



Efeitos da morte cerebral na microvasculatura pulmonar em um modelo experimental de doador de pulmão

Rafael Simas¹, Fernando Luiz Zanoni¹,
Raphael dos Santos Coutinho e Silva¹, Luiz Felipe Pinho Moreira¹

1. Laboratório Cirúrgico de Pesquisa Cardiovascular, Instituto do Coração, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo (SP) Brasil.

Recebido: 03 outubro 2018.

Aprovado: 21 abril 2019.

Trabalho realizado no Laboratório Cirúrgico de Pesquisa Cardiovascular, Instituto do Coração, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo (SP) Brasil.

RESUMO

Objetivo: A morte cerebral (MC) desencadeia alterações hemodinâmicas e inflamatórias importantes, comprometendo a viabilidade dos órgãos empregados em transplantes. Para compreender melhor as alterações microcirculatórias nos pulmões de doadores com MC, o presente estudo investigou a microcirculação pulmonar em um modelo de roedor com MC via microscopia intravital. **Métodos:** Ratos Wistar machos foram anestesiados e ventilados mecanicamente. Eles foram submetidos a trepanação e a MC induzida por meio do aumento da pressão intracraniana. Os ratos do grupo *Sham* (SH), utilizado como controle, foram submetidos apenas à trepanação. Em ambos os grupos, foram monitorados o O_2 expiratório e o CO_2 , e, após 3 horas, foi realizada a toracotomia e criada uma janela para observar a superfície pulmonar usando o sistema de microscopia intravital. As expressões pulmonares das moléculas de adesão intercelular (ICAM)-1 e da óxido nítrico-sintase endotelial (eNOS) foram avaliadas por imuno-histoquímica, e as citocinas foram medidas em amostras pulmonares. **Resultados:** Três horas após os procedimentos cirúrgicos, a perfusão pulmonar foi de 73% no grupo SH. Por outro lado, os animais com MC apresentaram uma importante diminuição na perfusão do órgão para 28% ($p = 0,036$). O comprometimento microcirculatório pulmonar após a indução de MC foi associado a um aumento do número de leucócitos recrutados para o tecido pulmonar, além de uma redução na expressão de eNOS e um aumento na expressão de ICAM-1 nas células endoteliais do pulmão. Os ratos com MC apresentaram valores mais elevados de O_2 expiratório e valores mais baixos de CO_2 em comparação com os animais SH após 3 horas de monitorização. **Conclusões:** Os dados apresentados demonstraram que a MC desencadeia uma importante hipoperfusão e inflamação nos pulmões, comprometendo a microcirculação pulmonar do doador.

Descritores: Morte encefálica; Inflamação; Microscopia intravital; Microcirculação pulmonar.

INTRODUÇÃO

A prática de transplante pulmonar continua a ser restrita por apresentar uma sobrevida limitada a longo prazo e alta incidência de comprometimento dos doadores de pulmão. Vários estudos mostram que o dano microvascular parece ser uma causa importante de insuficiência precoce e de falha do enxerto pulmonar a longo prazo,^(1,2) assim como de outros órgãos sólidos,^(3,4) o que põe em evidência a relevância de se preservar a função da microcirculação como uma estratégia terapêutica para prevenir a remodelação fibrosa crônica.

Além da inflamação aloimune e da lesão de isquemia-reperusão, que são consideradas as causas de lesão microvascular nos órgãos sólidos utilizados para transplante,⁽¹⁻⁴⁾ alterações fisiopatológicas desencadeadas pela morte cerebral (MC) também podem afetar negativamente o sistema microcirculatório. Em um estudo anterior,⁽⁵⁾ a observação de microcirculação mesentérica de ratos in

situ e in vivo por microscopia intravital mostrou que a MC desencadeia hipoperfusão mesentérica persistente, inflamação local e disfunção orgânica. Para entender melhor as alterações microcirculatórias nos pulmões de doadores com MC, o presente estudo teve como objetivo investigar a microcirculação pulmonar em um modelo de roedor com MC via microscopia intravital.

MÉTODOS

Grupos experimentais e procedimentos cirúrgicos

Ratos Wistar machos (300 ± 30 g) foram utilizados para o estudo e divididos em dois grupos: grupo MC ($n = 10$), com ratos que tiveram MC induzida; grupo *sham* (SH) ($n = 10$), com ratos operados sem indução de MC. Cinco ratos de cada grupo foram utilizados para análise de microscopia intravital, e outros cinco por

Endereço para correspondência:

Luiz Felipe Pinho Moreira. Laboratório Cirúrgico de Pesquisa Cardiovascular, Instituto do Coração, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Av. Dr. Eneas Carvalho de Aguiar, 44, Cerqueira César, CEP 05403-000, São Paulo, SP, Brasil.
Tel.: 55 11 2661-5075. E-mail: luiz.moreira@incor.usp.br

Apoio financeiro: Este trabalho contou com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

grupo, para análise histológica do tecido pulmonar, evitando, dessa forma, qualquer viés relacionado ao estudo pulmonar invasivo. Todos os ratos receberam cuidados em conformidade com os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

A anestesia foi induzida em uma câmara com 5% de isoflurano, seguida por intubação e ventilação mecânica (Harvard Apparatus, Estados Unidos) com volume corrente de 10 mL/kg, frequência de 70 respirações/min e FiO_2 de 100%. O ventilador foi conectado a um analisador de gás (AD Instruments, Austrália), e a porcentagem de O_2 e CO_2 exalados foi medida em todos os animais durante o experimento.

Modelo de morte cerebral

Os procedimentos cirúrgicos para indução de MC foram executados como descrito previamente.⁽⁵⁾ A MC foi induzida por meio de um cateter Fogarty-4F colocado em cavidade intracraniana e inflado com 0,5 mL de solução salina; sendo a anestesia imediatamente interrompida. O aumento repentino da pressão intracraniana foi confirmado por episódio hipertensivo, dilatação máxima da pupila e ausência de reflexo, de acordo com protocolo previamente descrito.⁽⁵⁾ Ratos do grupo *sham*, submetidos apenas à trepanação, foram utilizados como grupo controle.

Antes da trepanação, a artéria carótida esquerda foi canulada, sendo então colocado um cateter no vaso para monitoramento contínuo da pressão arterial média e extração de amostras de sangue nos ratos de ambos os grupos. Como observado anteriormente em outros modelos experimentais, esse procedimento não provoca importante isquemia cerebral.⁽⁶⁾ A veia jugular foi canulada para infusão contínua de 0,9% de solução salina (2 mL/h) para minimizar a desidratação.

Estudo de microscopia intravital

Três horas após a indução de MC, foi realizada uma toracotomia direita em cinco animais por grupo e criada uma janela para exame microscópico in vivo do tecido pulmonar. A microcirculação pulmonar foi avaliada por meio de um sistema de microscopia intravital de epifluorescência (Carl Zeiss, Alemanha). Para avaliar a perfusão pulmonar, o isotiocianato de fluoresceína (FITC) conjugado com albumina foi administrado aos ratos pelo cateter colocado na veia jugular. O número de microvasos com um diâmetro inferior a 30 μm , com ou sem fluxo sanguíneo, foi determinado em uma área de 0,2 mm^2 – cálculo realizado por meio do software AxioVision LE. Após a injeção intravenosa com rodamina 6G, foi determinado o número de leucócitos aderidos ou migrados na mesma área do tecido pulmonar. Para obter melhor resolução, a ventilação foi realizada com pressão positiva expiratória final (PEEP) de 5 cm de H_2O no decorrer das análises de microscopia intravital. Durante a gravação de vídeo, os animais foram mantidos

em apneia ao final da inspiração máxima. Todas as imagens foram gravadas usando lente objetiva de 20 x.

Análises imuno-histoquímicas

Após a eutanásia, os pulmões dos outros cinco animais por grupo foram removidos, insuflados com solução OCT (Tissue Teck, Estados Unidos), imersos em hexano e congelados com nitrogênio líquido. Os níveis de expressão da molécula de adesão intercelular (ICAM)-1 e do óxido nítrico-sintase endotelial (eNOS) no endotélio de microvasos pulmonares foram determinados por imuno-histoquímica. Crio seções dos pulmões (8 μm) foram fixadas em acetona fria por 10 min. As lâminas foram lavadas com solução TRIS salina tamponada tween-20 (TBS-T), e os locais de ligação inespecíficos foram bloqueados usando TBS-T contendo 1% de albumina de soro bovina (BSA), enquanto a peroxidase endógena foi bloqueada usando a solução H_2O_2 2%. As seções foram incubadas por 1 hora a 37 °C com anticorpo antirrato ICAM-1 (Santa Cruz, Estados Unidos) ou com anticorpo anti eNOS (Abcam, Estados Unidos). Após a incubação, as lâminas de vidro foram lavadas com TBS-T e incubadas com anticorpos secundários (Millipore, Estados Unidos) do peroxidase de rábano silvestre (HRP). O substrato de HRP (3-amino-9-etilcarbazole; Vector Laboratories, Estados Unidos) foi usado para coloração e identificado nas paredes dos vasos após determinação do limiar. As frações da área de coloração foram quantificadas por meio de um analisador de imagem (NIS-elements; Nikon, Japão). A reação de fundo foi identificada nas seções do pulmão incubadas na ausência do anticorpo primário (controle negativo)

Concentrações de citocinas nos tecidos

Os níveis do fator de necrose tumoral (TNF)- α , interleucina (IL)-1 β , IL-6 e IL-10 foram quantificados no tecido pulmonar por meio do método de ELISA (R&D Systems, USAR&D Systems Inc). Um fragmento colhido dos pulmões congelados foi seccionado, imerso em solução salina e moído em um *mixer* de tecidos (Miltényi Biotec, Estados Unidos). O líquido sobrenadante foi analisado por ELISA como recomendado pelo fabricante. Os resultados foram representados como ng/g ou pg/g tissue.

Análises estatísticas

O tamanho da amostra foi fundamentado em estudos semelhantes realizados anteriormente pelo grupo de estudo.^(5,7) Todos os dados são apresentados como média $\pm$ SEM (erro-padrão da média em inglês). Os resultados entre grupos foram comparados por um teste *Mann-Whitney* não paramétrico usando o software *Graph Pad Prism*, versão 6.1. Os valores *p* inferiores a 0,05 foram considerados significativos.

RESULTADOS

Não houve óbitos, e o volume total de fluido administrado durante os experimentos foi semelhante entre os grupos. Como esperado, a MC induziu um episódio

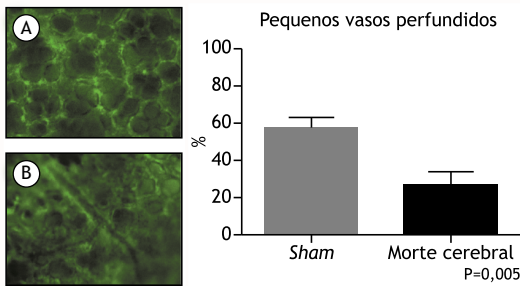


Figura 1. Porcentagem de pequenos vasos perfundidos em microcirculação pulmonar. Fotomicrografias in vivo obtidas por microscopia intravital em ratos dos grupos *sham* (A) e com morte cerebral (B). Os dados são apresentados como média $\pm$ média do erro-padrão; 5 ratos por grupo.

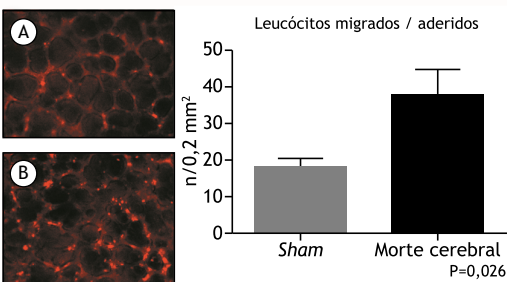


Figura 2. Número de leucócitos migrados e aderidos ao tecido pulmonar. Fotomicrografias fluorescentes in vivo obtidas por microscopia intravital em ratos dos grupos *sham* (A) e com morte cerebral (B). Os dados são apresentados como média $\pm$ média do erro-padrão; 5 ratos por grupo.

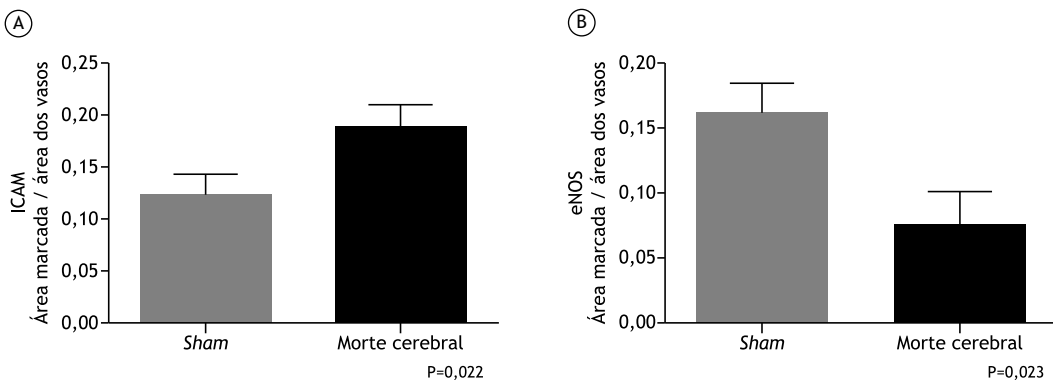


Figura 3. (A) Expressão da molécula de adesão intercelular (ICAM)-1 em vasos dos pulmões; (B) Expressão intraluminal de óxido nítrico-sintase endotelial (eNOS) no tecido pulmonar. Os dados são apresentados como média $\pm$ média do erro-padrão; 5 ratos por grupo.

Tabela 1. Níveis de citocinas no tecido pulmonar.

	Sham	Morte cerebral	Valor p
TNF- α	1,63 $\pm$ 0,35	18,22 $\pm$ 7,24	0,008
Interleucina 18	67,4 $\pm$ 20,4	74,6 $\pm$ 31,3	0,854
Interleucina 6	74,4 $\pm$ 15,1	92,5 $\pm$ 25,4	0,772
Interleucina 10	36,8 $\pm$ 16,6	28 $\pm$ 25,1	0,672

Os dados (pg/g no tecido) são apresentados como média $\pm$ média de erro-padrão; 5 ratos por grupo.

de crise hipertensiva repentina após o aumento da pressão intracraniana, seguido de hipotensão, enquanto, em ratos SH, a pressão arterial média não mudou ao longo do tempo. O episódio de crise hipertensiva é uma característica peculiar em MC e confirma que o modelo está bem estabelecido.

A perfusão pulmonar microvascular foi avaliada 3 horas após os procedimentos cirúrgicos por microscopia de epifluorescência. Como ilustrado na Figura 1, os ratos com MC apresentaram uma diminuição significativa na porcentagem de microvasos perfundidos em comparação com ratos SH em uma área de 0,2 μm^2 . A hipoperfusão pulmonar estava associada ao aumento do recrutamento de leucócitos para o tecido pulmonar, conforme ilustrado na Figura 2. Foi possível observar um maior número de leucócitos recrutados para os pulmões em ratos com MC em comparação com o grupo SH.

As células endoteliais dos microvasos pulmonares em ratos com MC apresentaram aumento na expressão do ICAM-1 em comparação com os do grupo SH. Em contraste, o grupo MC teve níveis mais baixos de expressão eNOS no endotélio (Figura 3A e B). A Tabela 1 mostra os valores dos níveis de citocinas teciduais no tecido pulmonar de ambos os grupos. Não foram observadas diferenças nas concentrações pulmonares de IL-1 β , IL-6 e IL-10 entre os grupos, mas a concentração de TNF- α aumentou significativamente no grupo MC em comparação com os animais do grupo SH.

Antes da indução de MC, a pressão parcial do oxigênio arterial e do dióxido de carbono era similar em ambos os grupos. Ao final do experimento, o PaO₂ no grupo

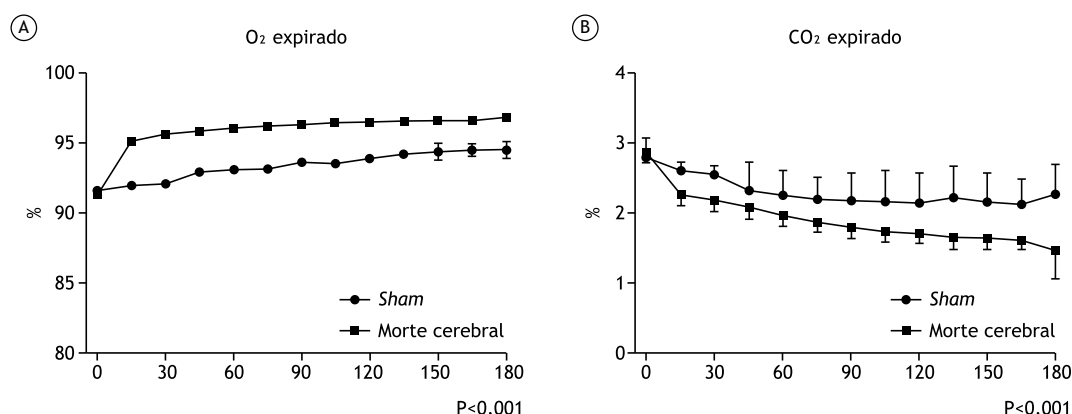


Figura 4. Análises de (A) O₂ expirado e (B) CO₂ expirado em ratos dos grupos *sham* e com morte cerebral ao longo de 3 horas de monitoramento. Os dados são apresentados como média ± média do erro-padrão da porcentagem do volume expiratório; 10 ratos por grupo.

MC ($204,5 \pm 35,07$ mmHg) foi menor do que no grupo SH ($303,4 \pm 26,47$ mmHg, $p = 0,039$). Não houve diferenças significativas nos valores do PaCO₂ entre os grupos (SH, $31,66 \pm 3,81$; MC, $37,68 \pm 2,64$ mmHg, $p = 0,235$). Os gases expiratórios foram medidos ao longo do experimento nos animais de ambos os grupos. Após 3 horas de monitoramento, os ratos com MC apresentaram valores mais altos de O₂ expiratório e valores mais baixos de CO₂ em comparação com os animais SH no mesmo momento (Figura 4A e B).

DISCUSSÃO

A elucidação dos eventos fisiopatológicos desencadeados pela MC pode levar a um melhor tratamento dos doadores de órgãos e, consequentemente, a um melhor resultado após o transplante. Vários estudos foram realizados para esclarecer esses eventos, seja em modelos clínicos, seja em modelos experimentais. Não obstante, a observação da microcirculação pulmonar *in vivo* ou *in situ* não foi realizada em doador de pulmão com MC antes deste estudo, no qual se demonstrou que a MC foi responsável por uma hipoperfusão pulmonar com aumento no recrutamento leucocitário para os pulmões. Essas alterações microcirculatórias foram associadas a alterações endoteliais, como aumento na expressão do ICAM-1 e diminuição da expressão do eNOS. Por fim, essas observações foram correlacionadas com alterações no percentual de O₂ e CO₂ exalados, indicando que a MC foi responsável por um comprometimento na função pulmonar do doador, apesar da ausência de comprometimento dos gases sanguíneos por causa do curto período de observação.

Em relação ao comportamento pulmonar na microscopia intravital, Ivanov e colegas descreveram que o alvéolo é um corpo esférico cercado por uma rede microvascular.⁽⁷⁾ Por outro lado, Sack et al.⁽²⁾ mostraram que a microcirculação pulmonar apresenta um número significativo de áreas sem fluxo com velocidades de células vermelhas extremamente reduzidas após o transplante pulmonar em suínos,

situação que provavelmente foi desencadeada pelas lesões resultantes do processo de isquemia-reperfusão. A observação do mesmo comportamento em relação à microcirculação pulmonar documentada no presente estudo após a indução de MC, indica outra causa para esse fenômeno e reforça a relevância da lesão microvascular no manejo do doador.

A correlação entre a MC e o comprometimento da microcirculação foi previamente verificada em órgãos abdominais. Foi demonstrado que a MC acarreta a diminuição da perfusão dos órgãos na microcirculação mesentérica, pancreática e hepática e que essas mudanças estão associadas a um aumento da inflamação local.^(5,8-10) Os eventos descritos apareceram logo depois da indução da MC e podem ser claramente observados 3 horas após o dano cerebral.^(5,8) Da mesma forma, o aumento do recrutamento leucocitário para os pulmões também foi observado no presente estudo após a indução de MC, associado a uma série de eventos que incluem o rolamento, adesão e transmigração leucocitária para o tecido perivascular.⁽¹¹⁾

A microvasculatura tem um papel importante a longo prazo na manutenção da vitalidade dos órgãos transplantados, e os mecanismos de danos microvasculares após o transplante estão relacionados principalmente à lesão das células endoteliais por estresse oxidativo e fatores associados à resposta imune.^(1-4,12) O estresse oxidativo é normalmente percebido em transplantes de órgãos sólidos e tem sido atribuível a vários fatores, incluindo lesões decorrentes de isquemia-reperfusão, disfunção do enxerto pós-transplante, drogas imunossupressoras e doença primária do órgão transplantado que tem a MC como sua causa mais importante.

Durante o aumento do estresse oxidativo, os aloanticorpos podem induzir à morte das células de endotélio por mecanismos dependentes de complemento, que estimulam a expressão de células endoteliais das moléculas de adesão. A apoptose das células endoteliais via supressão do eNOS também pode ser observada.⁽¹²⁾ A literatura atual mostra

que esses mecanismos também estão diretamente envolvidos no comprometimento microvascular pulmonar induzido pela MC, demonstrando claramente que os danos microvasculares iniciam antes do processo de transplante, adicionando um elemento de gravidade para as alterações subsequentes por causa de lesões por isquemia-reperfusão e alterações imunológicas.

A inflamação observada em ratos com MC foi caracterizada igualmente por um aumento na expressão ICAM-1 nos pulmões, demonstrando a interação entre os leucócitos e as células endoteliais.⁽⁴⁾ Em um estudo anterior, o aumento na expressão das moléculas de adesão foi associado a uma redução importante nos níveis de corticosterona no soro.⁽⁵⁾ Sabe-se que a MC interrompe o eixo hormonal, o que leva a uma redução na liberação de hormônios, incluindo glicocorticoides, como a corticosterona, que atuam controlando a inflamação e evitando a superexpressão de moléculas de adesão nas células endoteliais.⁽⁵⁾

Outros estudos demonstraram que a MC desencadeia um aumento no nível de soro das citocinas, expressão de moléculas de adesão e recrutamento de leucócitos para o tecido perivascular,^(10,13-17) sugerindo uma relação

entre essas características. Este estudo mostrou que os ratos com MC exibiram níveis aumentados de TNF- α em comparação aos animais SH no tecido pulmonar, apesar da ausência de diferenças entre as outras citocinas investigadas. Esse fato foi observado de maneira semelhante em um estudo anterior com o mesmo protocolo, o que sugere que alguns dos eventos inflamatórios percebidos são provocados por traumas associados à MC.⁽⁵⁾

A partir destes achados, pode-se concluir que a MC desencadeia uma hipoperfusão importante nos pulmões, comprometendo a microcirculação e a função pulmonar, uma vez que se observa o recrutamento de leucócitos associado à ativação endotelial. Durante as diferentes fases do processo de transplante pulmonar, incluindo o manejo de doadores de órgãos com MC, extensa lesão microvascular não corrigida leva à angiogênese patológica e, posteriormente, à fibrose. Portanto, a preservação de uma microvasculatura saudável, inibindo vias que levam a lesões microvasculares, é uma estratégia fundamental para melhorar tanto a disponibilidade de doadores pulmonares quanto a extensão da sobrevivência do enxerto.

REFERÊNCIAS

- Nicolls MR, Hsu JL, Jiang X. Microvascular injury after lung transplantation. *Curr Opin Organ Transplant*. 2016;21(3):279-84. <http://dx.doi.org/10.1097/MOT.0000000000000307>. PMID:26967995.
- Sack FU, Dollner R, Reidenbach B, Koch A, Gebhard MM, Hagl S. Intravital microscopy of pulmonary microcirculation after single lung transplantation in pigs. *Transplant Proc*. 2006;38(3):737-40. <http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2006.01.060>. PMID:1667459.
- Jiang X, Sung YK, Tian W, Qian J, Semenza GL, Nicolls MR. Graft microvascular disease in solid organ transplantation. *J Mol Med*. 2014;92(8):797-810. <http://dx.doi.org/10.1007/s00109-014-1173-y>. PMID:24880953.
- Labarrere CA, Jaeger BR, Kassab GS. Cardiac allograft vasculopathy: microvascular arteriolar capillaries ("capiholes") and survival. *Front Biosci*. 2017;9(1):110-28. <http://dx.doi.org/10.2741/e790>. PMID:27814594.
- 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*. 2012;67(1):69-75. [http://dx.doi.org/10.6061/clinics/2012\(01\)11](http://dx.doi.org/10.6061/clinics/2012(01)11). PMID:22249483.
- Ivanov KP. Circulation in the lungs and microcirculation in the alveoli. *Respir Physiol Neurobiol*. 2013;187(1):26-30. <http://dx.doi.org/10.1016/j.resp.2013.02.022>. PMID:23466953.
- 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):446-52. [http://dx.doi.org/10.6061/clinics/2015\(06\)11](http://dx.doi.org/10.6061/clinics/2015(06)11). PMID:26106965.
- Cavalcante LP, Ferreira SG, Pereira DR, Moraes SR, Simas R, Sannomiya P, et al. Acute administration of oestradiol or progesterone in a spinal cord ischaemia-reperfusion model in rats. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2018;26(2):196-201. <http://dx.doi.org/10.1093/icvts/ivx314>. PMID:29049608.
- Obermaier R, Dobschuetz E, Keck T, Hopp H-H, Drognitz O, Schareck W, et al. Brain death impairs pancreatic microcirculation. *Am J Transplant*. 2004;4(2):210-5. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1600-6143.2003.00317.x>. PMID:14974941.
- Yamagami K, Hutter J, Yamamoto Y, Schauer RJ, Enders G, Leiderer R, et al. Synergistic effects of brain death and liver steatosis on the hepatic microcirculation. *Transplantation*. 2005;80(4):500-5. <http://dx.doi.org/10.1097/01.tp.0000167723.46580.78>. PMID:16123725.
- Leick M, Azcutia V, Newton G, Lusinskas FW. Leukocyte recruitment in inflammation: basic concepts and new mechanistic insights based on new models and microscopic imaging technologies. *Cell Tissue Res*. 2014;355(3):647-56. <http://dx.doi.org/10.1007/s00441-014-1809-9>. PMID:24562377.
- Jiang X, Khan MA, Tian W, Beilke J, Natarajan R, Kosek J, et al. Adenovirus-mediated HIF-1 α gene transfer promotes repair of mouse airway allograft microvasculature and attenuates chronic rejection. *J Clin Invest*. 2011;121(6):2336-49. <http://dx.doi.org/10.1172/JCI46192>. PMID:21606594.
- Barklin A. Systemic inflammation in the brain-dead organ donor. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2009;53(4):425-35. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-6576.2008.01879.x>. PMID:19226294.
- Van der Hoeven JA, Molema G, Ter Horst GJ, Freund RL, Wiersema J, van Schilfgaarde R, et al. Relationship between duration of brain death and hemodynamic (in)stability on progressive dysfunction and increased immunologic activation of donor kidneys. *Kidney Int*. 2003;64(5):1874-82. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1523-1755.2003.00272.x>. PMID:14531823.
- Van Der Hoeven JA, Ter Horst GJ, Molema G, de Vos P, Girbes AR, Postema F, et al. Effects of brain death and hemodynamic status on function and immunologic activation of the potential donor liver in the rat. *Ann Surg*. 2000;232(6):804-13. <http://dx.doi.org/10.1097/0000658-200012000-00009>. PMID:11088075.
- 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;123(1):118-25. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jss.2004.07.245>. PMID:15652959.
- Rostron AJ, Avlonitis VS, Cork DMW, Grenade DS, Kirby JA, Dark JH. Hemodynamic resuscitation with arginine vasopressin reduces lung injury after brain death in the transplant donor. *Transplantation*. 2008;85(4):597-606. <http://dx.doi.org/10.1097/TP.0b013e31816398dd>. PMID:18347540.