney leukocyte migration under BD induction in comparison to sham-operated rats. Nevertheless, moderate tubular edema was observed only in the kidneys of BD groups. Interestingly, BD associated trauma induced an important vascular congestion, similarly to BD itself, also indicating that the associated trauma induces damage on the kidneys.

Conclusions

The brain death leads to hemodynamic instability and vascular changes in all solid organs. The lungs are most severely compromised under this situation due to the development of significant alveolar edema. On the other hand, brain death associated trauma seems to be also responsible for triggering important pathophysiological changes in solid organs.

References

- 1) Mascia L, Mastromauro I, Viberti S, Vincenzi M, Zanello M. Management to optimize organ procurement in brain dead donors. *Minerva Anesthesiol.* 2009;75(3):125-33.
- 2) 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.
- 3) Bugge JF. Brain death and its implications for management of the potential organ donor. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2009;53(10):1239-50.
- 4) Domínguez-Roldán JM, García-Alfaro C, Jiménez-González PI, Hernández-Hazañas F, Gascón Castillo ML, Egea Guerrero JJ. Brain death: repercussion on the organs and tissues. *Med Intensiva.* 2009;33(9):434-41.
- 5) Barklin, A. Systemic inflammation in the brain-dead organ donor. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2009;53(4):425-35.
- 6) 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.* 2012;67(1):69-75.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) Faropoulos K, Apostolakis E. Brain death and its influence on the lungs of the donor: how is it prevented? *Transplant Proc.* 2009;41(10):4114-9.
- 10) Rostron AJ, Avlonitis VS, Cork DM, Grenade DS, Kirby JA, Dark JH. Hemodynamic resuscitation with arginine vasopressin reduces lung injury after brain death in the transplant donor. *Transplantation.* 2008;85(4):597-606.
- 11) Bos EM, Leuvenink HG, van Goor H, Ploeg RJ. Kidney grafts from brain dead donors: Inferior quality or opportunity for improvement? *Kidney Int.* 2007;72(7):797-805.
- 12) van Der Hoeven JA, Ter Horst GJ, Molema G, de Vos P, Girbes AR, Postema F, Freund RL, Wiersma J, van Schilfgaarde R, Ploeg RJ. Effects of brain death and hemodynamic status on function and immunologic activation of the potential donor liver in the rat. *Ann Surg.* 2000;232(6):804-13.
- 13) van der Hoeven JA, Molema G, Ter Horst GJ, Freund RL, Wiersma J, van Schilfgaarde R, Leuvenink HG, Ploeg RJ. Relationship between duration of brain death and hemodynamic (in)stability on progressive dysfunction and increased immunologic activation of donor kidneys. *Kidney Int.* 2003;64(5):1874-82.

Simas R et al.

Correspondence:

Rafael Simas
Avenida Dr. Arnaldo, 455
01246-903 São Paulo – SP Brasil
Tel./Fax: (55 11)3061-7178
biosimas@usp.br

Conflict of interest: none

Financial source: Sao Paulo Research Foundation (FAPESP)

National Council of Scientific and Technology Development (CNPq)

¹Research performed at Laboratory of Cardiovascular Surgery and Physiopathology of Circulation (LIM-11), Heart Institute (InCor). Part of PhD thesis, Postgraduate Program on Thoracic and Cardiovascular Surgery, Medicine School, University of Sao Paulo (USP), Brazil. Tutor: Luiz Felipe Pinho Moreira.

Análise Crítica

Em nossos trabalhos, observamos que a morte encefálica determina uma rápida interrupção da perfusão no tecido mesentérico, associada com maior número de leucócitos migrados para o tecido perivascular e com aumento na expressão da molécula de adesão ICAM-1 no endotélio. O aumento na pressão intracraniana, com ruptura do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, resulta em menor concentração sérica de corticosterona nos animais com morte encefálica. Além disso, foi possível observar uma queda no número de leucócitos totais. Por sua vez, o trauma desencadeado pela trepanação dos animais foi o elemento responsável pelo aumento equivalente das concentrações séricas de citocinas e quimiocinas em ambos os grupos.

Os resultados, obtidos a partir da análise histológica, sugerem que a morte encefálica induz alterações moderadas ao longo de 6 h de observação. O comprometimento da microcirculação, observado pela congestão vascular, foi a alteração predominante nos órgãos avaliados, sendo que o coração e o pulmão apresentaram maior número de vasos congestos já nos primeiros 30 min. Além disso, nos pulmões foi observado maior edema alveolar em animais com morte encefálica do que nos animais apenas trepanados. Fígado e rim apresentaram diferenças menos expressivas na comparação entre os grupos experimentais, com destaque para um aumento do infiltrado leucocitário no fígado e maior edema tubular nos animais com morte encefálica. Todas as

alterações observadas foram desencadeadas já na primeira avaliação, isto é, 30 min após a conclusão dos procedimentos experimentais.

Inúmeros trabalhos têm sido realizados com foco nas alterações desencadeadas pela morte encefálica e sua implicação nos diferentes órgãos alvo para transplante¹¹. Contudo, muitas dúvidas ainda persistem com relação aos mecanismos envolvidos nessas alterações, bem como o papel do trauma associado à morte encefálica.

A indução da morte encefálica em modelos experimentais se dá, principalmente, pela inserção de um cateter para aumento da pressão intracraniana através de uma trepanação. Portanto, é necessário avaliar quais os efeitos desencadeados pelo trauma associado. Nos nossos trabalhos, foi possível afirmar que a perfuração do crânio dos animais desencadeou uma resposta inflamatória importante, avaliada pela liberação sistêmica de citocinas e quimiocinas e pelo aumento no número de neutrófilos na corrente sanguínea, além de congestão vascular nos rins e fígado. Tais afirmações só podem ser feitas em experimentos conduzidos em animais falso-operados, os quais foram submetidos à trepanação, quando comparados aos animais com a morte encefálica induzida.

Na literatura, alguns trabalhos comparam os resultados obtidos pela indução da morte encefálica com animais controle ou falso-operados, os quais não são avaliados em tempos equivalentes, o que dificulta a adequada avaliação da influência dos fenômenos envolvidos^{27, 28}. Além disso, é possível encontrar estudos nos quais os autores, após a realização da trepanação, inserem um cateter no espaço intracraniano de animais que não seriam

induzidos à morte encefálica^{29, 30}. Por mais que não seja insuflado, um cateter posicionado intracranialmente pode levar a alterações fisiopatológicas, uma vez que a ação mecânica do cateter pode lesionar áreas distintas do encéfalo, gerando resultados que podem se confundir com a morte encefálica. Outros trabalhos avaliam apenas animais com morte encefálica em diferentes tempos, fazendo um comparativo da evolução temporal das alterações desencadeadas pela cessação irreversível da atividade encefálica³¹⁻³³. Estes estudos acabam por negligenciar as alterações decorrentes do trauma associado à morte encefálica, o que impossibilita aferir quais resultados foram obtidos pela morte encefálica em si.

Um dos resultados mais importantes do estudo atual foi obtido através da observação direta da microcirculação mesentérica pela técnica de microscopia intravital. O evidente comprometimento do leito vascular mesentérico foi resultado de uma rápida, e persistente, hipoperfusão dos vasos com diâmetro inferior a 30 μm . Embora a avaliação do fluxo sanguíneo na microcirculação mesentérica não tenha sido realizada com o auxílio de um fluxômetro, é possível encontrar, na literatura, estudos que avaliaram a perfusão sanguínea de modo semelhante^{34, 35}. Uma vez que a morte encefálica resultou em hipoperfusão mesentérica já nos primeiros 30 min, realizamos adicionalmente experimentos com foco na evolução das alterações ocorridas. A avaliação da perfusão, no mesentério de ratos, foi realizada antes, durante e imediatamente após a indução da morte encefálica, sendo constatado que muitos vasos, com diâmetro menor do que 30 μm , apresentaram interrupção do fluxo sanguíneo já nos primeiros 10 min após a indução da morte encefálica

(dados apresentados no *Meeting of the British Microcirculation Society and The Microcirculatory Society*, Oxford, 2012).

Ainda através da técnica de microscopia intravital, foi possível avaliar as interações leucócito-endotélio, determinando-se o número de leucócitos *rollers*, aderidos e migrados, além da velocidade de rolamento dos leucócitos. É importante ressaltar que esta avaliação, nos animais com morte encefálica, se deu em área restrita da microcirculação, considerando-se o comprometimento da perfusão mesentérica observado naquela situação.

O nível de expressão de moléculas de adesão por leucócitos e células endoteliais depende da liberação/síntese de mediadores inflamatórios, além da intervenção de moduladores hormonais^{23,36}. Em nossos experimentos, foi observado que as concentrações séricas das citocinas e quimiocinas avaliadas aumentam, de modo equivalente, em ambos os grupos. Porém, somente animais com morte encefálica apresentam aumento na expressão de ICAM-1. Esse aumento se deve, em parte, à perda da regulação da inflamação devido à baixa concentração sérica de corticosterona. Glicocorticoides endógenos, como a corticosterona, modulam a resposta inflamatória regulando a permeabilidade vascular, a expressão de moléculas de adesão endoteliais e a migração leucocitária³⁷⁻³⁹.

A hipoperfusão mesentérica, de ratos submetidos à morte encefálica, coincide com as alterações histológicas observadas nos órgãos sólidos. No coração, pulmão, fígado e rim de animais com morte encefálica, foi observado um maior comprometimento vascular já nos primeiros 30 minutos, com todos os órgãos apresentando congestão vascular de leve a moderada intensidade,

que se manteve durante as 6 h de observação. Em relação à resposta inflamatória, alterações histológicas relacionadas à morte encefálica foram também documentadas nos diversos órgãos estudados, à exceção do coração.

Uma das características mais evidentes em estudos com morte encefálica é a ocorrência da instabilidade hemodinâmica associada à tempestade de catecolaminas². Uma vez que existe uma íntima ligação entre a microcirculação e as alterações hemodinâmicas sistêmicas, nosso grupo também avaliou o efeito do bloqueio da tempestade autonômica sobre a microcirculação mesentérica. Ao se administrar bupivacaína no espaço peridural, previamente à indução da morte encefálica, foi possível observar que a intervenção inibiu os efeitos da tempestade autonômica sobre a pressão arterial média, resultando em ausência de pico hipertensivo, e quadro hemodinâmico estável. Porém, após 3 h de observação, o bloqueio simpático não se mostrou eficaz em relação à prevenção do comprometimento da perfusão mesentérica. Mesmo com a melhora do quadro hemodinâmico, os animais, com morte encefálica, apresentaram hipoperfusão e aumento de marcadores inflamatórios no mesentério (dados não publicados). Utilizando-se da mesma intervenção terapêutica para a inibição da tempestade autonômica, Silva e colaboradores⁴⁰ também não observaram alterações significativas na expressão de moléculas de adesão endoteliais no tecido miocárdico.

Em condições normais, e ao contrário do que se observa em humanos, os ratos exibem um predomínio de linfócitos (60%) e somente 35% de neutrófilos no sangue circulante (dados: Laboratório de Hematologia do Centro de Bioterismo; FMUSP; 2012). Contudo, sob influência de um estímulo

inflamatório, seja infeccioso ou não, a relação neutrófilo/linfócito se altera, com predomínio de leucócitos polimorfonucleares. Neste estudo, ratos falso-operados apresentaram aumento do número total de leucócitos enquanto nos animais com morte encefálica foi observada leucopenia. Contudo, em ambos os grupos ocorreu inversão na razão neutrófilo/linfócito. Essa observação sugere uma resposta ambígua após o estabelecimento da morte encefálica, considerando-se o aumento do infiltrado inflamatório e da expressão de ICAM-1 associado, paradoxalmente, a uma redução no número de leucócitos circulantes.

Em nossos estudos, foi possível observar que há migração de leucócitos para o tecido perivascular no mesentério e infiltrado leucocitário no fígado de animais com morte encefálica. Na literatura, poucos trabalhos monitoram o leucograma em experimentos de morte encefálica^{40, 41}. Takada e colaboradores⁴¹ observaram leucopenia associada a infiltrado leucocitário no tecido perivascular. Esses autores consideraram que a migração leucocitária justificaria a queda no número de leucócitos circulantes. No entanto, na vigência de uma resposta inflamatória, à medida que ocorre maior recrutamento leucocitário, a medula óssea libera mais leucócitos para corrente sanguínea, especialmente neutrófilos¹⁵, não sendo esperada a ocorrência de leucopenia.

Embora o modelo de morte encefálica em ratos seja amplamente aceito pela comunidade científica, existem algumas limitações em relação à sua utilização. Nos nossos estudos, a principal limitação encontrada foi o tempo de avaliação. Sem a administração de drogas vasoativas, a utilização de animais

por um período maior que 6 h torna-se inviável. Outra possível limitação é o fato de se ter induzido morte encefálica através do súbito aumento da pressão intracraniana. Estudos demonstram que a velocidade de insuflação do cateter para indução da morte encefálica, pode levar a diferentes níveis de comprometimento^{9, 42, 43}.

Com os resultados obtidos neste estudo, aliados a resultados ainda não publicados, surgem várias perspectivas para a melhor compreensão dos processos desencadeados pela morte encefálica. Atualmente, há poucos trabalhos com foco na influência de fatores derivados do endotélio, como óxido nítrico e endotelina, sobre as alterações microcirculatórias decorrentes da morte encefálica. Uma vez que a microcirculação mesentérica encontra-se comprometida, sendo observada importante hipoperfusão, o controle da ativação do endotélio pode resultar em alterações favoráveis, com maior perfusão tecidual.

A morte encefálica induz alterações vasculares em todos os órgãos avaliados, associando-se com hipoperfusão e instabilidade hemodinâmica. Sendo assim, o estudo dos diferentes eicosanoides, incluindo-se prostaglandinas, prostaciclina, tromboxano A₂, e leucotrienos, pode também ser de relevância para uma melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos neste modelo experimental.

Por fim, o estudo dos processos de mobilização leucocitária é de especial interesse. O aumento da resposta inflamatória local e a liberação de marcadores sistêmicos se associam de maneira intrigante com a leucopenia encontrada nos animais com morte encefálica. A observação da medula óssea,

para avaliação do processo de hematopoiese, pode auxiliar na compreensão dos mecanismos envolvidos na regulação da resposta inflamatória desencadeada em pacientes doadores de órgãos.

Conclusões

Com base nos resultados obtidos, é possível concluir que:

- A morte encefálica induz instabilidade hemodinâmica associada à rápida, e persistente, hipoperfusão mesentérica.
- Observa-se aumento na migração leucocitária para o tecido perivascular mesentérico na presença da morte encefálica, associado à elevação da expressão de moléculas de adesão.
- O trauma associado à morte encefálica foi o elemento responsável pelo aumento das concentrações séricas de citocinas e quimiocinas. Paralelamente, a quebra do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal na morte encefálica é responsável pela diminuição da concentração de corticosterona e associou-se a um quadro de leucopenia.
- O comprometimento vascular induzido pela morte encefálica se refletiu nos órgãos sólidos avaliados pela presença de congestão vascular.
- A morte encefálica foi responsável por alterações inflamatórias nos tecidos pulmonar, hepático e renal, documentadas após 6 h de observação.

Anexos



Of.0278/11-CPGE

São Paulo, 16 de setembro de 2011

Senhores Coordenadores,

Na última reunião da Comissão de Pós-graduação/FMUSP foram aprovadas as normas para apresentação de dissertações e teses sob forma de compilação de artigos:

- 1) A critério da Comissão Coordenadora do Programa, poderão ser aceitas dissertações e teses baseadas em compilação de artigo(s)
- 2) As dissertações deverão conter, pelo menos, um artigo aceito para publicação
- 3) As teses deverão conter, pelo menos, dois artigos aceitos para publicação
- 4) A data da submissão do(s) artigo(s) deve ser posterior à matrícula do interessado no programa
- 5) O(s) artigo(s) aceito(s) / publicado(s) deve(m) conter dados relacionados ao objetivo do projeto de pesquisa aprovado pela CAPPesq e encaminhado à CPG
- 6) O aluno obrigatoriamente deverá ser primeiro autor do(s) artigo(s)
- 7) O orientador obrigatoriamente deverá ser coautor do(s) artigo(s)
- 8) A indexação do periódico que aceitou/publicou o(s) artigo(s) deverá seguir as normas específicas do programa, no tocante aos procedimentos para depósito da dissertação/tese.

Forma de apresentação

As teses e dissertações devem incluir obrigatoriamente:

- 1) Entrega de volume encadernado, contendo o projeto de pesquisa aprovado pela CAPPesq, com apresentação e análise crítica escritas em português
- 2) Inserção do(s) manuscrito(s) aceito(s) / publicado(s)
- 3) Análise crítica em que as contribuições do artigo(s) sejam analisadas, discutidas e sintetizadas.

Cordialmente,

Aluísio Augusto Cotrim Segurado
Presidente da Comissão de Pós-Graduação

Comissão de Pós-Graduação

Rua Teodoro Sampaio, 115 – 1º andar – Prédio do Instituto Oscar Freire – CEP 05405-000 – São Paulo
Fones: (11)3061-8203/8204/8205/8209/8214 – Fax: 3061-8215

Referências

1. Pratschke J, Neuhaus P, Tullius SG. What can be learned from brain-death models? *Transpl Int*. 2005;18(1):15-21.
2. Barklin, A. Systemic inflammation in the brain-dead organ donor. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2009;53(4):425-35.
3. Ince, C. The microcirculation is the motor of sepsis. *Crit Care*. 2005;9 Suppl 4:S13-9.
4. Hoffmann JN, Fertmann JM, Jauch KW. Microcirculatory disorders in sepsis and transplantation: therapy with natural coagulatory inhibitors antithrombin and activated protein C. *Curr Opin Crit Care*. 2006;12(5):426-30.
5. Ranasinghe AM, Bonser RS. Endocrine changes in brain death and transplantation. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2011;25(5):799-812.
6. Westendorp WH, Leuvenink HG, Ploeg RJ. Brain death induced renal injury. *Curr Opin Organ Transplant*. 2011;16(2):151-6.
7. Dare AJ, Bartlett AS, Fraser JF. Critical care of the potential organ donor. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2012;12(4):456-65.

8. 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.
9. 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.
10. Floerchinger B, Oberhuber R, Tullius SG. Effects of brain death on organ quality and transplant outcome. *Transplant Rev (Orlando)*. 2012;26(2):54-9.
11. Domínguez-Roldán JM, García-Alfaro C, Jimenéz-González PI, Hernández-Hazañas F, Gascón Castillo ML, Egea Guerrero JJ. Muerte encefálica: repercusión sobre órganos y tejidos. *Med Intensiva*. 2009;33(9): 434-41.
12. Williams MR, Azcutia V, Newton G, Alcaide P, Luscinskas FW. Emerging mechanisms of neutrophil recruitment across endothelium. *Trends Immunol*. 2011;32(10):461-9.
13. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(9):678-89.

14. Woodfin A, Voisin MB, Imhof BA, Dejana E, Engelhardt B, Nourshargh S. Endothelial cell activation leads to neutrophil transmigration as supported by the sequential roles of ICAM-2, JAM-A, and PECAM-1. *Blood*. 2009;113(24):6246-57.
15. Sadik CD, Kim ND, Luster AD. Neutrophils cascading their way to inflammation. *Trends Immunol*. 2011;32(10):452-60.
16. Petri B, Phillipson M, Kubes P. The physiology of leukocyte recruitment: an in vivo perspective. *J Immunol*. 2008;180(10):6439-46.
17. Phillipson M, Kubes P. The neutrophil in vascular inflammation. *Nat Med*. 2011;17(11):1381-90.
18. Johnson Z, Proudfoot AE, Handel TM. Interaction of chemokines and glycosaminoglycans: a new twist in the regulation of chemokine function with opportunities for therapeutic intervention. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2005;16(6):625-36.
19. Hogg N, Patzak I, Willenbrock F. The insider's guide to leukocyte integrin signalling and function. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(6):416-26.
20. Lawson C, Wolf S. ICAM-1 signaling in endothelial cells. *Pharmacol Rep*. 2009;61(1):22-32.
21. Juliano, RL. Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton: functions of integrins, cadherins, selectins, and immunoglobulin-superfamily members. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2002;42:283-323.

22. Vestweber D. Novel insights into leukocyte extravasation. *Curr Opin Hematol.* 2012;19(3):212-7.
23. Nourshargh S, Hordijk PL, Sixt M. Breaching multiple barriers: leukocyte motility through venular walls and the interstitium. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11(5):366-78.
24. Abbas, AK; Lichtman, AH; Pillai, S. *Imunologia celular e molecular*. 6^a ed Rio de Janeiro: Elsevier; 2008. Cap. 2, p.19-46: Imunidade natural.
25. Nakagawa, NK; Nogueira, RA; Correia, CJ; Shiwa, SR; Cruz, JWC; Polide-Figueredo, LF; Rocha-e-Silva, M; Sannomiya, P. Leukocyte-endothelium interactions after hemorrhagic shock/reperfusion and cecal ligation/puncture; an intravital microscopic study in rat mesentery. *Shock.* 2006;26(2):180-6
26. Zanoni FL, Benabou S, Greco KV, Moreno AC, Cruz JW, Filgueira FP, Martinez MB, Figueiredo LF, Silva MR, Sannomiya P. Mesenteric microcirculatory dysfunctions and translocation of indigenous bacteria in a rat model of strangulated small bowel obstruction. *Clinics (Sao Paulo).* 2009;64(9):911-9.
27. 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.
28. 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.

29. Zhou H, Liu J, Pan P, Jin D, Ding W, Li W. Carbon monoxide inhalation decreased lung injury via anti-inflammatory and anti-apoptotic effects in brain death rats. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2010;235(10):1236-43.
30. Contreras JL, Eckstein C, Smyth CA, Sellers MT, Vilatoba M, Bilbao G, Rahemtulla FG, Young CJ, Thompson JA, Chaudry IH, Eckhoff DE. Brain death significantly reduces isolated pancreatic islet yields and functionality in vitro and in vivo after transplantation in rats. *Diabetes*. 2003;52(12):2935-42.
31. Ferrera R, Hadour G, Tamion F, Henry JP, Mulder P, Richard V, Thuillez C, Ovize M, Derumeaux G. Brain death provokes very acute alteration in myocardial morphology detected by echocardiography: preventive effect of beta-blockers. *Transpl Int*. 2011;24(3):300-6.
32. Martikainen TJ, Kurola J, Kärjä V, Parviainen I, Ruokonen E. Vasopressor agents after experimental brain death: effects of dopamine and vasopressin on vitality of the small gut. *Transplant Proc*. 2010;42(7):2449-56.
33. Avlonitis VS, Wigfield CH, Kirby JA, Dark JH. Treatment of the brain-dead lung donor with aprotinin and nitric oxide. *J Heart Lung Transplant*. 2010;29(10):1177-84.
34. 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.
35. Yamagami K, Hutter J, Yamamoto Y, Schauer RJ, Enders G, Leiderer R, Ozen O, Hammer C, Yamaoka Y, Messmer K. Synergistic effects of

- brain death and liver steatosis on the hepatic microcirculation. *Transplantation*. 2005;80(4):500-5.
36. Pitzalis C, Pipitone N, Perretti M. Regulation of leukocyte-endothelial interactions by glucocorticoids. *Ann N Y Acad Sci*. 2002;966:108-18.
 37. Farsky SP, Sannomiya P, Garcia-Leme J. Secreted glucocorticoids regulate leukocyte-endothelial interactions in inflammation. A direct vital microscopic study. *J Leukoc Biol*. 1995;57(3):379-86.
 38. Cavalcanti DM, Lotufo CM, Borelli P, Ferreira ZS, Markus RP, Farsky SH. Endogenous glucocorticoids control neutrophil mobilization from bone marrow to blood and tissues in non-inflammatory conditions. *Br J Pharmacol*. 2007;152(8):1291-300.
 39. Garcia-Leme J, Farsky SP. Hormonal control of inflammatory responses. *Mediators Inflamm*. 1993;2(3):181-98.
 40. Silva IA, Correia CJ, Simas R, Cruz JW, Ferreira SG, Zanoni FL, Menegat L, Sannomiya P, Moreira LF. Inhibition of autonomic storm by epidural anesthesia does not influence cardiac inflammatory response after brain death in rats. *Transplant Proc*. 2012;44(7):2213-8.
 41. 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.
 42. 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.

43. Pratschke J, Wilhelm MJ, Kusaka M, Laskowski I, Tilney NL. A model of gradual onset brain death for transplant-associated studies in rats. *Transplantation.* 2000;69(3):427-30.