

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL – UFRGS
FACULDADE DE MEDICINA - FAMED
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS PNEUMOLÓGICAS

**INFLUÊNCIA DA ADMINISTRAÇÃO DE METILPREDNISOLONA NA
ATIVIDADE INFLAMATÓRIA E NO ESTRESSE OXIDATIVO DE PULMÕES DE
RATOS SUBMETIDOS A MORTE ENCEFÁLICA**

EDUARDO SPERB PILLA

Porto Alegre

2011

EDUARDO SPERB PILLA

**INFLUÊNCIA DA ADMINISTRAÇÃO DE METILPREDNISOLONA NA
ATIVIDADE INFLAMATÓRIA E NO ESTRESSE OXIDATIVO DE PULMÕES DE
RATOS SUBMETIDOS A MORTE ENCEFÁLICA**

*Tese de Doutorado do Programa de Pós-graduação em
Ciências Pneumológicas, da Universidade Federal do Rio
Grande do Sul*

Orientador: Prof. Dr. Cristiano Feijó Andrade

Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Francisco Guerreiro Cardoso

Porto Alegre

2011

Sperb Pilla, Eduardo
INFLUÊNCIA DA ADMINISTRAÇÃO DE METILPREDNISOLONA
NA ATIVIDADE INFLAMATÓRIA E NO ESTRESSE OXIDATIVO DE
PULMÕES DE RATOS SUBMETIDOS A MORTE ENCEFÁLICA /
Eduardo Sperb Pilla. -- 2011.
97 f.

Orientador: Cristiano Andrade.
Coorientador: Paulo Cardoso.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-
Graduação em Ciências Pneumológicas, Porto Alegre, BR-
RS, 2011.

1. Morte encefálica. 2. Corticóide. 3. Estresse
oxidativo. 4. Modelo experimental. 5. Preservação
pulmonar. I. Andrade, Cristiano, orient. II.
Cardoso, Paulo, coorient. III. Título.

Dedicatória

Aos meus pais, Nelson e Sylvia, que nunca pouparam esforços para me proporcionar uma educação de qualidade e para serem um exemplo a ser seguido.

A minha esposa Patrícia, por tudo o que representa na minha vida.

Agradecimentos

Agradeço aos ex-alunos de medicina, agora colegas de especialidade Gustavo Grün e Eduardo Fontena, pela dedicação durante o projeto e pelos momentos de amizade e em especial ao aluno Raôni Bins Pereira, pela extraordinária dedicação em todas as fases do estudo.

Agradeço ao fisioterapeuta e doutor Luiz Alberto Forgiarini Junior pela orientação no processamento e na análise das amostras.

Agradeço ao meu grande companheiro, colega de trabalho diário e padrinho/afilhado, Gabriel Ribeiro Mädke, pela discussão do trabalho e pelo companheirismo do dia-a-dia.

Agradeço ao Dr. Cristiano pela ajuda inestimável na orientação durante todas as fases da tese.

Agradeço ao Dr. Paulo Cardoso pela convivência, dedicação, exemplo, amizade desses anos e por mostrar, desde os tempos de iniciação científica, o melhor caminho a seguir.

Lista de Figuras

Referencial Teórico

Quadro 1. Resolução do Conselho Federal de Medicina Brasileiro referente ao diagnóstico de morte encefálica	8
Quadro 2. Resumo das alterações decorrentes da morte encefálica	29
Figura 1. Os três possíveis mecanismos (simpático, hemodinâmico e inflamatório) da lesão pulmonar resultante da morte encefálica e suas inter-relações	44

Artigo Científico

Figure 1. Oxidative stress and brain death	78
Figure 2. Histological Score and microscopic optical analysis of hematoxylin-eosin stain	79
Figure 3. Pulmonary TNF- α quantification	80

Abreviaturas

ABTO - associação brasileira de transplante de órgãos

AP1 - proteína ativadora 1

Ca⁺⁺ - íon cálcio

CFM - conselho federal de medicina brasileiro

ERO - espécies reativas de oxigênio

GABA_A- ácido gama-aminobutírico (receptor A para)

ICAM - molécula de adesão intercelular

IFN - interferon

IFN β - interferon beta

IFN γ - interferon gama

IL - interleucina

IR - isquemia e reperfusão

MPO - mieloperoxidase

MHC - moléculas do complexo maior de histocompatibilidade

MyD88 - proteína de resposta primária de diferenciação mielóide

Na⁺ - íon sódio

NF κ B- fator nuclear kappa beta

NO - óxido nítrico

NOS - óxido nítrico-sintetase

PaCO₂ - pressão parcial de monóxido de carbono

PaO₂ - pressão parcial de oxigênio

PEEP - pressão positiva expiratória

SNC - sistema nervoso central

SOD - superóxido dismutase

TBARS - substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TNF α - fator de necrose tumoral alfa

TLR - receptores *Toll-like*

TRIF - adaptador de indução de interferon beta

VCAM - proteína de adesão celular vascular

Sumário

Dedicatória	IV
Agradecimentos.....	V
Lista de Figuras	VI
Abreviaturas	VII
Sumário	IX
Resumo	1
Abstract	2
1. Introdução.....	3
2. Referencial Teórico	7
2.1 Morte encefálica	7
2.1.1 Definição e diagnóstico de morte encefálica	7
2.1.2 Doação de órgãos e as recomendações da ABTO	11
2.1.3 O limitante da sobrevida em transplante pulmonar	12
2.1.4 Modelos animais de morte encefálica	14
2.1.5 Fisiopatologia da morte encefálica	17
2.1.6 Alterações hemodinâmicas	18
2.1.7 Alterações endócrinas	20
2.1.8 Alterações morfológicas	21
2.1.9 Alterações metabólicas	24
2.1.10 Alterações inflamatórias, imunológicas e genéticas.....	25
2.1.11 Morte encefálica e ressuscitação hormonal em estudos experimentais	30
2.1.12 Morte encefálica e ressuscitação hormonal em estudos clínicos.....	31
2.2 Edema Pulmonar Neurogênico	33
2.2.1 Definição.....	33
2.2.2 Epidemiologia	34
2.2.3 Modelos experimentais.....	35
2.2.4 Fisiopatologia	37
2.2.5 Mecanismo hemodinâmico.....	37
2.2.6 Mecanismo inflamatório.....	41
2.2.7 Conexão entre os mecanismos simpático, hemodinâmico e inflamatório.....	43
2.2.8 Alterações morfológicas	46
2.2.9 Tratamento	46
3. Justificativa	49

4. Objetivos.....	50
5. Referências Bibliográficas	51
6. Artigo Científico	70
7. Conclusão.....	86
8. Considerações Finais	87

Resumo

O transplante pulmonar é terapia estabelecida para pacientes portadores de doença pulmonar em estágio terminal. Os doadores em morte encefálica são a principal fonte de pulmões para transplante. A fisiopatologia da encefálica é complexa e envolve mecanismos simpático, hemodinâmico e inflamatório que determinam o dano pulmonar. A administração de metilprednisolona em modelo animal de morte encefálica e transplante pulmonar diminuiu o dano de reperfusão no enxerto. Métodos- Vinte e quatro ratos Wistar foram anestesiados e randomizados em 4 grupos (n=6): Sham (sham): apenas trepanação; Morte Encefálica (ME): indução de morte encefálica e administração de solução salina; Corticóide 5min (mt5): indução de morte encefálica e após 5min administração de MET e Grupo Corticóide 60min (mt60): indução de morte encefálica e após 60min. administração de MET. Os animais de todos os grupos foram observados e ventilados durante 120min. Avaliou-se dados hemodinâmicos e gasométricos; dosagem de LDH, proteínas totais e citológico diferencial no lavado broncoalveolar (LBA); escore histológico; dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (*TBARS*), TNF- α , superóxido dismutase (SOD) e catalase em tecido pulmonar. Resultados- Não foi observado diferença estatística entre os grupos nos dados hemodinâmicos e gasométricos, dosagens do LBA, avaliação do escore histológico, dosagem de SOD e catalase. O *TBARS* aumentou significativamente ($P<0,001$) em ambos os grupos tratados com MET em relação aos grupos sham e ME. O TNF- α aumentou significativamente ($P<0,001$) no grupo ME em relação aos grupos tratados com MET. Não ocorreu diferença estatística entre os grupos mt5 e mt60. Conclusão- A administração precoce ou tardia de MET nesse modelo de morte encefálica resulta em efeitos similares nas atividades inflamatória e de peroxidação lipídica no tecido pulmonar.

Abstract

Lung transplantation is an established therapy for patients with end-stage lung disease. The main source of lungs for transplantation is brain-dead donors. The pathophysiology of brain death is complex and involves sympathetic, hemodynamic and inflammatory mechanisms that can injure the lung. It has been previously shown that brain-dead donor treatment with methylprednisolone reduces reperfusion injury after lung transplantation in animals. We hypothesized that early administration of methylprednisolone after brain death could result in reduced lung inflammatory injury in the donor lung. **METHODS:** Twenty-four Wistar rats were anesthetized and randomly allocated into four groups (n=6): Sham (sham), Brain Death (BD), methylprednisolone 5min. (mt5) and methylprednisolone 60min. (mt60). BD, met5 and met60 groups were submitted to brain death by extradural space balloon inflation. Methylprednisolone (i.v. 30mg/kg) was administered to met5 and met60 groups, 5 or 60 minutes after brain death confirmation, respectively. The animals of all groups were observed and ventilated for 120 minutes. Hemodynamics, arterial blood gases, wet/dry weight ratio, bronchoalveolar lavage (white cell count, total protein and LDH concentration), histological score, superoxide dismutase (SOD) and catalase determination were analyzed. Lipid peroxidation and TNF- α determination were assessed in lung tissue. **RESULTS:** No significant differences were observed in hemodynamics, arterial blood gases, wet/dry weight ratio, bronchoalveolar lavage analysis, histological score, SOD and catalase in the different groups. TBARS determination was statistically higher in both methylprednisolone groups when compared to sham ($p < 0.001$) and BD ($p < 0.001$) groups. TNF- α concentration was significantly lower in met5 ($p < 0.001$) and met60 groups ($p < 0.001$) when compared to BD group. **CONCLUSIONS:** We conclude that early or late administration of methylprednisolone in this model of brain death has similar effect regarding inflammatory and lipid peroxidation activity on lung tissue.

1. Introdução

O transplante pulmonar é a última opção terapêutica para pacientes selecionados com doença pulmonar em estágio terminal. O aumento das indicações têm resultado em maior número de candidatos em lista de espera, sendo o número de órgãos disponíveis insuficientes tendo em vista a reduzida oferta de doadores. (1, 2) As principais indicações são: Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (37%), Fibrose Pulmonar Idiopática (19%), Fibrose Cística (16%) e Enfisema Pulmonar por deficiência de α 1-anti-tripsina (8%). (2)

Menos de 20% dos potenciais doadores em morte encefálica apresentam pulmões apropriados para o transplante, conseqüentemente, o pulmão permanece como o órgão menos utilizado em doadores de múltiplos órgãos (3, 4), sendo este um dos principais limitadores da expansão dos programas de transplante pulmonar. (5)

Na realidade brasileira observa-se números ainda mais desanimadores. Em 2006, no estado de São Paulo, entre 348 possíveis doadores, a taxa de aproveitamento foi de apenas 4%. (6)

A falência primária do enxerto, é outro fator limitante ao sucesso do transplante pulmonar, contribuindo para uma sobrevida em 3 meses e um ano de 87% e 78%, respectivamente. Da mesma forma, a sobrevida em 5 e 10 anos não ultrapassa 50% e 26% respectivamente (2). No que tange à mortalidade precoce, o principal responsável é a chamada disfunção aguda do enxerto ou injúria pulmonar aguda ou ainda disfunção primária do enxerto, a qual incide em 15 a 50% dos pacientes transplantados de pulmão. (7-10) Essa complicação usualmente requer períodos prolongados de ventilação mecânica

e, por conseguinte, permanência do paciente em unidade de terapia intensiva, contribuindo para aumento de complicações (8). Além disso, a disfunção primária do enxerto constitui-se em fator de risco bem estabelecido para o desenvolvimento de bronquiolite obliterante, principal limitante da sobrevida a longo prazo do transplante pulmonar. (11)

Na fase precoce pós-transplante, a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) ou “radicais livres de oxigênio”, a ativação endotelial, o aumento na expressão de citocinas inflamatórias e a infiltração neutrofílica, entre outros, estão associadas aos diferentes graus de gravidade da lesão de isquemia e reperfusão (IR) e, conseqüentemente, a disfunção primária do enxerto. (12-14)

A maioria dos órgãos utilizados em transplante é retirado de doadores em morte encefálica, sendo que seus resultados funcionais após implante são inferiores se comparados àqueles provenientes de doadores vivos. (15) Além disso, os pulmões de doadores em morte encefálica possuem uma maior tendência ao desenvolvimento de rejeição crônica. (16) No entanto, a causa da morte encefálica, se traumática ou vascular, não parece influenciar a sobrevida ou o tempo livre de bronquiolite obliterante nos receptores. (17)

Em modelo experimental, os pulmões de animais em parada cardíaca (*non-heart-beating donor*) foram menos suscetíveis ao dano de isquemia e reperfusão que dos animais em morte encefálica. (18) Outros pesquisadores também salientam a importância da morte encefálica na viabilidade pulmonar. (19-21)

A morte encefálica resulta de grave dano ao tronco cerebral, com perda completa e irreversível de suas funções. (22) Em modelos animais, este insulto

inicial acompanha-se de elevação imediata dos níveis de adrenalina e noradrenalina plasmáticas, a chamada “tempestade autonômica”, resultando em hipertensão, taquicardia e taquiarritmias (23-25). Este período hipertensivo, embora breve, é seguido de uma redução gradual da pressão arterial, resultando em vasodilatação sistêmica e edema pulmonar. (26-29)

Alterações endócrinas envolvendo o eixo hipotalâmico-hipofisário também são observadas e os níveis plasmáticos dos hormônios adrenocorticotrófico, cortisol, triiodotironina, tiroxina, insulina e vasopressina tendem a reduzir. (23, 28)

A resposta inflamatória que sucede a morte encefálica ainda não está totalmente elucidada. (30) Estudos clínicos e animais demonstram que a morte encefálica promove alterações inflamatórias nos órgãos periféricos e especialmente nos pulmões. O aumento na expressão de diversas citocinas como: interleucina (IL)-1, IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), bem como, a ativação de vias responsáveis pela indução de inflamação como a do fator nuclear kappa beta (NF κ B), têm sido associadas às alterações decorrentes da morte encefálica. (5, 29, 31-34)

O edema pulmonar neurogênico é definido como um edema pulmonar agudo que ocorre imediatamente após um dano neurológico central (30) e a morte encefálica é uma condição geralmente associada a esta situação clínica. (35)

Os dois principais eventos decorrentes da morte encefálica e desencadeantes da gênese do edema pulmonar neurogênico são a tempestade autonômica e a isquemia cerebral. A liberação de catecolaminas promove alterações na permeabilidade capilar e alterações hemodinâmicas,

que, conseqüentemente, aumentam a pressão hidrostática e danificam a membrana alvéolo-capilar. Já a isquemia cerebral normalmente ativa fatores inflamatórios diretamente. A isquemia de órgãos periféricos, como o intestino delgado, decorrente das alterações hemodinâmicas e a ativação endotelial também promove o aumento de expressão de fatores inflamatórios. (19)

Outras evidências de que a resposta inflamatória participa ativa e conjuntamente no processo de dano pulmonar após a morte encefálica consistem em estudos experimentais que demonstraram que o uso de corticóides pode evitar ou retardar o surgimento de edema pulmonar neurogênico. (36, 37) Wigfield e cols. foram os primeiros a evidenciar que o dano pulmonar no doador em decorrência da morte encefálica pode ser modulado com a administração de metilprednisolona. (36)

Estudos clínicos retrospectivos (38, 39) e randomizados (40) já demonstraram benefício na utilização da ressuscitação hormonal em doadores com morte encefálica.

Com base na revisão da literatura realizamos a hipótese de que a administração de metilprednisolona melhoraria a viabilidade pulmonar de ratos submetidos a morte encefálica.

2. Referencial Teórico

2.1 Morte Encefálica

2.1.1 Definição e diagnóstico de morte encefálica

Antigamente o conceito de morte estava atrelado a parada da respiração e dos batimentos cardíacos pois era consenso que nessa situação o cérebro morreria em poucos minutos. Assim, o coração era considerado o órgão central do corpo humano. Com o advento e a melhoria da ressuscitação cárdio-pulmonar, bem como, da medicina intensiva, houve a necessidade de um novo diagnóstico de morte. Dessa forma, foi proposto a definição de coma irreversível como um novo critério de morte em artigo do *Journal of the American Medical Association* em 1968, primeira publicação sobre a definição de morte encefálica. (41) O principal objetivo desse estudo de Harvard foi provar que o coma irreversível poderia ser um novo critério para morte, pois naquela época o diagnóstico de morte obedecia critérios que poderiam levar a controvérsias na obtenção de órgãos para transplante. Os autores utilizaram os seguintes critérios para a definição de "coma irreversível": a) não-responsividade e não-receptividade a estímulos; b) ausência de movimentos, incluindo movimentos respiratórios; c) ausência de reflexos de tronco encefálico e d) eletroencefalograma isoeletrico (*flat electroencephalogram*). A necessidade de repetição de todos os exames em um intervalo de 24 horas, além da exclusão de hipotermia e de uso de depressores do sistema nervoso central, como os barbitúricos, era salientada pelos autores; entretanto, não

havia referência da necessidade da realização dos procedimentos por mais de um médico.

Importante ressaltar que os critérios definidos pelo grupo de Harvard ainda são considerados confiáveis e aceitos pela grande maioria da comunidade científica, estando, inclusive, presentes na Resolução de morte encefálica do Conselho Federal de Medicina Brasileiro (CFM).

Atualmente, morte encefálica é definida como uma condição clínica na qual por meio de um exame neurológico o paciente apresenta ausência de todos os reflexos do tronco cerebral e de qualquer resposta ventilatória quando submetido a uma hipercapnia que exceda uma PaCO_2 de 60mmHg, apresente temperatura corporal normal, resultados de exames bioquímicos e toxicológicos de rotina normais, além de ausência de fluxo sanguíneo cerebral em exames diagnósticos de imagem. (22)

O CFM publicou Resolução (RESOLUÇÃO CFM nº 1.480/97) em agosto de 1997 referente ao diagnóstico de morte encefálica (Quadro 1). Importante frisar que faz parte dessa Resolução o Termo de Declaração de Morte Encefálica que objetiva orientar e padronizar o manejo de pacientes com suspeita de morte encefálica em todos os hospitais brasileiros. (42)

Quadro 1. Resolução do Conselho Federal de Medicina Brasileiro referente ao diagnóstico de morte encefálica.

RESOLUÇÃO CFM nº 1.480/97

Art. 1º. A morte encefálica será caracterizada através da realização de exames clínicos e complementares durante intervalos de tempo variáveis, próprios para determinadas faixas etárias.

Art. 2º. Os dados clínicos e complementares observados quando da caracterização da morte encefálica deverão ser registrados no "termo de declaração de morte encefálica" anexo a esta

Resolução. Parágrafo único. As instituições hospitalares poderão fazer acréscimos ao presente termo, que deverão ser aprovados pelos Conselhos Regionais de Medicina da sua jurisdição, sendo vedada a supressão de qualquer de seus itens.

Art. 3º. A morte encefálica deverá ser consequência de processo irreversível e de causa conhecida.

Art. 4º. Os parâmetros clínicos a serem observados para constatação de morte encefálica são: coma aperceptivo com ausência de atividade motora supra-espinal e apnéia.

Art. 5º. Os intervalos mínimos entre as duas avaliações clínicas necessárias para a caracterização da morte encefálica serão definidos por faixa etária, conforme abaixo especificado:

- a) de 7 dias a 2 meses incompletos - 48 horas
- b) de 2 meses a 1 ano incompleto - 24 horas
- c) de 1 ano a 2 anos incompletos - 12 horas
- d) acima de 2 anos - 6 horas

Art. 6º. Os exames complementares a serem observados para constatação de morte encefálica deverão demonstrar de forma inequívoca:

- a) ausência de atividade elétrica cerebral ou,
- b) ausência de atividade metabólica cerebral ou,
- c) ausência de perfusão sangüínea cerebral.

Art. 7º. Os exames complementares serão utilizados por faixa etária, conforme abaixo especificado:

- a) acima de 2 anos - um dos exames citados no Art. 6º, alíneas "a", "b" e "c";
- b) de 1 a 2 anos incompletos: um dos exames citados no Art. 6º, alíneas "a", "b" e "c". Quando optar-se por eletroencefalograma, serão necessários 2 exames com intervalo de 12 horas entre um e outro;
- c) de 2 meses a 1 ano incompleto - 2 eletroencefalogramas com intervalo de 24 horas entre um e outro;
- d) de 7 dias a 2 meses incompletos - 2 eletroencefalogramas com intervalo de 48 horas entre um e outro.

Art. 8º. O Termo de Declaração de Morte Encefálica, devidamente preenchido e assinado, e os exames complementares utilizados para diagnóstico da morte encefálica deverão ser arquivados no próprio prontuário do paciente.

Art. 9º. Constatada e documentada a morte encefálica, deverá o Diretor-Clínico da instituição hospitalar, ou quem for delegado, comunicar tal fato aos responsáveis legais do paciente, se houver, e à Central de Notificação, Captação e Distribuição de Órgãos a que estiver vinculada a unidade hospitalar onde o mesmo se encontrava internado.

Alguns pesquisadores não aceitam e criticam os critérios atualmente estabelecidos para o diagnóstico de morte encefálica. (43, 44) Em artigo de revisão, Giacomini critica os critérios estabelecidos pelo Comitê de Harvard em 1968, afirmando que foi estabelecido um diagnóstico, incontestável, rígido, assegurando uma aplicação universal para todos os casos clínicos suspeitos de morte encefálica. (45)

Segundo Shewmon, os atuais critérios utilizados para diagnóstico clínico de morte encefálica não permitem excluir-se a possibilidade de que um diagnóstico falso-positivo possa ocorrer. Afirma que aceitando-se um risco máximo de falso-positivo de 0,01% (1/10.000) seria necessário o acompanhamento da evolução de 23.025 pacientes que preencham os atuais critérios diagnósticos e concluir que nenhum deles apresentou um diagnóstico falso-positivo. (46)

O teste da apnéia é criticado por alguns autores como sendo potencialmente prejudicial pela possível ocorrência de hipotensão e aumento na pressão intracraniana em pacientes com uma baixa perfusão cerebral (47), além da possibilidade de resultados não totalmente confiáveis em pacientes com dano pulmonar (hipoxemia) e acidose. (48)

Estudo prospectivo demonstrou que a hipertermia aumenta a mortalidade de pacientes com o diagnóstico de acidente vascular encefálico. (49) Já a utilização da hipotermia moderada como medida terapêutica para vítimas de trauma crânio-encefálico grave demonstrou ser benéfica em estudos clínicos. (50-52) Segundo Coimbra, o resultado desses estudos, sugere que o diagnóstico atual de morte encefálica não seria totalmente confiável e que pacientes inicialmente diagnosticados como doadores em potencial deveriam

ser submetidos a hipotermia moderada como alternativa ao teste da apnéia.

(44)

2.1.2 Doação de órgãos e as recomendações da Associação Brasileira de Transplante de Órgãos

Órgãos utilizados para transplante podem ser captados de doador vivo, doador cadáver e doador em morte encefálica. A doação de rim, de medula óssea e o transplante inter-vivos de fígado (53, 54) e pulmão (55-58) são exemplos de captação de doadores vivos. A doação de córnea, osso e pele são os principais exemplos relacionados ao doador cadáver. No entanto, a captação de rins (59, 60), fígado (61, 62) e até mesmo pulmões (63-65) tem sido utilizada recentemente em doadores após parada cardiorrespiratória (*non-heart-beating donors*). No nosso meio, a grande maioria dos órgãos são captados de doadores em morte encefálica antes da parada cardiorrespiratória (*heart-beating brain dead donors*).

Apenas os estados do Rio Grande do Sul e São Paulo possuem programas atuantes em transplante pulmonar, sendo responsáveis por 22 transplantes de doadores cadáveres no primeiro trimestre de 2010, segundo o Registro Brasileiro de Transplantes publicado pela Associação Brasileira de Transplante de Órgãos (ABTO). (66, 67)

A ABTO cita em seu site algumas orientações básicas em relação a manutenção do doador cadáver: (a) garantia de acessos vasculares; (b) tratamento de hipotensão com: reposição volêmica rigorosa (cristalóides e colóides), uso de dopamina ou outra droga vasoativa; (c) ventilação mecânica com: volume inspiratório de 10ml/Kg de peso, pressão positiva expiratória

(PEEP) de 5 cm de H₂O e gasometria arterial periódica; (d) controle de hipotermia com: focos de luz próximo ao tórax e abdome, infusão e ventilação aquecidos e cobertor térmico; (e) outros cuidados: reposição de eletrólitos, reposição de bicarbonato de sódio em acidose metabólica, correção de hiperglicemia com insulina regular, uso regular de antibióticos profiláticos e terapêuticos, transfusão de sangue quando hemoglobina abaixo de 10 g/dl e proteção ocular com gaze umedecida. (68) Não há, portanto, orientações em relação a realização de ressuscitação hormonal com a administração de corticóide ou hormônio tireoidiano, por exemplo.

2.1.3 O limitante da sobrevida em transplante pulmonar- a disfunção primária do enxerto pulmonar

A disfunção primária do enxerto apresenta-se como uma forma de dano pulmonar agudo que resulta de uma sequência de eventos inerentes ao processo do transplante pulmonar como a morte encefálica do doador e os eventos relacionados diretamente ao enxerto como isquemia, preservação, transplante e reperfusão. Apesar de numerosos recentes avanços em preservação pulmonar, técnica cirúrgica e cuidados peri-operatórios, a disfunção do enxerto no pós-transplante ainda é prevalente com incidência entre 11% e 25%. (69-71)

Vários termos descrevem essa situação clínica: injúria (lesão) de isquemia e reperfusão (IR), resposta pós-implante, edema pós-implante, edema de reperfusão, edema pulmonar não cardiogênico, disfunção precoce do enxerto, disfunção primária do enxerto, falência primária do enxerto, síndrome da distrição respiratória aguda pós-transplante e dano pulmonar

agudo. Essas expressões não são sinônimas, sendo algumas utilizadas para descrever o evento terminal da lesão de IR e outras, para relatar quadros clínicos menos graves. (72) Mesmo com as variações presentes entre os estudos existe consenso que a disfunção primária do enxerto é responsável por grande morbidade e mortalidade no transplante pulmonar. (10) Idade, raça, gênero, história de tabagismo e doença pulmonar subjacente são características do doador que podem influenciar na qualidade do enxerto. Além disso, outros fatores presentes no doador como: morte encefálica, ventilação mecânica prolongada, aspiração brônquica, pneumonia, trauma, politransusão e instabilidade hemodinâmica contribuem para o dano pulmonar resultante da IR e, conseqüentemente, para a disfunção do enxerto. (14, 20)

Dados recentes da literatura demonstram que os enxertos não devem ser considerados imunologicamente inertes. Todos os fatores citados acima, principalmente, as conseqüências da lesão de IR e da morte encefálica “reprogramam” o enxerto em um órgão imunologicamente ativo. Conseqüentemente, a imunossupressão deve ser iniciada já no doador. O tratamento do doador em potencial após a confirmação da morte encefálica pode ser uma abordagem promissora para reduzir a ativação imunológica do enxerto e melhorar a qualidade do órgão antes do transplante. (34)

Dessa forma, o tratamento e, principalmente, a prevenção da disfunção primária do enxerto são abordagens de suma importância no atual contexto dos programas de transplante pulmonar.

2.1.4 Modelos animais de morte encefálica

Normalmente os pulmões utilizados para transplante são captados de doadores em morte encefálica antes da parada cardiorrespiratória (*heart-beating brain dead donors*). A maioria desses doadores sofrem dano cerebral decorrente de hemorragia subaracnóidea ou traumatismo crânio-encefálico, por exemplo, antes do diagnóstico de morte encefálica. (6)

Além disso, os pulmões do doador estão submetidos a outras alterações associadas ou a não a morte encefálica como: instabilidade hemodinâmica, ventilação mecânica prolongada, trauma, infecção, alterações metabólicas, aspiração brônquica e politransusão. (14, 20)

Em 1992, Cooper em artigo de revisão, teceu comentários interessantes sobre a escolha de modelos experimentais para avaliação da preservação pulmonar. Enfatizou que o estabelecimento de um modelo experimental padrão, “universal”, com técnica cirúrgica, avaliação da função pulmonar e seguimento pós-operatório padronizados era fator de extrema importância para uma melhor avaliação dos resultados entre diferentes estudos. Além disso, salientou que em modelos onde a preservação pulmonar é avaliada em pulmões previamente normais, ocorre um distanciamento muito grande da realidade clínica, onde o doador está submetido aos efeitos de morte encefálica, instabilidade hemodinâmica, infecção e trauma. (21)

Vários modelos experimentais têm sido validados com o objetivo de avaliar o efeito da morte encefálica na viabilidade do enxerto. (73-80)

Na maioria desses modelos um aumento da pressão intracraniana é gerado por meio da insuflação de um balão, geralmente, um cateter de embolectomia, tipo Fogarty®, posicionado no espaço extra-dural. Essa

expansão do conteúdo intra-craniano determina compressão e herniação do tronco cerebral com a consequente instalação dos eventos que irão desencadear a morte encefálica. Essa insuflação tem sido realizada de duas formas nos modelos experimentais: início abrupto ou início gradual.

No modelo abrupto de insuflação, ocorre uma simulação de um trauma crânio encefálico agudo e grave, o qual aumenta a pressão intra-craniana em apenas 30 a 60 segundos. A crítica a este modelo “explosivo” de morte encefálica é a importante instabilidade hemodinâmica e a congestão pulmonar resultante. Em decorrência dessas alterações muitos animais morrem ou necessitam de suporte hemodinâmico. Com o objetivo de evitar variações excessivas na pressão arterial, alguns modelos preconizam a utilização de suporte inotrópico.

Já um aumento gradual e lento na pressão intra-craniana tem por objetivo simular o evento de morte encefálica decorrente de uma hemorragia cerebral, por exemplo, resultando em menor instabilidade hemodinâmica e mantendo uma pressão arterial mais próxima da normalidade. Poucos estudos foram publicados com a utilização desse tipo de modelo experimental (25, 73, 79)

Um modelo de aumento gradual da pressão intra-craniana foi estabelecido por Kolkert e cols. Nesse estudo, os animais foram submetidos a uma craniotomia circular de 2mm de diâmetro na região fronto-lateral e um cateter Fogarty® 4F foi introduzido caudalmente no espaço extra-dural. Após, 16 μ L/min. de solução salina foram infundidos por meio de uma bomba de infusão. A pressão arterial média apresentou declínio entre 10+/-1min após o início da infusão com uma duração média de 11+/-1min, retornando, então,

para os níveis basais, momento onde o diagnóstico de morte encefálica era estabelecido. Os resultados do estudo demonstraram menor variação hemodinâmica do grupo com infusão gradual, sem a necessidade de administração de inotrópicos e sem “perdas” (óbitos), além disso, não houve diferença na infiltração tecidual leucocitária entre os grupos (insuflação gradual *versus* aguda). Os achados neuropatológicos evidenciaram que a insuflação do cateter na região supra-tentorial determinou compressão do cerebelo e do tronco encefálico, além de deslocamento caudal do tecido cerebral. Os autores salientam que o correto posicionamento do cateter é fator determinante na reprodutibilidade desse modelo. (81)

No entanto, em validação de modelo de morte encefálica em camundongos, não foram observadas diferenças hemodinâmicas entre indução gradual ou explosiva. (82)

A importância do modelo animal a ser utilizado em pesquisas experimentais pode ser exemplificado em recente estudo realizado por Avlonitis e cols. Os autores estudaram o efeito anti-inflamatório da aprotinina e do óxido nítrico em modelo de morte encefálica por insuflação de cateter com balão, seguido por transplante pulmonar. Concluíram que não houve redução na resposta inflamatória sistêmica, mas sim uma piora na função pulmonar do enxerto após a reperfusão. (83) Esses resultados contrariam as conclusões de outros estudos que demonstraram benefício na utilização da aprotinina e do óxido nítrico. (84, 85) Entretanto, nesses estudos com resultados considerados “positivos”, o modelo experimental utilizado foi o de doadores vivos, condição que difere da realidade clínica.

2.1.5 Fisiopatologia da Morte Encefálica

As principais causas de morte encefálica em potenciais doadores de pulmão em nosso meio são: acidente vascular cerebral (40,5%), traumatismo crânio-encefálico (34,2%), hemorragia subaracnóidea (10,9%) e ferimento por arma de fogo (5,7%). (6)

É consenso que o sucesso do transplante em órgãos de doadores em morte encefálica é inferior ao de doadores vivos. (15, 86) A grande maioria dos transplantes pulmonares são realizados com órgãos oriundos de doadores em morte encefálica, tal condição afeta o desfecho do receptor, sendo associada a uma pior função do enxerto (14) e a um maior risco de rejeição crônica (16) e aguda. (87)

O mecanismo desencadeante da morte encefálica também possui influência na rejeição crônica do enxerto. Em estudo retrospectivo, Ciccone e cols. concluíram que os pulmões captados de doadores em morte encefálica traumática apresentaram estatisticamente uma associação positiva com bronquiolite obliterante. (88)

Em modelo de morte encefálica para estudo da viabilidade hepática em doadores ideais (normotensos) e marginais (hipotensos), van Der Hoeven observou que a morte encefálica promove uma deterioração progressiva da função hepática e que a instabilidade hemodinâmica é um fator agravante dessa deterioração. Dessa forma, os autores concluem que a morte encefálica não deve ser considerada uma condição estática, mas um processo dinâmico que influencia diretamente na viabilidade dos órgãos dos doadores. Assim, o tempo existente entre a declaração de morte encefálica e a retirada de

múltiplos órgãos para transplante pode ser uma oportunidade para intervenções que diminuam os efeitos deletérios da morte encefálica. (89)

Neyrinck e cols. estudaram em modelo animal de perfusão isolada o dano pulmonar decorrente da IR em doadores em morte encefálica ou doadores cadáveres e concluíram que o doador em parada cardíaca (*non-heart-beating donor*) é menos suscetível a lesão de IR do que o doador em morte encefálica. (18)

Os mecanismos pelos quais a morte encefálica determina os danos nos órgãos do doador ainda não estão totalmente elucidados (Quadro 2). Entretanto, o correto entendimento desses mecanismos e o desenvolvimento de estratégias para inibir esse dano podem contribuir no aumento do número de doadores e diminuir a incidência de falência primária do enxerto. (90)

2.1.6 Alterações hemodinâmicas

Resumidamente, a morte encefálica decorre de um dano ao tronco cerebral com a perda irreversível de suas funções. Em modelos animais esse tipo de dano é seguido imediatamente por uma “tempestade” do sistema nervoso autônomo (*autonomic storm*). O aumento nos níveis plasmáticos de adrenalina e noradrenalina (25) determina os seguintes eventos: taquicardia, flutuação caótica da pressão arterial, arritmias, alterações pulmonares, hipotermia, coagulopatia e alterações eletrolíticas. Além disso, a descarga simpática resultante do dano cerebral está associada a um quadro conhecido como edema pulmonar neurogênico. (91)

Essas alterações na dinâmica cardio-pulmonar e na estabilidade hemodinâmica ocorrem em duas fases. A fase inicial está associada à

compressão e estimulação do tronco encefálico, além de herniação das estruturas cranianas. Conseqüentemente, ocorre aumento da pressão intra-craniana com diminuição na perfusão cerebral e aumento da isquemia. A diminuição do pH e o aumento no pCO_2 resultantes da isquemia sensibilizam os quimiorreceptores do hipotálamo que, então, ativam o sistema simpático. A chamada “tempestade simpática” ativa receptores α -1-adrenérgicos determinando vasoconstrição, aumento na resistência periférica e aumento na pressão arterial com o objetivo de melhorar a perfusão cerebral. Entretanto, esse aumento na pressão arterial sensibiliza os barorreceptores carotídeos e uma ativação parassimpática ocorre induzindo uma bradicardia transitória. (75, 92, 93)

A presença de hipertensão, padrão ventilatório irregular e bradicardia como resposta a um aumento na pressão intra-craniana definem o Reflexo de Cushing, descrito por esse neurocirurgião em 1902. (94)

As conseqüências dessa tempestade de catecolaminas na resistência vascular periférica e nos parâmetros cardiopulmonares se correlacionam com o aumento na pressão intra-craniana. Mesmo na presença dessa crise hipertensiva os tecidos se tornam isquêmicos em virtude da intensa vasoconstrição periférica, do aumento da resistência vascular e da significativa diminuição do fluxo sanguíneo tecidual.

No miocárdio, essas alterações acarretam um súbito e maciço aumento no trabalho cardíaco e, conseqüentemente, no consumo tecidual de oxigênio. A oferta de oxigênio ao coração, embora aumentada, é insuficiente para cobrir a demanda necessária e, assim, se observa uma isquemia global e transitória do miocárdio. Essa fase tem a duração de poucos minutos. (34)

Seguindo a crise hipertensiva inicial observa-se uma hipotensão sustentada (*hypotensive plateau*) em decorrência da diminuição da liberação de catecolaminas. (27) Com uma menor quantidade de catecolaminas circulante ocorre uma diminuição da resistência vascular periférica (vasodilatação periférica) e da contratilidade cardíaca, conseqüentemente, uma piora na pressão de perfusão e na auto-regulação vascular se instalam, culminando com menor perfusão e oferta de oxigênio teciduais. (5, 34)

2.1.7 Alterações endócrinas

A morte encefálica promove dois tipos distintos de alterações hormonais. Uma associada a tempestade autonômica, caracterizada pelo grande aumento transitório nas catecolaminas circulantes e outra associada a disfunção hipotalâmico-hipofisária. Como conseqüência, ocorrem a instalação de diabetes insípido neurogênica e uma marcada diminuição nos níveis de triiodotironina, tiroxina, insulina, vasopressina, hormônio adrenocorticotrópico e cortisol. (75) Bittner e cols., observaram em modelo experimental que a vasopressina apresentou diminuição aos 15min. e o hormônio adrenocorticotrópico aos 45min. pós-indução da morte encefálica. (95)

Os peptídeos natriuréticos tipo B e atrial são produzidos no miocárdio e associam-se a gravidade do dano miocárdico. O nível do hormônio atrial natriurético apresentou aumento em porcos submetidos a morte encefálica, sugerindo preservação da função endócrina do coração mesmo em vigência de comprometimento da contratilidade ventricular. (28) No estudo de Potapov e cols., as alterações hemodinâmicas decorrentes da morte encefálica não

alteraram significativamente os níveis do peptídeo atrial natriurético e do peptídeo natriurético tipo B em relação ao grupo controle. (96)

Em estudo animal, a infusão contínua de insulina promoveu uma menor expressão de TNF- α , IL-6 e IL-10 em ventrículo direito, córtex e medular renal. (97)

Novitzky demonstrou em modelo experimental que a administração de triiodotironina promove uma diminuição no acúmulo plasmático de lactato e ácidos graxos resultante do metabolismo anaeróbico presente na morte encefálica. (98)

No entanto, alguns autores discordam desses achados relacionados ao declínio nos níveis de hormônios em pacientes em morte encefálica. Gramm estudando a concentração plasmática de hormônios do eixo hipotalâmico-hipofisário, hormônios da tireóide e do cortisol em potenciais doadores em morte encefálica não observou declínio na meia vida de nenhum dos hormônios. O autor concluiu que mesmo na presença do diagnóstico de morte encefálica permanece uma função residual do sistema neuroendócrino hipotalâmico-hipofisário suficiente para manter os níveis hormonais em valores mínimos. (99) A mesma conclusão foi obtida por Arita e cols. estudando o nível sérico dos hormônios do eixo hipotalâmico-hipofisário e a histologia dos neurônios hipotalâmicos de pacientes em morte encefálica. (100)

2.1.8 Alterações morfológicas

Níveis elevados de catecolaminas produzem alterações morfológicas importantes no coração, principalmente, no sub-endocárdio do ventrículo esquerdo. Os achados de hemorragia petequial, lise de coagulação dos

miócitos e infiltração mononuclear estão presentes. (101) Essas alterações decorrentes da tempestade autonômica, mas, principalmente, da grande liberação de noradrenalina nas fibras simpáticas da inervação miocárdica podem resultar em necrose miocárdica. (102) Dessa forma, corações retirados de pacientes em morte encefálica mesmo apresentando boa perfusão podem apresentar aumento da resposta imunológica do receptor, bem como, uma pior sobrevida do enxerto. Em modelos experimentais de morte encefálica não explosiva, utilizando-se aumento gradual na pressão intra-craniana não se observa alterações significativas nos parâmetros hemodinâmicos e as alterações morfológicas no miocárdio são mínimas. Dessa forma, a grande liberação de catecolaminas é um dos fatores responsáveis pela qualidade dos órgãos para transplante após morte encefálica. (73, 79)

No transplante renal, a presença de isquemia devido a hipotensão, independente da etiologia, pode ser uma importante causa de dano renal. Após a implantação do enxerto, a função renal pode ser afetada pela instabilidade hemodinâmica relacionada a morte encefálica, sendo considerado um dos principais fatores etiológicos a importante vasoconstrição decorrente da tempestade autonômica. Em órgãos retirados de doadores com instabilidade hemodinâmica é observado uma alta incidência de necrose tubular aguda. (103) Os achados histopatológicos descritos no rim após a morte encefálica incluem o início imediato de hiperemia glomerular, o desenvolvimento de glomerulite, a proliferação endotelial e a periglomerulite, sendo que após 3 dias pode-se observar degeneração, atrofia e necrose das células tubulares. (104) A instabilidade hemodinâmica e o tempo de exposição do rim à morte encefálica

estão relacionados à disfunção do enxerto conforme os resultados de um estudo em modelo animal. (105)

As alterações morfológicas presentes no fígado após a morte encefálica não estão bem definidas. Estudo em modelo canino de hipotensão prolongada e morte encefálica concluiu que o fígado é muito resistente a hipotensão e que o mesmo possui uma grande reserva fisiológica. (106) Em estudo da viabilidade hepática em modelo de morte encefálica, os autores observaram menor perfusão dos sinusóides, maior aderência leucocitária nas vênulas pós-sinusóide e maior deterioração da função hepática nos animais submetidos a morte encefálica quando comparados ao grupo controle. (77) Estudos clínicos demonstraram que quatro dias após a morte encefálica o fígado apresenta congestão venosa central extensa e que após quinze dias pode ocorrer necrose peri-portal. Outra alteração importante presente nos hepatócitos de pacientes em morte encefálica é a alteração na permeabilidade e integridade da membrana celular associada a infiltração leucocitária. (103, 107, 108)

O pulmão é um órgão extremamente suscetível às alterações hemodinâmicas decorrentes da tempestade autonômica. O aumento na resistência vascular periférica pode determinar um aumento na reserva capilar pulmonar e a um aumento no fluxo da artéria pulmonar. Essas alterações podem deteriorar a função pulmonar e tornar o órgão não passível de captação. (19) Os pacientes em morte encefálica apresentam uma maior infiltração de neutrófilos no tecido pulmonar, alteração associada a uma maior concentração de IL-8 no lavado broncoalveolar. (31)

Em modelo experimental de morte encefálica em ratos seguido de transplante pulmonar, a microscopia óptica após 100 dias de seguimento

evidenciou infiltração leucocitária intersticial, peribronquiolar e perivascular denotando alterações compatíveis com rejeição crônica. (16) Em relação aos achados da microscopia eletrônica, Avlonitis e cols. evidenciaram em modelo de morte encefálica em ratos, áreas de ruptura total da membrana alvéolo-capilar em todos os animais submetidos a morte encefálica. (5)

A função pancreática altera-se pouco em doadores com morte encefálica desde que a estabilidade hemodinâmica seja mantida, entretanto, níveis elevados de insulina e peptídeo C são observados. Em modelo experimental de transplante de ilhotas células pancreáticas, os autores comprovaram que a morte encefálica induz a infiltração de macrófagos e o aumento na liberação de moléculas inflamatórias. (109)

2.1.9 Alterações metabólicas

A tempestade do sistema nervoso autônomo, os distúrbios hemodinâmicos e endócrinos e a decorrente hipoperfusão tecidual determinam alterações metabólicas. Em vigência da morte encefálica ocorre uma troca do metabolismo aeróbico para o anaeróbico com depleção da reserva energética celular e, conseqüentemente, o desenvolvimento de acidose láctica. A administração de triiodotironina em animais submetidos a morte encefálica resultou em redução na concentração plasmática de lactato, indicando uma aparente reversão do metabolismo tissular de anaeróbico para aeróbico. (28, 98)

O metabolismo anaeróbico observado no músculo cardíaco de porcos submetidos a morte encefálica decorre provavelmente do comprometimento precoce da contratilidade ventricular esquerda. (28)

A liberação de enzimas como lipases, proteases, endonucleases e a conseqüente geração e liberação de ERO foram identificadas durante a morte encefálica. (110) O aumento na liberação de ERO promove o dano de vários componentes celulares como proteínas, DNA e fosfolipídios, causando alterações na integridade e permeabilidade da membrana celular. (111)

O uso do antioxidante selênio em modelo de trauma cerebral em camundongos inibiu a liberação de ERO e conseqüentemente a apoptose celular. (112)

2.1.10 Alterações inflamatórias, imunológicas e genéticas

O pulmão é um órgão muito suscetível a alterações inflamatórias locais ou sistêmicas. Simultaneamente às alterações hemodinâmicas decorrentes da morte encefálica, ocorre a ativação do sistema imune com o desenvolvimento de uma cascata inflamatória sistêmica por meio de um aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias e conseqüente infiltração leucocitária nos tecidos. (113) A grande maioria dos estudos experimentais confirma um aumento significativo de moléculas inflamatórias e interleucinas imediatamente após a indução de morte encefálica. (33)

Fischer e cols. demonstraram que o lavado broncoalveolar de doadores em morte encefálica apresenta uma concentração média de neutrófilos, IL-8 e genes relacionados ao crescimento α (GRO- α) maior do que o grupo controle e que essas alterações estão relacionadas a uma maior infiltração de neutrófilos no tecido pulmonar. (31) Os autores concluem com base em resultados de outro estudo realizado (114) que o grau de infiltração de neutrófilos no

parênquima pulmonar de pacientes em morte encefálica é mais extenso que de pacientes em ventilação mecânica sem morte encefálica.

Os rins de ratos submetidos a morte encefálica apresentam infiltração leucocitária, mormente, neutrófilos, após 6 horas do evento. (90)

As moléculas de adesão, responsáveis pela interação endotélio-leucócito estão com sua expressão aumentada na morte encefálica (19). A selectina-P, uma molécula precoce de adesão apresenta-se com maior expressão após a morte encefálica e, dessa forma, é aparentemente, responsável pelos eventos subsequentes. Os leucócitos aderidos ao endotélio expressam outras moléculas de adesão como molécula de adesão intercelular (ICAM), proteína de adesão celular vascular (VCAM), e liberam outras citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , interferon gama (IFN- γ) e IL-6. (113) Birks e cols demonstraram que o aumento na expressão de TNF- α no miocárdio do doador é considerado como um preditor de disfunção ventricular direita no receptor com especificidade de 83.3% e sensibilidade de 87.5%. (115)

A expressão de moléculas do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) das classes I e II estão aumentados em virtude do aumento de INF- γ que ocorre após a morte encefálica. Embora uma maior expressão do complexo MHC não determine um aumento na possibilidade de rejeição, ocorre um aumento na imunogenicidade do enxerto via processo de reconhecimento das células T. Um aumento na expressão de antígenos secundário ao dano endotelial inespecífico pode aumentar as chances de uma rejeição aguda. (116)

No entanto, Barklin e cols. não observaram diferença na expressão de interleucinas (TNF- α , IL-6 e IL-10) no tecido renal, hepático e cardíaco após 360 min. de observação entre os grupos controle e morte encefálica. (117)

O TNF- α é considerado o mediador chave do processo de inflamação na morte encefálica. Além de ativar o processo da inflamação, também é responsável pela ativação do processo de pró e anti-apoptose. Hepatócitos de ratos submetidos a morte encefálica apresentaram um aumento na indução de apoptose, mesmo na presença de uma maior expressão nas vias anti-apoptose do NF κ B. (118) A inalação de monóxido de carbono em modelo experimental diminuiu a expressão de TNF- α e IL-6, de moléculas de adesão e vias pró-apoptose, melhorando a relação PaO₂/FiO₂, o excesso de base e a acidose decorrentes da morte encefálica. (119)

Estudos clínicos também sugerem uma maior taxa de apoptose em órgãos oriundos de doadores em morte encefálica. Em estudo recente realizado com 85 pacientes em morte encefálica, os autores concluíram que uma das explicações para a rápida disfunção observada nos órgãos de pacientes em morte encefálica é o aumento na expressão da caspase 9, uma molécula pró-apoptótica. (120)

Os receptores *Toll-like* (TLR) são sensores chaves do sistema imune inato que reconhecem padrões moleculares associados a microorganismos patogênicos como lipopolissacarídeos, lipopeptídeos e ácido nucléico. (121, 122) Entretanto, existem evidências que mesmo na ausência de infecção, células submetidas a algum dano podem liberar moléculas (chamadas de alarminas), capazes de ativar os receptores *Toll-like*. (123) Quando ativados, os receptores *Toll-like*, exceto o TLR-3, determinam o recrutamento das moléculas

de adaptação: proteína de resposta primária de diferenciação mielóide (MyD88) e adaptador de indução de interferon- β (TRIF). Essa interação determina a ativação da via dependente da MyD88, resultando na ativação de fatores de transcrição como a proteína ativadora 1 (AP1) e o fator nuclear kappa beta (NF κ B) e, conseqüentemente, a síntese de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-6 e IFN- γ . (124) A importância do papel do TLR-4 no dano de isquemia/reperfusão pulmonar já foi demonstrado em estudos experimentais. (125) Os TLR-2 e TLR-4 estão expressos nos leucócitos e nos pneumócitos, permitindo que ambas as células possam responder a algum antagonismo desses receptores. (126, 127)

Rostron e cols. conduziram estudo experimental para determinar se a estimulação do sistema dos TLR contribui nas alterações determinadas pela morte encefálica. Os animais foram previamente tratados com agonistas dos TLR: LPS derivado de *Escherichia coli* (agonista seletivo do TLR4) ou lipoproteína sintética de *Mycoplasma* (agonista seletivo TLR2/6) durante 4 dias e após submetidos a morte encefálica por insuflação de cateter com balão. Os resultados demonstraram que a dessensibilização dos TLRs preveniu a hipotensão neurogênica, bem como, a acidose metabólica. Além disso, reduziu os níveis da citocinas CXCL1 e TNF- α no lavado broncoalveolar. A dessensibilização da TLR4 reduziu também a expressão da molécula de adesão integrina CD 11b nos neutrófilos. Na avaliação do tecido pulmonar, a inibição da TLR4 limitou a expressão das citocinas IFN- γ , IFN- β e CXCL10, enquanto que a dessensibilização dos TLR2/6 reduziram apenas a expressão do IFN- γ . (32)

A análise dos perfis de expressão gênica em pulmões de doadores em morte encefálica e doadores após parada cardíaco-respiratória demonstrou uma maior ativação das vias inflamatórias no grupo de doadores em morte encefálica. (128) Outro estudo realizado entre pacientes em morte encefálica e voluntários não observou aumento na expressão de genes relacionados a inflamação no tecido muscular esquelético, mas demonstrou uma maior ativação de genes pró-apoptose. (120)

Quadro 2. Resumo das alterações decorrentes da morte encefálica

- Alterações hemodinâmicas
 - Fase hipertensiva
 - Bradicardia inicial
 - Hipertensão
 - Taquicardia
 - Vasoconstrição periférica
 - Fase de hipotensão sustentada
 - Hipotensão
 - Vasodilatação periférica
 - Diminuição contratilidade cardíaca
 - Menor perfusão tecidual
- Alterações endócrinas
 - Aumento
 - Catecolaminas e hormônio atrial natriurético
 - Diminuição
 - hormônios tireoidianos, insulina, vasopressina e cortisol
- Alterações morfológicas pulmonares
 - Ruptura da membrana alvéolo-capilar (aguda)
 - Aumento reserva capilar pulmonar
 - Infiltração leucocitária intersticial
 - Infiltração peribronquiolar e perivascular (rejeição crônica)

- Alterações metabólicas
 - Metabolismo anaeróbico (acidose láctica)
 - Liberação de espécies reativas de oxigênio
- Alterações inflamatórias e imunológicas
 - Aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias
 - Aumento na expressão de moléculas de adesão leucocitária
 - Aumento na expressão de receptores *Toll-like*
- Alterações genéticas
 - Aumento na expressão de genes relacionados a apoptose
 - Aumento na expressão de genes relacionados a inflamação

2.1.11 Morte encefálica e ressuscitação hormonal em estudos experimentais

Wigfield e cols. foram os primeiros a evidenciar que o dano pulmonar no doador em decorrência da morte encefálica pode ser modulado com o uso de corticóide. Demonstraram que a administração de metilprednisolona após a indução de morte encefálica em modelo de transplante pulmonar em ratos é capaz de diminuir a resistência vascular pulmonar, a celularidade e a expressão de polimorfonucleares CD 11b e 18 no lavado broncoalveolar, além de melhorar a troca gasosa do enxerto. (36)

A administração de metilprednisolona em porcos submetidos à morte encefálica foi capaz de inibir a cascata pró-inflamatória induzida pelo insulto (129) e melhorar a função ventricular sistólica e diastólica. (130)

A eritropoietina é uma citocina endógena com propriedades anti-apoptóticas, anti-inflamatórias e neurotróficas, estando presente no tecido cerebral após eventos como hipoxemia, isquemia cerebral e hemorragia subaracnóide (131). Yildirim e cols concluíram que o uso desse anti-oxidante em modelo animal de trauma cerebral direto tem ação protetora sobre o

epitélio respiratório da mucosa traqueobrônquica. (132) Em rins de ratos submetidos a morte encefálica, a eritropoietina mostrou-se eficaz em diminuir a expressão de genes inflamatórios e a infiltração de polimorfonucleares. (133)

2.1.12 Morte encefálica e ressuscitação hormonal em estudos clínicos

Trabalho retrospectivo realizado com os registros da base de dados da *California Transplant Donor Network* analisou 251 doadores de órgãos torácicos (coração, pulmão e coração-pulmão) entre os anos de 1995 a 1997. Ausculta pulmonar limpa, curto tempo entre a admissão e a morte encefálica, curto tempo entre a morte encefálica e a retirada do órgão, ausência de obesidade e administração de metilprednisolona foram fatores que por meio de uma análise univariada se correlacionaram significativamente com a obtenção de enxertos aptos para transplante. No entanto, quando esses fatores foram avaliados em uma análise multivariada, ausculta pulmonar limpa (OR = 2.1 [1.3 – 3.4], p= 0.008) e administração de metilprednisolona (OR = 3.0 [1.9 – 4.9], p<0.001) foram os únicos preditores independentes significativos de sucesso na obtenção de órgãos em condições para transplante, sendo esse último o preditor com maior poder estatístico. (38)

Follete e cols. realizaram um estudo retrospectivo em 118 doadores consecutivos em morte encefálica e observaram que o grupo de doadores que recebeu altas doses de corticóide apresentou melhora na PaO_2/FiO_2 , além de um aumento no número de pulmões utilizados bilateralmente. (39) Outro estudo retrospectivo realizado com 133 pacientes concluiu que a administração

precoce de metilprednisolona diminuiu estatisticamente a necessidade de suporte vasoativo. (134)

Com o mesmo objetivo de obter maior número de órgãos viáveis para transplante Venkateswaran e cols. realizaram um ensaio clínico randomizado em 182 potenciais doadores divididos em 4 grupos: metilprednisolona, triiodotironina, metilprednisolona associada a triiodotironina e placebo. Concluíram que um manejo ativo e precoce em potenciais doadores aumenta o número de órgãos para transplante e que o uso de corticóide endovenoso reduz a progressão do edema pulmonar (40). Conclusão semelhante foi obtida por Rosendale e cols. e publicada em dois estudos semelhantes. (135, 136) Por meio da análise do banco de dados da *United Network for Organ Sharing/Organ Procurement and Transplantation Network* os autores concluíram que o uso de vasopressina, metilprednisolona e triiodotironina está associado a um aumento no número de corações viáveis para transplante. No outro estudo, observaram que a ressuscitação hormonal (infusão de vasopressina, metilprednisolona e triiodotironina) aumenta significativamente a disponibilidade de órgãos em potenciais doadores. A análise multivariada demonstrou aumento nas chances de doação de 7,3% para rim, 4,7% para coração, 4,9% para fígado, 6% para pâncreas e 2,8% para pulmão.

Em artigo de revisão da literatura sobre o manejo de pacientes candidatos a doação de órgãos, Kutsogiannis e cols. concluem que cuidados hemodinâmicos e ventilatórios agressivos, além do uso da terapia hormonal aumentam a disponibilidade de órgãos para transplante, bem como a sobrevida do enxerto. (137)

O estudo da ressuscitação hormonal em pacientes com diagnóstico de morte encefálica e instabilidade hemodinâmica foi avaliado por um grupo da Califórnia. O protocolo de pesquisa compreendia a infusão rápida de 1 ampola de glicose 50%, 2 g de succinato de metilprednisolona, 20 U de insulina e 20 µg de levotiroxina, seguido de uma infusão contínua de 10 µg/h de levotiroxina em potenciais doadores que necessitassem de altas doses de vasopressores (infusão de noradrenalina acima de 10 µg/kg/min). Os resultados do estudo apontaram uma redução significativa na dose de vasopressor ($p=0.02$), sendo que em 53% dos pacientes a infusão de vasopressores pode ser suspensa. As críticas a esse estudo são a ausência de randomização e de grupo controle (138). Novitzky obteve resultados semelhantes em outro estudo clínico, onde o grupo de potenciais doadores tratados com 2 µg de T3, 100 mg de cortisol e 20 U de insulina a cada hora necessitou menor dose de inotrópicos e de bicarbonato de sódio, sendo os órgãos de todos os pacientes ($n=21$) utilizados para transplante (coração, pulmão e rim). No entanto, no grupo controle ocorreu uma perda de 20% de potenciais doadores por deterioração cardiovascular e fibrilação ventricular. (139)

2.2 Edema Pulmonar Neurogênico

2.2.1 Definição

O edema pulmonar neurogênico é uma complicação bem reconhecida de um dano ao Sistema Nervoso Central (SNC), sendo definido como um edema pulmonar agudo que ocorre imediatamente após um dano neurológico central. Foi inicialmente reconhecido por Shanahan como uma complicação de

convulsões epiléticas no início do século passado. (19) Normalmente ocorre em pacientes sem doença cardio-pulmonar prévia e está associado a um aumento na pressão intra-craniana e a uma taxa de mortalidade entre 60 a 100%. (140)

2.2.2 Epidemiologia

Qualquer dano cerebral ou medular agudo pode resultar em edema pulmonar neurogênico. São causas comuns: hemorragia sub-aracnoidéia, traumatismo crânio encefálico, dano medular cervical, trombose cerebral, embolia gasosa cerebral, hemorragia intra-cerebral, tumor cerebral, estado epilético, cirurgia intra-craniana, encefalite, meningite e esclerose múltipla. (30, 141)

É estimado que ocorra em cerca de 1% dos pacientes vítimas de traumatismo crânio encefálico, 71% após hemorragia cerebral e em cerca 2% das vítimas de convulsão. (140)

A hemorragia sub-aracnoidéia aguda é considerada uma das principais causas de edema pulmonar neurogênico. Essa alteração pulmonar pode ocorrer em até 23% dos pacientes, sendo 6% na forma grave. Em virtude da presença de hipóxia, a mortalidade associada é cerca de 10%. Além disso, observou-se a presença do edema pulmonar neurogênico em 90% dos óbitos decorrentes de hemorragia sub-aracnoidéia aguda. (142) O edema pulmonar neurogênico normalmente ocorre entre o primeiro e sétimo dia após o sangramento. Clinicamente, os principais fatores de risco para o desenvolvimento do edema pulmonar neurogênico são gravidade clínica e radiológica da hemorragia sub-aracnoidéia. Além disso, existe uma correlação

positiva entre com a idade do paciente, demora até a intervenção cirúrgica e a hidratação excessiva. (143)

O edema pulmonar neurogênico tem sido reportado em até 20% dos casos graves de traumatismo crânio encefálico (escala de coma de Glasgow < 8). (144) A incidência de edema pulmonar neurogênico em vítimas fatais de traumatismo crânio encefálico isolado é de cerca de 32%. (145)

As alterações pulmonares associadas ao aumento da pressão intracraniana são de extrema relevância em potenciais doadores em morte encefálica. Nesses pacientes, o edema pulmonar neurogênico e a infecção pulmonar são as duas principais causas de não utilização de pulmões para transplante. Assim, apenas 20% dos pulmões de doadores de múltiplos órgãos são utilizados para transplante. (4)

Alguns autores relatam que o edema pulmonar neurogênico pode ocorrer em até um terço dos pacientes em estado epilético (146), geralmente no período pós-ictal, outros referem ser esta a causa mais freqüente de edema pulmonar neurogênico. (147)

2.2.3 Modelos experimentais

A utilização de modelos experimentais como forma de estabelecer a fisiopatologia e estudar possíveis intervenções terapêuticas no edema pulmonar neurogênico iniciaram por Cameron e De em 1949. (19)

Esses modelos podem ser classificados como específicos ou não-específicos. Os modelos específicos compreendem a destruição ou estimulação de determinadas áreas cerebrais. (148, 149) Já os modelos não

específicos utilizam métodos de dano maciço ao SNC, convulsões ou dano sub-maciço ao SNC.

O dano maciço compreende injeção intra-cisterna magna de determinados irritantes como trombina, fibrinogênio, veratrina (neurotoxina obtida de raízes de determinadas plantas e ativadora dos canais de Na^+), albumina, sangue autólogo, acotinina (neurotoxina ativadora dos canais de Na^+ , utilizada em modelos de arritmia cardíaca). (142, 150-153) A injeção de sangue autólogo ou albumina na cisterna magna de ratos em diferentes velocidades (modelo de hemorragia sub-aracnoidea) demonstrou que o aumento na permeabilidade capilar pulmonar independe da velocidade ou da substância infundida. (142) Modelos com a utilização de trauma cerebral contuso ou concussão cerebral também foram estabelecidos. (154, 155) Além dos modelos citados, o dano maciço ao SNC pode ser determinado pela insuflação intra-craniana de cateter com balão, semelhante aos modelos experimentais utilizados em morte encefálica.

O dano sub-maciço ao SNC, modelo pouco utilizado, consiste em aumento gradual da pressão intra-craniana (150mmHg) por infusão controlada de líquido céfalo-raquidiano diretamente na cisterna magna. (156) Outro modelo não específico estabelecido para o estudo do edema pulmonar neurogênico consiste na indução de convulsões por administração de bicuculina, um antagonista do receptor GABA_A . (157, 158)

Mais recentemente, modelos de trauma medular determinado por insuflação de cateter posicionado no espaço epidural da coluna torácica de ratos foram estabelecidos para o estudo do edema pulmonar neurogênico associado ao trauma raquimedular. (159, 160)

Os estudos realizados com esses modelos experimentais definiram dois mecanismos possivelmente responsáveis pelo edema pulmonar neurogênico: o mecanismo hemodinâmico (*“Blast injury theory”*) e o mecanismo inflamatório.

2.2.4 Fisiopatologia

A fisiopatologia desse mecanismo tem sido debatida por anos e ainda não está totalmente elucidada. Acredita-se que ocorra em virtude de um aumento na pressão hidrostática induzida pela liberação de catecolaminas ou por um aumento na permeabilidade capilar decorrente da ação direta das catecolaminas circulantes e/ou pela liberação de mediadores inflamatórios. (35) Dessa forma, pelo menos, dois mecanismos principais parecem coexistir na gênese do edema pulmonar neurogênico em decorrência do rápido aumento na pressão intra-craniana e conseqüente diminuição na perfusão cerebral. (30)

Do ponto de vista anatômico, as zonas cerebrais de gatilho para o edema pulmonar neurogênico são o hipotálamo e a medula oblonga (bulbo). Duas regiões na medula oblonga: parte ventral (grupo de neurônios catecolaminérgicos A1) e parte dorsal (núcleo reticulado medial, núcleo motor dorsal do vago e núcleo do trato solitário). Já no hipotálamo, a região posterior é o local de grande ativação simpática por isquemia e hemorragia. (161)

2.2.5 Mecanismo hemodinâmico

O mecanismo hemodinâmico está associado a uma intensa vasoconstrição pulmonar decorrente da descarga adrenérgica resultante do dano cerebral. Essa estimulação simpática aumenta a pressão hidrostática pulmonar e, conseqüentemente, a permeabilidade vascular, mesmo após a

depleção intra-neuronal das reservas de catecolaminas, indicando, dessa forma, que outros mediadores também são responsáveis pelo edema pulmonar neurogênico. Esses mediadores estão associados a um mecanismo inflamatório, também responsável pelo aumento na permeabilidade capilar pulmonar e, conseqüentemente, edema pulmonar. (162)

O mecanismo hemodinâmico é chamado de a teoria da lesão por explosão ("*Blast injury theory*"). Essa definição foi publicada por Theodore e Robin em 1975, os autores concluíram que a massiva descarga simpática resultante do trauma cerebral determinava a passagem do sangue da circulação sistêmica (alta resistência) para a circulação pulmonar (baixa resistência) causando o edema pulmonar. (163)

O aumento súbito na pressão intra-craniana induz a uma resposta α -adrenérgica a qual resulta em um aumento transitório, porém importante na vasoconstrição venosa e arterial tanto pulmonar quanto sistêmica. Esse impressionante aumento na pressão vascular pulmonar determina uma alteração nas Forças de Starling pulmonar com resultante passagem de líquido para o espaço alveolar e o interstício pulmonar. Esse edema hidrostático ocorre quando a pressão trans-mural excede 40mmHg. Inicialmente se observa dano ao endotélio capilar pulmonar, seguido por dano da membrana basal dos capilares alveolares e finalmente dano ao epitélio alveolar o que resulta em extravasamento de hemácias e proteínas de alto peso para o espaço alveolar. (164)

Essas alterações na circulação pulmonar são frequentemente associadas a um comprometimento cardíaco. Por meio de monitoramento invasivo observa-se um aumento no trabalho cardíaco seguido por uma

marcada depressão miocárdica. Alterações na contratilidade ventricular esquerda explicam a instabilidade hemodinâmica geralmente associada a esse aumento na carga hídrica e uma pobre reserva funcional miocárdica aumenta o risco de edema pulmonar nesses casos. (28) Arritmias cardíacas graves e até mesmo parada cardiorrespiratória estão descritas. (165)

Embora pulmões, átrio e ventrículo esquerdos contenham normalmente 24% da volemia circulante, esse volume pode aumentar até 72% em virtude das alterações hemodinâmicas decorrentes da morte encefálica. Essas alterações determinam um aumento de pressão no átrio esquerdo acima da pressão arterial pulmonar que em associação ao aumento do fluxo sanguíneo pulmonar resultam em ruptura da integridade dos capilares pulmonares e conseqüentemente hemorragia intersticial septal pulmonar. (23)

A descarga adrenérgica também promove uma constrição venosa pulmonar, o que contribui para um aumento na pressão capilar pulmonar. (166)

Segundo Avlonitis, a Teoria da Lesão por Explosão (*"Blast injury theory"*) é simples e explica a coexistência de dois mecanismos no edema pulmonar neurogênico: a alta permeabilidade e o hidrostático. O grau de hipertensão capilar irá determinar se as Forças de Starling irão aumentar o fluxo de água através do endotélio ou se o dano estrutural da parede dos capilares irá permitir a passagem de plasma e até mesmo hemácias para interstício ou espaço alveolar. Por outro lado essa teoria não exclui a existência de um segundo mecanismo no qual uma estimulação α -adrenérgica agiria diretamente alterando a permeabilidade capilar pulmonar. (19)

A resposta hemodinâmica ao dano do tronco cerebral e o edema pulmonar neurogênico resultante podem ser inibidos por bloqueio α -

adrenérgico, secção da medula espinhal, secção dos nervos esplâncnicos e bloqueio raquimedular, porém não são inibidos pela adrenalectomia ou por β -bloqueadores. Esses achados são conclusivos de que a noradrenalina liberada pela extremidade distal do neurônio simpático é o mediador e não a liberada pela glândula adrenal. (30, 167)

A noradrenalina e o neuropeptídeo Y são neurotransmissores localizados em grandes vesículas densas nas extremidades distais dos nervos simpáticos, sendo secretados em grandes quantidades durante a tempestade simpática (*“sympathetic storm”*) devido a exposição do SNC a algum tipo de dano. Ambos são potentes vasoconstritores e estão, dessa forma, associados a um aumento na permeabilidade capilar pulmonar. (5, 168, 169)

O dano vascular endotelial promove a liberação de endotelina-1, considerada um dos mais potentes vasoconstritores. Em modelo de edema pulmonar neurogênico por indução de epilepsia observou-se que existe um aumento tempo-dependente nos níveis de endotelina-1 no lavado broncoalveolar. Além disso, o pré-tratamento com um inibidor da enzima conversora de endotelina-1 possui efeito protetor diminuindo a quantidade desse vasoconstritor no lavado broncoalveolar. (157) Outro estudo demonstrou que a instilação intra-traqueal de endotelina-1 pode aumentar em até 22 vezes a permeabilidade vascular pulmonar resultando em edema pulmonar. No entanto, a administração endovenosa não resultou em edema pulmonar. O pré-tratamento com um antagonista seletivo de endotelina impediu o aumento na permeabilidade pulmonar, bem como, o edema pulmonar. (170)

O papel do óxido nítrico também tem sido implicado na etiologia do edema pulmonar neurogênico. Tanto modelos de trauma cerebral direto,

quanto de trauma medular demonstraram que a administração de inibidores da produção de óxido nítrico resulta em aumento na permeabilidade capilar e aumento no edema pulmonar. Além disso, a administração de L-arginina, precursor do óxido nítrico resulta em menor grau de edema, demonstrando assim o papel protetor do óxido nítrico em relação ao edema pulmonar neurogênico. (171-173)

2.2.6 Mecanismo inflamatório

Simultaneamente a resposta hemodinâmica, uma resposta inflamatória sistêmica ocorre na gênese do edema pulmonar neurogênico. Citocinas e quimiocinas cerebrais têm sido associadas a esta resposta inflamatória. No entanto, se a origem dessas citocinas e fatores quimiotáticos produzidos após o dano cerebral é central ou periférica ainda é motivo de discussão. (30)

Um dano cerebral importante induz uma reação inflamatória local com produção e liberação de citocinas, tais como, fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina (IL)-1 β e IL-6 pelas células da microglia e astrócitos. (174) Essas moléculas inflamatórias têm acesso a circulação sistêmica após a ruptura da barreira hemato-encefálica e dessa forma estimulam células alvo no sangue e em órgãos periféricos. (175) Dano importante ao SNC, como, na morte encefálica, resulta em aumento na expressão de IL-1, IL-2, IL-6, TNF- α , e interferon- γ em órgãos periféricos, incluindo o pulmão. (90)

Após o evento do dano cerebral, as primeiras citocinas produzidas pelos macrófagos alveolares através da ativação do fator NF- κ B são a IL-1 e o TNF- α e ambas estão implicadas na patogênese de dano pulmonar agudo (116) Essas citocinas ativam as células endoteliais a expressar moléculas de adesão

como a molécula-1 de adesão intercelular (ICAM-1), selectina-P e selectina-E. Também são as moléculas responsáveis pela ativação da produção de IL-8 pelas células endoteliais e células epiteliais da membrana alvéolo-capilar. Sabe-se que a IL-8 é um potente ativador de neutrófilos, podendo mediar a expressão das integrinas- β 2 CD-18 e CD11 β , dessa forma, os neutrófilos ligam-se às células endoteliais e migram para o interstício e espaços alveolares do pulmão determinando a liberação de espécies reativas de oxigênio, enzimas proteolíticas e outras citocinas. (176) Um nível elevado de IL-8 no lavado broncoalveolar está associado à Síndrome da Distrição Respiratória Aguda (177), à morte encefálica (31), à disfunção precoce do enxerto e à mortalidade precoce do receptor. (178)

Uma marcada liberação de interleucina-1 β pode ser detectada por meio de microdiálise cerebral após 60 min. de dano cerebral em modelo de trauma cerebral em ratos. (179) Modelos de dano cerebral por impacto cortical controlado induzem a expressão dos neuropeptídeos substância P e neurocinina A no córtex frontal dos animais (180). Tais peptídeos provocam broncoconstrição e edema na mucosa brônquica, além de aumento da permeabilidade capilar pulmonar, edema pulmonar e ativação leucocitária. (181)

Em modelo de morte encefálica não aguda em suínos Barklin e cols. não observaram diferença entre os dois grupos (controle e morte encefálica) em relação aos parâmetros ecocardiográficos. Dessa forma, concluem que o edema pulmonar não decorre de disfunção cardíaca. Outra conclusão importante desse estudo é a correlação entre o nível de neuropeptídeos Y no lavado broncoalveolar e o edema pulmonar, sugerindo uma liberação e ação

local (aumento da permeabilidade capilar) e não uma ação como um vasoconstritor sistêmico. Em virtude dos níveis normais de PaO₂ observados no grupo morte encefálica, os autores sugerem que o local de ação do neuropeptídeo Y seria primariamente como um vasoconstritor pós-capilar e não diretamente no endotélio capilar. (35)

Outra evidência que corrobora com a importância do mecanismo inflamatório na gênese do edema pulmonar neurogênico são estudos clínicos e experimentais que demonstraram benefício com o uso anti-inflamatório dos corticosteróides. (36, 37, 153)

2.2.7 Conexão entre os mecanismos simpático, hemodinâmico e inflamatório

Segundo Avlonitis, ambos os mecanismos desencadeantes do edema pulmonar neurogênico e a lesão pulmonar aguda resultante estão relacionados. O estímulo adrenérgico resultante da tempestade de catecolaminas pode determinar edema pulmonar neurogênico pela alteração simpática direta da permeabilidade dos capilares pulmonares ou pelos seus efeitos hemodinâmicos. Ao mesmo tempo, a morte encefálica induz a resposta inflamatória, que pode ser resultado da isquemia cerebral ou ser originada nos efeitos hemodinâmicos da tempestade de catecolaminas (Figura1). (19)

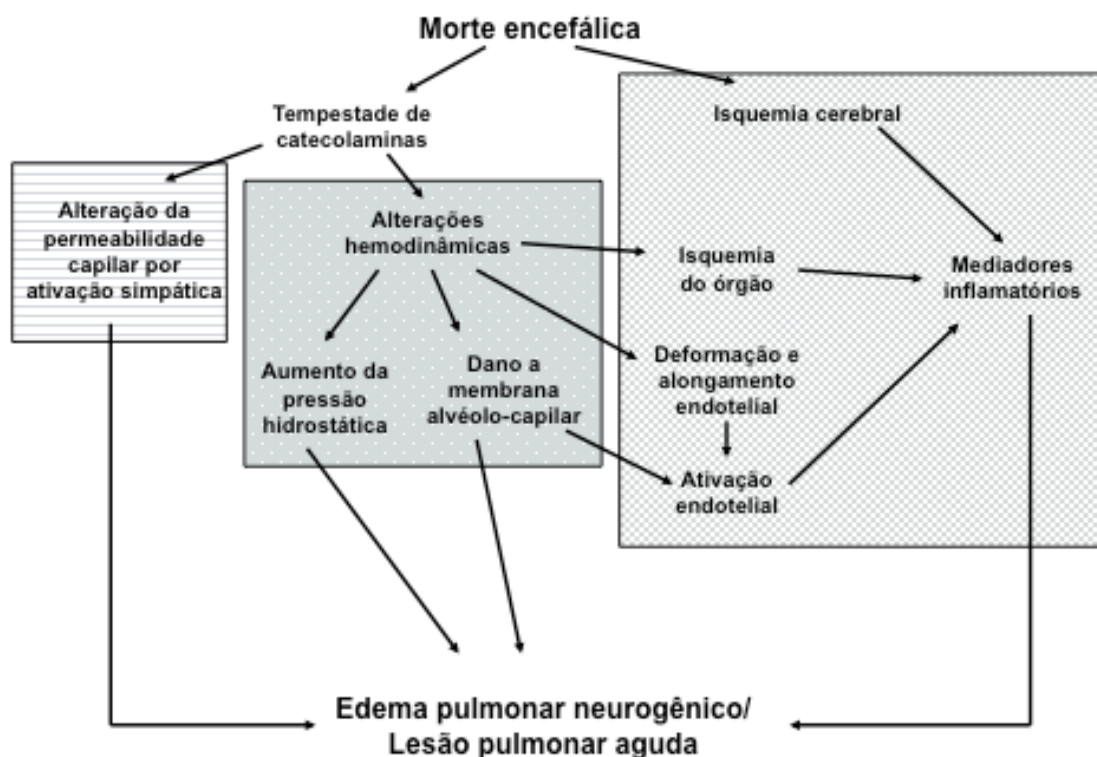


Figura 1. Os três possíveis mecanismos (simpático, hemodinâmico e inflamatório) da lesão pulmonar resultante da morte encefálica e suas inter-relações. O estímulo adrenérgico resultante da tempestade de catecolaminas pode causar edema pulmonar neurogênico tanto pela alteração simpática direta da permeabilidade dos capilares pulmonares (caixa hachurada a esquerda) ou pelos seus efeitos hemodinâmicos (caixa hachurada central). Ao mesmo tempo, a morte encefálica induz a resposta inflamatória (caixa hachurada a direita), que pode ser resultado da isquemia cerebral ou ser originada nos efeitos hemodinâmicos da tempestade de catecolaminas. Modificado de Avlonitis e cols. (19)

Os mediadores pró-inflamatórios liberados na circulação sistêmica após um dano cerebral como na morte encefálica, são muito provavelmente, os responsáveis pela cascata inflamatória observada nos órgãos periféricos. Estudo experimental demonstrou aumento na expressão de moléculas de inflamação linfocitárias e leucocitárias nos animais controles que receberam circulação cruzada de animais submetidos a morte encefálica. (90)

A isquemia cerebral focal ou global libera localmente fatores inflamatórios como IL-1 β e TNF- α que atuam paralelamente às alterações hemodinâmicas (fenômeno adrenérgico) na gênese do edema pulmonar neurogênico. (182) Essas citocinas são indutoras da produção de IL-6 e um estudo clínico concluiu que o nível sérico de IL-6 na veia jugular de pacientes internados em unidade de tratamento intensivo após trauma cerebral é maior que o nível presente no sangue arterial. (183) Esses achados corroboram a hipótese de produção e liberação de IL-6 em nível cerebral, sendo essa uma interleucina presente em altos níveis no lavado broncoalveolar de pacientes com síndrome da restrição respiratória. (184, 185)

Outro trabalho clínico concluiu que pacientes vítimas de acidente vascular cerebral apresentaram aumento na expressão das IL-1 β , IL-8 e IL-17 nas células mononucleares periféricas. (186) Dessa forma, conclui-se que a isquemia cerebral ativa os leucócitos da circulação periférica a produzir e liberar citocinas inflamatórias.

A tempestade simpática por meio de seus efeitos hemodinâmicos pode ativar a resposta inflamatória tanto pela ativação do endotélio, quanto pela isquemia de órgãos periféricos. A administração de antagonistas das selectinas-P e E impediu a expressão de citocinas inflamatórias em órgãos periféricos de ratos submetidos a morte encefálica. (90) Conclui-se, portanto, que existe uma evidente associação entre a ativação endotelial e a cascata inflamatória. No entanto, esses achados não elucidam totalmente a etiologia da ativação endotelial. Avlonitis acredita que as alterações hemodinâmicas resultantes da tempestade autonômica podem ativar as células endoteliais resultando em produção de espécies reativas de oxigênio, ativação do receptor

NF- κ B e aumento na expressão de moléculas de adesão e de citocinas inflamatórias. (19)

Em modelo experimental de trauma cerebral direto, os animais foram randomizados em 5 grupos (controle; sham; 2h, 8h e 24h pós trauma). Interessantemente, a quantificação de ERO no tecido pulmonar demonstrou diferença significativa apenas 24h após o trauma. (187)

2.2.8 Alterações morfológicas

Em modelo de trauma cerebral, Yildirim e cols. observaram, por meio de microscopia eletrônica, que o dano celular já está presente 2 horas após a lesão cerebral, deteriorando-se nas 24 horas subseqüentes. Não observaram alterações na ultra-estrutura do pneumócito tipo I e na membrana alvéolo-capilar. Entretanto, o pneumócito tipo II apresentou intenso edema intracelular, traduzido por dilatação do Complexo de Golgi e retículo endoplasmático liso e edema mitocondrial. (187)

2.2.9 Tratamento

O edema pulmonar neurogênico pode apresentar resolução em 48-72h com a instalação de tratamento apropriado. O manejo inicial do edema pulmonar neurogênico deve objetivar o controle do evento cerebral subjacente, sendo uma craniotomia descompressiva ou o tratamento das convulsões, exemplos. (30)

A escolha da ventilação apropriada será dependente do nível de consciência do paciente e o grau de gravidade do dano pulmonar. Dessa forma, alguns pacientes serão manejados com ventilação não invasiva e outros

com entubação traqueal, sedação e uso de PEEP. Valores de PEEP menores que 15 cm H₂O são preconizados por não impedirem a perfusão cerebral. (188) A hipercapnia permissiva e a ventilação em prona devem ser realizadas com cautela sempre mantendo a pressão intra-craniana em níveis normais. (189, 190)

Em relação a função hemodinâmica, o tratamento deve objetivar diminuição da pré e pós-carga, além de aumento da contratilidade cardíaca. Sendo necessária uma diminuição da pressão arterial, drogas vasodilatadores cerebrais não devem ser utilizadas. O uso de esmolol como tratamento da crise hipertensiva decorrente da “tempestade autonômica” aumentou a probabilidade de sucesso do transplante cardíaco em um estudo de coorte. (191) No entanto, o uso de β -bloqueadores deve ser proscrito em pacientes com evidência de insuficiência cardíaca pós-tempestade simpática. (30) A dobutamina mostrou-se benéfica no manejo dos pacientes com edema pulmonar neurogênico em estudo retrospectivo. Os pacientes tratados com dobutamina apresentaram reversão da depressão miocárdica, diminuição da elevação da pressão arterial pulmonar e aumento na razão PaO₂/FiO₂ após 6h de início da infusão, além desses achados, não apresentaram comprometimento de perfusão e oxigenação cerebral. (192) Estudos experimentais indicam que o uso de adrenalina ou noradrenalina não piora o quadro do edema pulmonar neurogênico, além de não aumentar a permeabilidade vascular pulmonar, apesar de aumentar a pressão capilar pulmonar. (193) Outro estudo experimental concluiu que a adrenalina produzida pela adrenal aumenta o clearance do líquido alveolar por estimular o transporte de Na⁺, sugerindo participação da adrenalina endógena na resolução do quadro de edema

pulmonar neurogênico. (194) Diuréticos podem ser utilizados desde que mantenha-se pressão arterial e pressão de perfusão cerebral adequadas. Em recente estudo, Minambres e cols. concluíram que em doadores de múltiplos órgãos um balanço hídrico positivo entre o momento da morte encefálica e a retirada dos órgãos não diminui o risco de disfunção precoce ou tardia do enxerto renal. Dessa forma, uma restrição hídrica que mantenha uma pressão venosa central menor de 6mmHg é uma estratégia para diminuir o risco de edema pulmonar neurogênico. (195)

O uso de lidocaína intratecal em ratos submetidos a morte encefálica inibiu o colapso cardiovascular e diminuiu, estatisticamente, as áreas de edema pulmonar, quando comparado ao grupo controle. (196)

Em modelo experimental de hemorragia subaracnóidea em camundongos, a inibição da caspase-1 evitou apoptose celular pulmonar e o edema pulmonar neurogênico. (197)

O objetivo principal do manejo neurológico deve ser diminuir a hipertensão intra-craniana mantendo uma pressão de perfusão cerebral adequada. O manitol e a solução salina hipertônica são geralmente utilizados com esse objetivo. A infusão contínua de solução salina hipertônica (5% ou 7,5%) mostrou-se superior ao manitol em diminuir os edemas cerebral e pulmonar em modelo de infarto cerebral extenso por oclusão carotídea. (198)

3. Justificativa

O transplante pulmonar é a última opção terapêutica para pacientes com doença pulmonar em estágio terminal. A maioria dos órgãos utilizados em transplante são retirados de doadores em morte encefálica e menos de 20% dos potenciais doadores apresentam pulmões apropriados para o transplante, sendo este um dos principais limitadores da expansão dos programas de transplante pulmonar.

Estudos clínicos e animais demonstram que a morte encefálica promove alterações inflamatórias nos órgãos periféricos e especialmente nos pulmões e que a administração de corticosteróide nos doadores em morte encefálica pode melhorar a viabilidade pulmonar.

O estabelecimento de um modelo experimental de morte encefálica é fundamental no desenvolvimento de linhas de pesquisa relacionadas a preservação pulmonar e transplante pulmonar, pois aproxima os estudos experimentais da realidade clínica.

Pesquisas para elucidar os danos da morte encefálica sobre a viabilidade pulmonar e formas de tratamento são fundamentais para o desenvolvimento dos programas de transplante.

4. Objetivos

4.1 Objetivos Geral

Avaliar os efeitos do tratamento com metilprednisolona em pulmões de ratos submetidos a modelo de morte encefálica.

4.2 Objetivos Específicos

Avaliar os efeitos de dois diferentes períodos de administração de metilprednisolona sobre pulmões de ratos submetidos a morte encefálica.

Analisar a influência do tratamento com metilprednisolona sobre estresse oxidativo em pulmões de ratos submetidos a morte encefálica.

Analisar a influência do tratamento com metilprednisolona sobre atividade inflamatória em pulmões de ratos submetidos a morte encefálica.

5. Referências Bibliográficas

1. Aigner C, Seebacher G, Klepetko W. Lung transplantation. Donor selection. *Chest Surg Clin N Am.* 2003 Aug;13(3):429-42.
2. Trulock EP, Christie JD, Edwards LB, Boucek MM, Aurora P, Taylor DO, et al. Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-fourth official adult lung and heart-lung transplantation report-2007. *J Heart Lung Transplant.* 2007 Aug;26(8):782-95.
3. Sundaresan S, Trachiotis GD, Aoe M, Patterson GA, Cooper JD. Donor lung procurement: assessment and operative technique. *Ann Thorac Surg.* 1993 Dec;56(6):1409-13.
4. Chakinala MM, Kollef MH, Trulock EP. Critical Care Aspects of Lung Transplant Patients. *J Intensive Care Med.* 2002;17:8-33.
5. Avlonitis VS, Wigfield CH, Kirby JA, Dark JH. The hemodynamic mechanisms of lung injury and systemic inflammatory response following brain death in the transplant donor. *Am J Transplant.* 2005 Apr;5(4 Pt 1):684-93.
6. Fernandes PM, Samano MN, Junqueira JJ, Waisberg DR, Noletto GS, Jatene FB. [Lung donor profile in the State of Sao Paulo, Brazil, in 2006]. *J Bras Pneumol.* 2008 Jul;34(7):497-505.
7. Thabut G, Vinatier I, Stern JB, Leseche G, Loirat P, Fournier M, et al. Primary graft failure following lung transplantation: predictive factors of mortality. *Chest.* 2002 Jun;121(6):1876-82.
8. Christie JD, Bavaria JE, Palevsky HI, Litzky L, Blumenthal NP, Kaiser LR, et al. Primary graft failure following lung transplantation. *Chest.* 1998 Jul;114(1):51-60.
9. Cottini SR, Lerch N, de Perrot M, Treggiari MM, Spiliopoulos A, Nicod L, et al. Risk factors for reperfusion injury after lung transplantation. *Intensive Care Med.* 2006 Apr;32(4):557-63.
10. Christie JD, Sager JS, Kimmel SE, Ahya VN, Gaughan C, Blumenthal NP, et al. Impact of primary graft failure on outcomes following lung transplantation. *Chest.* 2005 Jan;127(1):161-5.
11. Fiser SM, Tribble CG, Long SM, Kaza AK, Kern JA, Jones DR, et al. Ischemia-reperfusion injury after lung transplantation increases risk of late

bronchiolitis obliterans syndrome. *Ann Thorac Surg.* 2002 Apr;73(4):1041-7; discussion 7-8.

12. Clark SF, Martin S, Carozzi AJ, Hill MM, James DE. Intracellular localization of phosphatidylinositide 3-kinase and insulin receptor substrate-1 in adipocytes: potential involvement of a membrane skeleton. *J Cell Biol.* 1998 Mar 9;140(5):1211-25.

13. Eppinger MJ, Deeb GM, Bolling SF, Ward PA. Mediators of ischemia-reperfusion injury of rat lung. *Am J Pathol.* 1997 May;150(5):1773-84.

14. de Perrot M, Liu M, Waddell TK, Keshavjee S. Ischemia-reperfusion-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003 Feb 15;167(4):490-511.

15. Terasaki PI, Cecka JM, Gjertson DW, Takemoto S. High survival rates of kidney transplants from spousal and living unrelated donors. *N Engl J Med.* 1995 Aug 10;333(6):333-6.

16. Zweers N, Petersen AH, van der Hoeven JA, de Haan A, Ploeg RJ, de Leij LF, et al. Donor brain death aggravates chronic rejection after lung transplantation in rats. *Transplantation.* 2004 Nov 15;78(9):1251-8.

17. Wauters S, Verleden GM, Belmans A, Coosemans W, De Leyn P, Nafteux P, et al. Donor cause of brain death and related time intervals: does it affect outcome after lung transplantation? *Eur J Cardiothorac Surg.* 2011 Apr;39(4):e68-76.

18. Neyrinck AP, Van De Wauwer C, Geudens N, Rega FR, Verleden GM, Wouters P, et al. Comparative study of donor lung injury in heart-beating versus non-heart-beating donors. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2006 Oct;30(4):628-36.

19. Avlonitis VS, Fisher AJ, Kirby JA, Dark JH. Pulmonary transplantation: the role of brain death in donor lung injury. *Transplantation.* 2003 Jun 27;75(12):1928-33.

20. de Perrot M, Bonser RS, Dark J, Kelly RF, McGiffin D, Menza R, et al. Report of the ISHLT Working Group on Primary Lung Graft Dysfunction part III: donor-related risk factors and markers. *J Heart Lung Transplant.* 2005 Oct;24(10):1460-7.

21. Cooper JD, Vreim CE. NHLBI workshop summary. Biology of lung preservation for transplantation. *Am Rev Respir Dis.* 1992 Sep;146(3):803-7.

22. Rosenberg RN. Consciousness, coma, and brain death--2009. *Jama.* 2009 Mar 18;301(11):1172-4.

23. Novitzky D, Wicomb WN, Rose AG, Cooper DK, Reichart B. Pathophysiology of pulmonary edema following experimental brain death in the chacma baboon. *Ann Thorac Surg.* 1987 Mar;43(3):288-94.
24. Rosner MJ, Newsome HH, Becker DP. Mechanical brain injury: the sympathoadrenal response. *J Neurosurg.* 1984 Jul;61(1):76-86.
25. Van Loon J, Shivalkar B, Plets C, Goffin J, Tjandra-Maga TB, Flameng W. Catecholamine response to a gradual increase of intracranial pressure. *J Neurosurg.* 1993 Nov;79(5):705-9.
26. Herijgers P, Borgers M, Flameng W. The effect of brain death on cardiovascular function in rats. Part I. Is the heart damaged? *Cardiovasc Res.* 1998 Apr;38(1):98-106.
27. Herijgers P, Flameng W. The effect of brain death on cardiovascular function in rats. Part II. The cause of the in vivo haemodynamic changes. *Cardiovasc Res.* 1998 Apr;38(1):107-15.
28. Mertes PM, el Abassi K, Jaboin Y, Burtin P, Pinelli G, Carreaux JP, et al. Changes in hemodynamic and metabolic parameters following induced brain death in the pig. *Transplantation.* 1994 Aug 27;58(4):414-8.
29. Bittner HB, Kendall SW, Chen EP, Craig D, Van Trigt P. The effects of brain death on cardiopulmonary hemodynamics and pulmonary blood flow characteristics. *Chest.* 1995 Nov;108(5):1358-63.
30. Baumann A, Audibert G, McDonnell J, Mertes PM. Neurogenic pulmonary edema. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2007 Apr;51(4):447-55.
31. Fisher AJ, Donnelly SC, Hirani N, Burdick MD, Strieter RM, Dark JH, et al. Enhanced pulmonary inflammation in organ donors following fatal non-traumatic brain injury. *Lancet.* 1999 Apr 24;353(9162):1412-3.
32. Rostron AJ, Cork DM, Avlonitis VS, Fisher AJ, Dark JH, Kirby JA. Contribution of Toll-Like Receptor Activation to Lung Damage After Donor Brain Death. *Transplantation.* 2010 Jul 27.
33. Barklin A. Systemic inflammation in the brain-dead organ donor. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2009 Apr;53(4):425-35.
34. Pratschke J, Neuhaus P, Tullius SG. What can be learned from brain-death models? *Transpl Int.* 2005 Jan;18(1):15-21.

35. Barklin A, Theodorsson E, Tyvold SS, Larsson A, Granfeldt A, Sloth E, et al. Alteration of neuropeptides in the lung tissue correlates brain death-induced neurogenic edema. *J Heart Lung Transplant*. 2009 Jul;28(7):725-32.
36. Wigfield C, Golledge H, Shenton B, Kirby J, Dark J. Ameliorated reperfusion injury in lung transplantation after reduction of brain death induced inflammatory graft damage in the donor. *J Heart Lung Transplant* 2002;21(1):57.
37. Edmonds HL, Jr., Cannon HC, Jr., Garretson HD, Dahlquist G. Effects of aerosolized methylprednisolone on experimental neurogenic pulmonary injury. *Neurosurgery*. 1986 Jul;19(1):36-40.
38. McElhinney DB, Khan JH, Babcock WD, Hall TS. Thoracic organ donor characteristics associated with successful lung procurement. *Clin Transplant*. 2001 Feb;15(1):68-71.
39. Follette DM, Rudich SM, Babcock WD. Improved oxygenation and increased lung donor recovery with high-dose steroid administration after brain death. *J Heart Lung Transplant*. 1998 Apr;17(4):423-9.
40. Venkateswaran RV, Patchell VB, Wilson IC, Mascaro JG, Thompson RD, Quinn DW, et al. Early donor management increases the retrieval rate of lungs for transplantation. *Ann Thorac Surg*. 2008 Jan;85(1):278-86; discussion 86.
41. Ad Hoc Committee of the HMS. A definition of irreversible coma. Report of the Ad Hoc Committee of the Harvard Medical School to Examine the Definition of Brain Death. *Jama*. 1968 Aug 5;205(6):337-40.
42. RESOLUÇÃO CFM nº 1.480/97, 1480 (1997).
43. Truog RD. Is it time to abandon brain death? *Hastings Cent Rep*. 1997 Jan-Feb;27(1):29-37.
44. Coimbra CG. Morte Encefálica: Um Diagnóstico Agonizante. *Rev Neurociências*. 1998;6(2):58-68.
45. Giacomini M. A change of heart and a change of mind? Technology and the redefinition of death in 1968. *Soc Sci Med*. 1997 May;44(10):1465-82.
46. Shewmon DA. The probability of inevitability: the inherent impossibility of validating criteria for brain death or 'irreversibility' through clinical studies. *Stat Med*. 1987 Jul-Aug;6(5):535-53.
47. Jeret JS, Benjamin JL. Risk of hypotension during apnea testing. *Arch Neurol*. 1994 Jun;51(6):595-9.

48. Yee AH, Mandrekar J, Rabinstein AA, Wijdicks EF. Predictors of apnea test failure during brain death determination. *Neurocrit Care*. 2010 Jun;12(3):352-5.
49. Reith J, Jorgensen HS, Pedersen PM, Nakayama H, Raaschou HO, Jeppesen LL, et al. Body temperature in acute stroke: relation to stroke severity, infarct size, mortality, and outcome. *Lancet*. 1996 Feb 17;347(8999):422-5.
50. Shiozaki T, Sugimoto H, Taneda M, Yoshida H, Iwai A, Yoshioka T, et al. Effect of mild hypothermia on uncontrollable intracranial hypertension after severe head injury. *J Neurosurg*. 1993 Sep;79(3):363-8.
51. Biswas AK, Bruce DA, Sklar FH, Bokovoy JL, Sommerauer JF. Treatment of acute traumatic brain injury in children with moderate hypothermia improves intracranial hypertension. *Crit Care Med*. 2002 Dec;30(12):2742-51.
52. Marion DW, Penrod LE, Kelsey SF, Obrist WD, Kochanek PM, Palmer AM, et al. Treatment of traumatic brain injury with moderate hypothermia. *N Engl J Med*. 1997 Feb 20;336(8):540-6.
53. Bartlett A, Rela M. Progress in surgical techniques in pediatric liver transplantation. *Pediatr Transplant*. 2010 Feb;14(1):33-40.
54. Mohamed El Moghazy W, Ogura Y, Mutsuko M, Harada K, Koizumi A, Uemoto S. Pediatric living-donor liver transplantation for acute liver failure: analysis of 57 cases. *Transpl Int*. 2010 Aug;23(8):823-30.
55. Solomon M, Grasmann H, Keshavjee S. Pediatric lung transplantation. *Pediatr Clin North Am*. 2010 Apr;57(2):375-91, table of contents.
56. Mueller C, Hansen G, Ballmann M, Schwerk N, Simon AR, Goerler H, et al. Size reduction of donor organs in pediatric lung transplantation. *Pediatr Transplant*. 2010 May;14(3):364-8.
57. Sweet SC. Pediatric living donor lobar lung transplantation. *Pediatr Transplant*. 2006 Nov;10(7):861-8.
58. Camargo SM, Camargo Jde J, Schio SM, Sanchez LB, Felicetti JC, Moreira Jda S, et al. Complications related to lobectomy in living lobar lung transplant donors. *J Bras Pneumol*. 2008 May;34(5):256-63.
59. Fieux F, Losser MR, Bourgeois E, Bonnet F, Marie O, Gaudez F, et al. Kidney retrieval after sudden out of hospital refractory cardiac arrest: a cohort of uncontrolled non heart beating donors. *Crit Care*. 2009;13(4):R141.

60. Mateos-Rodriguez A, Pardillos-Ferrer L, Navalpotro-Pascual JM, Barba-Alonso C, Martin-Maldonado ME, Andres-Belmonte A. Kidney transplant function using organs from non-heart-beating donors maintained by mechanical chest compressions. *Resuscitation*. 2010 Jul;81(7):904-7.
61. Jimenez-Galanes S, Meneu-Diaz MJ, Elola-Olaso AM, Perez-Saborido B, Yiliam FS, Calvo AG, et al. Liver transplantation using uncontrolled non-heart-beating donors under normothermic extracorporeal membrane oxygenation. *Liver Transpl*. 2009 Sep;15(9):1110-8.
62. Gozzini S, Perera MT, Mayer DA, Mirza DF, Kelly DA, Muiesan P, et al. Liver transplantation in children using non-heart-beating donors (NHBD). *Pediatr Transplant*. 2010 Jun;14(4):554-7.
63. Oto T. Lung transplantation from donation after cardiac death (non-heart-beating) donors. *Gen Thorac Cardiovasc Surg*. 2008 Nov;56(11):533-8.
64. Mason DP, Thuita L, Alster JM, Murthy SC, Budev MM, Mehta AC, et al. Should lung transplantation be performed using donation after cardiac death? The United States experience. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2008 Oct;136(4):1061-6.
65. De Oliveira NC, Osaki S, Maloney JD, Meyer KC, Kohmoto T, D'Alessandro AM, et al. Lung transplantation with donation after cardiac death donors: long-term follow-up in a single center. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2010 May;139(5):1306-15.
66. Machuca TN, Schio SM, Camargo SM, Lobato V, Costa CD, Felicetti JC, et al. Prognostic factors in lung transplantation: the Santa Casa de Porto Alegre experience. *Transplantation*. 2011 Jun 15;91(11):1297-303.
67. Transplantes de Pulmão por Estado [database on the Internet]. Associação Brasileira de Transplante de Órgãos. 2010 [cited 05/06/2010]. Available from: <http://www.abto.org.br/abtov02/portugues/profissionais/rbt/mensagemRestrita.aspx?idCategoria=2>.
68. ABTO. Cuidados Básicos na Manutenção do Doador. São paulo: Associação Brasileira de Transplante de Órgãos; 2010 [cited 2010 05/06/2010]; Available from: <http://www.abto.org.br/abtov02/portugues/profissionais/doacao/doacao.aspx>.

69. Christie JD, Kotloff RM, Pochettino A, Arcasoy SM, Rosengard BR, Landis JR, et al. Clinical risk factors for primary graft failure following lung transplantation. *Chest*. 2003 Oct;124(4):1232-41.
70. Zaas D, Palmer SM. Respiratory failure early after lung transplantation: now that we know the extent of the problem, what are the solutions? *Chest*. 2003 Jan;123(1):14-6.
71. King RC, Binns OA, Rodriguez F, Kanithanon RC, Daniel TM, Spotnitz WD, et al. Reperfusion injury significantly impacts clinical outcome after pulmonary transplantation. *Ann Thorac Surg*. 2000 Jun;69(6):1681-5.
72. Christie JD, Van Raemdonck D, de Perrot M, Barr M, Keshavjee S, Arcasoy S, et al. Report of the ISHLT Working Group on Primary Lung Graft Dysfunction part I: introduction and methods. *J Heart Lung Transplant*. 2005 Oct;24(10):1451-3.
73. Shivalkar B, Van Loon J, Wieland W, Tjandra-Maga TB, Borgers M, Plets C, et al. Variable effects of explosive or gradual increase of intracranial pressure on myocardial structure and function. *Circulation*. 1993 Jan;87(1):230-9.
74. Bittner HB, Kendall SW, Campbell KA, Montine TJ, Van Trigt P. A valid experimental brain death organ donor model. *J Heart Lung Transplant*. 1995 Mar-Apr;14(2):308-17.
75. Chen EP, Bittner HB, Kendall SW, Van Trigt P. Hormonal and hemodynamic changes in a validated animal model of brain death. *Crit Care Med*. 1996 Aug;24(8):1352-9.
76. Herijgers P, Leunens V, Tjandra-Maga TB, Mubagwa K, Flameng W. Changes in organ perfusion after brain death in the rat and its relation to circulating catecholamines. *Transplantation*. 1996 Aug 15;62(3):330-5.
77. Okamoto S, Corso CO, Nolte D, Rascher W, Thiery J, Yamaoka Y, et al. Impact of brain death on hormonal homeostasis and hepatic microcirculation of transplant organ donors. *Transpl Int*. 1998;11 Suppl 1:S404-7.
78. van der Hoeven JA, Ploeg RJ, Postema F, Molema I, de Vos P, Girbes AR, et al. Induction of organ dysfunction and up-regulation of inflammatory markers in the liver and kidneys of hypotensive brain dead rats: a model to study marginal organ donors. *Transplantation*. 1999 Dec 27;68(12):1884-90.

79. 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 Feb 15;69(3):427-30.
80. Sawauchi S, Marmarou A, Beaumont A, Tomita Y, Fukui S. A new rat model of diffuse brain injury associated with acute subdural hematoma: assessment of varying hematoma volume, insult severity, and the presence of hypoxemia. *J Neurotrauma*. 2003 Jul;20(7):613-22.
81. 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 Jul;41(3):363-71.
82. Pomper G, Trescher K, Santer D, Hasun M, Baumgartner A, Adelman K, et al. Introducing a mouse model of brain death. *J Neurosci Methods*. 2010 Sep 30;192(1):70-4.
83. 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 Jul 7.
84. Eren S, Esme H, Balci AE, Cakir O, Buyukbayram H, Eren MN, et al. The effect of aprotinin on ischemia-reperfusion injury in an in situ normothermic ischemic lung model. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2003 Jan;23(1):60-5.
85. Schutte H, Witzernath M, Mayer K, Rosseau S, Seeger W, Grimminger F. Short-term "preconditioning" with inhaled nitric oxide protects rabbit lungs against ischemia-reperfusion injury. *Transplantation*. 2001 Oct 27;72(8):1363-70.
86. Pratschke J, Wilhelm MJ, Kusaka M, Beato F, Milford EL, Hancock WW, et al. Accelerated rejection of renal allografts from brain-dead donors. *Ann Surg*. 2000 Aug;232(2):263-71.
87. 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 Nov 7;102(19):2426-33.
88. Ciccone AM, Stewart KC, Meyers BF, Guthrie TJ, Battafarano RJ, Trulock EP, et al. Does donor cause of death affect the outcome of lung transplantation? *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2002 Mar;123(3):429-34; discussion 34-6.

89. van Der Hoeven JA, Ter Horst GJ, Molema G, de Vos P, Girbes AR, Postema F, et al. Effects of brain death and hemodynamic status on function and immunologic activation of the potential donor liver in the rat. *Ann Surg.* 2000 Dec;232(6):804-13.
90. Takada M, Nadeau KC, Hancock WW, Mackenzie HS, Shaw GD, Waaga AM, et al. Effects of explosive brain death on cytokine activation of peripheral organs in the rat. *Transplantation.* 1998 Jun 27;65(12):1533-42.
91. Colice GL. Neurogenic pulmonary edema. *Clin Chest Med.* 1985 Sep;6(3):473-89.
92. Schrader H, Zwetnow NN, Morkrid L. Regional cerebral blood flow and CSF pressures during Cushing response induced by a supratentorial expanding mass. *Acta Neurol Scand.* 1985 Jun;71(6):453-63.
93. Schmidt EA, Czosnyka Z, Momjian S, Czosnyka M, Bech RA, Pickard JD. Intracranial baroreflex yielding an early cushing response in human. *Acta Neurochir Suppl.* 2005;95:253-6.
94. Fodstad H, Kelly PJ, Buchfelder M. History of the cushing reflex. *Neurosurgery.* 2006 Nov;59(5):1132-7; discussion 7.
95. Bittner HB, Kendall SW, Chen EP, Van Trigt P. Endocrine changes and metabolic responses in a validated canine brain death model. *J Crit Care.* 1995 Jun;10(2):56-63.
96. Potapov EV, Blomer T, Michael R, Hennig F, Muller C, Loebe M, et al. Effect of acute brain death on release of atrium and B-type natriuretic peptides in an animal model. *Transplantation.* 2004 Apr 15;77(7):985-90.
97. Barklin A, Larsson A, Vestergaard C, Kjaergaard A, Wogensen L, Schmitz O, et al. Insulin alters cytokine content in two pivotal organs after brain death: a porcine model. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2008 May;52(5):628-34.
98. Novitzky D, Cooper DK, Morrell D, Isaacs S. Change from aerobic to anaerobic metabolism after brain death, and reversal following triiodothyronine therapy. *Transplantation.* 1988 Jan;45(1):32-6.
99. Gramm HJ, Meinhold H, Bickel U, Zimmermann J, von Hammerstein B, Keller F, et al. Acute endocrine failure after brain death? *Transplantation.* 1992 Nov;54(5):851-7.

100. Arita K, Uozumi T, Oki S, Kurisu K, Ohtani M, Mikami T. The function of the hypothalamo-pituitary axis in brain dead patients. *Acta Neurochir (Wien)*. 1993;123(1-2):64-75.
101. 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 May;19(5):414-8.
102. Mertes PM, Burtin P, Carteaux JP, Jaboin Y, Dopff C, Pinelli G, et al. Brain death and myocardial injury: role of cardiac sympathetic innervation evaluated by in vivo interstitial microdialysis. *Transplant Proc*. 1994 Feb;26(1):231-2.
103. Nagareda T, Kinoshita Y, Tanaka A, Takeda M, Sakano T, Yawata K, et al. Clinicopathology of kidneys from brain-dead patients treated with vasopressin and epinephrine. *Kidney Int*. 1993 Jun;43(6):1363-70.
104. Wicomb WN, Cooper DK, Novitzky D. Impairment of renal slice function following brain death, with reversibility of injury by hormonal therapy. *Transplantation*. 1986 Jan;41(1):29-33.
105. 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 Nov;64(5):1874-82.
106. Lin H, Yamamoto Y, Okamoto R, Ueda J, Yamamoto S, Mori K, et al. Hepatic functional difference between brain death hypotension and hypovolemic hypotension in liver donation. *Transplant Proc*. 1989 Feb;21(1 Pt 2):2389-91.
107. Toyama H, Takada M, Suzuki Y, Kuroda Y. Brain death-induced expression of ICAM-1 and VCAM-1 on rat hepatocytes. *Hepatogastroenterology*. 2003 Nov-Dec;50(54):1854-6.
108. Jassem W, Koo DD, Cerundolo L, Rela M, Heaton ND, Fuggle SV. Leukocyte infiltration and inflammatory antigen expression in cadaveric and living-donor livers before transplant. *Transplantation*. 2003 Jun 27;75(12):2001-7.
109. Toyama H, Takada M, Suzuki Y, Kuroda Y. Activation of macrophage-associated molecules after brain death in islets. *Cell Transplant*. 2003;12(1):27-32.

110. Novitzky D. Detrimental effects of brain death on the potential organ donor. *Transplant Proc.* 1997 Dec;29(8):3770-2.
111. Hoffman SW, Moore S, Ellis EF. Isoprostanes: free radical-generated prostaglandins with constrictor effects on cerebral arterioles. *Stroke.* 1997 Apr;28(4):844-9.
112. Yeo JE, Kang SK. Selenium effectively inhibits ROS-mediated apoptotic neural precursor cell death in vitro and in vivo in traumatic brain injury. *Biochim Biophys Acta.* 2007 Dec;1772(11-12):1199-210.
113. Amado JA, Lopez-Espadas F, Vazquez-Barquero A, Salas E, Riancho JA, Lopez-Cordovilla JJ, et al. Blood levels of cytokines in brain-dead patients: relationship with circulating hormones and acute-phase reactants. *Metabolism.* 1995 Jun;44(6):812-6.
114. Donnelly SC, Strieter RM, Reid PT, Kunkel SL, Burdick MD, Armstrong I, et al. The association between mortality rates and decreased concentrations of interleukin-10 and interleukin-1 receptor antagonist in the lung fluids of patients with the adult respiratory distress syndrome. *Ann Intern Med.* 1996 Aug 1;125(3):191-6.
115. Birks EJ, Owen VJ, Burton PB, Bishop AE, Banner NR, Khaghani A, et al. Tumor necrosis factor-alpha is expressed in donor heart and predicts right ventricular failure after human heart transplantation. *Circulation.* 2000 Jul 18;102(3):326-31.
116. Lentsch AB, Ward PA. Regulation of experimental lung inflammation. *Respir Physiol.* 2001 Oct;128(1):17-22.
117. 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 May;52(5):621-7.
118. Van Der Hoeven JA, Moshage H, Schuurs T, Nijboer M, Van Schilfgaarde R, Ploeg RJ. Brain death induces apoptosis in donor liver of the rat. *Transplantation.* 2003 Oct 27;76(8):1150-4.
119. Zhou HC, Ding WG, Cui XG, Pan P, Zhang B, Li WZ. Carbon monoxide inhalation ameliorates conditions of lung grafts from rat brain death donors. *Chin Med J (Engl).* 2008 Aug 5;121(15):1411-9.

120. Adrie C, Monchi M, Fulgencio JP, Cottias P, Haouache H, Alvarez-Gonzalez A, et al. Immune status and apoptosis activation during brain death. *Shock*. 2010 Apr;33(4):353-62.
121. O'Neill LA, Fitzgerald KA, Bowie AG. The Toll-IL-1 receptor adaptor family grows to five members. *Trends Immunol*. 2003 Jun;24(6):286-90.
122. Andrade CF, Waddell TK, Keshavjee S, Liu M. Innate immunity and organ transplantation: the potential role of toll-like receptors. *Am J Transplant*. 2005 May;5(5):969-75.
123. Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature*. 2002 Jul 11;418(6894):191-5.
124. Vogel SN, Fitzgerald KA, Fenton MJ. TLRs: differential adapter utilization by toll-like receptors mediates TLR-specific patterns of gene expression. *Mol Interv*. 2003 Dec;3(8):466-77.
125. Shimamoto A, Pohlman TH, Shomura S, Tarukawa T, Takao M, Shimpo H. Toll-like receptor 4 mediates lung ischemia-reperfusion injury. *Ann Thorac Surg*. 2006 Dec;82(6):2017-23.
126. Guillot L, Medjane S, Le-Barillec K, Balloy V, Danel C, Chignard M, et al. Response of human pulmonary epithelial cells to lipopolysaccharide involves Toll-like receptor 4 (TLR4)-dependent signaling pathways: evidence for an intracellular compartmentalization of TLR4. *J Biol Chem*. 2004 Jan 23;279(4):2712-8.
127. Melkamu T, Squillace D, Kita H, O'Grady SM. Regulation of TLR2 expression and function in human airway epithelial cells. *J Membr Biol*. 2009 May;229(2):101-13.
128. Kang CH, Anraku M, Cypel M, Sato M, Yeung J, Gharib SA, et al. Transcriptional signatures in donor lungs from donation after cardiac death vs after brain death: a functional pathway analysis. *J Heart Lung Transplant*. 2011 Mar;30(3):289-98.
129. McLean KM, Duffy JY, Pandalai PK, Lyons JM, Bulcao CF, Wagner CJ, et al. Glucocorticoids alter the balance between pro- and anti-inflammatory mediators in the myocardium in a porcine model of brain death. *J Heart Lung Transplant*. 2007 Jan;26(1):78-84.

130. Lyons JM, Pearl JM, McLean KM, Akhter SA, Wagner CJ, Pandalai PK, et al. Glucocorticoid administration reduces cardiac dysfunction after brain death in pigs. *J Heart Lung Transplant*. 2005 Dec;24(12):2249-54.
131. Brines ML, Ghezzi P, Keenan S, Agnello D, de Lanerolle NC, Cerami C, et al. Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Sep 12;97(19):10526-31.
132. Yildirim E, Solaroglu I, Okutan O, Ozisik K, Kaptanoglu E, Sargon MF, et al. Ultrastructural changes in tracheobronchial epithelia following experimental traumatic brain injury in rats: protective effect of erythropoietin. *J Heart Lung Transplant*. 2004 Dec;23(12):1423-9.
133. Nijboer WN, Ottens PJ, van Dijk A, van Goor H, Ploeg RJ, Leuvenink HG. Donor pretreatment with carbamylated erythropoietin in a brain death model reduces inflammation more effectively than erythropoietin while preserving renal function. *Crit Care Med*. 2010 Apr;38(4):1155-61.
134. Van Bakel AB, Pitzer S, Drake P, Kay NA, Stroud M, Sade RM. Early hormonal therapy stabilizes hemodynamics during donor procurement. *Transplant Proc*. 2004 Nov;36(9):2573-8.
135. Rosendale JD, Kauffman HM, McBride MA, Chabalewski FL, Zaroff JG, Garrity ER, et al. Aggressive pharmacologic donor management results in more transplanted organs. *Transplantation*. 2003 Feb 27;75(4):482-7.
136. Rosendale JD, Kauffman HM, McBride MA, Chabalewski FL, Zaroff JG, Garrity ER, et al. Hormonal resuscitation yields more transplanted hearts, with improved early function. *Transplantation*. 2003 Apr 27;75(8):1336-41.
137. Kutsogiannis DJ, Pagliarello G, Doig C, Ross H, Shemie SD. Medical management to optimize donor organ potential: review of the literature. *Can J Anaesth*. 2006 Aug;53(8):820-30.
138. Salim A, Vassiliu P, Velmahos GC, Sava J, Murray JA, Belzberg H, et al. The role of thyroid hormone administration in potential organ donors. *Arch Surg*. 2001 Dec;136(12):1377-80.
139. Novitzky D, Cooper DK, Reichart B. Hemodynamic and metabolic responses to hormonal therapy in brain-dead potential organ donors. *Transplantation*. 1987 Jun;43(6):852-4.

140. Brambrink AM, Dick WF. [Neurogenic pulmonary edema. Pathogenesis, clinical picture and therapy]. *Anaesthesist*. 1997 Nov;46(11):953-63.
141. Inobe JJ, Mori T, Ueyama H, Kumamoto T, Tsuda T. Neurogenic pulmonary edema induced by primary medullary hemorrhage: a case report. *J Neurol Sci*. 2000 Jan 1;172(1):73-6.
142. Walder B, Brundler MA, Totsch M, Elia N, Morel DR. Influence of the type and rate of subarachnoid fluid infusion on lethal neurogenic pulmonary edema in rats. *J Neurosurg Anesthesiol*. 2002 Jul;14(3):194-203.
143. Solenski NJ, Haley EC, Jr., Kassell NF, Kongable G, Germanson T, Truskowski L, et al. Medical complications of aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a report of the multicenter, cooperative aneurysm study. Participants of the Multicenter Cooperative Aneurysm Study. *Crit Care Med*. 1995 Jun;23(6):1007-17.
144. Bratton SL, Davis RL. Acute lung injury in isolated traumatic brain injury. *Neurosurgery*. 1997 Apr;40(4):707-12; discussion 12.
145. Rogers FB, Shackford SR, Trevisani GT, Davis JW, Mackersie RC, Hoyt DB. Neurogenic pulmonary edema in fatal and nonfatal head injuries. *J Trauma*. 1995 Nov;39(5):860-6; discussion 6-8.
146. Simon RP. Neurogenic pulmonary edema. *Neurol Clin*. 1993 May;11(2):309-23.
147. Colice GL, Matthay MA, Bass E, Matthay RA. Neurogenic pulmonary edema. *Am Rev Respir Dis*. 1984 Nov;130(5):941-8.
148. Talman WT, Perrone MH, Reis DJ. Acute hypertension after the local injection of kainic acid into the nucleus tractus solitarii of rats. *Circ Res*. 1981 Feb;48(2):292-8.
149. Reynolds RW. Pulmonary Edema as a Consequence of Hypothalamic Lesions in Rats. *Science*. 1963 Sep 6;141:930-2.
150. Sarnoff SJ, Sarnoff LC. Neurohemodynamics of pulmonary edema. II. The role of sympathetic pathways in the elevation of pulmonary and systemic vascular pressures following the intracisternal injection of fibrin. *Circulation*. 1952 Jul;6(1):51-62.
151. Maron MB. Pulmonary vasoconstriction in a canine model of neurogenic pulmonary edema. *J Appl Physiol*. 1990 Mar;68(3):912-8.

152. Maron MB. A canine model of neurogenic pulmonary edema. *J Appl Physiol*. 1985 Sep;59(3):1019-25.
153. Minnear FL, Connell RS. Prevention of aconitine-induced neurogenic pulmonary edema (NPE) with hypovolemia or methylprednisolone. *J Trauma*. 1982 Feb;22(2):121-8.
154. Millen JE, Glauser FL. Low levels of concussive brain trauma and pulmonary edema. *J Appl Physiol*. 1983 Mar;54(3):666-70.
155. Lévassieur JE, Patterson JL, Jr., Garcia CI, Moskowitz MA, Choi SC, Kontos HA. Effect of neonatal capsaicin treatment on neurogenic pulmonary edema from fluid-percussion brain injury in the adult rat. *J Neurosurg*. 1993 Apr;78(4):610-8.
156. Hoff JT, Nishimura M. Experimental neurogenic pulmonary edema in cats. *J Neurosurg*. 1978 Mar;48(3):383-9.
157. Herbst C, Tippler B, Shams H, Simmet T. A role for endothelin in bicuculline-induced neurogenic pulmonary oedema in rats. *Br J Pharmacol*. 1995 Jul;115(5):753-60.
158. Simon RP, Bayne LL, Tranbaugh RF, Lewis FR. Elevated pulmonary lymph flow and protein content during status epilepticus in sheep. *J Appl Physiol*. 1982 Jan;52(1):91-5.
159. Sedy J, Urdzikova L, Likavcanova K, Hejcl A, Jendelova P, Sykova E. A new model of severe neurogenic pulmonary edema in spinal cord injured rat. *Neurosci Lett*. 2007 Aug 16;423(2):167-71.
160. Leal Filho MB, Morandin RC, de Almeida AR, Cambiucci EC, Metze K, Borges G, et al. Hemodynamic parameters and neurogenic pulmonary edema following spinal cord injury: an experimental model. *Arq Neuropsiquiatr*. 2005 Dec;63(4):990-6.
161. Darragh TM, Simon RP. Nucleus tractus solitarius lesions elevate pulmonary arterial pressure and lymph flow. *Ann Neurol*. 1985 Jun;17(6):565-9.
162. Sakakibara H, Hashiba Y, Taki K, Kawanishi M, Shimada Y, Ishikawa N. Effect of sympathetic nerve stimulation on lung vascular permeability in the rat. *Am Rev Respir Dis*. 1992 Mar;145(3):685-92.
163. Theodore J, Robin ED. Pathogenesis of neurogenic pulmonary oedema. *Lancet*. 1975 Oct 18;2(7938):749-51.

164. Hachenberg T, Rettig R. Stress failure of the blood-gas barrier. *Curr Opin Anaesthesiol.* 1998 Feb;11(1):37-44.
165. Di Pasquale G, Pinelli G, Andreoli A, Manini GL, Grazi P, Tognetti F. Torsade de pointes and ventricular flutter-fibrillation following spontaneous cerebral subarachnoid hemorrhage. *Int J Cardiol.* 1988 Feb;18(2):163-72.
166. Maron MB, Dawson CA. Pulmonary venoconstriction caused by elevated cerebrospinal fluid pressure in the dog. *J Appl Physiol.* 1980 Jul;49(1):73-8.
167. Maron MB. Analysis of airway fluid protein concentration in neurogenic pulmonary edema. *J Appl Physiol.* 1987 Feb;62(2):470-6.
168. Hamdy O, Nishiwaki K, Yajima M, Murakami HO, Maekawa H, Moy RT, et al. Presence and quantification of neuropeptide Y in pulmonary edema fluids in rats. *Exp Lung Res.* 2000 Apr-May;26(3):137-47.
169. Hirabayashi A, Nishiwaki K, Shimada Y, Ishikawa N. Role of neuropeptide Y and its receptor subtypes in neurogenic pulmonary edema. *Eur J Pharmacol.* 1996 Feb 5;296(3):297-305.
170. Poulat P, Couture R. Increased pulmonary vascular permeability and oedema induced by intrathecally injected endothelins in rat. *Eur J Pharmacol.* 1998 Mar 5;344(2-3):251-9.
171. Sedy J, Zicha J, Kunes J, Hejcl A, Sykova E. The role of nitric oxide in the development of neurogenic pulmonary edema in spinal cord-injured rats: the effect of preventive interventions. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2009 Oct;297(4):R1111-7.
172. Feng GG, Nishiwaki K, Kondo H, Shimada Y, Ishikawa N. Inhibition of fibrin-induced neurogenic pulmonary edema by previous unilateral left-vagotomy correlates with increased levels of brain nitric oxide synthase in the nucleus tractus solitarii of rats. *Auton Neurosci.* 2002 Nov 29;102(1-2):1-7.
173. Hamdy O, Maekawa H, Shimada Y, Feng GG, Ishikawa N. Role of central nervous system nitric oxide in the development of neurogenic pulmonary edema in rats. *Crit Care Med.* 2001 Jun;29(6):1222-8.
174. Woiciechowsky C, Schoning B, Daberkow N, Asche K, Lanksch WR, Docke WD, et al. Brain IL-1beta increases neutrophil and decreases lymphocyte counts through stimulation of neuroimmune pathways. *Neurobiol Dis.* 1999 Jun;6(3):200-8.

175. Ott L, McClain CJ, Gillespie M, Young B. Cytokines and metabolic dysfunction after severe head injury. *J Neurotrauma*. 1994 Oct;11(5):447-72.
176. Strieter RM, Kunkel SL. Acute lung injury: the role of cytokines in the elicitation of neutrophils. *J Investig Med*. 1994 Dec;42(4):640-51.
177. Donnelly SC, Strieter RM, Kunkel SL, Walz A, Robertson CR, Carter DC, et al. Interleukin-8 and development of adult respiratory distress syndrome in at-risk patient groups. *Lancet*. 1993 Mar 13;341(8846):643-7.
178. Fisher AJ, Donnelly SC, Hirani N, Haslett C, Strieter RM, Dark JH, et al. Elevated levels of interleukin-8 in donor lungs is associated with early graft failure after lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001 Jan;163(1):259-65.
179. Fassbender K, Schneider S, Bertsch T, Schlueter D, Fatar M, Ragoschke A, et al. Temporal profile of release of interleukin-1beta in neurotrauma. *Neurosci Lett*. 2000 Apr 28;284(3):135-8.
180. Rall JM, Matzilevich DA, Dash PK. Comparative analysis of mRNA levels in the frontal cortex and the hippocampus in the basal state and in response to experimental brain injury. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2003 Apr;29(2):118-31.
181. Campos MM, Calixto JB. Neurokinin mediation of edema and inflammation. *Neuropeptides*. 2000 Oct;34(5):314-22.
182. Wang CX, Shuaib A. Involvement of inflammatory cytokines in central nervous system injury. *Prog Neurobiol*. 2002 Jun;67(2):161-72.
183. McKeating EG, Andrews PJ, Signorini DF, Mascia L. Transcranial cytokine gradients in patients requiring intensive care after acute brain injury. *Br J Anaesth*. 1997 May;78(5):520-3.
184. Martin TR. Lung cytokines and ARDS: Roger S. Mitchell Lecture. *Chest*. 1999 Jul;116(1 Suppl):2S-8S.
185. Lin WC, Lin CF, Chen CL, Chen CW, Lin YS. Prediction of outcome in patients with acute respiratory distress syndrome by bronchoalveolar lavage inflammatory mediators. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2010 Jan;235(1):57-65.
186. Kostulas N, Pelidou SH, Kivisakk P, Kostulas V, Link H. Increased IL-1beta, IL-8, and IL-17 mRNA expression in blood mononuclear cells observed in a prospective ischemic stroke study. *Stroke*. 1999 Oct;30(10):2174-9.

187. Yildirim E, Kaptanoglu E, Ozisik K, Beskonakli E, Okutan O, Sargon MF, et al. Ultrastructural changes in pneumocyte type II cells following traumatic brain injury in rats. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2004 Apr;25(4):523-9.
188. Videtta W, Villarejo F, Cohen M, Domeniconi G, Santa Cruz R, Pinillos O, et al. Effects of positive end-expiratory pressure on intracranial pressure and cerebral perfusion pressure. *Acta Neurochir Suppl*. 2002;81:93-7.
189. Nekludov M, Bellander BM, Mure M. Oxygenation and cerebral perfusion pressure improved in the prone position. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2006 Sep;50(8):932-6.
190. Marshall SA, Nyquist P. A change of position for neurogenic pulmonary edema. *Neurocrit Care*. 2009;10(2):213-7.
191. Audibert G, Charpentier C, Seguin-Devaux C, Charretier PA, Gregoire H, Devaux Y, et al. Improvement of donor myocardial function after treatment of autonomic storm during brain death. *Transplantation*. 2006 Oct 27;82(8):1031-6.
192. Deehan SC, Grant IS. Haemodynamic changes in neurogenic pulmonary oedema: effect of dobutamine. *Intensive Care Med*. 1996 Jul;22(7):672-6.
193. Shibamoto T, Wang HG, Tanaka S, Koyama S. No effects of large doses of catecholamines on vascular permeability in isolated blood-perfused dog lungs. *Acta Physiol Scand*. 1995 Oct;155(2):127-35.
194. Lane SM, Maender KC, Awender NE, Maron MB. Adrenal epinephrine increases alveolar liquid clearance in a canine model of neurogenic pulmonary edema. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998 Sep;158(3):760-8.
195. Minambres E, Rodrigo E, Ballesteros MA, Llorca J, Ruiz JC, Fernandez-Fresnedo G, et al. Impact of restrictive fluid balance focused to increase lung procurement on renal function after kidney transplantation. *Nephrol Dial Transplant*. 2010 Feb 14.
196. Hall SR, Wang L, Milne B, Ford S, Hong M. Intrathecal lidocaine prevents cardiovascular collapse and neurogenic pulmonary edema in a rat model of acute intracranial hypertension. *Anesth Analg*. 2002 Apr;94(4):948-53, table of contents.
197. Suzuki H, Sozen T, Hasegawa Y, Chen W, Zhang JH. Caspase-1 inhibitor prevents neurogenic pulmonary edema after subarachnoid hemorrhage in mice. *Stroke*. 2009 Dec;40(12):3872-5.

198. Toung TJ, Chang Y, Lin J, Bhardwaj A. Increases in lung and brain water following experimental stroke: effect of mannitol and hypertonic saline. *Crit Care Med.* 2005 Jan;33(1):203-8; discussion 59-60.

6. Artigo Científico

EFFECTS OF METHYLPREDNISOLONE ADMINISTRATION IN INFLAMMATORY ACTIVITY AND OXIDATIVE STRESS ON LUNGS FROM BRAIN-DEAD RATS

INTRODUCTION

Lung transplantation is an established therapeutic option for end-stage lung disease. The last decade has seen a significant increase in the number of lung transplantation centers (1). As a result, there have been an increasing number of patients enrolled in the waiting lists as opposed to the donor pool that remains fairly constant, with a range of 4.9% to 27% of the lungs suitable for transplantation (1-4). Recently, with the use of lungs from marginal donors and the encouraging results of the ex-vivo lung perfusion for lung reconditioning, there has been a trend to an increase in the number of lung transplants (5, 6)

Brain dead donors still represent the main source of organs for transplantation. In the intensive care unit (ICU), the lungs of the potential donors are exposed to the direct damage caused by the process of brain death. In addition, the lungs are at risk for acute lung injury secondary to trauma, prolonged mechanical ventilation, transfusion, ischemia, aspiration and infection. (7, 8)

Brain death encompasses the death of all central neurological tissue resulting in the loss of cerebral function. (9) The pathophysiology of brain death is complex and involves sympathetic, hemodynamic, and inflammatory mechanisms that can injure the lung. (7, 10) Significant endocrine changes

result in decrease in the plasma levels of adrenocorticotrophic hormone, cortisol, triiodothyronine, thyroxine, insulin, and vasopressin. (7)

More recently, there is a consensus that organ grafts should not be considered as immunological inert. Donor risk factors, such as previous diseases, age, the cause of death, donor management and most importantly brain death, reprogram the graft into an immunological active organ. (8, 11) The treatment of potential brain death donors may be a promising approach to reduce immune activation of the graft and improve the quality of the organ before transplantation. (12)

The administration of systemic corticosteroids to brain dead donors is known to be beneficial mostly because of its ability to modulate the systemic inflammatory response caused by brain death and improve the graft viability by means of reducing the release of pro-inflammatory molecules and production of leukocyte adhesion molecules thus increasing alveolar fluid clearance. (13, 14) Controversy still remains regarding the best time for administering corticosteroids in the setting of brain death. The aim the present study is to evaluate the effects on the lungs of early versus late systemic administration of methylprednisolone in an animal model of brain death.

MATERIAL AND METHODS

The local Institutional Animal Care Committee and the Ethical and Research Committee approved protocols used in this study. All animals received humane care in compliance with the Principles of Laboratory Animal Care formulated by the National Society for Medical Research and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (Institute of Laboratory Animal

Resources and published by the National Institutes of Health, Publication No. 86-23, revised 1996).

Surgical Procedure

Twenty-four male Wistar rats, weighing between 170-200g underwent general anesthesia induced with intraperitoneal administration of ketamine (100mg/Kg) and xylazine (15mg/kg). This was followed by a tracheostomy with an indwelling 14-gauge cannula (Abbocath® #14; Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, EUA) and ventilation at a rate of 70-80 breaths/min, a tidal volume of 10 ml/kg in inspired room air (Harvard Rodent Ventilator, model 683; Harvard Apparatus Co., Millis, MA). The right carotid artery was dissected and cannulated with a 24-gauge cannula (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) for mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) recordings (Sirecust 730 Siemens, Solna, Sweden). The right jugular vein was also dissected and cannulated in the same fashion. Normal saline was used to flush the lines, with a total volume of 5 mL/kg/hour in all animals and a warmed surgical table was used to maintain body temperature at 37°C during the procedure.

Induction of Brain Death

The brain death model was described elsewhere (15, 16). Briefly, through a frontolateral trepanation (1x1mm with a dental drill), a 14G Fogarty balloon catheter (Baxter Health Care Corp., Irvine, CA) was introduced into the extradural space with the tip pointed caudally. The balloon was inflated with 1,5ml of water for 1 minute producing a sudden rise in intracranial pressure. This resulted in rapidly progressive brain injury leading to immediate brain

death. A sharp rise and then a subsequent drop of blood pressure and heart rate defined initiation of brain death. The state of brain death was confirmed by the absence of corneal reflexes and by the apnea test.

Study groups

After the initial procedures the animals were randomly allocated into the following four groups:

-Sham Group (sham): craniotomy was performed and no balloon catheter was introduced into the extradural space.

-Brain Death Group (BD): brain death was induced as described above, and 5 minutes after BD confirmation, 0,2ml of normal saline was administered intravenously.

-Methylprednisolone 5 minutes Group (mt5) an IV bolus of methylprednisolone (30mg/kg) diluted in 0,2ml of normal saline was administered 5 minutes after brain death was confirmed.

-Methylprednisolone 60 minutes Group (mt60): an IV bolus of methylprednisolone (30mg/kg) diluted in 0,2ml of normal saline was administered 60 minutes after brain death was confirmed.

Sampling

The animals were monitored for 120 minutes and were submitted to the same ventilation regimen. Arterial blood samples were drawn for blood gas analyses at insertion of the arterial line (basal), and at 60 and 120 minutes after brain death, and at corresponding time points in the sham group. Upon completion of the assessment, a median sternolaparotomy was performed and

the animals were sacrificed by exsanguination. The heart-lung blocks were excised and a bronchoalveolar-lavage (BAL) of the left lung was performed three times (3mL of normal saline each) after clamping of the right main bronchus. The right lung was then separated from the heart-lung block and divided into two pieces. Most of the right lung was snap-frozen in liquid nitrogen and stored in -80°C for lipid peroxidation, catalase, superoxide dismutase (SOD) and $\text{TNF-}\alpha$ determination. The remainder of the lung was fixed in formalin for histopathology. The mediastinal lobe was excised and weighed (wet weight) in a precision scale. Samples were then placed in a vacuum oven (at 70°C for 72 h) until a stable dry weight was achieved. The wet to dry lung weight ratio was then obtained as an indicator of lung edema. (17)

BAL fluid processing

The BAL was centrifuged at 300g for 5min and the cell pellet was separated from the supernatant. The differential white cell count was determined after preparation with Romanowsky stain. Total protein concentration was determined through Protein-Biuret Method (Modular Analytics, Roche, Germany) and LDH concentration was determined through UV kinetic method (Modular Analytics, Roche, Germany).

Pulmonary $\text{TNF-}\alpha$ determination

After samples unfreeze, a microplaque of 96 holes was sensitized with monoclonal antibody to $\text{TNF-}\alpha$. In these plaques were added 100 μl of homogenized lung (dilution 1:2), 100 μl of positive and negative controls and 100 μl of recombinant $\text{TNF-}\alpha$ in concentration establish by the manufacture

(Creative Biomart, New York). After, 100 μ l of policlonal-conjugated anti-TNF- α marked with peroxidase was added to the plaques for incubation during 3 hours at room temperature. After the incubation time, the plaque was washed four times with detergent solution. Later, it was added hidrogen peroxide (0,02%) and tetramethylbenze (2%). The reaction was interrupted 30 minutes later, using sulfuric acid 1M. Color intensity was measured through optic density in an ELISA automatic reader (Titertek Multiskan®) in 450nm. The TNF- α concentration in the homogenized lung was calculated from the results obtained through a standard curve.

Thiobarbituric acid reacting substances (TBARS) determination

The products generated by lipid peroxidation were quantified by the TBARS reaction using 3mg of protein per sample. The samples were incubated at 90°C for 30 minutes, subsequently adding 500 μ L of 0.37% thiobarbituric acid to 15% trichloroacetic acid, centrifuged at 4°C at 2000x g for 15 minutes. Absorbance was determined by spectrophotometry at 535 nm. (18)

Superoxide Dismutase (SOD) and catalase (CAT) determination

The activity of SOD was determined by pulse radiolytic method based in the autoxidation of epinephrine, according the method described by Misra and Fridovich. (19) Catalase (CAT) activity was determined by spectrophotometer method described by Maehly and Chance. (20)

Histology

The fragment of lung fixed in formalin was embedded in paraffin and cut into 3mm sections and stained with hematoxylin-eosin. A pathologist blinded to

the experimental protocol performed the quantitative examination by light microscopy. Each lung sample was examined under both low and high power fields and 20 fields were randomly selected and analyzed. The severity of histological lesions was assessed using a five-parameter score: intra-alveolar edema, hyaline membrane formation, hemorrhage, focal alveolar collapse or consolidation, and epithelial desquamation /necrosis of airways or alveoli. Each parameter was evaluated semi-quantitatively using the following scale: 0= absent, 1= mild, 2= moderate, 3= prominent. In each animal, the scale of each parameter was added to result in a score. (21)

Statistical Analysis

All the collected data from the experiment were coded, recorded, and analyzed using SPSS 16.0 for Windows (Chicago, IL). ANOVA was used for comparing differences between groups. When analysis of variance showed a significant difference, the post-hoc multiple comparison test (Tukey test) was applied to demonstrate the differences in the groups. The ANOVA for Repeated Measures was used for comparing differences between groups of related dependent variables with more than one measure along the observation period. In each test, the data were expressed as the mean value +/- standard error (SE) and $P < 0.05$ was accepted as statistically significant.

RESULTS

There were no differences between groups in procedure length, wet/dry weight ratio, blood gases measurements, superoxide dismutase and catalase determination. There were no differences among the groups in BAL analysis

regarding differential white cell count, total protein contents and LDH. There were no differences in the mean arterial pressure in the groups submitted to brain death during all observation period.

TBARS was statistically higher in both methylprednisolone groups when compared to sham and BD groups ($p < 0.001$) (Figure 1). There were no significant differences in histological score among the groups (Figure 2). Lung injury represented by intra-alveolar hemorrhage or hyaline membrane formation was not observed in any samples. The predominant finding was mild focal alveolar collapse presented in the majority of the samples with no difference in intensity across the different groups (Figure 2). TNF- α concentration was significantly lower in met5 ($p < 0.001$) and met60 groups ($p < 0.001$) when compared to BD group (Figure 3).

DISCUSSION

The vast majority of experimental studies have shown a significant increase in inflammatory molecules and interleukins immediately after induction of brain death. (22, 23) The pro-inflammatory cytokine, TNF- α , has been shown to be significantly up regulated in lung tissue after brain death (12, 24) and has important role in the development of lung injury. (22) Our study showed that brain death resulted in donor systemic inflammatory response, and methylprednisolone administration was associated with reduced TNF- α expression in lung tissue. Similar results were observed by McLean et al when studying the effects of glucocorticoid administration on myocardial function in a porcine model of brain death. (25)

To our knowledge, the present study is the first to investigate the role of methylprednisolone administration in a rat brain death model and its influence on TNF- α lung expression and oxidative stress. (22)

Our study demonstrated that methylprednisolone administration has no effect on blood gases and hemodynamic parameters. These findings probably are result of the period of observation, which was not long enough to show any differences among the groups. The administration of methylprednisolone just after brain death in a model of lung transplantation in rats can modulate inflammatory donor lung injury showing better graft performance after transplantation. (14)

Clinically, the use of corticosteroids in multi organ donors is still controversial. However, there are various clinical studies with different resuscitative hormonal protocols showing promising results. Nevertheless, a standard protocol has not been established yet, especially related to lung retrieval. (26-29) The use of glucocorticoids in brain-dead donors probably has dual beneficial effects: it reduces antiinflammatory activity and replaces the blood cortisol levels. Although we have studied only TNF- α activity after brain death, it might have been interesting to measure the cortisol levels after brain death in this model as well. Faropoulos & Apostolakis found that cortisol levels rise within 5 minutes following induction of brain death in a baboon model, and decline steadily thereafter over the next 15 to 45 minutes to almost disappear and become undetectable at 4 hours after brain death induction. (30)

In our experiments we found no differences in the differential white cell count in the BAL as well as in histology. Conversely, Fischer et al. showed a greater concentration of neutrophils in the BAL of brain-dead donors, interleukin

8 (IL-8) and genes related to growth α (GRO- α) compared to controls, and such changes were related to a more pronounced neutrophil infiltration in lung tissue. (31)

We suppose that lung inflammatory changes can be assessed up to 120 minutes of ventilation after brain death induction in lungs that are still suitable to transplantation. Avlonitis et al. demonstrated that there are no differences on recipient lung function or alveolar neutrophilia if the lung retrieval occurs 15 minutes or 5 hours after brain death. (32) However there have been reports on other experimental models of lung injury and brain death advocating a 6-hour period after brain death induction for inflammatory lung analysis. (33)

The present study has limitations and one must be careful when extrapolating its results into a clinical situation. We used a standardized small animal model of brain death that includes sudden rise in intracranial pressure that does not resemble what is often found clinically, where the intracranial pressure rises at a slower pace until it leads to brain death. Another difference is the time elapsed from brain death until organ harvest which is rather longer in the clinical scenario than in our model. A brain death model in which intracranial pressure was gradually induced by inflation of a subdurally placed balloon catheter has been developed. This improved model allows the study on donor organ quality without inotropic infusion. (34)

The present study shows that early methylprednisolone administration after acute brain death does not lead to better oxygenation indices and hemodynamic parameters in lungs ventilated for 120 minutes. Our results also demonstrate an increase in the products generated by lipid peroxidation in the groups treated with methylprednisolone after 5 or 60 minutes of brain death. As

demonstrated by Yildirim et al., traumatic brain injury increased lung tissue lipid peroxidation levels significantly only at 24 h after trauma (35) and this data could explain our lipid peroxidation results but the exact causes behind these findings cannot be determined from our data.

We conclude that early or late administrations of methylprednisolone in this model of brain death have similar effects regarding inflammatory and lipid peroxidation activity on lung tissue. We suggest that late administration of methylprednisolone may be used in settings of brain dead with potential anti-inflammatory effects. Further studies investigating the effect of late administration of methylprednisolone in the setting of lung transplantation following brain death are need in order to confirm its beneficial effects on inflammatory activity.

REFERENCES

1. Trulock EP, Christie JD, Edwards LB, Boucek MM, Aurora P, Taylor DO, et al. Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-fourth official adult lung and heart-lung transplantation report-2007. *J Heart Lung Transplant.* 2007 Aug;26(8):782-95.
2. Fernandes PM, Samano MN, Junqueira JJ, Waisberg DR, Noleto GS, Jatene FB. [Lung donor profile in the State of Sao Paulo, Brazil, in 2006]. *J Bras Pneumol.* 2008 Jul;34(7):497-505.
3. Organ and tissue donation and transplantation (update 2000). Canadian Medical Association. *CMAJ.* 2000 Jul 25;163(2):206-11.
4. Chakinala MM, Kollef MH, Trulock EP. Critical Care Aspects of Lung Transplant Patients. *J Intensive Care Med.* 2002;17:8-33.
5. Yeung JC, Cypel M, Waddell TK, van Raemdonck D, Keshavjee S. Update on donor assessment, resuscitation, and acceptance criteria, including novel techniques--non-heart-beating donor lung retrieval and ex vivo donor lung perfusion. *Thorac Surg Clin.* 2009 May;19(2):261-74.

6. Cypel M, Yeung JC, Liu M, Anraku M, Chen F, Karolak W, et al. Normothermic ex vivo lung perfusion in clinical lung transplantation. *N Engl J Med*. 2011 Apr 14;364(15):1431-40.
7. Avlonitis VS, Fisher AJ, Kirby JA, Dark JH. Pulmonary transplantation: the role of brain death in donor lung injury. *Transplantation*. 2003 Jun 27;75(12):1928-33.
8. de Perrot M, Liu M, Waddell TK, Keshavjee S. Ischemia-reperfusion-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003 Feb 15;167(4):490-511.
9. Power BM, Van Heerden PV. The physiological changes associated with brain death--current concepts and implications for treatment of the brain dead organ donor. *Anaesth Intensive Care*. 1995 Feb;23(1):26-36.
10. Rosenberg RN. Consciousness, coma, and brain death--2009. *Jama*. 2009 Mar 18;301(11):1172-4.
11. de Perrot M, Bonser RS, Dark J, Kelly RF, McGiffin D, Menza R, et al. Report of the ISHLT Working Group on Primary Lung Graft Dysfunction part III: donor-related risk factors and markers. *J Heart Lung Transplant*. 2005 Oct;24(10):1460-7.
12. Pratschke J, Neuhaus P, Tullius SG. What can be learned from brain-death models? *Transpl Int*. 2005 Jan;18(1):15-21.
13. Follette DM, Rudich SM, Babcock WD. Improved oxygenation and increased lung donor recovery with high-dose steroid administration after brain death. *J Heart Lung Transplant*. 1998 Apr;17(4):423-9.
14. Wigfield C, Golledge H, Shenton B, Kirby J, Dark J. Ameliorated reperfusion injury in lung transplantation after reduction of brain death induced inflammatory graft damage in the donor. *J Heart Lung Transplant* 2002;21(1):57.
15. Bittner HB, Kendall SW, Campbell KA, Montine TJ, Van Trigt P. A valid experimental brain death organ donor model. *J Heart Lung Transplant*. 1995 Mar-Apr;14(2):308-17.
16. Herijgers P, Leunens V, Tjandra-Maga TB, Mubagwa K, Flameng W. Changes in organ perfusion after brain death in the rat and its relation to circulating catecholamines. *Transplantation*. 1996 Aug 15;62(3):330-5.
17. Pearce ML, Yamashita J, Beazell J. Measurement of Pulmonary Edema. *Circ Res*. 1965 May;16:482-8.

18. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1978;52:302-10.
19. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 1972 May 25;247(10):3170-5.
20. Maehly AC, Chance B. The assay of catalases and peroxidases: methods of biochemical analysis. In: Glick D, editor. *Methods of Biochemical Analysis.* New York: Interscience Publishers; 1954. p. 357-424.
21. Fujino Y, Goddon S, Chiche JD, Hromi J, Kacmarek RM. Partial liquid ventilation ventilates better than gas ventilation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000 Aug;162(2 Pt 1):650-7.
22. Barklin A. Systemic inflammation in the brain-dead organ donor. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2009 Apr;53(4):425-35.
23. Takada M, Nadeau KC, Hancock WW, Mackenzie HS, Shaw GD, Waaga AM, et al. Effects of explosive brain death on cytokine activation of peripheral organs in the rat. *Transplantation.* 1998 Jun 27;65(12):1533-42.
24. Skrabal CA, Thompson LO, Potapov EV, Southard RE, Joyce DL, Youker KA, et al. Organ-specific regulation of pro-inflammatory molecules in heart, lung, and kidney following brain death. *J Surg Res.* 2005 Jan;123(1):118-25.
25. McLean KM, Duffy JY, Pandalai PK, Lyons JM, Bulcao CF, Wagner CJ, et al. Glucocorticoids alter the balance between pro- and anti-inflammatory mediators in the myocardium in a porcine model of brain death. *J Heart Lung Transplant.* 2007 Jan;26(1):78-84.
26. Van Bakel AB, Pitzer S, Drake P, Kay NA, Stroud M, Sade RM. Early hormonal therapy stabilizes hemodynamics during donor procurement. *Transplant Proc.* 2004 Nov;36(9):2573-8.
27. Venkateswaran RV, Patchell VB, Wilson IC, Mascaro JG, Thompson RD, Quinn DW, et al. Early donor management increases the retrieval rate of lungs for transplantation. *Ann Thorac Surg.* 2008 Jan;85(1):278-86; discussion 86.
28. Rosendale JD, Kauffman HM, McBride MA, Chabalewski FL, Zaroff JG, Garrity ER, et al. Aggressive pharmacologic donor management results in more transplanted organs. *Transplantation.* 2003 Feb 27;75(4):482-7.

29. Kutsogiannis DJ, Pagliarello G, Doig C, Ross H, Shemie SD. Medical management to optimize donor organ potential: review of the literature. *Can J Anaesth*. 2006 Aug;53(8):820-30.
30. Faropoulos K, Apostolakis E. Brain death and its influence on the lungs of the donor: how is it prevented? *Transplant Proc*. 2009 Dec;41(10):4114-9.
31. Fisher AJ, Donnelly SC, Hirani N, Burdick MD, Strieter RM, Dark JH, et al. Enhanced pulmonary inflammation in organ donors following fatal non-traumatic brain injury. *Lancet*. 1999 Apr 24;353(9162):1412-3.
32. Avlonitis VS, Kirby JA, Dark JH. The effect of time from donor brain death to retrieval on reperfusion injury after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2005;24(2S):S121.
33. Zweers N, Petersen AH, van der Hoeven JA, de Haan A, Ploeg RJ, de Leij LF, et al. Donor brain death aggravates chronic rejection after lung transplantation in rats. *Transplantation*. 2004 Nov 15;78(9):1251-8.
34. 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 Jul;41(3):363-71.
35. Yildirim E, Kaptanoglu E, Ozisik K, Beskonakli E, Okutan O, Sargon MF, et al. Ultrastructural changes in pneumocyte type II cells following traumatic brain injury in rats. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2004 Apr;25(4):523-9.
36. Lentsch AB, Ward PA. Regulation of experimental lung inflammation. *Respir Physiol*. 2001 Oct;128(1):17-22.
37. Yang G, Hamacher J, Gorshkov B, White R, Sridhar S, Verin A, et al. The Dual Role of TNF in Pulmonary Edema. *J Cardiovasc Dis Res*. 2010 Jan;1(1):29-36.
38. Persson HL, Vainikka LK. TNF-alpha preserves lysosomal stability in macrophages: a potential defense against oxidative lung injury. *Toxicol Lett*. 2010 Feb 1;192(2):261-7.

FIGURES

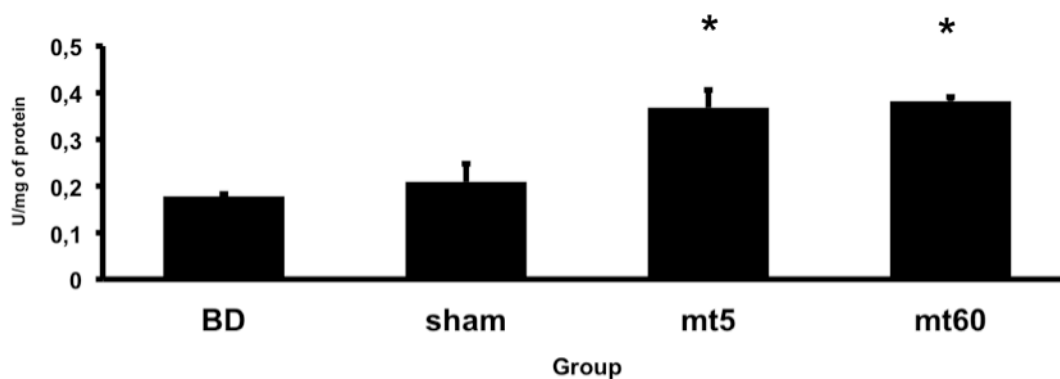


Figure 1. Oxidative stress and brain death. There was a significant increase in lipid peroxidation using TBARS assay in mt5 and mt60 groups (* $p < 0.001$) when compared to sham and BD groups. Values are expressed at mean \pm standard error of the mean.

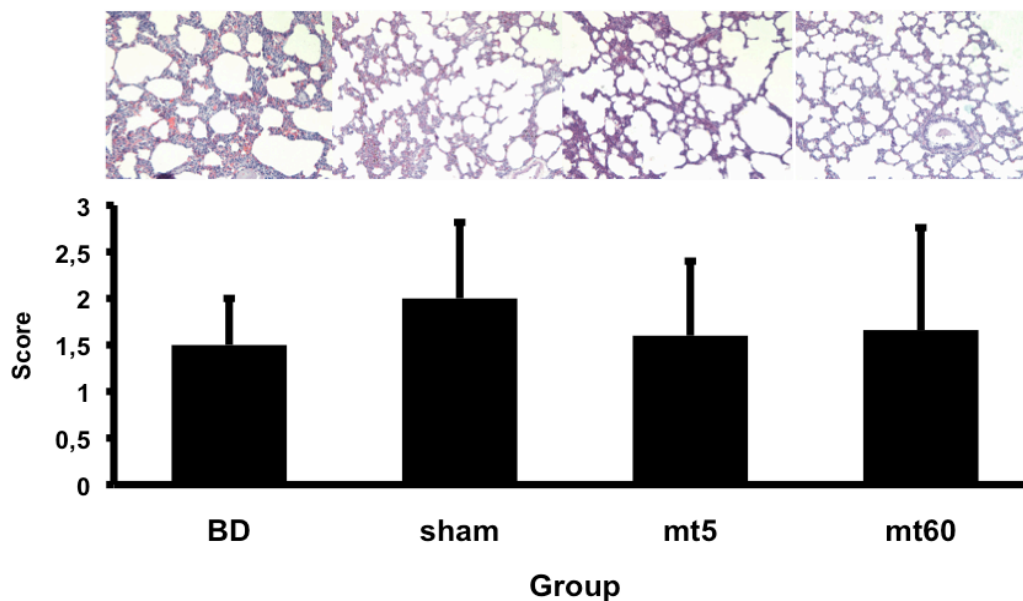


Figure 2. Histological Score and microscopic optical analysis of hematoxylin-eosin stain. No significant difference was observed between the groups. The most predominant finding was mild focal alveolar collapse. Values are expressed at mean \pm standard error of the mean. Magnification 400X.

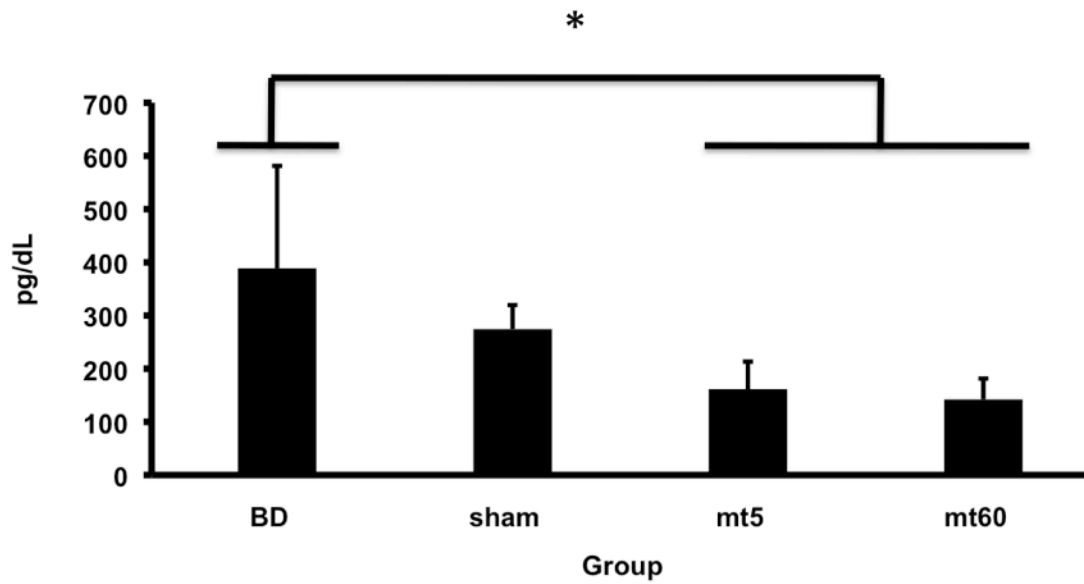


Figure 3. Pulmonary TNF- α quantification. There was a significant increase in TNF- α in BD group when compared to mt5 and mt60 groups. (* $p < 0.001$) Values are mean \pm standard error of the mean.

7. Conclusão

A administração precoce ou tardia de metilprednisolona em modelo de morte encefálica apresenta efeitos semelhantes sobre atividade inflamatória e estresse oxidativo em pulmões de ratos.

8. Considerações Finais

Com o objetivo de avaliar o efeito da administração de metilprednisolona na viabilidade pulmonar de ratos submetidos a morte encefálica, primeiramente, tivemos de estabelecer um modelo de morte encefálica factível em nosso laboratório de experimentação animal. Dessa forma, em uma primeira fase do estudo foi necessário aprimorar a técnica cirúrgica e o diagnóstico de morte encefálica em ratos até torná-lo um modelo reprodutível em nosso meio.

Demonstramos, pela primeira vez na literatura, que uma administração tardia de metilprednisolona apresenta efeitos semelhantes que a administração precoce com relação a viabilidade pulmonar nesse modelo de morte encefálica.

Este trabalho forneceu importantes informações sobre a utilização da metilprednisolona em modelo de morte encefálica em ratos e possivelmente impulsionará novos estudos para testar sua aplicabilidade em modelos animais de grande porte. Além disso, estabeleceu o modelo de morte encefálica em nosso laboratório, determinando o uso desse importante modelo nos próximos estudos experimentais relacionados a transplante pulmonar e viabilidade pulmonar.