Laura Menegat

Estudo dos processos de mobilização, ativação e apoptose das células da medula óssea em modelo de morte encefálica em ratos

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

Programa de Cirurgia Torácica e Cardiovascular

Orientadora Profª. Dra. Paulina Sannomiya

São Paulo

2016

DEDICATÓRIA

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, Célio e Stela.

Aos meus irmãos, Ana Alice e Fausto.

Ao meu esposo, Rafael Simas.

Obrigada por estarem ao meu lado realizando mais uma etapa de vida.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos

À Professora Paulina Sannomiya pela orientação, ensinamentos e pela paciência ao longo desses 4 anos de doutorado. Aprendi muito com sua ética, dedicação e profissionalismo na pesquisa científica. Desculpe-me pelas minhas falhas como aluna e mais uma vez, muito obrigada por tudo! Eternamente grata.

À Professora Primavera Borelli pelo auxílio na elaboração do projeto, pelas análises de mielograma, por me acolher em seu laboratório sempre muito gentil e pela disponibilidade de esclarecer minhas dúvidas.

Ao Professor Luiz Felipe Pinho Moreira pelo incentivo, análises estatísticas, pelas conversas e por todos os ensinamentos.

À Dra. Jacqueline Jacysyn que fez muito mais do que me ajudar na citometria de fluxo. Foi companheira de discussões científicas, de risadas e choros. Quero te agradecer por sempre estar disposta a me ajudar e por ter se tornado essa grande amiga.

Ao Professor Luiz Fernando Ferraz da Silva pelo auxílio na análise histológica e pela supervisão do estágio em docência juntamente com o Professor Paulo Hilário Nascimento Saldiva.

À Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento deste projeto (2011/22803-2).

À Maristela Tsujita e Graziela Batista da Silva por me ensinarem as técnicas, pelas inúmeras vezes que me ajudaram, tiraram minhas dúvidas por e-mail e pela paciência que tiveram comigo.

Aos amigos que ganhei quando me mudei para São Paulo:

Isaac Azevedo Silva, um pesquisador excelente, um médico e pai exemplar. Um amigo que sabe escutar e dar os melhores conselhos. Obrigada pelas melhores aulas improvisadas na sala de casa, regadas à lasanha e energético.

Fernando Zanoni, um grande amigo que a ciência trouxe e que ficará para sempre. É uma das pessoas mais pacientes que eu já conheci. Sua dedicação e organização são indiscutíveis. Obrigada pelo seu bom humor e pela sua amizade. E ainda por cima nos tornamos compadres!

Thales Rocha. O que falar da pessoa que ao mesmo tempo é ranzinza e engraçada, que é dedicado e superinteligente? Sem dúvida alguma, essa é uma amizade que não acabará assim tão fácil! Ah... Além de ciência, aprendi muito sobre futebol com você! Valeu, jovem!

Aos companheiros de LIM 11: Gustavo Judas, Leila Areco, Ismael Guarda, Sueli Ferreira, Sérgio Sales, Cristiano Correia, Roberta Vieira e Ana Cristina Faloppa.

À aluna de iniciação científica, Julia Caliman. Obrigada pela ajuda e dedicação que teve nesse tempo que trabalhamos juntas. Minha pupila!

Aos alunos Daniela Janolli, Roberto Armstrong e Raphael Coutinho.

As meninas da secretaria da pós-graduação: Tatiana, Mônica, Juliana e Neusa. Obrigada pela paciência e disposição que sempre tiveram em me ajudar.

Aos amigos “de sempre”: Arthur Rausch, Daiane Anzolin, Gustavo Gomes, Jaqueline Muniz, Luciano Machado, Vanessa Ginzeli e Tiago Silva. Vocês são os amigos que vieram no pacote quando conheci o Rafa e que se tornaram essenciais para mim. Obrigada pelas conversas e risadas que a cada encontro temos.

Às minhas grandes amigas que ganhei na faculdade: Bruna Westphal, Camila Graciola, Morgana Carvalho e Raisa Pamplona. Amizade que nem mesmo a distância pode abalar. Obrigada por me ouvirem, por entenderem minhas angústias, por serem companheiras de vida! Amo vocês!

À minha eterna melhor amiga, Camila Ramuski. Meu anjo da guarda, meu amor. Mesmo depois de tampo tempo sem você, jamais deixei de lembrar e pedir a sua proteção aí de cima. Te amo, minha linda amiga!

Aos meus primos, vocês são demais. Amo cada um de vocês, Flávia, Laís, Ana Elisa, José Otávio, Josué, Ani, Janice, Mari, Gerson, Gabi, Milena, Henrique, Matheus, Leandro, Lise, Fábio, Mari, Lenusa e Isis. Aos meus tios e tias, em especial à tia Rosa que sempre foi uma mãe, cuidando, se preocupando e incentivando. Amo vocês e sinto muita falta de todos.

Ao meu amigo mais fiel, ao colo mais acolhedor. À pessoa responsável por eu estar concluindo mais uma etapa de vida. Àquele que nunca deixou que eu desistisse de enfrentar uma batalha, que eu baixasse a cabeça. Àquele que esteve ao meu lado em cada experimento, em cada análise. Que ficou cansado

junto comigo depois de um longo experimento de citometria de fluxo. Agradeço todos os dias por Deus ter te colocado no meu caminho. Rafael Simas, obrigada por tudo que temos vivido um ao lado do outro. Meu eterno companheiro, te amo muito!

À minha sogra, Maria Aparecida Schmitt. Às minhas cunhadas e cunhados, Renata e Nelinho, Roberta e Alessandro e Jaqueline e Fabrício e aos meus sobrinhos João Pedro, Rafaela e Pietra. Obrigada por me acolherem, me receberem como parte da família e me apoiarem nessa jornada.

À minha vó Ana, que em cada ligação dizia: "*Má se cuida nesse Sun Paulo*". Vó, deu tudo certo! À minha vó Vera, que no meio do meu doutorado nos deixou para um lugar ainda melhor. Amo vocês e sinto muita falta...

Aos meus irmãos, Ana Alice e Fausto. Obrigada pelo carinho e incentivo, pelas brigas e pelas risadas. Obrigada por me apoiarem nessa decisão, obrigada pela nossa união. Sinto falta de vocês. Amo vocês.

Ao meu cunhado Sérgio, ao meu sobrinho Lucas (amor e alegria da Dinda!) e a minha cunhada Luci. Obrigada pelo incentivo de sempre. Vocês são muito especiais para mim.

Aos meus pais Célio e Stela. Obrigada por tudo que já fizeram por mim, pelas renuncias, pelas batalhas, pelos anos dedicados a nossa educação. Espero que vocês possam ter orgulho do que me tornei, pois todos os dias que olho pra vocês sinto orgulho de ter os pais que tenho. Amo muito vocês, vocês são sem dúvida alguma o meu espelho de garra e dedicação.

Agradeço, sobretudo, a minha Mãe Rainha e a Deus por terem me guiado e protegido todos esses anos.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Normalização adotada

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

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

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

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

SUMÁRIO

Sumário

Dedicatória

Agradecimentos

Normalização adotada

Sumário

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1. Introdução 1

ASPECTOS GERAIS 1

MORTE ENCEFÁLICA 2

HEMATOPOIESE 4

2. Objetivos 11

OBJETIVO GERAL 11

OBJETIVOS ESPECÍFICOS 11

3. Métodos 12

ANESTESIA 12

PROCEDIMENTO CIRÚRGICO 13

MODELO DE MORTE ENCEFÁLICA 13

PROTOCOLO EXPERIMENTAL 15

PARÂMETROS HEMODINÂMICOS E GASOMÉTRICOS 16

LEUCOGRAMA 16

OBTENÇÃO DE CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA E MIELOGRAMA 17

AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA MEDULA ÓSSEA 17

AVALIAÇÃO DOS PROCESSOS DE APOPTOSE E NECROSE DE LEUCÓCITOS DA MEDULA ÓSSEA 18

AVALIAÇÃO DAS SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS NA MEDULA ÓSSEA 19

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS MOLÉCULAS DE ADESÃO L-SELECTINA E CD11A E CD11B/C NAS CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA 20

ANÁLISE ESTATÍSTICA 21

4. Resultados 22

5. Discussão 35

6. Conclusões 41

7. Anexos 42

8. Referências 43

Apêndices 54

Epílogo 57

LISTA DE FIGURAS

Lista de figuras

Figura 1. Esquema simplificado da hematopoiese.

Figura 2. Pressão arterial média de ratos submetidos à morte encefálica e ratos falso-operados durante 360 min após o início dos procedimentos cirúrgicos.

Figura 3. Leucograma de ratos submetidos à morte encefálica e ratos falso-operados nos tempos basal, 3 h e 6 h após os procedimentos cirúrgicos.

Figura 4. Avaliação da celularidade da medula óssea de ratos com morte encefálica e ratos falso-operados.

Figura 5. Fotomicrografia de preparação citológica de células da medula óssea de rato e fotomicrografia da medula óssea do esterno de rato.

Figura 6. Análise de apoptose e necrose por técnica de citometria de fluxo das células totais da medula óssea de ratos com morte encefálica e falso-operados.

Figura 7. Gráfico de dispersão de células da medula óssea de ratos com morte encefálica e falso-operado por técnica de citometria de fluxo.

Figura 8. Expressão de moléculas de adesão granulocíticas da medula óssea de ratos com morte encefálica e falso-operado por citometria de fluxo.

LISTA DE TABELAS

Lista de tabelas

Tabela 1. Análise da gasometria arterial, eletrólitos, pH, lactato, hematócrito e hemoglobina.

Tabela 2. Contagem diferencial de células da medula óssea.

Tabela 3. Avaliação das subpopulações de linfócitos.

RESUMO

Resumo

Menegat L. *Estudo dos processos de mobilização, ativação e apoptose das células da medula óssea em modelo de morte encefálica em ratos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

INTRODUÇÃO: Estudos experimentais suportam a evidência de leucopenia persistente desencadeada pela morte encefálica (ME). OBJETIVO: Esse estudo teve como objetivo investigar o comportamento leucocitário na medula óssea e no sangue após a morte encefálica em ratos. MÉTODOS: A morte encefálica foi induzida através da inserção e insuflação rápida de um cateter no espaço intracraniano. Ratos falso-operados (FO) foram apenas trepanados. Decorridas seis horas, as células da medula óssea, coletadas da cavidade femural, foram utilizadas para as contagens total e diferencial e analisadas por citometria de fluxo para a caracterização das subpopulações linfocitárias, a expressão de moléculas de adesão granulocíticas e apoptose/necrose (método de Anexina V/Iodeto de Propídio (PI)). RESULTADOS: Ratos com ME apresentaram uma redução de 30% no número de células da medula óssea devido à redução de linfócitos (40%) e células segmentadas (45%). As subpopulações de linfócitos na medula óssea foram semelhantes nos animais ME e FO (CD3, p=0,1; CD4, p=0,4; CD3/CD4, p=0,4; CD5, p=0,4, CD3/CD5, p=0,2; CD8, p=0,8). A expressão de L-selectina e β2-Integrinas nos granulócitos também não diferiram entre os grupos (CD11a, p=0,9; CD11b/c,

p=0,7; CD62L, p=0,1). Não existem diferenças nas porcentagens de apoptose e de necrose (Anexina V, p=0,73; PI, p=0,21; Anexina V/PI, p=0,29). CONCLUSÃO: Os dados sugerem que a redução na mobilização de células da medula óssea para o sangue, desencadeada pela morte encefálica, não se relaciona a alterações de subpopulações de linfócitos, expressão de moléculas de adesão granulocíticas, ou apoptose e necrose.

Descritores: Morte encefálica; células da medula óssea; contagem de células sanguíneas; subpopulações de linfócitos; moléculas de adesão celular; apoptose; necrose; ratos.

SUMMARY

Summary

Menegat L. *Study of bone marrow cells mobilization, activation and apoptosis in brain dead rats* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2016.

INTRODUCTION: Experimental findings support the evidence of a persistent leucopenia triggered by brain death (BD). AIMS: This study aimed to investigate leukocyte behavior in bone marrow and blood after BD in rats. METHODS: BD was induced by quickly inflation of an intracranial balloon catheter. Sham operated (SH) rats were trepanned only. Six hours thereafter bone marrow cells harvested from the femoral cavity were used for total and differential counts, and analyzed by flow cytometry to characterize lymphocyte subsets, granulocyte adhesion molecules expression, and apoptosis/necrosis (annexin V/propidium iodide (PI) protocol). RESULTS: BD rats exhibited a 30% reduction in bone marrow cells due to a reduction in lymphocytes (40%) and segmented cells (45%). Bone marrow lymphocyte subsets were similar in BD and SH rats (CD3, p=0.1; CD4, p=0.4; CD3/CD4, p=0.4; CD5, p=0.4, CD3/CD5, p=0.2; CD8, p=0.8). Expression of L-selectin and β2-integrins on granulocytes did not differ (CD11a, p=0.9; CD11b/c, p=0.7; CD62L, p=0.1). There were no differences in the percentage of apoptosis and necrosis (Annexin V, p=0.73; PI, p=0.21; Annexin V/PI, p=0.29). CONCLUSIONS: Data presented suggest that the down-regulation of the bone marrow triggered by BD is not related to changes

in lymphocyte subsets, granulocyte adhesion molecules expression, or apoptosis and necrosis.

Descriptors: Brain death; bone marrow cells; blood cell count; lymphocyte subsets; cell adhesion molecules; apoptosis; necrosis; rats.

INTRODUÇÃO

1. Introdução

Aspectos Gerais

O Ministério da Saúde tem investido cada vez mais em campanhas de incentivo para que a doação de órgãos cresça no país. Ainda assim, a taxa de recusa familiar no Brasil é grande (44%) e este é, ainda, o maior obstáculo para a efetivação da doação de órgãos na maioria dos estados brasileiros. Em alguns estados, a dificuldade encontra-se em realizar testes para diagnosticar a morte encefálica. Segundo dados da Associação Brasileira de Transplante de Órgãos (ABTO) o número de transplantes tem aumentado nos últimos anos, sendo que no período de janeiro a junho de 2015 foram realizadas 3116 cirurgias de transplante de órgãos de doadores falecidos, sendo o rim e o fígado órgãos com desempenho mais positivo (2085 e 763, respectivamente). O transplante de pulmão apresentou crescimento de 22% em relação ao ano de 2014, sendo realizadas 38 cirurgias no primeiro semestre do ano de 2015, porém abaixo do esperado pela ABTO. Em 2010, 59.728 pessoas constavam na lista nacional de espera e, em 2014, esse número caiu para 38.350 (Portal da Saúde, 2015). Segundo a ABTO, até junho de 2015, o número de pacientes em lista de espera caiu para 32.000.

Nas últimas décadas e, particularmente nos últimos anos, aumentou a taxa de sucesso de transplantes devido à melhor compreensão sobre a falência

de órgãos e visão mais aprofundada a respeito do processo de rejeição do órgão transplantado (Pratschke *et al*., 2005; Skrabal *et al*., 2005; MacKay, 2011, Barklin *et al.*, 2013). Embora o transplante cardíaco tenha uma taxa de sucesso de mais de 80%, a qualidade do órgão transplantado pode afetar seu desempenho posterior (Wilhelm *et al*., 2000a). Durante a morte encefálica ocorrem disfunções hemodinâmicas, hormonais e imunológicas, comprometendo o órgão destinado ao transplante (Chamorro *et al*., 2009, Barklin, 2009, Barklin *et al.*, 2013).

Morte Encefálica

O paciente doador de órgãos é aquele que sofreu previamente um evento agudo como, por exemplo, traumatismo, hemorragia ou acidente vascular cerebral. A evolução das lesões, provocadas por um desses eventos, pode culminar com a morte encefálica do paciente, quase sempre por aumento da pressão intracraniana. (Schrader *et al.*,1985). Imediatamente após a morte encefálica ocorre um pico hipertensivo, com perda da atividade do núcleo vagal, caracterizada pela máxima estimulação da atividade simpática (Barklin, 2009; Domínguez-Roldán *et al*., 2009). O pico hipertensivo decorre do aumento de catecolaminas séricas, fase denominada de tempestade autonômica ou de catecolaminas, com liberação massiva de substâncias vasoativas que provocam vasoconstrição generalizada e redução do fluxo sanguíneo para os órgãos. A extensa vasoconstrição periférica leva à isquemia; o metabolismo se

altera de aeróbico para anaeróbico; por fim ocorre vasodilatação, hipovolemia e disfunção cardíaca (Barklin, 2009; Domínguez-Roldán *et al*., 2009). O episódio hipotensivo, que se segue ao pico hipertensivo, ocorre principalmente como consequência da vasodilatação (Chamorro *et al*., 2009; Skrabal *et al*., 2005). A morte encefálica não deve ser considerada uma situação estática, mas um processo dinâmico que, de um modo direto e através de múltiplos mecanismos, pode ter influência significativa na qualidade dos órgãos destinados ao transplante. Portanto, parece evidente que a morte encefálica seja considerada como o maior fator de estresse que acomete os órgãos antes do transplante, sendo um importante indutor de resposta inflamatória e imunológica, com elevação nas concentrações séricas de várias citocinas (Skrabal *et al*., 2005; Domínguez-Roldán *et al*., 2009). A atividade inflamatória contribui para a deterioração hemodinâmica e orgânica, e as alterações imunológicas favorecem o aparecimento posterior de fenômenos de rejeição no receptor (Chamorro *et al*., 2009, Barklin *et al.*, 2013).

Em estudos prévios, conduzidos em ratos com morte encefálica, verificou-se aumento na expressão de moléculas de adesão endoteliais na microcirculação mesentérica associada a aumento na migração leucocitária para o tecido perivascular (Simas *et al*., 2012a; Simas *et al*., 2012b). A morte encefálica induz hipoperfusão mesentérica relacionada à redução da concentração plasmática de corticosterona endógena, inflamação local e disfunção orgânica (Simas *et al*., 2012a). Além disso, Simas et al. (2015) demonstraram que a anestesia peridural torácica contínua, utilizada para bloquear o pico hipertensivo desencadeado pela tempestade autonômica, não

restaura a perfusão mesentérica, sugerindo que as alterações inflamatórias observadas na morte encefálica são desencadeadas independentemente da atividade simpática exacerbada. Além do mais, avaliando-se a influência de gêneros na evolução do processo inflamatório pulmonar, induzido pela morte encefálica, verificou-se aumento da inflamação no pulmão de ratas fêmeas, comparado ao observado em ratos machos, associado à redução aguda dos hormônios femininos, estradiol e progesterona, desencadeada pela morte encefálica (Breithaupt-Faloppa *et al.*, 2016).

Hematopoiese

O termo hematopoiese envolve a origem, a proliferação, a maturação e distribuição das células sanguíneas. Trata-se de fenômeno complexo e altamente regulado, influenciado por vários estímulos que atuam em diferentes níveis do processo, central e periférico, caracterizando-se pela contínua produção e liberação de células maduras para a circulação sanguínea (Borelli, 2004).

Em mamíferos, a hematopoiese ocorre em diferentes locais, conforme a espécie e a fase de desenvolvimento do animal. No fígado fetal e, posteriormente, no baço ocorre a produção de granulócitos, linfócitos e plaquetas (Cumano *et al.*, 1995; Medvinsky & Dzierzak, 1996). Apesar da diversidade de funções, todos os tipos de células do sangue de vertebrados diferenciam-se a partir de um progenitor comum na medula óssea, chamado de

célula-tronco hematopoiética (Kondo *et al.*, 2003). Em humanos, durante a embriogênese, a hematopoiese ocorre em locais e tempos distintos, incluindo o tecido extra-embrionário do saco vitelino, o fígado fetal, o timo e a medula prematura. Na décima primeira semana de gestação, um pequeno número de leucócitos está presente na circulação. Células hematopoiéticas são vistas pela primeira vez na medula da décima a décima primeira semanas de desenvolvimento embrionário, permanecendo confinadas nas regiões da diáfise dos ossos longos até a décima quinta semana de gestação (Williams, 2010). A partir do quinto mês de gestação, com o surgimento da cavidade óssea, a hematopoiese passa a localizar-se na medula óssea, dando início ao período medular da hematopoiese fetal e adulta (Cumano *et al*., 1995; Medvinsky & Dzierzak, 1996). A medula se torna o principal local de hematopoiese após a vigésima quarta semana de gestação, permanecendo assim durante o resto da vida fetal (Williams, 2010). Após o nascimento, a medula óssea constitui-se no único local de produção das células sanguíneas em humanos, enquanto que, em ratos e camundongos, tanto o baço, como a medula óssea permanecem, fisiologicamente, como órgãos hematopoiéticos (Medvinsky & Dzierzak, 1996; Bianco, 2011).

Fisiologicamente, as células hematopoiéticas desenvolvidas dentro da cavidade óssea saem da medula somente após atingirem certo grau de maturação, quando perdem determinadas proteínas de adesão (integrinas), o que permite, no caso dos leucócitos, a sua migração pelo parênquima medular e penetração no sinusóide, atingindo a luz do vaso (Figura 1) (Williams *et al*., 2011; Del Fattore *et al*., 2010).

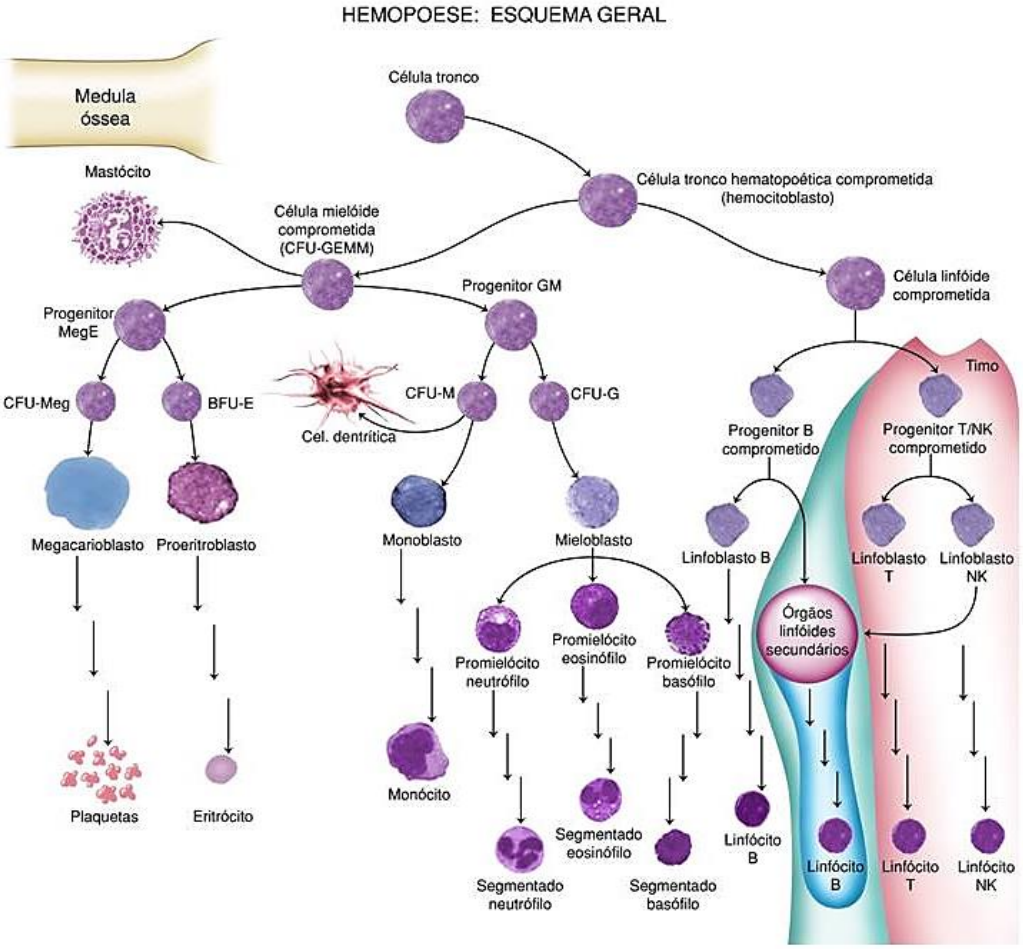


Figura 1. Esquema simplificado da hematopoiese. As células sanguíneas derivam de um precursor pluripotente denominado de célula tronco hemopoética, que por sua vez se origina da célula tronco embrionária. A célula tronco hemopoética dá origem a duas populações celulares de precursores multipotentes denominados de progenitor mielóide comprometido e o progenitor linfóide comprometido. Assume-se atualmente que a população de células mastocitárias derivam diretamente do progenitor CFU-GEMM (C*olony Formating Units of Granulocytic, Erythrocytic, Megakaryocytic and Monocytic series)*. Por outro lado, a população linfóide comprometida originará os progenitores dos linfócitos B e os progenitores dos linfócitos T/NK, que ao migrarem para o timo, irão diferenciar-se nas diferentes populações de células T e da linhagem NK (Primavera Borelli. Hemopoiese, cap. 2, Fundamentos de Hematologia: teoria e prática, Ed. Blucher, São Paulo, Brasil, *in press*. Imagem cedida gentilmente pala autora).

O microambiente medular apresenta-se como uma estrutura compartimentalizada, altamente organizada e dinâmica que, além de atuar como parênquima de sustentação para as células hematopoiéticas, possibilita a proliferação, diferenciação e maturação das células precursoras (Brach & Herrmann, 1991; Eaves *et al*., 1991; Mayani *et al*., 1992). Células tronco hematopoiéticas, residentes na medula óssea, dão origem às células do sistema imunológico. Porém, enquanto a maioria das células completa sua diferenciação na medula óssea, os linfócitos T precisam migrar para o timo para completar sua diferenciação (Ciofani & Zúñiga-Pflücker, 2007). No timo, são encontradas células em estágio incompleto de maturação, sendo caracterizadas como $CD3^{-}$ $CD4^{lo/-}CD8^{-}$. Tais células possuem potencial para diferenciação em linfócitos B, T, NK (*Natural Killer*) e células dendríticas (Hirose *et al*., 2002).

Diversos fatores influenciam o processo de diferenciação e maturação dos leucócitos na medula óssea. Citocinas, como a interleucina (IL)-1 e IL-3, produzem efeitos gerais, estimulando o desenvolvimento de diferentes tipos de leucócitos. Porém, existem estímulos que atuam de maneira específica no desenvolvimento das células da medula óssea, como os fatores de crescimento (Fox, 2007).

Os fatores de crescimento hematopoiéticos são hormônios glicoproteicos que regulam a proliferação e a diferenciação das células progenitoras hematopoiéticas e a função das células sanguíneas maduras. Esses fatores podem agir no local em que são produzidos por contato célula-célula ou podem circular no plasma. Podem causar não só a proliferação celular, como também

estimular a diferenciação e a maturação e prevenir a apoptose (Hoffbrand & Moss, 2013). Dentre os fatores de crescimento podemos citar o G-CSF (*Granulocyte colony-stimulating factor*), que estimula o desenvolvimento de neutrófilos e o GM-CSF (*Granulocyte macrophage-colony-stimulating factor*), que estimula o desenvolvimento de monócitos e eosinófilos (Fox, 2007).

Os leucócitos possuem papel fundamental na evolução do processo inflamatório bem como no processo de rejeição de órgãos, através da produção de citocinas, quimiocinas e mediadores lipídicos, resultando na ativação do endotélio e amplificando a ativação e o recrutamento de leucócitos (Williams *et al*., 2011; Sadik, 2011). Uma vez ativado, o endotélio aumenta sua interação com os leucócitos circulantes, através de moléculas de adesão expressas por ambas as células (Ley *et al*., 2007). Entre as moléculas de adesão expressas pelos leucócitos, inclui-se a família das β_2 integrinas (complexo CD11/CD18), constituídas de uma sub-unidade α e uma β. Entre as sub-unidades α, incluem-se CD11a, CD11b e CD11c, as quais compõem com a sub-unidade β_2 diferentes moléculas de integrina (Hogg *et al*., 2011; Abbas, 2008). A família das selectinas inclui a E-selectina, expressa pelas células endoteliais, a P-selectina, expressa pelas plaquetas e células endoteliais, e a L-selectina, expressa pelos leucócitos (Petri, 2008). A L-selectina (CD62L), em particular, tem a função de mediar a interação inicial do leucócito com o endotélio e o deslocamento dos linfócitos T *naïves* para os linfonodos periféricos (Abbas, 2008). Embora CD8 seja encontrado em células dendríticas e células T em todas as espécies (de la Mata *et al.*, 2001; Vremec *et al.*, 2000; Winkel *et al.*,

1994), é somente em ratos e humanos que o CD8 é encontrado em uma variedade maior de células do sistema imune.

Embora em indivíduos saudáveis um pequeno número de células tronco hematopoiéticas estejam presentes na circulação (1/100.000 células mononucleares), a hematopoiese ocorre somente quando estas células se encontram seletivamente retidas no espaço extravascular da medula óssea (Bentley, 1981; Nilsson *et al*., 2001; Tavassoli & Minguell, 1991; Badami *et al*., 2007). Por outro lado, pacientes vítimas de algum tipo de traumatismo grave, choque hemorrágico ou queimaduras, exibem aumento do número de células progenitoras hematopoiéticas circulantes, seguido de disfunção da medula óssea (Badami *et al*., 2007). O acidente vascular cerebral, por exemplo, induz uma resposta inflamatória sistêmica seguido, mais tarde, por imunodepressão (Denes *et al*., 2011).

Os neutrófilos são os leucócitos mais abundantes na circulação e são as primeiras células a serem recrutadas na vigência do processo inflamatório. Após a sua produção e maturação, os neutrófilos permanecem na medula óssea durante 4 a 6 dias até a sua saída para o sangue periférico. Normalmente, os neutrófilos possuem vida média na circulação de 6 a 8 horas, e nos tecidos de 1 a 4 dias. (Luo & Loison, 2008, Rankin, 2010). Em condições normais, os neutrófilos e os demais leucócitos são produzidos constantemente na medula óssea compensando as perdas por apoptose ou necrose (Tak *et al.*, 2013).

Os processos de morte celular conhecidos como apoptose e necrose podem ser diferenciados a partir da observação de alterações morfológicas e bioquímicas (Willinghan, 1999). Esses processos são importantes na manutenção da homeostasia tecidual, na hematopoiese e na diferenciação de linfócitos, bem como remoção de células danificadas, infectadas ou potencialmente neoplásicas (Saikumar *et al.*, 1999, Hoffbrand & Moss, 2013). A perda progressiva da integridade da membrana, por exemplo, pode ser avaliada pela incorporação de 7-aminoactinomicina D (7-AAD) ao DNA, que permite distinguir as células apoptóticas precoces das inviáveis (Schmid *et al.*, 1994). Assim, células em estágios iniciais de apoptose são fracamente marcadas com 7-AAD, enquanto as células inviáveis permitem a penetração efetiva deste marcador.

Estudos demonstram que o acidente vascular cerebral, o qual eventualmente leva à morte encefálica, pode comprometer o sistema imunológico dos pacientes, tornando-os mais susceptível a infecções. (Prass *et al.,* 2003; Liesz *et al.*, 2009). Além disso, diversos estudos previamente conduzidos em modelo experimental de morte encefálica resultaram em um maior recrutamento de leucócitos em órgãos alvos de transplante, sendo frequentemente observado infiltrado leucocitário no tecido cardíaco, pulmonar, hepático e renal (Simas *et al.*, 2012b; Simas *et al*., 2015; Yeh *et al.2002;* Faropoulos & Apostolakis *et al*., 2009; Rostron *et al.*, 2008; Wilhelm *et al.,* 2000b). Portanto, um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos no processo de mobilização e ativação leucocitária na morte encefálica poderia resultar em intervenções mais efetivas no manejo do doador de órgãos.

OBJETIVOS

2. Objetivos

Objetivo Geral

Investigar a mobilização, ativação e apoptose de células da medula óssea em modelo de morte encefálica em ratos.

Objetivos Específicos

- Avaliar o leucograma e o mielograma
- Proceder à avaliação histológica da medula óssea
- Avaliar células da medula óssea em apoptose ou necrose
- Investigar as subpopulações de linfócitos da medula óssea
- Avaliar a expressão de moléculas de adesão (L-selectina e CD11a, CD11b/c) em granulócitos da medula óssea

MÉTODOS

3. Métodos

O presente estudo foi submetido à Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, protocolado sob nº SDC 3742/11/160. Os animais utilizados foram obtidos junto ao Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e os experimentos foram realizados no Laboratório de Cirurgia Cardiovascular e Fisiopatologia da Circulação (LIM-11) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os animais foram manipulados de acordo com as diretrizes do *National Institute of Health* (1985) para o cuidado, manipulação e utilização de animais de laboratório.

Foram utilizados 30 ratos Wistar, machos, pesando entre 250 e 350 g, com aproximadamente 12 semanas de idade, mantidos em ambiente com controle de temperatura (23 ± 2°C), umidade e exposição à luz, com ciclo claro/escuro de 12 h e acesso livre à ração (QUIMTIA S.A., Colombo, PR) e água.

Anestesia

Os animais foram anestesiados em câmara fechada com isoflurano a 5%, seguido de intubação oro-traqueal com jelco 16 G conectado a um

ventilador para roedores (Harvard 683, Harvard Apparatus, Inc, Holliston, MA, USA), mantendo-se a frequência respiratória de 70 ciclos por minuto, volume corrente de 10 mL/Kg, FiO_2 de 100% e isoflurano a 2% ao longo do experimento.

Procedimento Cirúrgico

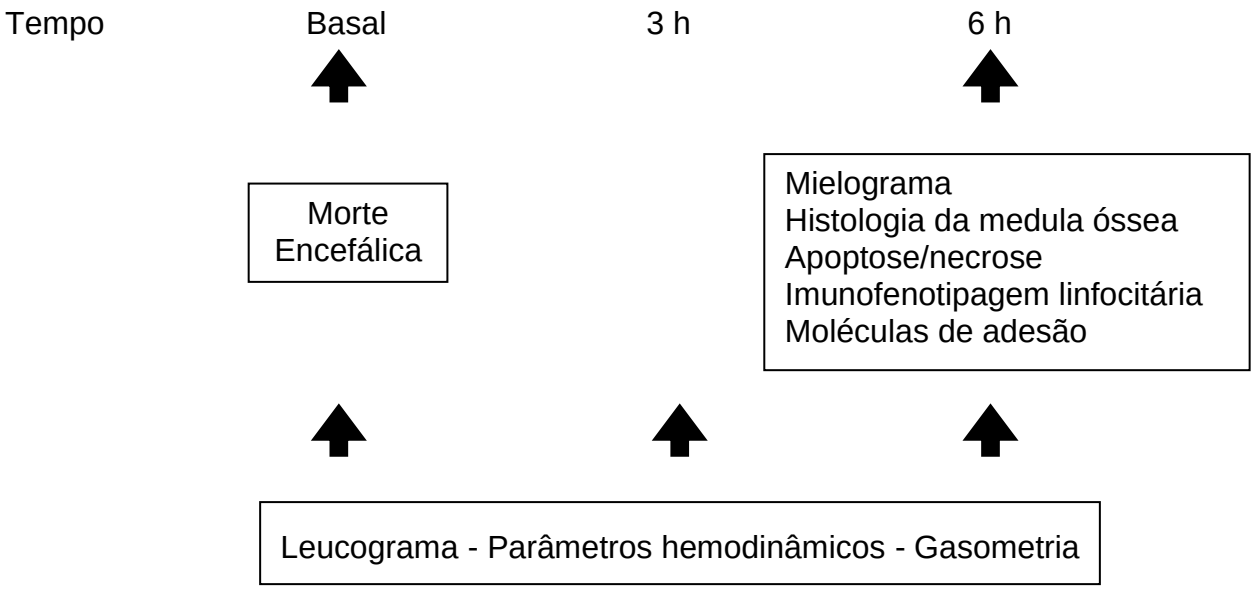
Após intubação e sob manutenção anestésica, os animais foram posicionados em decúbito dorsal, em placas aquecedoras para manutenção da temperatura (37°C), e submetidos à tricotomia da região cervical ventral e anti-sepsia local com iodopovidine. A artéria carótida e a veia jugular direita foram canuladas, utilizando cateter de polietileno Clay Adams PE-10, conectados a um cateter PE-50.

Modelo de Morte Encefálica

Os animais foram colocados em decúbito ventral para a realização da trepanação. Utilizando-se uma broca motorizada foi realizada a perfuração da calota craniana para posterior inserção de um cateter Fogarty-4F (Edwards Lifescience LLC, Irvine, CA, USA). A indução da morte encefálica foi realizada através da rápida insuflação do cateter com 500 µL de água destilada, sendo confirmada por pico hipertensivo, ausência de reflexos, midríase bilateral e

apneia. Em seguida, a anestesia foi suspensa e os animais receberam infusão contínua de solução salina 0,9% através da veia jugular (2 mL/h) para minimizar a desidratação. Ratos falso-operados foram apenas submetidos à trepanação, sem inserção do cateter e sem infusão contínua de solução salina, e o plano anestésico se manteve ao longo de todo o tempo de avaliação.

Protocolo Experimental



Grupos:

ME – animais submetidos à morte encefálica

FO – animais submetidos apenas à trepanação

Parâmetros Hemodinâmicos e Gasométricos

Através de um cateter colocado na artéria carótida e conectado a um transdutor de pressão (P23XL, Viggo-Spectramed Inc., Oxnard, CA, USA), ligado a um sistema multicanal de aquisição de dados biológicos (Acqknowledge – Biopac Systems, Inc., Goleta, CA, USA), a pressão arterial média (PAM) dos animais foi monitorada ao longo dos experimentos. Amostras de sangue da artéria carótida foram coletadas para a determinação dos parâmetros pH, pO_2, pCO_2, HCO_3^-, BE, sO_2, Na^+, K^+, e lactato (Radiometer ABL 555, Radiometer Medical, Copenhagen, Denmark). Um cateter inserido na veia jugular foi utilizado para reposição volêmica, com infusão contínua de solução salina (NaCl 0,9%), nos animais submetidos à morte encefálica.

Leucograma

Antes da morte encefálica (basal), 3h e 6h após, amostras de 20 µL de sangue foram obtidas através de punção na cauda dos animais para as contagens total e diferencial de leucócitos em analisador hematológico (Auto Hematology Analyzer, Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co., Ltd., Shenzhen, China).

Obtenção de Células da Medula Óssea e Mielograma

Os animais foram exanguinados pela aorta abdominal e as células da medula óssea foram coletadas do fêmur por meio de lavagem da cavidade medular com 10 mL de meio de cultura Iscove's (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) suplementado com 10% de soro bovino fetal (Cultilab, Campinas, SP, Brasil). Após centrifugação a 500 *xg*, 4°C por 10 min, as células foram ressuspensas em volume final de 2 mL de meio de cultura Iscove's. As células foram diluídas com solução de Turk (1:50) e a contagem realizada em câmara de Neubauer. A contagem diferencial foi realizada após citocentrifugação das células coradas pelo método May-Grunwald-Giemsa (Sigma Chemical Co.), avaliando-se 300 células por amostra.

Avaliação Histológica da Medula Óssea

O esterno dos animais foi isolado, fixado em paraformaldeído a 4% por 48 h a temperatura ambiente, descalcificado em solução de EDTA a 4% (pH 7,2) por 60 dias e incluídos em parafina. Cortes de aproximadamente 3 µm foram processados para coloração pelo método da hematoxilina e eosina. A determinação da celularidade da medula óssea do esterno foi realizada através da técnica de contagem de pontos (Weibel,1990), excluindo-se aqueles que coincidirem com o tecido ósseo e tecido adiposo. O sistema utilizado para

aquisição das imagens incluiu uma câmera digital DS-Ri1 (Nikon, Tokyo, Japan), conectada ao microscópio (Nikon) e a um computador. As imagens foram analisadas no aumento final de 20x utilizando-se o software NIS-Element Advanced Research (Nikon, Tokyo, Japan).

Avaliação dos Processos de Apoptose e Necrose de Leucócitos da Medula Óssea

Os processos de apoptose e necrose foram avaliados utilizando-se o método da anexina V – iodeto de propídeo. Células da medula óssea, obtidas dos mesmos animais, foram ressuspensas em tampão a $1x10^6$ células/mL (Binding Buffer, BD-Pharmigen, San Diego, CA, USA). Alíquotas contendo $1x10^5$ células, 5 µL de anexina V-FITC (BD-Pharmingen,San Diego, CA, USA) e 5 µL de iodeto de propídeo (BD-Pharmingen, San Diego, CA, USA) foram incubadas por 15 min, a 25ºC e ao abrigo da luz. Para controle da viabilidade celular, 5µL de 7-AAD foi adicionado a tubos contendo $1x10^6$ células e incubadas por 10 min em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Em seguida, adicionaram-se 400 µL do tampão e as amostras foram analisadas por citometria de fluxo. A análise foi realizada sobre aquisição de 10.000 células no citômetro de fluxo BD FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) empregando-se o programa FlowJo (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA).

Avaliação das Subpopulações de Linfócitos na Medula Óssea

Para a determinação da imunofenotipagem linfocitária na medula óssea foram utilizados os seguintes anticorpos monoclonais: IgG3 de camundongo anti-CD3 de rato conjugado à ficoeritrina (PE, Abcam, Inc., MA, USA); IgG1 de camundongo anti-CD4 de rato conjugado à aloficocianina (APC, AbD Serotec, Oxford, UK); IgG1 de camundongo anti-CD5 de rato conjugado ao isotiocianato de fluoresceína (FITC, Abcam, Inc., MA, USA); IgG1 de camundongo anti-CD8 de rato conjugado à PE (Abcam, Inc., MA, USA) e respectivos isótipos controles negativos conjugados aos fluorocromos indicados (Abcam, Inc., MA, USA).

As células da medula óssea do fêmur foram coletadas, conforme descrito anteriormente, após centrifugação, ressuspensas em 1 mL de NaCl 0,2% (1 min) adicionando-se, em seguida, 1 mL de NaCl 1,6% (1 min) para a lise das hemácias. Após centrifugação a 400 *xg*, 4ºC por 5 min, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 1 mL de tampão fosfato salina (PBS) contendo 1% BSA (*bovine serum albumin*). Alíquotas contendo $1x10^6$ células e 5 µL de cada anticorpo de interesse (não diluído), ou seus respectivos controles negativos, foram incubados por 30 min a 4ºC e ao abrigo da luz. Após duas lavagens com PBS contendo 1% de BSA, com a finalidade de eliminar os anticorpos que não se fixaram, o sedimento celular foi ressuspenso em 300 µL de PBS contendo 1% de paraformaldeido e as amostras analisadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto II (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). A

análise da expressão dos antígenos foi realizada sobre 10.000 células empregando-se o programa FlowJo (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA).

Avaliação da Expressão das Moléculas de Adesão L-selectina e CD11a e CD11b/c nas Células da Medula Óssea

Células da medula óssea do fêmur foram obtidas dos mesmos animais para avaliação das moléculas de adesão. Uma suspensão de leucócitos ($1x10^6$ células/mL) foi incubada por 30 min a 4ºC com 5 µL dos seguintes anticorpos monoclonais: IgG1 de camundongo anti-CD62L de rato conjugado ao FITC (Abcam, Inc., MA, USA); IgG2a de camundongo anti-CD11a de rato conjugado ao FITC (Abcam, Inc., MA, USA); IgG2a de camundongo anti-CD11b/c de rato conjugado à PE (Abcam, Inc., MA, USA), e respectivos isótipos controles negativos conjugados aos fluorocromos indicados (AbD Serotec, Oxford, UK).

As células foram lavadas duas vezes com PBS-BSA, centrifugadas a 300 *xg* por 5 min a 4ºC, com a finalidade de eliminar os anticorpos que não se fixaram. Em seguida, o sedimento celular foi ressuspenso em 300 µL de PBS contendo 1% de paraformaldeído e as amostras analisadas por citometria de fluxo (BD FACSCanto II, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). A análise da expressão dos antígenos foi realizada sobre 10.000 células empregando-se o programa FlowJo (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA).

Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o software *GraphPad Prism* e as variáveis são apresentadas como média e erro padrão da média (EPM). Os parâmetros de distribuição normal foram avaliados utilizando ANOVA de duplo fator, complementada pelo teste de Tukey para múltiplas comparações, ou teste *t* de Student não pareado. Consideraram-se significativos valores de *p* menor que 0,05.

RESULTADOS

4. Resultados

A indução da ME desencadeia um súbito aumento na pressão arterial média, imediatamente após a rápida insuflação do cateter. Este aumento foi seguido por uma diminuição da PAM abaixo dos valores basais, retornando aos níveis normais após 1 hora (Figura 2). Em ratos FO não foram observadas diferenças na PAM ao longo do tempo. Não se observaram diferenças na gasometria arterial, eletrólitos, pH, lactato, hemoglobina e valores de hematócrito entre os grupos ME e FO nos tempos Basal, 3 h e 6 h (Tabela 1).

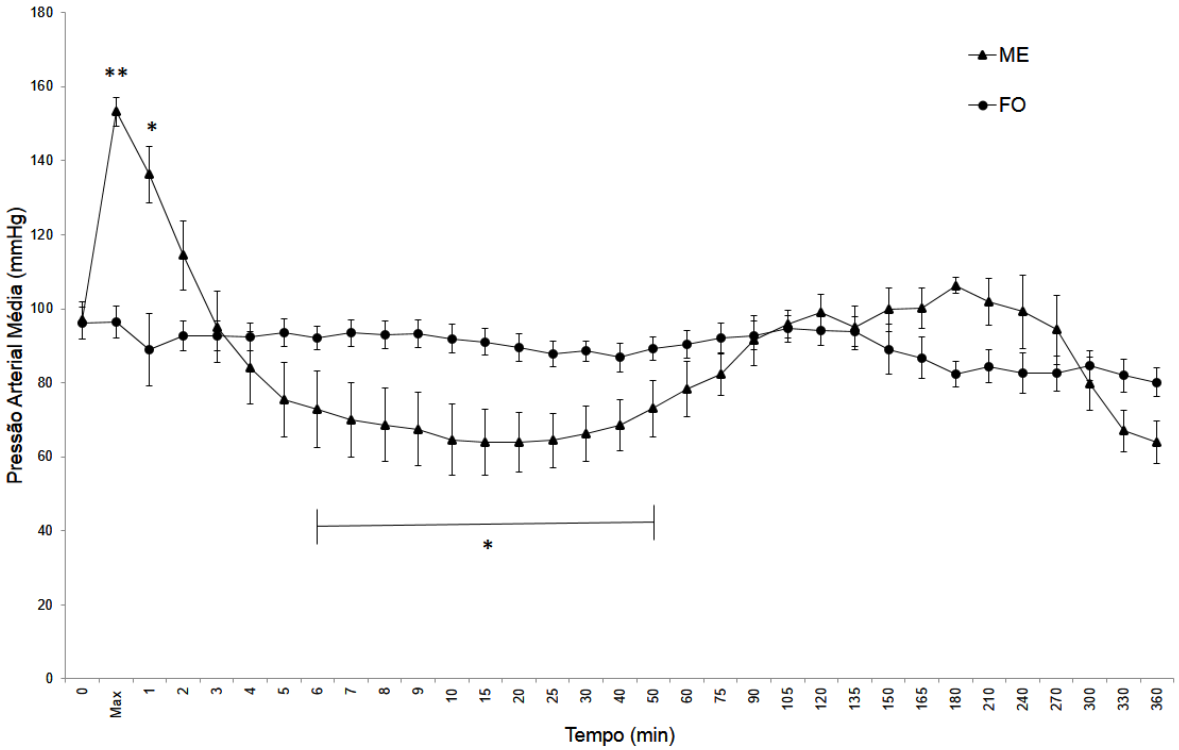


Figura 2. Pressão arterial média de ratos submetidos à morte encefálica (ME, n=13) e ratos falso-operados (FO, n=13) durante 360 min após o início dos procedimentos cirúrgicos. Os dados representam a média±EPM. *p<0,05, **p<0,0001 *vs* FO.

Tabela 1. Análise da gasometria arterial, eletrólitos, pH, lactato, hematócrito e hemoglobina.

	Morte Encefálica			Falso Operado		
	Basal	3 horas	6 horas	Basal	3 horas	6 horas
pH	7,34±0,02	7,373±0,03	7,353±0,03	7,439±0,02	7,384±0,02	7,403±0,02
pCO_2 (mmHg)	29,05±2,43	39,53±5,35	37,5±4,01	26,68±1,82	32,52±2,42	31,65±2,46
pO_2 (mmHg)	358,1±18,2	318,1±22,43	273±18,23	321±22,97	279,5±23	288,2±23,6
$HCO3^-$ (mmol/L)	18,68±0,78	19,93±0,73	19,3±0,99	17,59±0,82	18,68±0,80	19,78±1,63
BE (mmol/L)	-3,85±0,77	-4,28±0,74	-5,22±0,68	-4,33±0,72	-5,00±0,63	-3,88±0,80
sO_2 (%)	99,84±0,03	99,64±0,19	99,72±0,04	99,65±0,18	99,38±0,38	99,30±0,47
K^+ (mmol/L)	3,74±0,14	3,98±0,20	3,93±0,28	3,56±0,08	3,48±0,25	3,59±0,20
Na^+ (mmol/L)	150,8±1,29	155,6±1,18	157,2±1,03	148,5±1,15	152,8±1,21	151,8±1,29
Lactato (mmol/L)	3,91±0,52	1,43±0,20	1,92±1,14	3,99±0,40	2,90±0,30	2,80±0,32
Hematócrito (%)	45,15±0,97	42,9±1,37	41,95±1,60	46,60±1,47	45,87±1,69	43,86±1,24
Hemoglobina (g/dL)	10,26±0,20	9,50±0,22	8,40±0,32	11±0,53	9,62±0,35	9,07±0,36

Os valores representam a média±EPM de 13 animais/grupo.

As contagens de leucócitos realizadas nos tempos basal, 3 e 6 h encontram-se ilustradas na Figura 3. Com relação ao grupo FO, os ratos do grupo ME exibiram redução no número de leucócitos totais que variou de 44% em 3 h para 53%, 6 h após os procedimentos cirúrgicos. O número de granulócitos diminuiu aproximadamente 55%, e monócitos 75% em comparação aos valores observados no grupo FO. Apesar de não haver diferenças significativas no número absoluto de linfócitos entre os grupos ME e FO, a razão granulócito/linfócito diferiu significativamente. Os valores (média±EPM) obtidos foram: 2,35±0,32 no grupo ME, e 5,73±0,48 no grupo FO (p<0,0001). Verificou-se, ainda, um aumento do número de leucócitos totais no grupo FO em 3 e 6 h quando comparado com os valores basais, devido a um aumento no número de granulócitos. No entanto, em relação aos valores basais, os ratos do grupo ME exibiram leucopenia devido à redução do número de linfócitos e monócitos. A contagem de granulócitos não se alterou em 3 e 6 h, quando comparada com os valores basais (Figura 3).

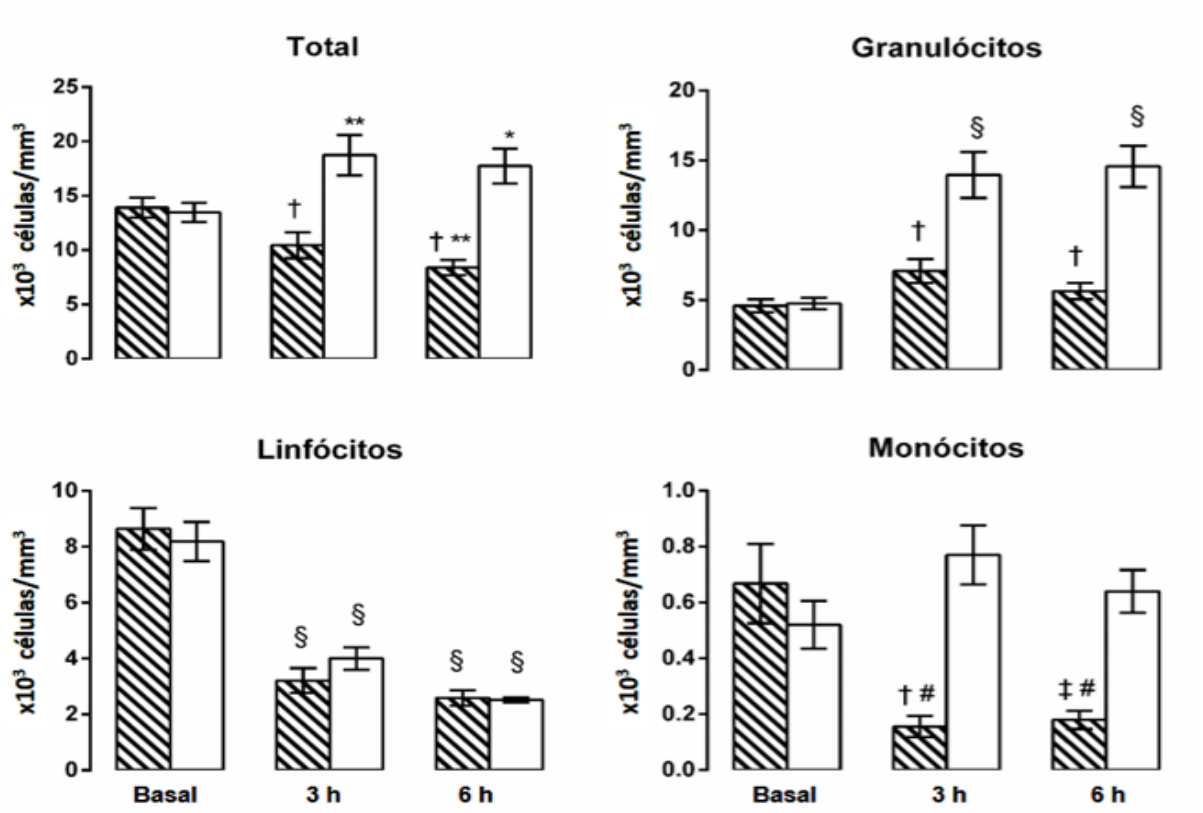


Figura 3. Leucograma de ratos submetidos à morte encefálica (coluna hachurada, n=10) e ratos falso-operados (coluna aberta, n=10) nos tempos basal, 3 h e 6 h após os procedimentos cirúrgicos. Os dados representam a média±EPM. ‡*p*<0,01, †*p*<0,0001 *vs* FO. **p*<0,05, ***p*<0,01, #*p*<0,001, §*p*<0,0001 *vs* valores basais.

Ao final dos experimentos, as células da medula óssea foram coletadas através de lavagem do canal femoral, e o esterno dos animais foi preparado para análise histológica. Os dados, ilustrados na Figura 4, demonstram que os ratos ME exibiram uma redução de 30% no número total de células da medula óssea em comparação com os valores obtidos nos ratos FO. Conforme resumido na Tabela 2, houve redução no número de linfócitos (40%) e células segmentadas (45%) no grupo ME. Não houve diferença no número de células imaturas, células jovens, células em forma de anel, macrófagos e eosinófilos entre os grupos ME e FO. Fotomicrografias características da medula óssea encontram-se ilustradas na Figura 5.

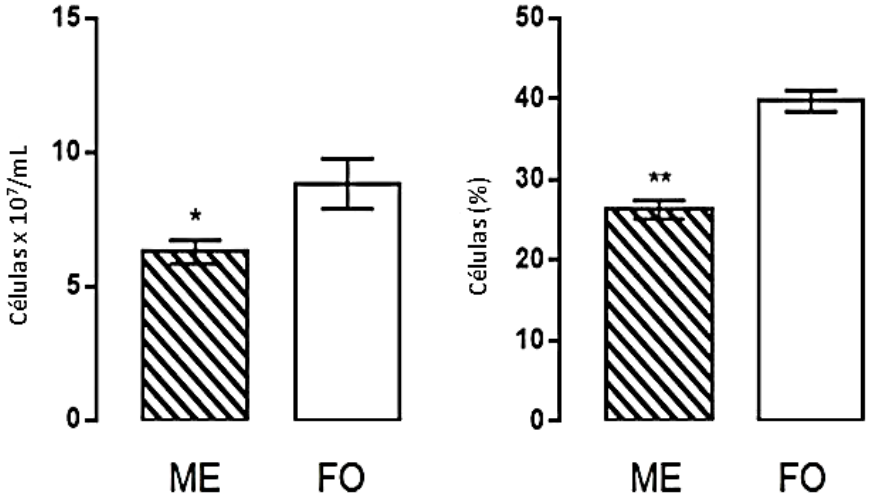


Figura 4. Avaliação da celularidade da medula óssea de ratos com morte encefálica (ME) e ratos falso-operados (FO). A, contagem total das células da medula óssea do fêmur (10 animais/grupo). B, análise histológica do esterno (10 campos/amostra; 7 animais/grupo). Os dados representam a média±EPM. *p<0,05, **p<0,0001.

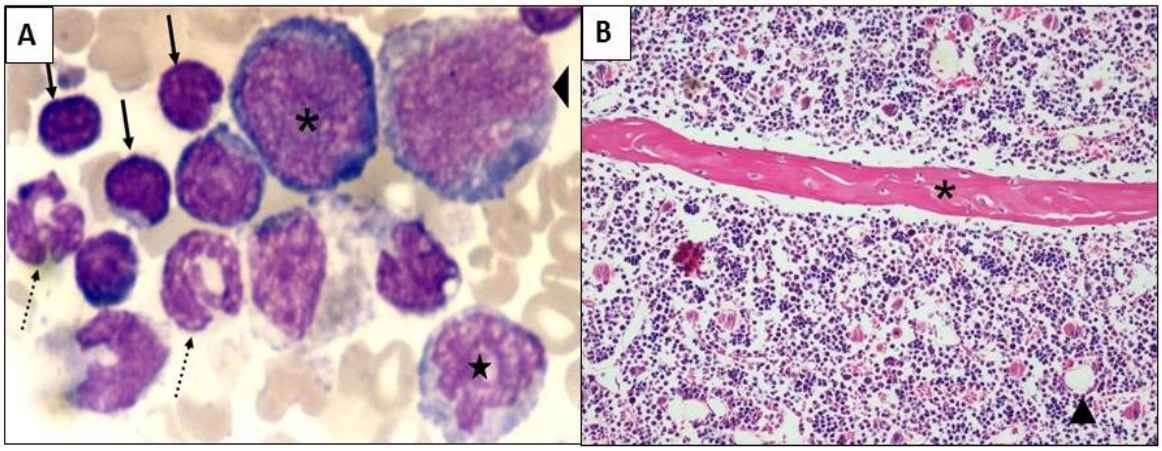


Figura 5. A, Fotomicrografia de preparação citológica de células da medula óssea de rato. Coloração de May-Grunwald-Giemsa. O asterisco indica um proeritroblasto; as setas indicam linfócitos; as setas tracejadas indicam neutrófilos segmentados; a cabeça de seta indica célula blástica da linhagem granulocítica e a estrela indica célula jovem da linhagem granulocítica (aumento final 1000x). B, Fotomicrografia da medula óssea do esterno de rato. Coloração hematoxilina e eosina. O asterisco indica a trabécula óssea e a cabeça de seta indica a presença de gordura (aumento final 20x).

Tabela 2. Contagem diferencial de células da medula óssea

Células x10^7/mL	ME	FO	*P*
Linfócitos	1,453±0,287	2,416±0,330	0,0410
Células Imaturas	0,357±0,098	0,290±0,065	0,5716
Células Jovens	0,652±0,099	0,675±0,167	0,7255
Células em Anel	0,608±0,124	0,889±0,283	0,3763
Segmentados	0,394±0,050	0,713±0,125	0,0287
Macrófagos	0,067±0,020	0,099±0,026	0,3505
Eosinófilos	0,397±0,057	0,549±0,089	0,1679

Os valores representam a média±EPM de ratos submetidos à morte encefálica (ME, n=10) e ratos falso-operados (FO, n=10).

Em outra série de experimentos, foi realizada citometria de fluxo das células da medula óssea dos animais ME e FO. Para isso, procedeu-se o teste de viabilidade celular com 7-AAD a fim de saber se as células estavam viáveis para utilização. Os animais foram avaliados quanto aos processos de apoptose e necrose das células da medula óssea por técnica de citometria de fluxo. Conforme ilustrado na Figura 6, observa-se a representação gráfica da apoptose/necrose (anexina/PI) das células obtidas de ratos ME e de ratos FO. Não houve, entretanto, diferenças significativas entre os grupos ME e FO.

Resultado semelhante foi observado ao se investigar a imunofenotipagem das subpopulações linfocitárias na medula óssea. Conforme ilustrado na Figura 7 e os dados resumidos na Tabela 3, não houve diferenças significativas entre os grupos ME e FO quanto à porcentagem de linfócitos $CD3^+$, $CD4^+$, $CD5^+$ e $CD8^+$ ou com dupla marcação $CD3^+/CD4^+$ e $CD3^+/CD5^+$, destacando-se a predominância de linfócitos $CD3^+$ em ambos os grupos de animais, ME e FO.

Conforme ilustrado na Figura 8, verifica-se que a subpopulação granulocítica da medula óssea dos animais ME e FO expressa, de modo consistente, as moléculas de adesão CD11b/c e a L-selectina. Os dados, indicam a prevalência destas moléculas sobre a expressão de CD11a. Não houve, entretanto, diferenças significativas entre os grupos de animais ME e FO.

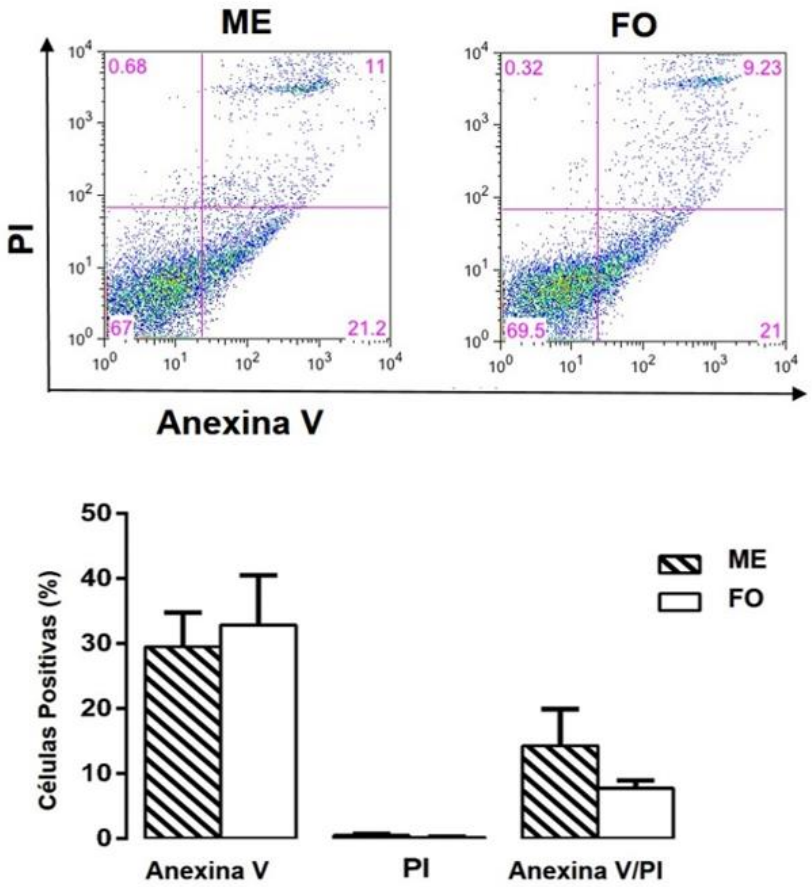


Figura 6. Análise de apoptose e necrose por técnica de citometria de fluxo das células totais da medula óssea de ratos com morte encefálica (ME) e falso-operados (FO) utilizando dupla marcação com Anexina V e Iodeto de Propídio (PI). Os dados são apresentados como média±EPM de 5 animais por grupo.

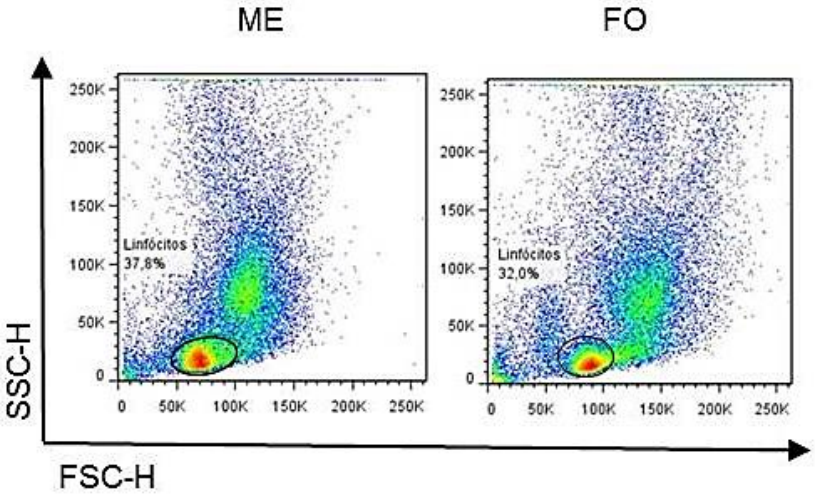


Figura 7. Gráfico de dispersão de células da medula óssea de ratos com morte encefálica (ME) e falso-operado (FO) por técnica de citometria de fluxo. A abcissa representa o volume celular (FSC) e a ordenada representa a granulosidade (SSC). A análise das subpopulações linfocitárias foi realizada a partir da região selecionada.

Tabela 3. Avaliação das subpopulações de linfócitos

	ME	FO	*p*
$CD3^+$	30,3±13,4	61,9±3,4	0,100
$CD4^+$	5,0±2,7	1,2±0,2	0,400
$CD3^+/CD4^+$	6,5±2,1	11,6±4,1	0,400
$CD3^+$	28,2±12,7	60,7±5,1	0,100
$CD5^+$	4,3±2,6	1,0±0,2	0,400
$CD3^+/CD5^+$	7,5±1,9	11,6±1,9	0,200
$CD8^+$	0,9±0,2	1,1±0,1	0,800

Determinação das subpopulações de linfócitos $CD3^+$, $CD4^+$, $CD5^+$ e $CD8^+$ na medula óssea de ratos com morte encefálica (ME) e falso-operado (FO) por da técnica de citometria de fluxo. A avaliação das subpopulações linfocitárias é apresentada como porcentagem de células positivas. Os dados são apresentados como média±EPM de 5 animais por grupo.

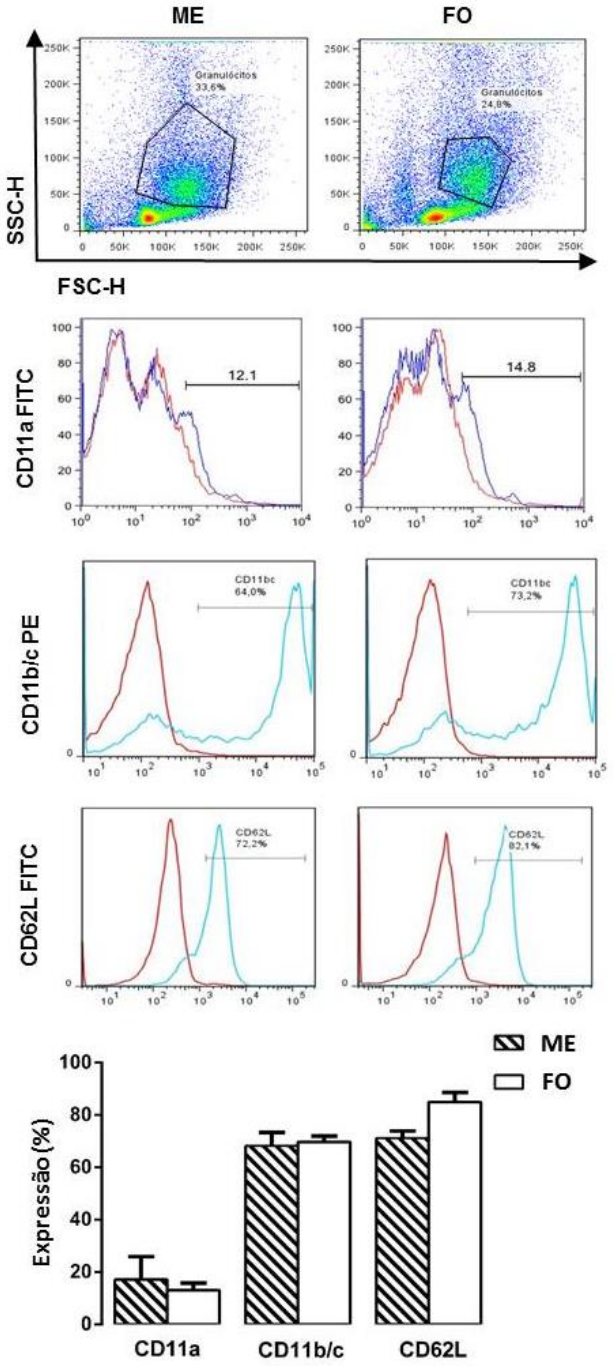


Figura 8. Expressão de moléculas de adesão granulocíticas da medula óssea de ratos com morte encefálica (ME) e falso-operado (FO) por citometria de fluxo. Gráfico de dispersão das células da medula óssea por volume celular e granulosidade (FSC/SSC) está apresentado na linha superior. A população total de granulócitos foi selecionada e avaliadas para cálculo da porcentagem de células positivas CD11a, CD11b/c e CD62L. Histogramas representativos das moléculas de adesão (traçado azul) e do isótopo controle (traçado vermelho) são apresentados nas linhas seguintes. Avaliação da expressão de CD11a, CD11b/c e CD62L nos grupos ME e FO são apresentados como média±EPM de 5 animais por grupo.

DISCUSSÃO

5. Discussão

Os dados apresentados sugerem que a leucopenia presente nos animais com morte encefálica associa-se a uma depressão da medula óssea. Suportam esta assertiva as seguintes observações: (i) a leucopenia induzida pela morte encefálica refletiu uma redução no número de linfócitos, monócitos e granulócitos, enquanto ratos falso-operados exibiram leucocitose com granulocitose; (ii) a redução no número total de células da medula óssea induzida pela morte encefálica deveu-se a uma redução no número de linfócitos e células segmentadas; (iii) não houve, entretanto, alterações nos processos de apoptose/necrose, na imunofenotipagem linfocitária ou na expressão de moléculas de adesão decorrentes da morte encefálica.

Evidências clínicas e experimentais demonstram que a lesão cerebral associa-se a alterações do sistema imune periférico (Prass *et al*., 2003; Urra *et al*., 2009; Denes *et al*., 2011). Tem sido demonstrado que, na vigência de acidente vascular cerebral (AVC) isquêmico, a resposta inflamatória aguda caracteriza-se por leucocitose e aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias (Emsley *et al*., 2003), seguida por acentuada imunodepressão que inclui linfopenia, redução da atividade monocítica, aumento de citocinas anti-inflamatórias, apoptose de linfócitos e atrofia do baço (Offner *et al*., 2006; Iadecola & Anrather, 2011). Em geral, alterações da resposta imune celular correlacionam-se com a gravidade da lesão cerebral, ocorrem dentro de horas após o trauma isquêmico, podendo durar por semanas (Meisel *et al*., 2005). No

presente estudo, verificou-se que a morte encefálica induziu alterações semelhantes na resposta imune celular, conforme observado pelo reduzido número de linfócitos na medula óssea e de linfomononucleares no sangue periférico.

Conforme demonstrado neste estudo, a depressão da medula óssea induzida pela morte encefálica é responsável pela redução no número de linfócitos e de células segmentadas. Os linfócitos constituem a maioria das células da medula óssea e predominam entre os leucócitos do sangue. De fato, linfócitos B e T constituem as células prevalentes na composição do sangue dos roedores, enquanto que em humanos o leucócito em maior abundância no sangue são os neutrófilos (Rankin 2010; Rongvaux *et al*., 2013). Com o objetivo de investigar a redução do número de células da medula óssea, subpopulações de linfócitos foram caracterizadas pela expressão das sub-unidades CD3 do complexo TCR (*T cell receptor complex*); expressão dos co-receptores CD4 e CD8 nas células T para o complexo MHC (*major histocompatibility complex*) (Wang & Reinherz 2012); expressão de CD5 em células T *naïve* envolvidas em vias-chave da sinalização do complexo TCR (Azzam *et al*., 2001; Fulton *et al*., 2015). Como mostrado nas análises de citometria de fluxo, não foram encontradas diferenças nas porcentagens de subpopulações de linfócitos entre o grupo ME e FO. Os principais determinantes do número de neutrófilos circulantes são a sua produção, o egresso da medula óssea, marginação e extravasamento/eliminação para o tecido perivascular (Bugl *et al,*. 2012; Manz & Boettcher 2014). A liberação de neutrófilos da medula óssea depende da sua migração através do endotélio

sinusoidal que expressa moléculas de adesão constitutivas, incluindo a P-selectina, ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule*) e VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule*) (Schweitzer et al. 1996; Ley et al. 2007; Rankin 2010). Com o intuito de investigar a redução de células segmentadas induzidas pela ME, foram analisadas por citometria de fluxo a expressão da L-selectina (CD62L) e β2-integrinas (CD11a e CD11b/c) nos granulócitos da medula óssea. Conforme demonstrado, não foram encontradas diferenças na expressão dessas moléculas de adesão granulocíticas entre os grupos ME e FO. Resultado semelhante foi observado com relação à porcentagem de células da medula óssea em apoptose e necrose entre os grupos ME e FO, conforme demonstrado pela análise dos dados da citometria de fluxo. A apoptose desempenha papel crítico na manutenção de um equilíbrio adequado entre as células progenitoras ou células diferenciadas e a eliminação das células danificadas ou não funcionais. Muitos destes eventos são regulados por fatores de crescimento, citocinas e interações celulares que promovem a sobrevivência, proliferação e diferenciação de todas as células e subpopulações de progenitores de células sanguíneas (Opferman, 2007). Eventual falta de fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas, envolvidas com a hematopoiese, poderia comprometer a mobilização de células da medula óssea para o sangue na vigência da morte encefálila. Porém, em estudo anterior (Simas *et al*., 2012a) demonstrou-se a presença de inflamação sistêmica em ambos os grupos ME e FO, ao se avaliar concentrações séricas equivalentes de citocinas (fator de necrose tumoral-α, interleucina (IL)-1β, IL-6, IL-10) e quimiocinas (*Cytokine-induced neutrophil chemoattractant*-1 e -2).

Sinusóides vasculares permitem a comunicação do tecido hematopoiético com a circulação periférica. A medula óssea oferece uma estrutura de nichos que sustentam o número e a função das células-tronco hematopoiéticas e células do sistema imunológico integrando inervação, perfusão vascular e oxigenação (Mercier *et al*., 2011). Tem sido demonstrado que a redução no número de linfócitos por apoptose em órgãos linfóides e no sangue periférico, quando induzido por AVC, está relacionada com a ativação do sistema nervoso simpático e do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, provocando a liberação sistêmica de catecolaminas e hormônios esteroidais (Prass *et al*., 2003; Mracsko *et al*., 2014). De fato, as interações do sistema nervoso central, eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e componentes do sistema imune inato e adaptativo desempenham papel fundamental na regulação da inflamação (Webster *et al*., 2002). A rápida ativação destas vias neuroendócrinas durante a inflamação protege o indivíduo contra uma resposta imune exacerbada podendo, entretanto, suprimir inapropriadamente o sistema imunológico quando ativada sem a presença de inflamação sistêmica (Prass *et al*., 2003). Levando-se em consideração a imunossupressão neuroendócrina sistêmica após lesão cerebral aguda, dois pontos principais devem ser abordados quando se avalia o papel da morte encefálica no desfecho do enxerto no cenário experimental e clínico. Em primeiro lugar, sabe-se que a estimulação do sistema nervoso simpático é desencadeada pela morte encefálica. Taquicardia e hipertensão são observadas por alguns minutos e seguidas por vasoplegia e hipotensão (Simas *et al*., 2012a; Silva *et al*., 2012; Novitzky *et al*., 1986; Woiciechowsky *et al*., 1998; Kutsogiannis *et al*., 2006). Em segundo lugar, a morte encefálica compromete o sistema neuroendócrino,

diminuindo a liberação de alguns hormônios como a triiodotironina (T3), tiroxina (T4), cortisol e hormônio anti-diurético, decorrente de uma interrupção ao longo do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (Simas *et al*., 2012a; Pratschke *et al*., 1999; Wilhelm *et al*., 2000a).

Embora a liberação de altos níveis de catecolaminas e hormônios esteroidais seja um componente essencial da resposta à morte encefálica, esses mediadores não possuem efeitos de longa duração, como demonstrado previamente em pacientes com morte cerebral e em modelos experimentais de morte encefálica (Simas *et al*., 2012a; Herijgers *et al*., 1996; Floerchinger *et al*., 2012). No entanto, a resposta inicial a esses mediadores é caracterizada por vasoconstrição, hipoperfusão, hipovolemia e hipóxia tecidual. De fato, demonstrou-se que logo após a indução da morte encefálica, pelo aumento da pressão intracraniana, a perfusão cerebral está virtualmente ausente bem como o fluxo regional em diversos leitos vasculares (Herijgers *et al*., 1996). Utilizando-se a técnica de microscopia intravital para a observação da microcirculação mesentérica em ratos demonstrou-se hipoperfusão imediata dos microvasos mesentéricos desencadeada pela morte encefálica *per se* (Simas *et al*., 2012a). Consequentemente, a característica inicial da morte encefálica inclui instabilidade hemodinâmica, com comprometimento da perfusão do órgão e redução da oxigenação, contribuindo para reduzir a qualidade dos órgãos de doadores em morte cerebral. Finalmente, estudos experimentais têm demonstrado a importância do comprometimento do sistema imunológico no aumento da susceptibilidade a infecções após uma lesão cerebral (Prass et al. 2003; Liesz et al. 2009). Uma melhor compreensão da

fisiopatologia da morte encefálica associada à redução da mobilização de células da medula óssea poderá permitir novos e eficazes medicamentos para o tratamento dos pacientes doadores de órgãos em morte encefálica.

CONCLUSÕES

6. Conclusões

Com base nos dados apresentados é possível concluir que:

- A leucopenia induzida pela morte encefálica associa-se a uma depressão da medula óssea, evidenciada por redução do número de linfócitos e células segmentadas.
- A morte encefálica não alterou as subpopulações linfocitárias da medula óssea.
- A expressão das moléculas de adesão na população granulocítica da medula óssea não se alterou com a indução da morte encefálica.
- Os processos de apoptose/necrose das células da medula óssea não foram alterados pela morte encefálica.

ANEXOS

7. Anexos

3742/11/160

MEDICINA

USP

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

APROVAÇÃO

O Coordenador da CEUA do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em **16.02.2012, APROVOU *ad-referendum*** o Protocolo de Pesquisa nº **022/12** intitulado: **"ESTUDO DOS PROCESSOS DE MOBILIZAÇÃO, ATIVAÇÃO E APOPTOSE DAS CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA EM MODELO DE MORTE ENCEFÁLICA EM RATOS" que utilizará 30 Ratos Wistar machos,** apresentado pela **Comissão Científica do Incor**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei No 11.794 -8 de outubro de 2008).

Pesquisador (a) Responsável: Paulina Sannomiya
Pesquisador (a) Executante: Laura Menegat

CEP-FMUSP,16 de fevereiro de 2012.

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Prof. Dr.Roger Chammas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

COMISSÃO CIENTIFICA
RECEBIDO
17/02/12

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Av. Dr. Arnaldo , 455 – Instituto Oscar Freire 1º andar CEP 01246903 – Fone : 3061-8004
mail: cep.fmusp@hcnet.usp.br

REFERÊNCIAS

8. Referências

Abbas, AK. Imunologia celular e molecular. Rio de Janeiro, Elsevier. 6 ed. 2008.

Azzam HS, DeJarnette JB, Huang K, Emmons R, Park CS, Sommers CL, et al.Fine tuning of TCR signaling by CD5. J Immunol. 2001;166(9):5464-5472.

Badami CD, Livingston DH, Sifri ZC, Caputo FJ, Bonilla L, Mohr AM, et al. Hematopoietic progenitor cells mobilize to the site of injury after trauma and hemorrhagic shock in rats. *J Trauma*. 2007;63(3):596-600.

Barklin A. Systemic inflammation in the brain-dead organ donor. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2009;53(4):425-35.

Barklin A, Hvas CL, Toennesen E. The Inflammatory Response to Brain Death. In: Novitzky, D and Cooper DKC eds. The Brain-Dead Organ Donor: Pathophysiology and Management. D. Springer Science+Business Media. New York 2013, p 107-119.

Bentley SA. Close range cell-cell interaction required for stem cell maintenance in continuous bone marrow culture. *Exp Hematol*. 1981; 9(3):308-12.

Bianco P. Bone and the hematopoietic niche: a tale of two stem cells. *Blood*. 2011;117(20):5281-8.

Borelli P. Comprometimento da hematopoese e do microambiente medular: efeito da desnutrição protéica. Tese de livre docência. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2004.

Borelli P. Hemopoiese, Fundamentos de Hematologia: teoria e prática, cap. 2, Ed. Blucher, São Paulo, Brasil, *in press*.

Brach MA, Herrmann F. Hematopoietic growth factors: interactions and regulation of production. *Acta Haematol*. 1991; 86(3):128-37.

Breithaupt-Faloppa AC, Ferreira SG, Kudo GK, Armstrong R Jr, Tavares-de-Lima W, da Silva LF, et al. *J Surg Res.* 2016; 200(2)714-721.

Bugl S, Wirths S, Müller MR, Radsak MP, Kopp HG. Current insights into neutrophil homeostasis. *Ann N Y Acad Sci*. 2012 1266:171-178.

Chamorro C, Falcón JA, Michelena JC. Controversial Points in Organ Donor Management. *Transplant Proc*. 2009;41: 3473–3475.

Ciofani M, Zúñiga-Pflücker JC. The thymus as an inductive site for T lymphopoiesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2007;23:463-93.

Cumano A, Garcia-Porrero J, Dieterlen-Lievre F, Godin I. Intra-embryonic hematopoiesis in mice. *C R Seances Soc Biol Fil*. 1995;189(4):617-27.

de la Mata M, Riera CM, Iribarren P. Identification of a CD8alpha(+) dendritic cell subpopulation in rat spleen and evaluation of its OX-62 expression. *Clin. Immunol*. 2001;101(3):371–378.

Del Fattore A, Capannolo M, Rucci N. Bone and bone marrow: The same organ. *Arch Biochem Biophys*. 2010;503(1):28–34.

Denes A, McColl BW, Leow-Dyke SF, Chapman KZ, Humphreys NE, Grencis RK, et al. Experimental stroke-induced changes in the bone marrow reveal complex regulation of leukocyte responses. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2011;31(4): 1036-50.

Domínguez-Roldán JM, García-Alfaro C, Jimenéz–González PI, Hernández-Hazañas F, Gascón Castillo ML, Egea Guerrero JJ. Muerte encefálica: repercussion sobre órganos y tejidos. *Med Intensiva*. 2009;33(9): 434-441.

Eaves CJ, Cashman JD, Sutherland HJ, Otsuka T, Humphries RK, Hogge DE, et al. Molecular analysis of primitive hematopoietic cell proliferation control mechanisms. *Ann N Y Acad Sci*. 1991;628: 298-306.

Emsley HC, Smith CJ, Gavin CM, Georgiou RF, Vail A, Barberan EM, et al. An early and sustained peripheral inflammatory response in acute ischemic stroke: relationships with infection and atherosclerosis. *J Neuroimmunol*. 2003;139(1-2):93-101.

Faropoulos K, Apostolakis E. Brain death and its influence on the lungs of the donor: how is it prevented? *Transplant Proc*. 2009;41(10):4114-9.

Floerchinger B, Oberhuber R, Tullius SG. Effects of brain death on organ quality and transplant outcome. *Transplant Rev*. 2012;26(2):54-9.

Fox SI, Fisiologia Humana. Tradução de Marcos Ikeda, 7ª ed. Barueri, SP: Manole; 2007.

Fulton RB, Hamilton SE, Xing Y. The TCR's sensitivity to self peptide-MHC dictates the ability of naïve CD8(+) T cells to respond to foreign antigens. *Nat Immunol*. 2015;16(1):107-117.

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;62(3):330-5.

Hirose J, Kouro T, Igarashi H, Yokota T, Sakaguchi N, Kincade PW. A developing picture of lymphopoiesis in bone marrow. *Immunol Rev*. 2002;189:28-40.

Hoffbrand AV, Moss PAH. Fundamentos em Hematologia. 6. ed., cap.01. Porto Alegre: Artmed, 2013.

Hogg N, Patzak I, Willenbrock F. The insider's guide to leukocyte integrin signalling and function. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(6):416-26.

Iadecola C, Anrather J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat Med*. 2011;17(7):796-808.

Kondo M, Wagers AJ, Manz MG, Prohaska SS, Scherer DC, Beilhack GF, et al. Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:759-806.

Kutsogiannis DJ, Pagliarello G, Doig C, Ross H, Shemie SD. Medical management to optimize donor organ potential: review of the literature. *Can J Anaesth*. 2006;53(8):820-30.

Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(9):678-89.

Liesz A, Hagmann S, Zschoche C, Adamek J, Zhou W, Sun L, et al. The spectrum of systemic immune alterations after murine focal ischemia. Immunodepression versus immunomodulation. *Stroke*. 2009;40(8):2849-58.

Luo HR, Loison F. Constitutive neutrophil apoptosis: mechanisms and regulation. *Am J Hematol*. 2008;83(4):288-95.

MacKay DB. The role of innate immunity in donor organ procurement. *Semin Immunopathol*. 2011;33(2):169-184.

Manz & Boettcher Emergency granulopoiesis *Nat Rev Immunol.* 2014; 14(5):302-14.

Mayani H, Guilbert LJ, Janowsa-Wieczorek A. Biology of the hematopoietic microenvironment. *Eur J Haematol*. 1992;49(5):225-33.

Medvinsky A, Dzierzak E. Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell*. 1996;86(6):897-906.

Meisel C, Schwab JM, Prass K, Meisel A, Dirnagl U. Central nervous system injury-induced immune deficiency syndrome. *Nat Rev Neurosci*. 2005;6(10): 775-86.

Mercier FE, Ragu C, Scadden DT. The bone marrow at the crossroads of blood and immunity. *Nat Rev Immunol*. 2011;12(1):49-60.

Mracsko E, Liesz A, Karcher S, Zorn M, Bari F, Veltkamp R. Differential effects of sympathetic nervous system and hypothalamic–pituitary–adrenal axis on systemic immune cells after severe experimental stroke. *Brain Behav Immun*. 2014;41:200-209

Nilsson SK, Johnston HM, Coverdale JA. Spatial localization of transplanted hemopoietic stem cells: inferences for the localization of stem cells niches. *Blood*. 2001;97(8):2293-9.

Novitzky D, Wicomb WN, Cooper DK, Rose AG, Reichart B. Prevention of myocardial injury during brain death by total cardiac sympathectomy in the Chacma baboon. *Ann Thorac Surg*. 1986;41(5):520-4.

Offner H, Subramanian S, Parker SM, Wang C, Afentoulis ME, Lewis A, et al. Splenic atrophy in experimental stroke is accompanied by increased regulatory T cells and circulating macrophages. *J Immunol*. 2006;176(11): 6523-31.

Opferman JT. Life and death during hematopoietic differentiation. *Curr Opin Immunol*. 2007;19(5):497–502.

Petri B, Phillipson M, Kubes P. The physiology of leukocyte recruitment: an in vivo perspective. *J Immunol*. 2008;180(10):6439-46.

Prass K, Meisel C, Höflich C, Braun J, Halle E, Wolf T, et al. Stroke-induced immunodeficiency promotes spontaneous bacterial infections and is mediated by sympathetic activation reversal by poststroke T helper cell type 1-like immunostimulation. *J Exp Med*. 2003;198(5):725-36.

Pratschke J, Wilhelm MJ, Kusaka M, Basker M, Cooper DK, Hancock WW, et al. Brain death and its influence on donor organ quality and outcome after transplantation. *Transplantation*. 1999;67(3):343-8.

Pratschke J, Neuhaus P, Tullius SG. What can be learned from brain-death models? *Transp Int*. 2005;18(1):15-21.

Portal da Saúde. Disponível em: http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/sas/sas-noticias/19887-brasil-registra-recorde-em-indice-de-doadores-efeti vos-de-orgaos. Acesso em: 02/11/2015.

Rankin SM. The bone marrow: a site of neutrophil clearance. *J Leukoc Biol.* 2010;88(2):241-251.

Registro Brasileiro de Transplantes - RBT. Disponível em: http://www.abto.org.br/abtov03/Upload/file/RBT/2015/rbt2015-1sem-lib2907.pdf - Acesso em: 01/09/2015.

Rongvaux A, Takizawa H, Strowig T, Willinger T, Eynon EE, Flavell RA et al. Human hemato-lymphoid system mice: current use and future potential for medicine. *Annu Rev Immunol.* 2013;31:635-674.

Rostron AJ, Avlonitis VS, Cork DM, Grenade DS, Kirby JA, Dark JH. Hemodynamic resuscitation with arginine vasopressin reduces lung injury after brain death in the transplant donor. *Transplantation*. 2008;85(4):597-606.

Sadik CD, Kim ND, Luster AD. Neutrophils cascading their way to inflammation. *Trends Immunol*. 2011;32(10):452-60.

Saikumar P, Dong Z, Mikhailov V, Denton M, Weinberg JM, Venkatachalam MA. Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease. *Am J Med*. 1999;107(5):489-506.

Schimid I, Uittenbogaart CH, Keld B, Giorgi JV. A rapid method for measuring apoptosis and dual-color immunofluorescence by singl laser flow cytometry. *J Immunol Methods*. 1994;170(2):145-57.

Schrader H, Hall C, Zwetnow NN. Effects of prolonged supratentorial mass expansion on regional blood flow and cardiovascular parameters during the Cushing response. *Acta Neurol. Scand*. 1985;72(3):283-94.

Schweitzer KM, Dräger AM, van der Valk P, Thijsen SFT, Zevenbergen A, Theijsmeijer AP, et al. Constitutive expression of E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 on endothelial cells of hematopoietic tissues. *Am J Pathol*. 1996;148(1):165-175.

Silva IA, Correia CJ, Simas R, Cruz JW, Ferreira SG, Zanoni FL, et al. Inhibition of autonomic storm by epidural anesthesia does not influence cardiac inflammatory response after brain death in rats. *Transplant Proc*. 2012;44(7):2213-8.

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

Simas R, Kogiso DH, Correia CJ, Silva LF, Silva IA, Cruz JW, et al. Influence of brain death and associated trauma on solid organ histological characteristics. *Acta Cir Bras*. 2012b;27(7):465-70.

Simas R, Ferreira SG, Menegat L, Zanoni FL, Correia CJ, Silva IA, et al. Mesenteric hypoperfusion and inflammation induced by brain death are not affected by inhibition of the autonomic storm in rats. *Clinics (Sao Paulo)*. 2015;70(6):446-452

Skrabal CA, Thompson LO, Potapov EJ, Southard RE, Joyce DL, Youker KA, et al. Organ-specific regulation of pro-inflammatory molecules in heart, lung and kidney following brain death. *J Surg Res*. 2005;123(1):118-125.

Tak T, Tesselaar K, Pillay J, Borghans JAM, Koenderman L. What's your age again? Determination of human neutrophil half-lives revisited. *J. Leukoc. Biol*. 2013;94(4):595–601.

Tavassoli M, Minguell JJ. Homing of hemopoietic progenitor cells to the marrow. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1991;196(4):367-73.

Urra X, Cervera A, Obach V, Climent N, Planas AM, Chamorro A. Monocytes are major players in the prognosis and risk of infection after acute stroke. *Stroke*. 2009;40(4):1262-8.

Vremec D, Pooley J, Hochrein H, Wu L, Shortman K. CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen. *J. Immunol*. 2000;164(6):2978–86.

Wang JH & Reinherz EL. The structural basis of αβ T-lineage immune recognition: TCR docking topologies, mechanotransduction, and co-receptor function. *Immunol Rev.* 2012; 250(1):102-119.

Webster JI, Tonelli L, Sternberg EM. Neuroendocrine regulation of immunity. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:125-63.

Weibel ER. Morphometry: stereological theory and practical methods. In: Gil J, ed. Models of Lung Disease-Microscopy and Structural Methods. New York, 1990:199.

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*. 2000a;19(5):414-8.

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*. 2000b;102(19):2426-33.

Williams Hematology, Lichtman MA, Kipps TJ, Seligsohn U, Kaushansky K, Prchal JT, cap. 6, 8a ed., 2010.

Williams MR, Azcutia V, Newton G, Alcaide P, Luscinskas FW. Emerging mechanisms of neutrophil recruitment across endothelium. *Trends Immunol*. 2011;32(10):461-9

Willingham MC. Cytochemical methods for the detection of apoptosis. *J. Histochem. Cytochem*. 1999;47(9):1101-10.

Winkel K, Sotzik F, Vremec D, Cameron PU, Shortman K. CD4 and CD8 expression by human and mouse thymic dendritic cells. *Immunol. Lett*. 1994;40(2):93–99.

Woiciechowsky C, Asadullah K, Nestler D, Eberhardt B, Platzer C, Schöning B, et al. Sympathetic activation triggers systemic interleukin-10 release in immunodepression induced by brain injury. *Nat Med*. 1998;4(7):808-13.

Yeh T Jr, Wechsler AS, Graham L, Loesser KE, Sica DA, Wolfe L, et al. Central sympathetic blockade ameliorates brain deathinduced cardiotoxicity and associated changes in myocardial gene expression. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2002;124(6):1087-98.

APÊNDICES

Apêndices

CLINICS 2012;67(1):69-75 DOI:10.6061/clinics/2012(01)11

BASIC RESEARCH

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

E-mail: biosimas@usp.br

Tel.: 55 11 3061-7178

ELSEVIER

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

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

ABSTRACT

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

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

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

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

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

CLINICS

BASIC RESEARCH

Mesenteric hypoperfusion and inflammation induced by brain death are not affected by inhibition of the autonomic storm in rats

Rafael Simas, Sueli G. Ferreira, Laura Menegat, Fernando L. Zanoni, Cristiano J. Correia, Isaac A. Silva, Paulina Sannomiya, Luiz F.P. Moreira*

Instituto do Coração (InCor) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Laboratory of Cardiovascular Surgery and Circulation Pathophysiology (LIM-11), São Paulo/SP, Brazil.

OBJECTIVES: Brain death is typically followed by autonomic changes that lead to hemodynamic instability, which is likely associated with microcirculatory dysfunction and inflammation. We evaluated the role of the microcirculation in the hemodynamic and inflammatory events that occur after brain death and the effects of autonomic storm inhibition via thoracic epidural blockade on mesenteric microcirculatory changes and inflammatory responses.

METHODS: Male Wistar rats were anesthetized and mechanically ventilated. Brain death was induced via intracranial balloon inflation. Bupivacaine (brain death-thoracic epidural blockade group) or saline (brain death group) infusion via an epidural catheter was initiated immediately before brain death induction. Sham-operated animals were used as controls (SH group). The mesenteric microcirculation was analyzed via intravital microscopy, and the expression of adhesion molecules was evaluated via immunohistochemistry 180 min after brain death induction.

RESULTS: A significant difference in mean arterial pressure behavior was observed between the brain death-thoracic epidural blockade group and the other groups, indicating that the former group experienced autonomic storm inhibition. However, the proportion of perfused small vessels in the brain death-thoracic epidural blockade group was similar to or lower than that in the brain death and SH groups, respectively. The expression of intercellular adhesion molecule 1 was similar between the brain death-thoracic epidural blockade and brain death groups but was significantly lower in the SH group than in the other two groups. The number of migrating leukocytes in the perivascular tissue followed the same trend for all groups.

CONCLUSIONS: Although thoracic epidural blockade effectively inhibited the autonomic storm, it did not affect mesenteric hypoperfusion or inflammation induced by brain death.

KEYWORDS: Brain Death; Autonomic Storm; Microcirculation; Intravital Microscopy.

Simas R, Ferreira SG, Menegat L, Zanoni FL, Correia CJ, Silva IA, et al. Mesenteric hypoperfusion and inflammation induced by brain death are not affected by inhibition of the autonomic storm in rats. Clinics. 2015;70(6):446-452

Received for publication on February 10, 2015; First review completed on March 31, 2015; Accepted for publication on March 31, 2015

E-mail: luiz.moreira@incor.usp.br

*Corresponding author

EPÍLOGO

Epílogo

“ Suba o primeiro degrau com fé.

Não é necessário que você veja toda a escada.

Apenas dê o primeiro passo. ”

Martin Luther King