

Roberta Figueiredo Vieira

Estudo dos efeitos do  $17\beta$ -estradiol sobre a  
microcirculação em modelo de morte encefálica em  
ratos machos

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

Coorientadora: Dra. Ana Cristina Breithaupt-Faloppa

São Paulo

2018

Roberta Figueiredo Vieira

Estudo dos efeitos do  $17\beta$ -estradiol sobre a  
microcirculação em modelo de morte encefálica em  
ratos machos

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

Coorientadora: Dra. Ana Cristina Breithaupt-Faloppa

São Paulo

2018

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

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

©reprodução autorizada pelo autor

Vieira, Roberta Figueiredo

Estudo dos efeitos do 17 $\beta$ -estradiol sobre a microcirculação em modelo de morte encefálica em ratos machos / Roberta Figueiredo Vieira. -- São Paulo, 2018.

Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Cirurgia Torácica e Cardiovascular.

Orientadora: Paulina Sannomiya.

Coorientadora: Ana Cristina Breithaupt-Faloppa.

Descritores: 1.Morte encefálica 2.Estradiol  
3.Microcirculação 4.Mesentério 5.Pulmão 6.Inflamação  
7.Ratos Wistar

USP/FM/DBD-001/18

**Dedicatória**

---

Aos meus pais e à minha irmã, pelo apoio e amor incondicionais.

## **Agradecimientos**

---

À Profa. Dra. Paulina Sannomiya pelo incentivo, dedicação e orientação.

À Dra. Ana Cristina Breithaupt-Faloppa pelo auxílio nas várias etapas deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Luiz Felipe Moreira pelas contribuições que enriqueceram este trabalho.

Aos funcionários Dra. Sueli Ferreira e Cristiano Correia, pelo auxílio na execução dos experimentos deste trabalho.

À banca de qualificação, pelas críticas construtivas que melhoraram a qualidade desta tese.

Aos colegas e funcionários do LIM 11, pelo apoio e companheirismo, que tornaram essa jornada mais alegre.

Aos estudantes de medicina, pelo auxílio nas análises deste trabalho.

Às funcionárias da pós-graduação do INCOR, pela atenção e profissionalismo.

À FAPESP pelo suporte financeiro e por acreditar no potencial deste estudo.

Aos animais, parte fundamental desse trabalho, obrigada por suas contribuições à ciência.

**Epígrafe**

---

“O interesse pela doença e pela morte é apenas outra expressão do interesse  
pela vida”.

**Thomas Mann**

**Normatização adotada**

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento de sua 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.

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

## **Sumário**

---

---

Lista de abreviaturas	
Lista de figuras	
Lista de tabelas	
Resumo	
Abstract	
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
1.1 Considerações Preliminares.....	02
1.2 Morte encefálica e microcirculação.....	03
1.3 Estradiol e microcirculação.....	05
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>08</b>
2.1 Objetivo geral.....	09
2.2 Objetivos específicos.....	09
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>10</b>
3.1 Animais.....	11
3.2 Delineamento experimental.....	11
3.3 Anestesia e preparo dos animais.....	12
3.4 Indução da morte encefálica.....	13
3.5 Tratamento dos animais com 17- $\beta$ estradiol.....	14
3.6 Microscopia intravital <i>in situ</i> de mesentério e análise do fluxo sanguíneo.....	14
3.7 Análise histológica do pulmão.....	15
3.8 Imunohistoquímica para pesquisa de eNOS, endotelina-1 e moléculas de adesão endoteliais no mesentério.....	16
3.9 Imunohistoquímica para pesquisa de eNOS, endotelina-1, moléculas de adesão endoteliais e iNOS no pulmão.....	17
3.10 Captação e análise de imagens.....	19
3.11 Real time PCR para expressão gênica de eNOS e endotelina-1 no mesentério e pulmão.....	20
3.12 Dosagem de 17- $\beta$ estradiol.....	20
3.13 Dosagem de corticosterona.....	21
3.14 Leucograma.....	21
3.15 Dosagem de citocinas no soro e no pulmão.....	21
3.16 Parâmetros hemodinâmicos e gasométricos.....	22

3.17	Análise estatística.....	22
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>23</b>
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>41</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>50</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>52</b>

**Listas**

---

AEC	3-amino-9-etilcarbazol
BSA	Albumina sérica bovina
CINC-1	Quimiocina para neutrófilo induzida por citocina-1
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Enzima-imunoensaio
eNOS	Sintase endotelial do óxido nítrico
EPM	Erro padrão da média
ER	Receptor de estradiol
ERE	Elementos responsivos ao estradiol
E2	Estradiol
FiO <sub>2</sub>	Fração inspirada de oxigênio
FO	Falso-operado
GPER	Receptor de estradiol acoplado à proteína G
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
iNOS	Sintase induzível do óxido nítrico
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MCP-1	Proteína quimiotática de macrófago-1
ME	Morte encefálica
MIP-1 $\alpha$	Proteína inflamatória de macrófago-1 $\alpha$
PAM	Pressão arterial média
PBS	Tampão fosfato salina
PECAM	Molécula de adesão da plaqueta/célula endotelial
PI3K/Akt	Fosfatidilinositol-3-quinase /ativação da proteína quinase B
OCT	<i>Optimal cutting temperature</i>
TBST	Tampão TRIS salina Tween
TNF $\alpha$	Fator de necrose tumoral- $\alpha$
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
T3	Triiodotironina
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular

- Figura 1 -** Pressão arterial média de ratos: FO, ratos falso-operados (n=11); ME, ratos submetidos à morte encefálica (n=11); E2, ratos tratados com 17 $\beta$ -estradiol (n=10). Os valores representam a média $\pm$ EPM. \* $p=0,0003$ , \*\* $p=0,0001$  FO versus ME e E2..... 24
- Figura 2 -** Concentrações séricas de 17 $\beta$ -estradiol e corticosterona em ratos FO, falso-operados; ME, submetidos à morte encefálica; E2, tratados com 17 $\beta$ -estradiol. Os valores representam a média $\pm$ EPM de 3 a 5 ratos/grupo. Kruskal Wallis seguido de teste de Dunn para múltiplas comparações.  $\varphi p<0,0255$  E2 versus ME; \* $p<0,0393$  FO versus ME..... 25
- Figura 3 -** Determinação do fluxo sanguíneo (A) e da porcentagem de microvasos perfundidos na microcirculação mesentérica (B) de ratos falso operados (FO, n=5), ratos submetidos à morte encefálica (ME, n=5) e ratos tratados com 17 $\beta$ -estradiol (E2, n=5). Os valores representam a média $\pm$ EPM. ANOVA seguida de teste de Tukey para múltiplas comparações. \* $p=0,0093$  FO versus ME;  $\varphi p=0,0404$  E2 versus ME..... 27
- Figura 4 -** Fotomicrografias e quantificação da expressão proteica de eNOS nos microvasos do mesentério de ratos FO, falso-operados; ME, submetidos à morte encefálica; E2, tratados com 17 $\beta$ -estradiol. Os valores representam a média $\pm$ EPM de 03 amostras/rato; 03 ratos/grupo. Kruskal-Wallis seguido de teste de Dunn para múltiplas comparações. \* $p<0,0001$  E2 versus ME..... 28
- Figura 5 -** Fotomicrografias e quantificação da expressão proteica de endotelina-1 nos microvasos do mesentério de ratos FO, falso-operados; ME, submetidos à morte encefálica; E2, tratados com 17 $\beta$ -estradiol. Os valores representam a média $\pm$ EPM de 03 amostras/rato; 04 ratos/grupo.

---

	Teste de Kruskal-Wallis.....	29
<b>Figura 6 -</b>	Quantificação da expressão gênica de eNOS e endotelina-1 no mesentério de: FO, ratos falso-operados; ME, ratos submetidos à morte encefálica; E2, ratos tratados com 17 $\beta$ -estradiol. Os valores representam a média $\pm$ EPM de 03 amostras/rato; 05 ratos/grupo. Os dados da expressão gênica são relativos aos valores obtidos de ratos naïve. Teste de Kruskal Wallis.....	30
<b>Figura 7 -</b>	Fotomicrografias e quantificação da expressão proteica de P-selectina nos microvasos do mesentério de ratos FO, falso-operados; ME, submetidos à morte encefálica; E2, tratados com 17 $\beta$ -estradiol. Os valores representam a média $\pm$ EPM de 03 amostras/rato; 04 ratos/grupo. Teste de Kruskal-Wallis.....	31
<b>Figura 8 -</b>	Fotomicrografias e quantificação da expressão proteica de ICAM-1 nos microvasos do mesentério de ratos FO, falso operados; ME, submetidos à morte encefálica; E2, tratados com 17 $\beta$ -estradiol. Os valores representam a média $\pm$ EPM de 03 amostras/rato e 04 ratos/grupo. Kruskal-Wallis seguido de teste de Dunn para múltiplas comparações. * $p=0,0002$ FO <i>versus</i> ME.....	32
<b>Figura 9 -</b>	Fotomicrografias e quantificação da expressão proteica de VCAM-1 nos microvasos do mesentério de ratos FO, falso operados; ME, submetidos à morte encefálica; E2, tratados com 17 $\beta$ -estradiol. Os valores representam a média $\pm$ EPM de 03 amostras/rato e 04 ratos/grupo. Kruskal-Wallis seguido de teste de Dunn para múltiplas comparações. * $p=0,0034$ E2 <i>versus</i> ME.....	33
<b>Figura 10 -</b>	Análise histomorfométrica do edema, hemorragia e infiltrado inflamatório pulmonar. Ratos falso-operados (FO), submetidos à morte encefálica (ME) e tratados com 17 $\beta$ -estradiol (E2). Os valores representam a	

- média±EPM de 05 amostras/rato e 06 ratos/grupo. ANOVA seguida de teste de Dunnett para múltiplas comparações.  $\varphi p < 0,0001$  e  $\lambda p = 0,0077$  FO *versus* ME;  $*p < 0,0001$  e  $\delta p < 0,0001$  E2 *versus* ME..... 34
- Figura 11 -** Fotomicrografias representativas do parênquima pulmonar de ratos falso-operado (FO), submetido à morte encefálica (ME) e tratado com 17 $\beta$ -estradiol (E2). Aumento final de 200x..... 35
- Figura 12 -** Fotomicrografias e quantificação da expressão proteica de iNOS no parênquima pulmonar de ratos FO, falso operados; ME, submetidos à morte encefálica; E2, tratados com 17 $\beta$ -estradiol. Os valores representam a média±EPM de 01 amostra/rato e 05 ratos/grupo. Kruskal-Wallis seguido de teste de Dunn para múltiplas comparações.  $*p < 0,0001$  FO *versus* ME e  $\varphi p = 0,0035$  E2 *versus* ME..... 36
- Figura 13 -** Quantificação das expressões proteica e gênica de eNOS e endotelina-1 no pulmão. Ratos falso-operados (FO), submetidos à morte encefálica (ME) e ratos tratados com 17 $\beta$ -estradiol (E2). Os valores representam a média±EPM para 02 amostras/rato, 05 ratos/grupo (imunohistoquímica) e 5 a 6 ratos/grupo (RT-PCR). Os dados da expressão gênica são relativos aos valores obtidos de ratos naïve. Teste de Kruskal Wallis seguido de teste de Dunn para múltiplas comparações.  $*p = 0,0055$  FO *versus* ME e  $\varphi p = 0,0003$  E2 *versus* ME..... 37
- Figura 14 -** Quantificação da expressão proteica de ICAM-1, PECAM-1 e VCAM-1 no pulmão de ratos FO, falso operados; ME, submetidos à morte encefálica; E2, tratados com 17 $\beta$ -estradiol. Os valores representam a média±EPM de 02 amostras/rato e 05 ratos/grupo. Kruskal-Wallis seguido de teste de Dunn para múltiplas

comparações. \* $p < 0,0001$  FO *versus* ME;  $\Phi p = 0,0482$  E2  
*versus* ME..... 38

<b>Tabela 1</b> - Contagens total e diferencial dos leucócitos circulantes...	26
<b>Tabela 2</b> - Dosagem de citocinas no pulmão.....	39
<b>Tabela 3</b> - Dosagem de citocinas séricas.....	40

**Resumo**

---

Vieira RF. *Estudo dos efeitos do 17 $\beta$ -estradiol sobre a microcirculação em modelo de morte encefálica em ratos machos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

**INTRODUÇÃO:** A morte encefálica (ME) associa-se à instabilidade hemodinâmica, disfunção microvascular e inflamação, comprometendo a viabilidade dos órgãos para o transplante. O hormônio 17 $\beta$ -estradiol caracteriza-se por seus efeitos protetores vasculares e propriedades anti-inflamatórias. **OBJETIVO:** Neste estudo investigou-se os efeitos do 17 $\beta$ -estradiol, como modulador da microcirculação, em modelo de indução rápida de morte encefálica em ratos machos. **MÉTODOS:** Ratos Wistar machos foram submetidos à indução rápida de morte encefálica através da insuflação intracraniana do cateter de Fogarty. Os animais foram randomizados em 3 grupos: ratos falso-operados, apenas trepanados (FO, n=11); ratos submetidos à ME (ME, n=11); ratos tratados com 17 $\beta$ -estradiol (280  $\mu$ g/Kg, iv) 60 minutos após a indução da ME (E2, n=11). Os experimentos foram realizados decorridos 180 minutos após a ME. A perfusão e o fluxo sanguíneo na microcirculação mesentérica foram avaliados através das técnicas de microscopia intravital e fluxometria a laser. A expressão gênica relativa da sintase endotelial do óxido nítrico (eNOS) e da endotelina-1, no mesentério e pulmão, foi avaliada por técnica de PCR (*polymerase chain reaction*) em tempo real. A expressão proteica de eNOS, endotelina-1, P-selectina, molécula de adesão intercelular (ICAM)-1, molécula de adesão vascular (VCAM)-1 e molécula de adesão da plaqueta/célula endotelial (PECAM)-1 foi determinada por técnica de imunohistoquímica. As alterações histopatológicas pulmonares foram analisadas por técnica histomorfométrica. A expressão da sintase induzível do óxido nítrico (iNOS) no pulmão foi determinada por técnica de imunohistoquímica. Citocinas, quimiocinas, corticosterona e 17 $\beta$ -estradiol foram quantificados por enzima-imunoensaio (ELISA). **RESULTADOS:** O grupo ME apresentou redução da porcentagem de microvasos perfundidos (<30  $\mu$ m) no mesentério comparado ao grupo FO e ao grupo E2, decorridos 180 minutos ( $p=0,0117$ ), sem alterações no fluxo sanguíneo mesentérico ( $p=0,3692$ ). Houve aumento na expressão proteica ( $p<0,0001$ ) e gênica ( $p=0,0009$ ) de eNOS no mesentério no grupo E2. Não houve diferenças na expressão proteica e gênica da endotelina-1 entre os grupos. A expressão de ICAM-1 nos microvasos mesentéricos aumentou no grupo ME ( $p<0,0001$ ) e a expressão de VCAM-1 foi reduzida no grupo E2 ( $p=0,0008$ ). Não houve diferenças significativas na expressão de P-selectina entre os grupos ( $p=0,0675$ ). As análises histopatológicas do pulmão demonstraram aumento do edema ( $p<0,0001$ ) e hemorragia ( $p<0,0001$ ) no grupo ME comparado aos grupos FO e E2, sem diferenças no número de células inflamatórias (células polimorfonucleares:  $p=0,4033$ ; células linfomononucleares:  $p=0,5003$ ). A expressão de iNOS no tecido pulmonar aumentou no grupo ME comparado aos grupos FO e E2 ( $p<0,0001$ ). A expressão proteica de eNOS no pulmão diminuiu nos ratos ME e aumentou nos ratos E2 ( $p=0,0002$ ). A expressão proteica de endotelina-1 no pulmão assim como a expressão gênica pulmonar de eNOS e endotelina-1 não diferiram entre os grupos. Com relação à expressão de moléculas de adesão na microcirculação pulmonar observou-se que os níveis de ICAM-1 não

diferiram entre os grupos ( $p=0,4550$ ); os níveis de VCAM-1 reduziram-se no grupo E2 ( $p<0,0001$ ); níveis de PECAM-1 foram reduzidos nos ratos ME ( $p=0,0037$ ). Observou-se aumento das concentrações séricas de TNF- $\alpha$  ( $p=0,0004$ ) e redução de VEGF sérico ( $p=0,0380$ ) nos ratos ME. Houve redução das concentrações séricas de CINC-1 ( $p=0,0020$ ) e aumento de MCP-1 ( $p=0,0094$ ) no grupo E2. CONCLUSÃO: O tratamento com o 17 $\beta$ -estradiol foi efetivo em restaurar a perfusão mesentérica e reduzir a lesão pulmonar associadas à morte encefálica. Sugere-se que o estradiol, como modulador microcirculatório, possa contribuir para a preservação dos órgãos destinados ao transplante.

Descritores: morte encefálica; estradiol; microcirculação; mesentério; pulmão; inflamação; ratos Wistar

**Abstract**

---

Vieira RF. *Effects of 17 $\beta$ -estradiol in the male rat microcirculation on a sudden brain death model* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2018.

**BACKGROUND:** Brain death (BD) is associated with hemodynamic instability, microvascular dysfunction and inflammation, which compromise the viability of the organs for transplantation. The hormone 17 $\beta$ -estradiol is known to display vascular protective effects and anti-inflammatory properties. **OBJECTIVE:** This study aimed to investigate the effects of 17 $\beta$ -estradiol, as a microcirculatory modulator, in a sudden onset BD model in male rats. **METHODS:** Male Wistar rats underwent rapid onset BD by inflating a Fogarty catheter in the intracranial space. Rats were randomly divided in three groups: sham-operated rats submitted to trepanation only (SH, n=11); rats submitted to BD (BD, n=11); and rats treated with 17 $\beta$ -estradiol (E2, 280  $\mu$ g/kg, iv) 60 min after BD (E2, n=11). Experiments were performed 180 min thereafter. Laser Doppler flowmetry and intravital microscopy were used to evaluate mesenteric microvascular alterations. Gene expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and endothelin-1 in the mesentery and lungs were measured by real-time polymerase chain reaction. Protein expression of eNOS, endothelin-1, P-selectin, intercellular adhesion molecule (ICAM)-1, vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1, and platelet/endothelial cell adhesion molecule (PECAM)-1 was investigated by immunohistochemistry. Lung histopathological changes were evaluated by histomorphometry and tissue expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) by immunohistochemistry. Cytokines, chemokines, 17 $\beta$ -estradiol, and corticosterone were measured by enzyme-linked immunosorbent assay. **RESULTS:** The proportion of mesenteric perfused small vessels (<30  $\mu$ m diameter) was reduced in BD rats compared to SH and E2 rats at 180 min ( $p=0.0117$ ), without changes in mesenteric blood flow ( $p=0.3692$ ). Protein expression of eNOS was increased in E2 group ( $p<0.0001$ ), as well gene expression of eNOS ( $p=0.0009$ ). There were no differences in protein and gene expression of endothelin-1 between groups. The expression of ICAM-1 on mesenteric vessels was increased in BD group ( $p<0.0001$ ) and expression of VCAM-1 was reduced in E2 rats ( $p=0.0008$ ). There were no differences in the expression of P-selectin between groups ( $p=0.0675$ ). Lung histopathological analyses showed increased edema ( $p<0.0001$ ) and hemorrhage ( $p<0.0001$ ) in BD group compared to SH and E2 groups, without differences in the number of inflammatory cells (polymorphonuclear cells:  $p=0.4033$ ; lymphomononuclear cells:  $p=0.5003$ ). The expression of iNOS on lung tissue was increased in BD group, compared with SH and E2 groups ( $p<0.0001$ ). Lung protein expression of eNOS decreased in BD rats, and increased in E2 rats ( $p=0.0002$ ). Protein expression of lung endothelin-1 as well as gene expression of lung eNOS and endothelin-1 did not differ among groups. Regarding the expression of adhesion molecules on lung microcirculation, it was observed that ICAM-1 levels did not differ between groups ( $p=0.4550$ ); levels of VCAM-1 decreased in E2 group ( $p<0.0001$ ); PECAM-1 levels were reduced in BD rats ( $p=0.0037$ ). BD rats showed increased levels of TNF- $\alpha$  ( $p=0.0004$ ), and a reduction in the levels of VEGF ( $p=0,0380$ ) in the serum. BD-E2 rats exhibited reduced CINC-1 levels ( $p=0.0020$ ) and increased levels of MCP-1 ( $p=0,0094$ ) in the serum. **CONCLUSION:** Data presented showed that 17 $\beta$ -estradiol treatment was

effective in restoring mesenteric perfusion and reducing lung injury in brain-dead rats. Estradiol, as a microcirculatory modulator, is a promise therapy to improve organs viability to transplant.

Descriptors: brain death; estradiol; microcirculation; mesentery; lung; inflammation; Wistar rats

# **1. Introdução**

---

## 1.1 Considerações Preliminares

O transplante de órgãos é considerado a única opção terapêutica para pacientes em estágio terminal de muitas doenças. Nas últimas décadas, a taxa de sucesso dos transplantes aumentou progressivamente devido a melhor compreensão da falência orgânica, do processo de rejeição e do desenvolvimento de tratamentos imunossupressores mais adequados (Pratschke et al., 2005; Skrabal et al., 2005; McKay, 2011).

Doadores em morte encefálica ainda são a principal fonte de órgãos para transplante. Entretanto, situações variadas comprometem a viabilidade dos diferentes órgãos, de modo que as diferentes listas de espera crescem a cada ano (Mascia et al., 2009; Dupuis et al., 2014). Essa situação é, ainda mais grave, no caso do transplante de pulmão, órgão que apresenta baixas taxas de utilização (Machuca et al., 2013). O pulmão é particularmente vulnerável aos efeitos deletérios relacionados à morte encefálica. Há lesões inespecíficas como a pneumonia associada à ventilação mecânica e lesões específicas como o edema pulmonar neurogênico, que contribuem para a sua baixa utilização (Avlonitis et al., 2005; Cypel et al., 2011; Zhou et al., 2013; Belhaj et al., 2017).

Com o objetivo de reduzir a desproporção entre demanda e oferta de órgãos, iniciou-se a flexibilização dos critérios de inclusão dos doadores, aceitando-se doadores considerados marginais e doadores após parada cardíaca (não aprovado no Brasil), além da adoção de técnicas de

recondicionamento de órgãos *ex vivo* (Mariani et al., 2012; Machuca et al., 2013; Krutsinger et al., 2015).

Evidências clínicas e experimentais ressaltam, também, o impacto da morte encefálica sobre a viabilidade de diferentes órgãos (Terasaki et al., 1995; Wilhelm et al., 2000; Pratschke et al., 2005; Floerchinger et al., 2012) e destacam a importância das condições clínicas do doador na taxa de sucesso dos transplantes (Feng et al., 2006). Deste modo, parece evidente que a morte encefálica seja considerada importante fator de estresse comprometendo os órgãos antes mesmo do transplante (Skrabal et al., 2005; Domínguez-Roldán et al., 2009; McKeown et al., 2012).

Portanto, a compreensão das alterações geradas pela morte encefálica contribui não apenas para a otimização clínica do doador mas, também, para a investigação de propostas terapêuticas mais adequadas.

## **1.2 Morte Encefálica e microcirculação**

A morte encefálica decorrente de trauma, infarto ou hemorragia cerebral resulta em aumento da pressão intracraniana, seguida de instabilidade hemodinâmica causada por aumento na concentração sérica das catecolaminas (tempestade autonômica) (Steen et al., 2012). Como consequência, ocorre uma fase hiperdinâmica caracterizada por hipertensão, taquicardia, aumento da resistência vascular sistêmica e do débito cardíaco, seguida de uma fase hipotensiva secundária à vasodilatação e à hipovolemia, relativa ou absoluta (Novitsky, 1997; Wood e McCartney, 2007). As baixas

taxas de utilização de glicose, piruvato e palmitato coincidem com o acúmulo de lactato e ácidos graxos livres no plasma, indicando a troca do metabolismo aeróbico para o anaeróbico (Cooper et al., 1989; Avlonitis et al., 2003; Mascia et al., 2009).

Modelos experimentais de morte encefálica evidenciam alterações hormonais secundárias à falência do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. Há redução nos níveis de corticosterona, insulina, T3 livre (triiodotironina) e T4 (tiroxina) (Ranasinghe e Bonser, 2011). Este colapso hormonal associado à tempestade autonômica provoca alterações microcirculatórias e metabólicas, que potencializam o processo degenerativo nos diferentes órgãos (Weymann et al., 2011).

A morte encefálica desencadeia a ativação do sistema imune inato, caracterizado pelo aumento na expressão de mediadores inflamatórios (citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão) e pelo infiltrado celular inflamatório representado pela presença de leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e linfócitos T no coração, pulmão, rim e fígado (Takada et al., 1998; Van der Hoeven et al., 1999; Avlonitis et al., 2003; Skrabal et al., 2005; Floerchinger et al., 2012; Rech et al., 2013).

A integridade da microcirculação é essencial para uma adequada oxigenação tecidual, particularmente no doador de órgãos (Ince, 2005; Tamosuitis et al., 2016). Em modelo de isquemia e reperfusão, a disfunção microcirculatória nos diferentes tecidos agrava-se com a redução da perfusão tecidual e interação dos neutrófilos com o endotélio (Hoffmann et al., 2006). O recrutamento dos leucócitos depende do reconhecimento sequencial de moléculas de adesão expressas pelo leucócito e pela célula endotelial. As

etapas desta cascata de adesão se iniciam pela captura e rolamento dos leucócitos ao longo da parede do vaso, interação de baixa afinidade mediada pelas selectinas e seus ligantes, glicoproteínas e glicolipídeos (Zarbock et al., 2011). Sob estímulo inflamatório, ativam-se leucócitos e células endoteliais que passam a expressar moléculas distintas responsáveis pela adesão e transmigração leucocitárias. Moléculas da família das  $\beta_2$ -integrinas, expressas pelos leucócitos, ligam-se a moléculas da família das imunoglobulinas, como a molécula de adesão intercelular (ICAM)-1, expressas pelas células endoteliais (Kolaczowska e Kubes,2013). Em estudos anteriores, descreveram-se as alterações decorrentes da morte encefálica em ratos machos, incluindo hipoperfusão na microcirculação mesentérica, aumento da expressão de ICAM-1 e infiltrado leucocitário associados à redução das concentrações séricas de corticosterona endógena (Simas et al., 2012a; Simas et al., 2012b).

Em suma, a morte encefálica associa-se a alterações hemodinâmicas, neuro-humorais e imunológicas, as quais contribuem para a deterioração da qualidade intrínseca do órgão e/ou ampliam a lesão de isquemia e reperfusão durante os procedimentos de preservação e transplante (Skrabal et al., 2005; Chamorro et al., 2009; Novitzky et al., 2014; Yount e Greer, 2014).

### **1.3 Estradiol e microcirculação**

Evidências indicam que o sexo feminino está associado a menor incidência de eventos cardiovasculares, sepse e falência múltipla de órgãos (Homma et al., 2005; Meyer et al., 2006; Frink et al., 2007; Iorga et al., 2017).

Destaca-se o efeito benéfico do hormônio feminino estrogênio e o efeito deletério do hormônio masculino testosterona (Kawasaki e Chaudry, 2012).

O esteroide gonadal  $17\beta$ -estradiol apresenta efeitos protetores contra lesões isquêmicas, inflamatórias e metabólicas (Straub, 2007; Burkhardt et al., 2008; Yang et al., 2012; Kypreos et al., 2014). Em experimentos conduzidos *in vitro* e *in vivo* Ma et al. (2001) demonstraram que o  $17\beta$ -estradiol exerce ação dilatadora sobre artérias mesentéricas isoladas de ratas ovariectomizadas e preserva a função endotelial dos animais submetidos à isquemia e reperfusão. Estudos adicionais indicam que o hormônio restaura a perfusão esplâncnica (Kuebler et al., 2002; Rocha de Sousa et al., 2017) e reduz a lesão intestinal e pulmonar na vigência de choque hemorrágico em ratos (Doucet et al., 2010). Conforme demonstrado por Breithaupt-Faloppa et al. (2014), a administração de  $17\beta$ -estradiol a ratos machos reduz a migração de leucócitos e a expressão das moléculas de adesão na microcirculação pulmonar em modelo de isquemia e reperfusão intestinal.

O hormônio  $17\beta$ -estradiol liga-se aos receptores clássicos  $ER\alpha$  e  $ER\beta$ , assim como ao receptor do estrogênio acoplado à proteína G (GPER). Ao se ligar aos receptores  $ER\alpha$  e  $ER\beta$ , o hormônio confere tanto a ação genômica quanto a ação rápida, não genômica. No mecanismo genômico, a ligação dos receptores clássicos ao estrogênio promove a sua dimerização e migração para o núcleo, ligando-se aos elementos responsivos ao estrogênio (ERE) ou a fatores de transcrição, como o ativador da proteína-1 (Ap-1), regulando a transcrição gênica (Iorga et al., 2017). Os receptores clássicos, quando presentes na membrana plasmática, e o GPER ativam vias de sinalização

rápidas, incluindo a via PI3K/Akt e/ou a cascata da MAPK (Menazza e Murphy, 2016; Iorga et al., 2017). No sistema cardiovascular, estes receptores foram identificados no endotélio, na musculatura lisa, na adventícia e em terminações nervosas adrenérgicas de artérias de diferentes territórios e espécies animais incluindo o homem (Novella et al., 2012).

O efeito protetor do  $17\beta$ -estradiol na microcirculação envolve a ativação da sintase endotelial do óxido nítrico (eNOS), determinando a produção de NO que, por sua vez, promove vasodilatação, inibe a agregação plaquetária e reduz a adesão leucocitária (Bullard et al., 2010; Kypreos et al., 2014). O hormônio também regula a expressão da sintase induzível do NO (iNOS), expressa por macrófagos residentes e leucócitos polimorfonucleares, no curso do processo inflamatório (Bullard et al., 2010).

Considerando as ações benéficas do  $17\beta$ -estradiol sobre a microcirculação em diferentes modelos experimentais, pretende-se investigar os efeitos deste hormônio em modelo de morte encefálica em ratos machos.

## **2. Objetivos**

---

## 2.1 Objetivo geral

Este estudo tem por objetivo investigar as ações do  $17\beta$ -estradiol sobre a microcirculação mesentérica e pulmonar no modelo de morte encefálica em ratos machos.

## 2.2 Objetivos específicos

Pretende-se investigar:

- O fluxo sanguíneo e a porcentagem de microvasos perfundidos na microcirculação mesentérica;
- As alterações histológicas no pulmão;
- A expressão proteica e gênica da sintase endotelial do óxido nítrico (eNOS) e da endotelina-1 no mesentério e no pulmão;
- A expressão gênica da sintase induzível do óxido nítrico (iNOS) no pulmão;
- A expressão de moléculas de adesão endoteliais no mesentério e no pulmão;
- As concentrações sérica e pulmonar de citocinas e quimiocinas;
- A concentração sérica de corticosterona;
- A concentração sérica de estradiol;
- O leucograma, parâmetros hemodinâmicos e gasométricos.

### **3. Materiais e Métodos**

---

### **3.1 Animais**

Neste estudo foram utilizados 45 ratos Wistar machos, provenientes do Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, com 8 semanas de idade (250-300 g). Os animais foram mantidos a  $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ , período de claro e escuro de 12 horas, sem restrições a ingestão de água e ração. O projeto de pesquisa foi realizado no Laboratório de Investigação Médica (LIM) - 11 da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os animais foram manipulados de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA – 2013) para o cuidado, manipulação e utilização de animais de laboratório. O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob número SDC 3989/13/112. Referente à eutanásia e descarte dos animais, estes foram submetidos à exsanguinação através da aorta abdominal e, em seguida, armazenados em câmara fria para posterior retirada por uma empresa responsável pela coleta.

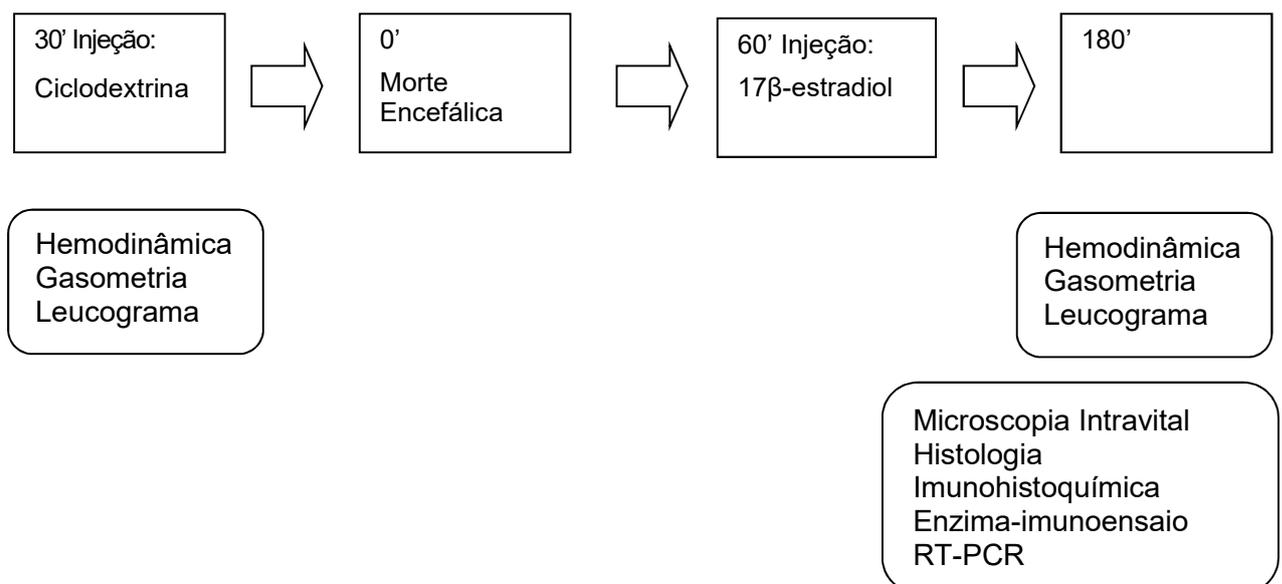
### **3.2 Delineamento experimental**

Os animais foram divididos nos seguintes grupos:

**Falso operado (FO)** - administração endovenosa de ciclodextrina 30 minutos antes da manipulação cirúrgica, porém sem indução da morte encefálica;

**Morte encefálica (ME)** – administração endovenosa de ciclodextrina 30 minutos antes da indução da morte encefálica;

**Estradiol (E2)** - administração endovenosa de  $17\beta$ -estradiol em bolus de 280  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  (associado ao seu veículo ciclodextrina) 1 hora após a indução da morte encefálica.



### 3.3 Anestesia e preparo dos animais

A anestesia foi induzida em câmara fechada com isoflurano a 5%, seguida de intubação e ventilação mecânica através de ventilador para roedores (Harvard 683, *Harvard Apparatus, Inc, Holliston, MA, USA*). O plano anestésico foi mantido com isoflurano a 2%. A ventilação foi realizada com  $\text{FiO}_2$

de 100%, volume corrente de 10 mL/kg e frequência de 70 ciclos por minuto. Os animais foram colocados em decúbito dorsal horizontal, e passaram por tricotomia e antissepsia da região cervical. Em seguida, os animais foram posicionados na plataforma cirúrgica com aquecimento local, para manutenção da temperatura (37°C). A artéria carótida esquerda e a veia jugular interna direita foram canuladas, utilizando cateter de polietileno *Clay Adams PE-10*, conectado a PE-50. O cateter da artéria foi conectado a um transdutor de pressão (P23XL *Viggo-Spectramed Statham, CA, USA*) acoplado ao sistema multicanal computadorizado de aquisição de dados biológicos (*Acqknowledge – Biopac Systems, Inc Goleta, CA, USA*). A veia jugular foi utilizada para infusão contínua de soro fisiológico a 2 mL/h.

### **3.4 Indução da morte encefálica**

Os animais foram colocados em decúbito ventral, passaram por tricotomia e antissepsia do crânio. Utilizando-se uma broca motorizada foi realizada a perfuração da calota craniana para posterior inserção intracraniana de um cateter Fogarty-4F (*Edwards Lifescience LLC, Irvine, CA, USA*). A indução da morte encefálica ocorreu com a rápida insuflação do cateter com 500 µL de solução salina e, na sequência, a anestesia foi suspensa. A morte encefálica foi confirmada por pico hipertensivo, ausência de reflexo palpebral, midríase fixa bilateral e apneia.

### 3.5 Tratamento dos animais com 17- $\beta$ estradiol

Os animais foram tratados com 280  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de 17 $\beta$ -estradiol ( *$\beta$ -estradiol-Water Soluble, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA*) em dose única por via endovenosa 1 hora após a indução da morte encefálica. Os grupos morte encefálica e falso operado foram tratados com volume equivalente do veículo ciclodextrina (*2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin, Sigma-Aldrich*) diluído em solução fisiológica.

### 3.6 Microscopia intravital *in situ* de mesentério e análise do fluxo sanguíneo

Para a observação da microcirculação mesentérica foi realizada uma incisão cutânea e muscular na porção lateral direita do abdome para a exteriorização do leito vascular mesentérico, conforme descrito anteriormente por Simas et al. (2012a). Os animais foram mantidos em decúbito lateral direito sobre uma placa acrílica aquecida a 37°C. A preparação foi mantida úmida e aquecida por superfusão com solução de Krebs-Henseleit (pH 7,2 a 7,4) com a seguinte composição (mM): 113 NaCl; 4,7 KCl; 2,5 CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; 25 NaHCO<sub>3</sub>; 1,1 MgSO<sub>4</sub>; 1,1 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 5-glicose, saturada com uma mistura de gases (95% N<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>). O sistema consiste de microscópio triocular (*Axioplan 2, Carl Zeiss Co., München-Hallbergmoos, Germany*) acoplado a uma câmera digital para captura de imagens em movimento (*Axiocam-HSB, Carl Zeiss Co., München-Hallbergmoos, Germany*) e microcomputador. A perfusão da microcirculação mesentérica foi determinada pela quantificação de vasos (<30

µm de diâmetro) com fluxo contínuo ou intermitente/ausente, considerado o número total de vasos em área de 1,0 mm<sup>2</sup>. A determinação do fluxo sanguíneo na microcirculação mesentérica foi avaliada pela utilização de *probe* (*MNP110XP Fine Needle Probe*) de 25 mm de extensão e 0.48 mm de diâmetro acoplado a fluxômetro a laser (*IN191 Laser Doppler Flowmetry, AD Instruments, Colorado Springs, CO, USA*). O sinal captado é proporcional ao fluxo de células sanguíneas na microvasculatura. Portanto, a perfusão microvascular é o produto da velocidade média das células sanguíneas e do número médio de células sanguíneas presentes no tecido sob incidência do laser. Os sinais do laser são registrados como unidades de perfusão sanguínea.

### **3.7 Análise histológica do pulmão**

Fragmentos do pulmão foram fixados e armazenados em solução de formaldeído (10%), incluídos em parafina, cortados e corados (hematoxilina/eosina) para análise histopatológica em microscópio óptico. Análises morfométricas convencionais foram realizadas em amostras de tecido pulmonar (01 amostra/rato; 05 ratos/grupo). Os parâmetros investigados foram: infiltrado leucocitário, edema intersticial e hemorragia. As análises foram realizadas por dois observadores. Os cortes foram digitalizados e cinco áreas por imagem foram extraídas e exportadas em formato compatível com o software *NIS Elements (Nikon)*. Um retículo com 104 intersecções foi utilizado para a avaliação da proporção ar/tecido. O número de leucócitos e as unidades de edema e hemorragia foram expressos por área de tecido.

### 3.8 Imunohistoquímica para pesquisa de eNOS, endotelina-1 e moléculas de adesão endoteliais no mesentério

Após exsanguinação pela aorta abdominal, o mesentério foi removido, imerso em hexano sob nitrogênio líquido e armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Cortes seriados do mesentério ( $8\ \mu\text{m}$  de espessura) foram colocados sobre lâminas silanizadas (*StarFrost<sup>®</sup>, Knittelglass, Germany*) e fixados em acetona gelada por 10 minutos. Os cortes foram lavados com solução tampão TRIS salina tween-20 (TBST) e permeabilizadas com TBST e triton X-100. O bloqueio de sítios inespecíficos foi realizado com tampão proteico, constituído de TBST e 2% de albumina sérica bovina (BSA) por 1 hora a  $37^{\circ}\text{C}$ , e o bloqueio da peroxidase endógena com solução de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (2%) por 15 minutos a temperatura ambiente. Seguem as especificações dos anticorpos utilizados: (a) para a imunodeteção de eNOS e endotelina-1 foram utilizados anticorpos primários, IgG de coelho anti-eNOS (*Abcam, Cambridge, Mass, USA*) e IgG de camundongo anti-endotelina-1 (*Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA*), diluídos em solução de TBST contendo 2% de BSA a 1:100. A incubação com os anticorpos foi realizada por 2 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ . Em seguida, as lâminas foram lavadas com TBST e incubadas com solução a 1:200 de anticorpo secundário anti-coelho ou anti-camundongo associados a HRP (*Horseradish peroxidase, Millipore, Billerica, Mass, USA*) por 1 hora a  $37^{\circ}\text{C}$ ; (b) para a imunodeteção de ICAM-1, VCAM-1 e P-selectina foram utilizados anticorpos primários monoclonais, IgG de camundongo anti-ICAM-1 de rato (CD54, *Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA*); IgG de camundongo anti-VCAM-1 de rato (CD106, *BD-Pharmigen, San Jose, CA, USA*) e IgG de camundongo anti-P-

selectina humana (CD62P, *R&D Systems, Minneapolis, Minn, USA*), diluídos em solução de TBST contendo 2% de BSA a 1:50, 1:100 e 1:40, respectivamente. A incubação com os anticorpos foi realizada por 2 horas a 37°C. Em seguida, as lâminas foram lavadas com TBST e incubadas com solução a 1:200 de anticorpo secundário anti-camundongo associado a HRP (*Millipore, Billerica, Mass, USA*) por 1 hora a 37°C. Após nova lavagem com TBST, as lâminas foram incubadas com solução de substrato 3-amino-9-etilcarbazol (AEC, *Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA*) por 5 a 10 minutos e contra coradas com hematoxilina. Para o controle negativo o anticorpo primário foi substituído por TBST-BSA.

### **3.9 Imunohistoquímica para pesquisa de eNOS, endotelina-1, moléculas de adesão endoteliais e iNOS no pulmão**

Após exsanguinação pela aorta abdominal, o pulmão esquerdo foi removido, insuflado com solução (1:3) de OCT (*optimal cutting temperature*) em tampão fosfato salina (PBS), os tecidos imersos em hexano sob nitrogênio líquido e armazenados a -80°C. Cortes seriados (10 µm de espessura) do pulmão foram colocados sobre lâminas silanizadas (*StarFrost®*, *Knittelglass, Germany*) e fixados em acetona gelada por 10 minutos. Os cortes foram lavados com solução tampão TRIS salina tween-20 (TBST) e permeabilizadas com TBST e triton X-100. O bloqueio de sítios inespecíficos foi realizado com tampão proteico, constituído de TBST e 2% de albumina sérica bovina (BSA) por 1 hora a 37°C, e o bloqueio da peroxidase endógena com solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2%) por 15 minutos a temperatura ambiente. Seguem as especificações dos

anticorpos utilizados: (a) para a imunodeteção de eNOS e endotelina-1 foram utilizados anticorpos primários, IgG de coelho anti-eNOS (*Abcam, Cambridge, Mass, USA*) e IgG de camundongo anti-endotelina-1 (*Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA*), diluídos em solução de TBST contendo 2% de BSA a 1:200 e 1:100, respectivamente. A incubação com os anticorpos foi realizada por 12 horas a 4°C. Em seguida, as lâminas foram lavadas com TBST e incubadas com solução a 1:200 de anticorpo secundário anti-coelho ou anti-camundongo associados a HRP (*Millipore, Billerica, Mass, USA*) por 1 hora a 37°C; (b) para a imunodeteção das moléculas de adesão endoteliais ICAM-1, PECAM-1 e VCAM-1 foram utilizados os anticorpos primários IgG de camundongo anti-ICAM-1 de rato (CD54, *Cedarlane, Burlington, Ontario, Canada*); IgG de camundongo anti-PECAM-1 de rato (CD31, *Millipore, Billerica, Mass, USA*); IgG de camundongo anti-VCAM-1 de rato (CD106, *BD-Pharmigen, San Jose, CA, USA*) diluídos em solução de TBST-BSA a 1:100, 1:200 e 1:200, respectivamente. Os cortes de tecido foram incubados por 12 horas a 4°C. Em seguida, as lâminas foram lavadas com TBST e incubadas com solução a 1:200 de anticorpo secundário anti-camundongo associado a HRP (*Millipore, Billerica, Mass, USA*) por 1 hora a 37°C. Após nova lavagem com TBST, as lâminas foram incubadas com solução de substrato AEC (*Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA*) por 5 a 10 minutos e contra coradas com hematoxilina. Para o controle negativo o anticorpo primário foi substituído por TBST-BSA.

Outro fragmento, obtido do pulmão direito, foi fixado em solução de formaldeído (10%) por 24 horas, desidratado em concentrações crescentes de etanol, diafanizado em xilol e incluído em parafina para a obtenção de cortes

seriados (4 µm) destinados à imunodeteção da sintase induzível do óxido nítrico (iNOS). Os cortes, dispostos sobre lâminas de vidro, foram desparafinizados, reidratados e os sítios antigênicos foram reativados pela incubação com tampão citrato (pH 6,0) por 20 minutos a 100°C. Na sequência, os cortes de pulmão foram permeabilizados com solução tampão de TBST e triton X-100, e os sítios inespecíficos foram bloqueados com solução tampão de TBST contendo 2% de BSA por 1 hora a temperatura ambiente, seguido de bloqueio da peroxidase endógena com solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2%) por 15 minutos a temperatura ambiente. Para a imunodeteção da enzima iNOS utilizou-se o anticorpo primário IgG de coelho anti-iNOS de rato (*Abcam, Cambridge, Mass, USA*) diluído a 1:100 em solução de TBST contendo 2% de BSA. As amostras foram incubadas por 12 horas a temperatura ambiente. Após lavagens sucessivas com TBST, os cortes foram incubados por 1 hora a 37°C com anticorpo secundário anti-coelho conjugado ao HRP (*Millipore, Billerica, Mass, USA*) diluído a 1:100 em TBST-BSA. Após lavagem com TBST, as amostras foram incubadas com solução do substrato AEC, (*Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA*), por 5 a 15 minutos, e contra coradas com hematoxilina. Para o controle negativo as amostras foram incubadas com PBS.

### **3.10 Captação e análise de imagens**

A avaliação das reações imunohistoquímicas nos cortes de tecido mesentérico e pulmonar foi realizada através de sistema de aquisição de imagens com câmera digital DS-Ri1 (*Nikon, Tokyo, Japan*), acoplada a

microscópio de fluorescência (*Nikon*), e analisadas com auxílio do *software NIS-Elements-BR (Nikon)*.

### **3.11 Real time PCR para expressão gênica de eNOS e endotelina-1 no mesentério e pulmão**

Os genes foram quantificados quanto à expressão através de PCR em tempo real, em aparelho Step One Plus® (*Applied Biosystem, USA*). A extração de RNA do mesentério e do pulmão foi realizada com a utilização de kit comercial (*Mirvana®, Ambion, MA, USA*), seguindo o protocolo do fabricante. O cDNA foi transcrito (*High capacity reverse transcriptase kit, Applied Biosystem, USA*) e a reação de PCR em tempo real realizada. Os *primers* utilizados foram Taqman (*Applied Biosystem, USA*): GAPDH (Rn01775763\_g1),  $\beta$ -actin (Rn00667869\_m1\*), eNOS (Rn02132634\_s1\*), endothelin-1 (Rn00561129\_m1\*). As condições de ciclagem foram: 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C seguido de 40 ciclos de 15 segundos 95°C e 1 minuto a 60°C.

### **3.12 Dosagem de 17- $\beta$ estradiol**

A concentração sérica de 17- $\beta$  estradiol foi determinada por enzima-imunoensaio (ELISA) utilizando o kit USCN® (*USCN Life Sciences, Cloude-Clone Co., Houston, TX, USA*) segundo protocolo do fabricante. O nível de detecção do Kit é 13,35 pg/mL até 1000 pg/mL.

### 3.13 Dosagem de corticosterona

A concentração sérica de corticosterona foi determinada por ELISA (Cayman®, *Ann Arbor, Michigan, USA*), segundo protocolo do fabricante.

### 3.14 Leucograma

A partir de amostras de sangue (20 µl) coletadas da cauda dos animais, contagens total e diferencial das células foram realizadas com auxílio de um analisador hematológico (*BC-2800vet, Mindray, China*).

### 3.15 Dosagem de citocinas no soro e no pulmão

As concentrações séricas do fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10, fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e das quimiocinas proteína inflamatória de macrófago (MIP)-1 $\alpha$  e proteína quimiotática de macrófago (MCP)-1 foram determinadas com o kit Milliplex (*Millipore, USA*). As concentrações séricas da quimiocina para neutrófilo induzida por citocina (CINC)-1 e da IL-6 foram determinadas por enzima-imunoensaio (ELISA) segundo instruções do fabricante (*R&D Systems Inc., Minneapolis, USA*). Amostras congeladas do tecido pulmonar foram homogeneizadas em tampão fosfato salina (PBS) na proporção de 4 µL/mg de tecido e, após centrifugação a 12.000g, 4°C por 20 minutos, amostras do sobrenadante foram utilizadas para a dosagem de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10), VEGF e CINC-1 por ELISA segundo instruções do fabricante (*R&D Systems Inc., Minneapolis, USA*).

### **3.16 Parâmetros hemodinâmicos e gasométricos**

Os parâmetros hemodinâmicos, pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca, foram registrados continuamente. A veia jugular foi utilizada para infusão de líquidos. Amostras de sangue foram coletadas da artéria carótida para determinação dos parâmetros pO<sub>2</sub>, pCO<sub>2</sub>, pH, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>++</sup>, Cl<sup>-</sup> e lactato (*ABL 555, Radiometer Medical ApS, Denmark*).

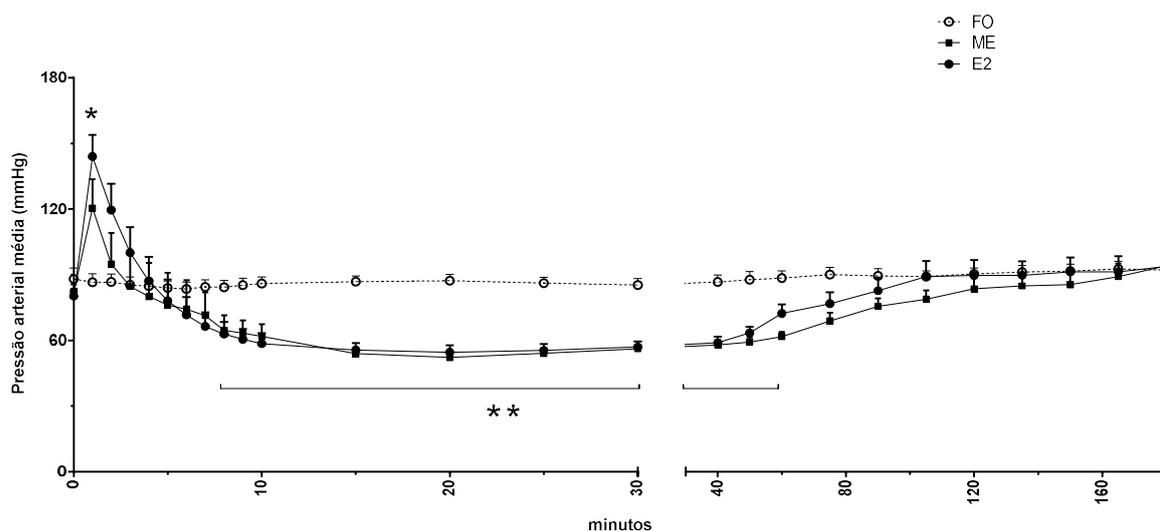
### **3.17 Análise estatística**

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey para múltiplas comparações ou o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn para múltiplas comparações. As análises estatísticas foram conduzidas utilizando o programa *GraphPad Prism Software* v.6. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM). Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significantes.

## **4. Resultados**

---

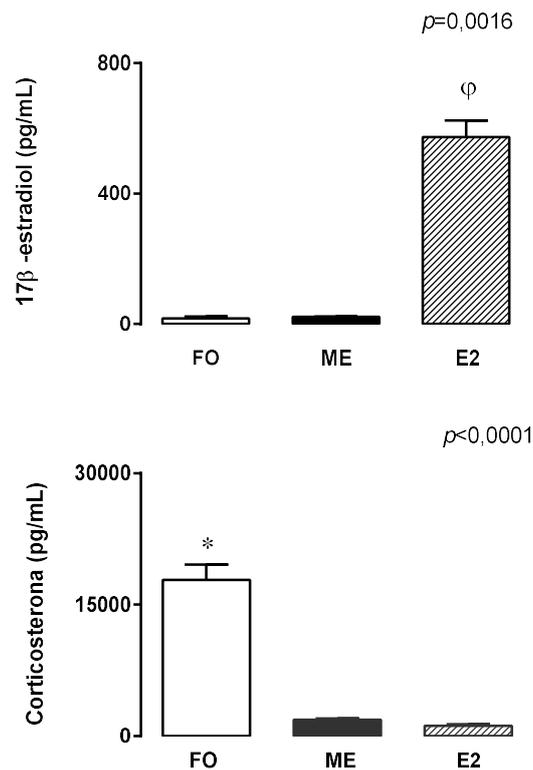
A indução da ME coincidiu com um pico hipertensivo conforme ilustrado na Figura 1. Oscilações na frequência cardíaca acompanharam o pico hipertensivo nestes animais. Decorridos aproximadamente 10 minutos, seguiu-se período hipotensivo em todos os grupos submetidos à ME perdurando até os 60 minutos. A PAM não se alterou de modo significativo no grupo FO. Não se observaram alterações significativas na gasometria arterial e eletrólitos entre os grupos (dados não mostrados).



**Figura 1** - Pressão arterial média de ratos: FO, ratos falso-operados (n=11); ME, ratos submetidos à morte encefálica (n=11); E2, ratos tratados com 17 $\beta$ -estradiol (n=10). Os valores representam a média $\pm$ EPM. \* $p=0,0003$ , \*\* $p=0,0001$  FO versus ME e E2.

Conforme ilustrado na Figura 2, houve um aumento significativo na concentração sérica do 17 $\beta$ -estradiol após a sua administração. Os valores basais do hormônio em ratos machos são 24,0 $\pm$ 6,1 pg/mL (média $\pm$ EPM). Os grupos submetidos à ME apresentaram redução acentuada na concentração

sérica de corticosterona. Os valores de referência para este hormônio são  $1356 \pm 196$  pg/mL (média $\pm$ EPM).



**Figura 2** - Concentrações séricas de 17β-estradiol e corticosterona em ratos FO, falso-operados; ME, submetidos à morte encefálica; E2, tratados com 17β-estradiol. Os valores representam a média $\pm$ EPM de 3 a 5 ratos/grupo. Kruskal Wallis seguido de teste de Dunn para múltiplas comparações.  $\phi p < 0,0255$  E2 versus ME; \* $p < 0,0393$  FO versus ME.

Pela análise da Tabela 1, verificou-se que ratos submetidos à ME apresentaram leucopenia com redução de linfócitos e monócitos e sem alteração do número de granulócitos. O tratamento com o hormônio 17β-estradiol corrigiu a leucopenia, com aumento da relação neutrófilo/linfócito. O

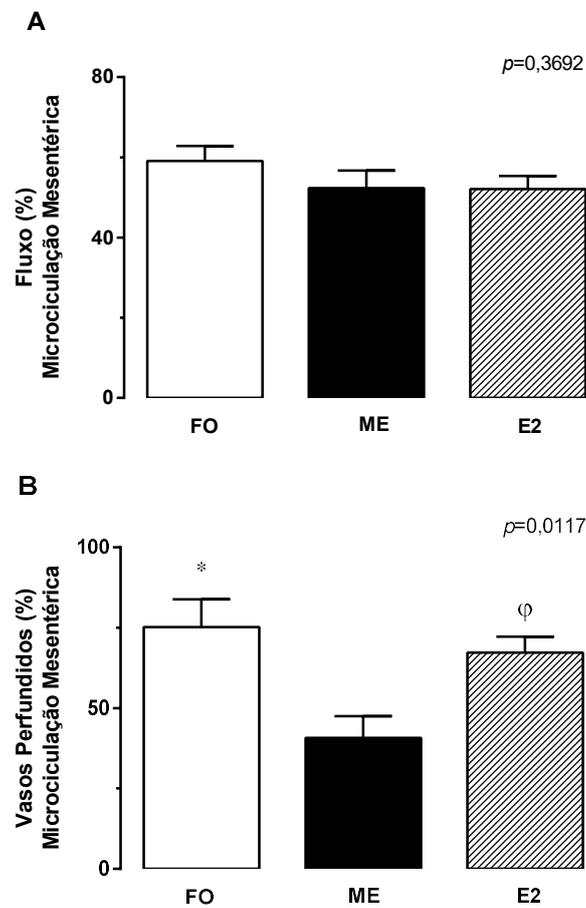
grupo FO exibiu leucocitose com neutrofilia, característico da resposta inflamatória decorrente da trepanação a que foi submetido.

**Tabela 1** - Contagens total e diferencial dos leucócitos circulantes

Grupos	n	Leucócitos/mm <sup>3</sup>			
		Total	Linfócitos	Granulócitos	Monócitos
<b>FO</b>	11				
Basal		13145±879	8145±597	4573±315	427±24
Final		24864±2075*	5491±612 <sup>†</sup>	18527±1653**	845±98 <sup>†</sup>
<b>ME</b>	07				
Basal		13343±802	8529±811	4357±362	457±53
Final		9071±1066 <sup>‡</sup>	3771±480 <sup>†</sup>	5014±594	286±40 <sup>‡</sup>
<b>E2</b>	10				
Basal		15690±803	10380±607	4820±337	490±48
Final		14950±2386	5190±568**	9400±1814 <sup>‡</sup>	360±67 <sup>‡</sup>

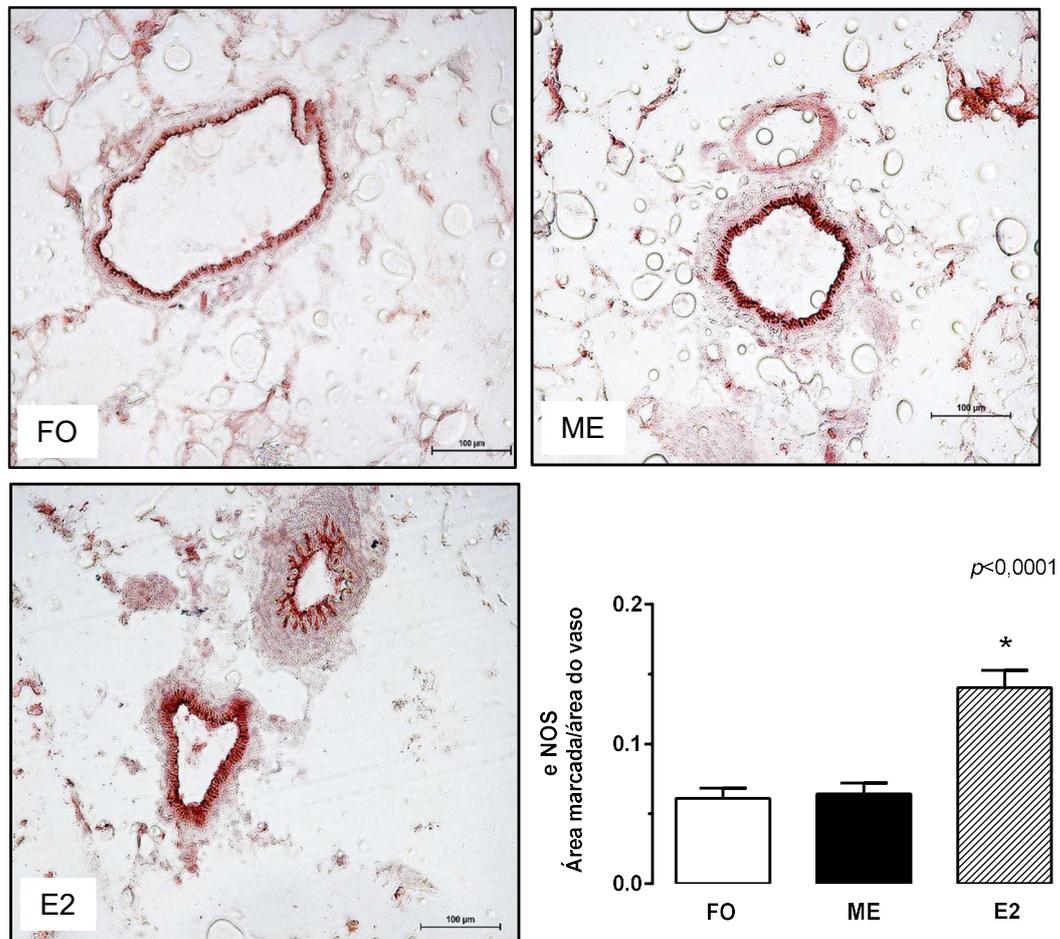
FO, ratos falso-operados; ME, ratos submetidos à morte encefálica; E2, ratos tratados com 17β-estradiol. Os valores representam a média±EPM. \*\* $p<0,0001$ , \* $p<0,001$ , <sup>†</sup> $p<0,01$ , <sup>‡</sup> $p<0,05$  versus valores basais em cada grupo.

Embora o fluxo sanguíneo não tenha variado entre os grupos, verificou-se uma redução no percentual de microvasos perfundidos no grupo ME comparado ao grupo FO. A administração do hormônio após a morte encefálica determinou uma melhora da perfusão. Os resultados encontram-se ilustrados na Figura 3.



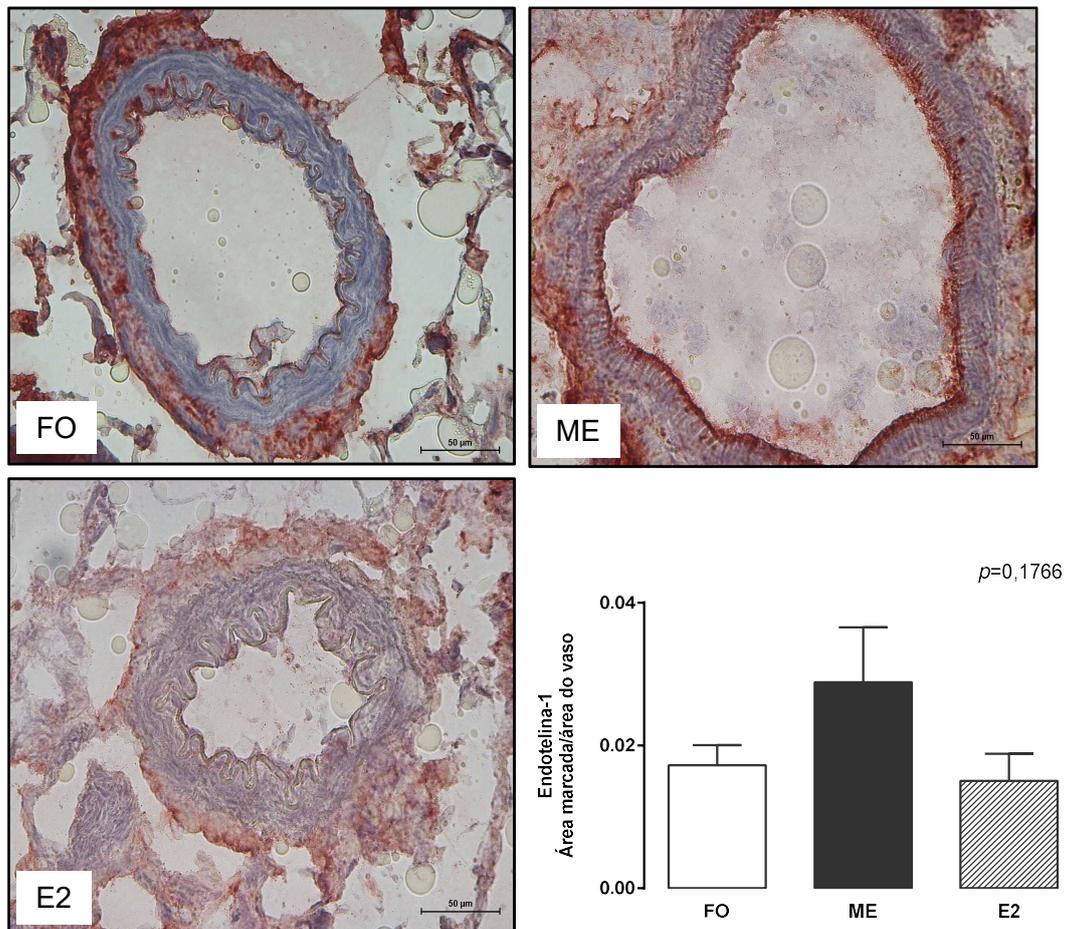
**Figura 3** - Determinação do fluxo sanguíneo (A) e da porcentagem de microvasos perfundidos na microcirculação mesentérica (B) de ratos falso operados (FO, n=5), ratos submetidos à morte encefálica (ME, n=5) e ratos tratados com 17 $\beta$ -estradiol (E2, n=5). Os valores representam a média $\pm$ EPM. ANOVA seguida de teste de Tukey para múltiplas comparações. \* $p=0,0093$  FO versus ME;  $\phi p=0,0404$  E2 versus ME.

Procedendo-se os ensaios de imunohistoquímica para a pesquisa da expressão da eNOS na microcirculação mesentérica, verificou-se que o tratamento dos ratos com o 17 $\beta$ -estradiol determinou aumento significativo da sua expressão. Fotomicrografias representativas encontram-se ilustradas na Figura 4.



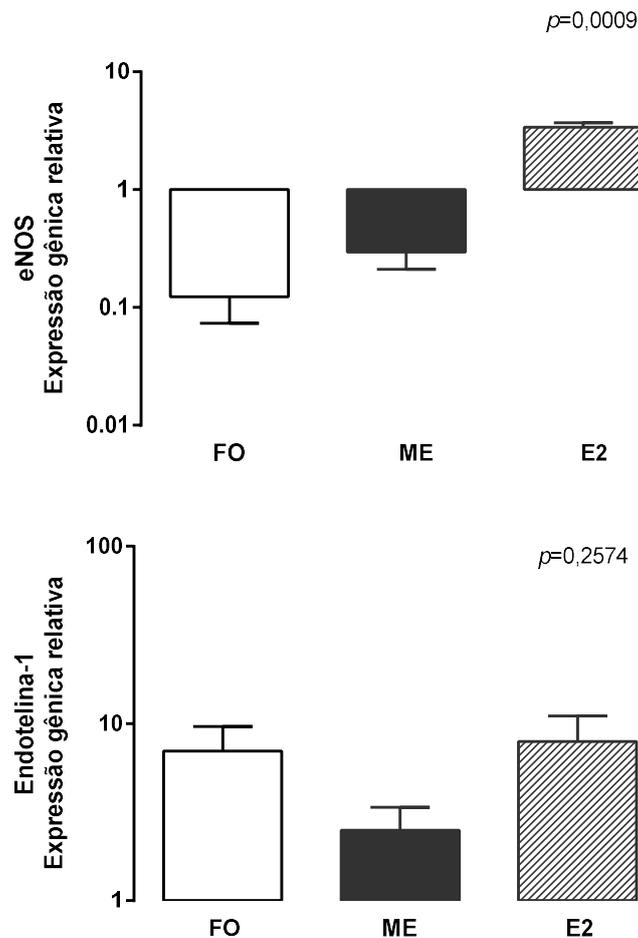
**Figura 4** - Fotomicrografias e quantificação da expressão proteica de eNOS nos microvasos do mesentério de ratos FO, falso-operados; ME, submetidos à morte encefálica; E2, tratados com  $17\beta$ -estradiol. Os valores representam a média $\pm$ EPM de 03 amostras/rato; 03 ratos/grupo. Kruskal-Wallis seguido de teste de Dunn para múltiplas comparações. \* $p < 0,0001$  E2 versus ME.

Em relação ao estudo da expressão da endotelina-1 na microcirculação mesentérica, observou-se que o tratamento com estradiol não influenciou a sua expressão. Fotomicrografias representativas encontram-se ilustradas na Figura 5.



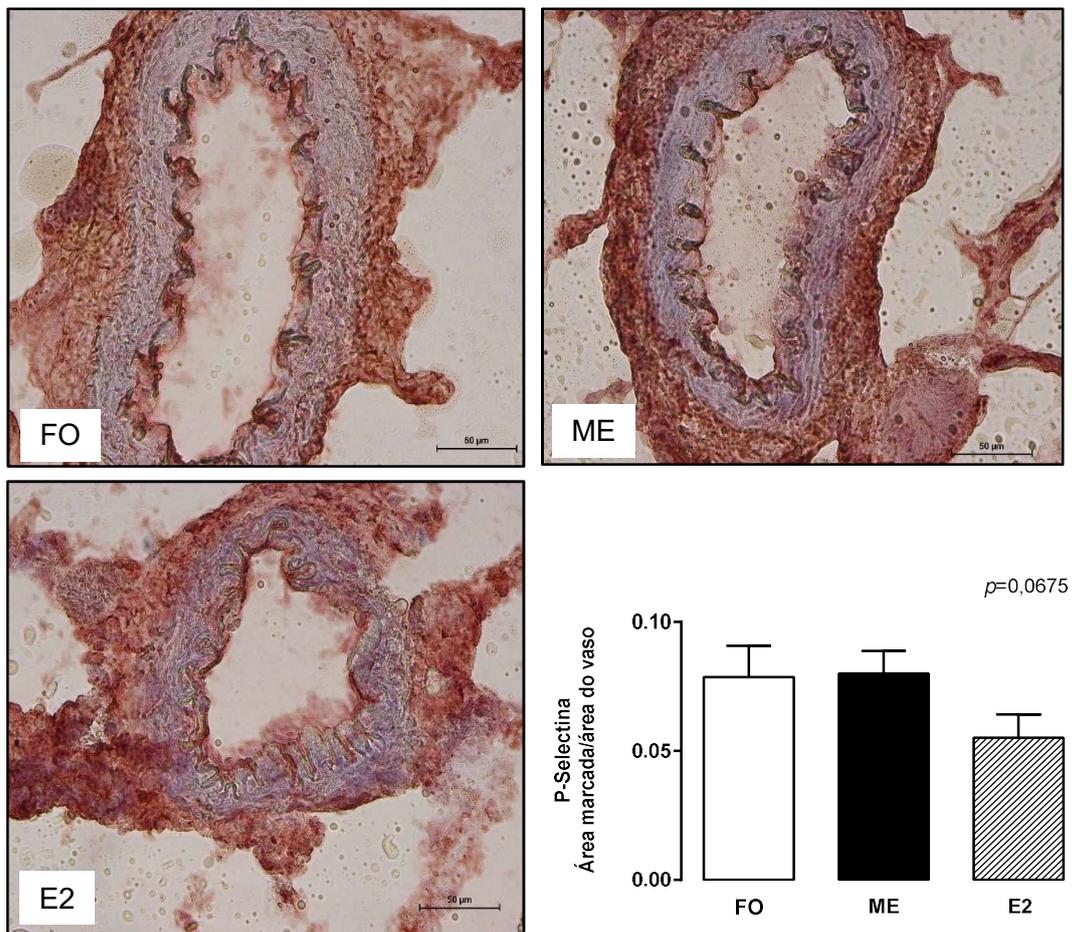
**Figura 5** - Fotomicrografias e quantificação da expressão proteica de endotelina-1 nos microvasos do mesentério de ratos FO, falso-operados; ME, submetidos à morte encefálica; E2, tratados com  $17\beta$ -estradiol. Os valores representam a média $\pm$ EPM de 03 amostras/rato; 04 ratos/grupo. Teste de Kruskal-Wallis.

Avaliando-se a expressão gênica da eNOS e endotelina-1 na microcirculação mesentérica, observou-se que o tratamento com estradiol determinou aumento da expressão da eNOS, sem interferir com a expressão de endotelina-1 (Fig.6).

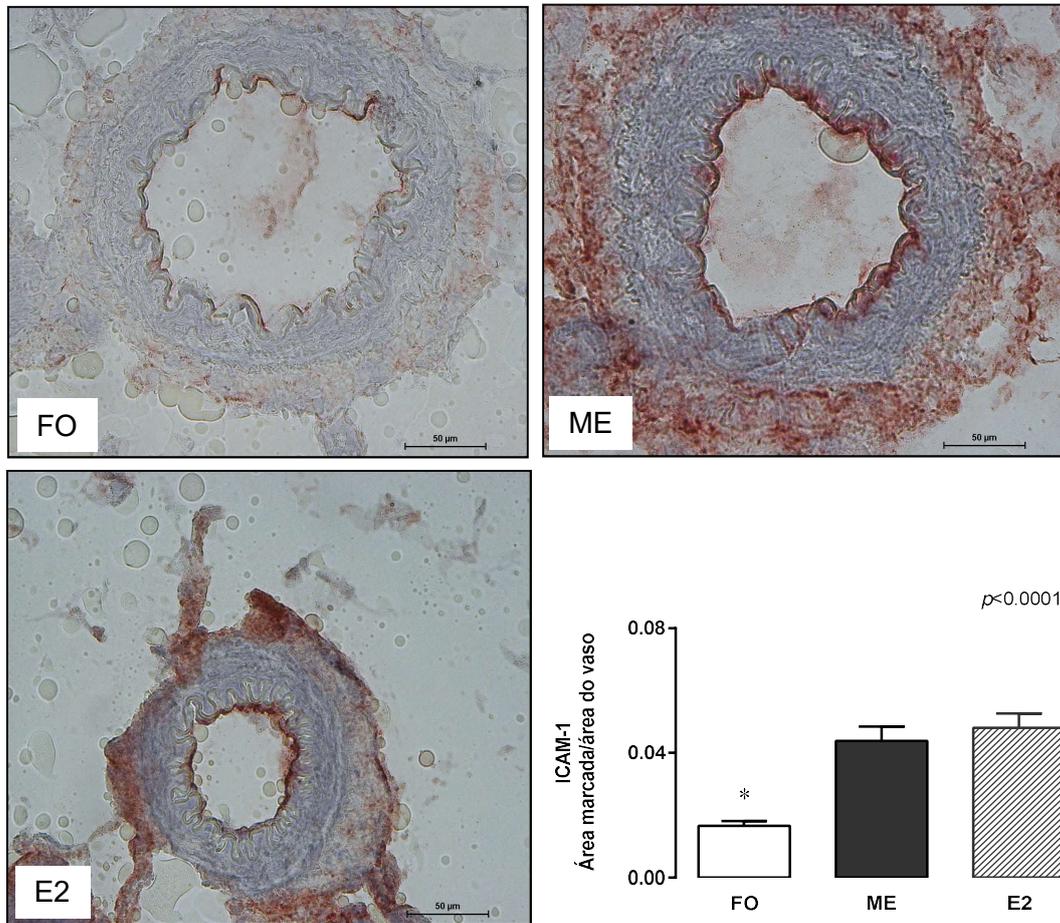


**Figura 6** - Quantificação da expressão gênica de eNOS e endotelina-1 no mesentério de: FO, ratos falso-operados; ME, ratos submetidos à morte encefálica; E2, ratos tratados com  $17\beta$ -estradiol. Os valores representam a média $\pm$ EPM de 03 amostras/rato; 05 ratos/grupo. Os dados da expressão gênica são relativos aos valores obtidos de ratos naïve. Teste de Kruskal Wallis.

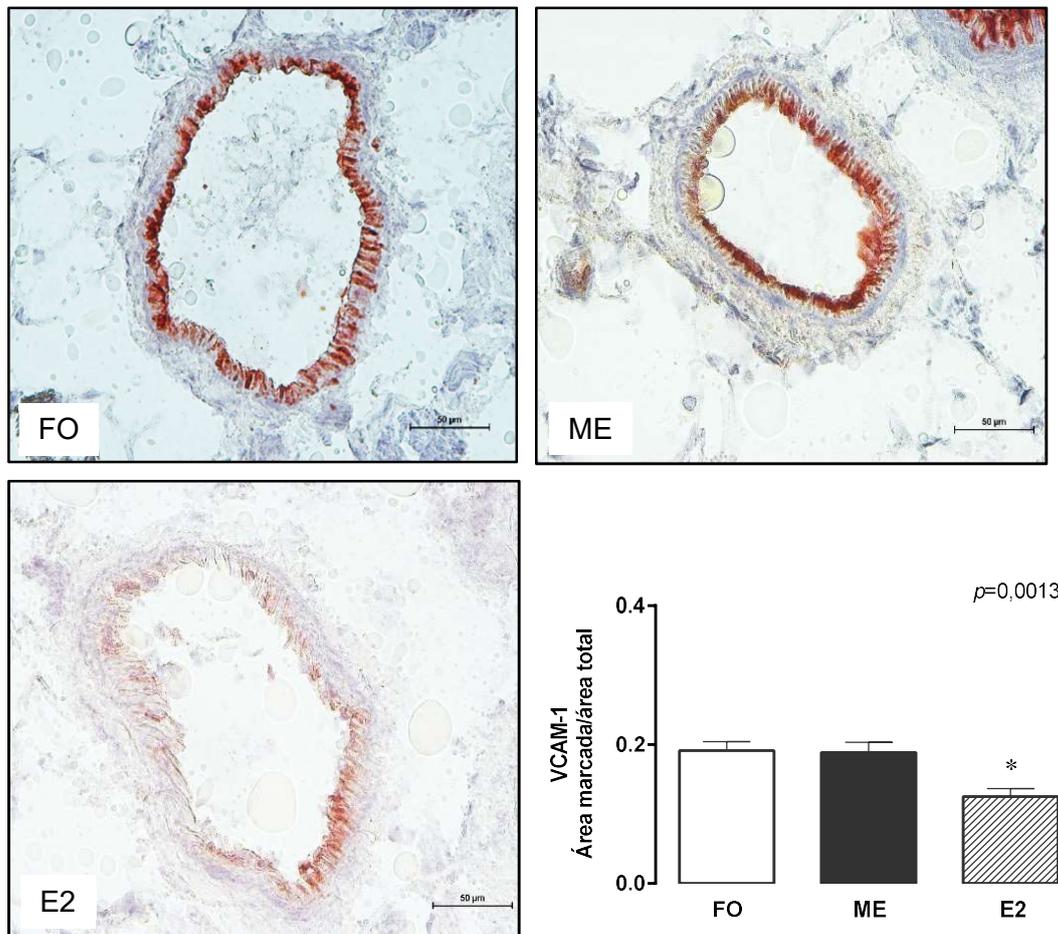
Com o propósito de investigar a ativação do endotélio, procedeu-se à análise da P-selectina, ICAM-1 e VCAM-1. Com relação à expressão de P-selectina não houve diferenças significativas entre os grupos (Fig. 7). Houve aumento significativo da expressão de ICAM-1 no grupo ME comparado ao FO (Fig. 8) e redução da expressão de VCAM-1 após o tratamento com o  $17\beta$ -estradiol (Fig. 9).



**Figura 7** - Fotomicrografias e quantificação da expressão proteica de P-selectina nos microvasos do mesentério de ratos FO, falso-operados; ME, submetidos à morte encefálica; E2, tratados com 17β-estradiol. Os valores representam a média±EPM de 03 amostras/rato; 04 ratos/grupo. Teste de Kruskal-Wallis.

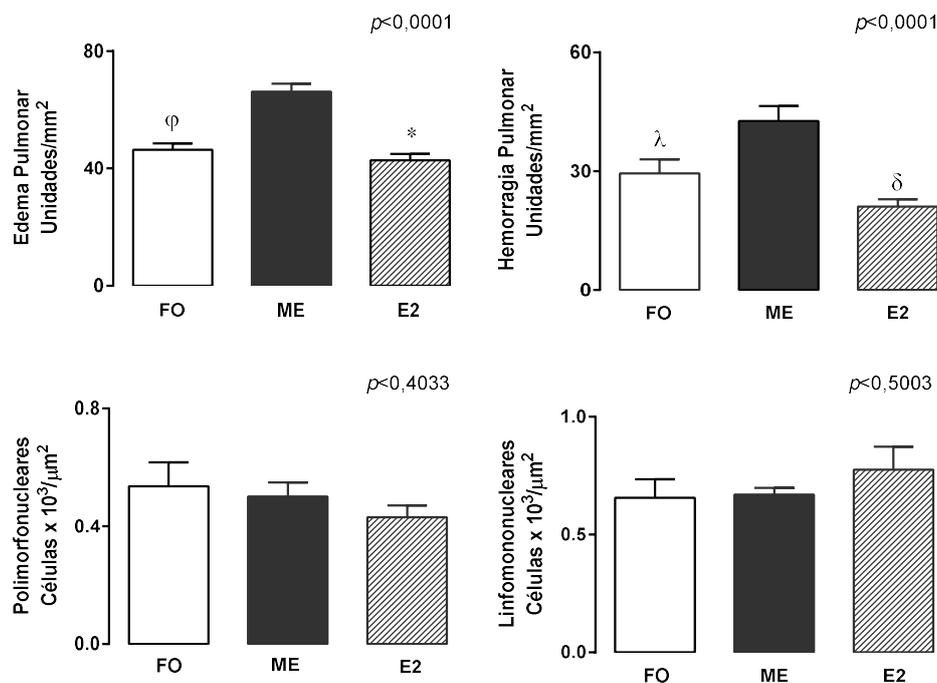


**Figura 8** - Fotomicrografias e quantificação da expressão proteica de ICAM-1 nos microvasos do mesentério de ratos FO, falso operados; ME, submetidos à morte encefálica; E2, tratados com  $17\beta$ -estradiol. Os valores representam a média $\pm$ EPM de 03 amostras/rato e 04 ratos/grupo. Kruskal-Wallis seguido de teste de Dunn para múltiplas comparações. \*  $p=0,0002$  FO versus ME.

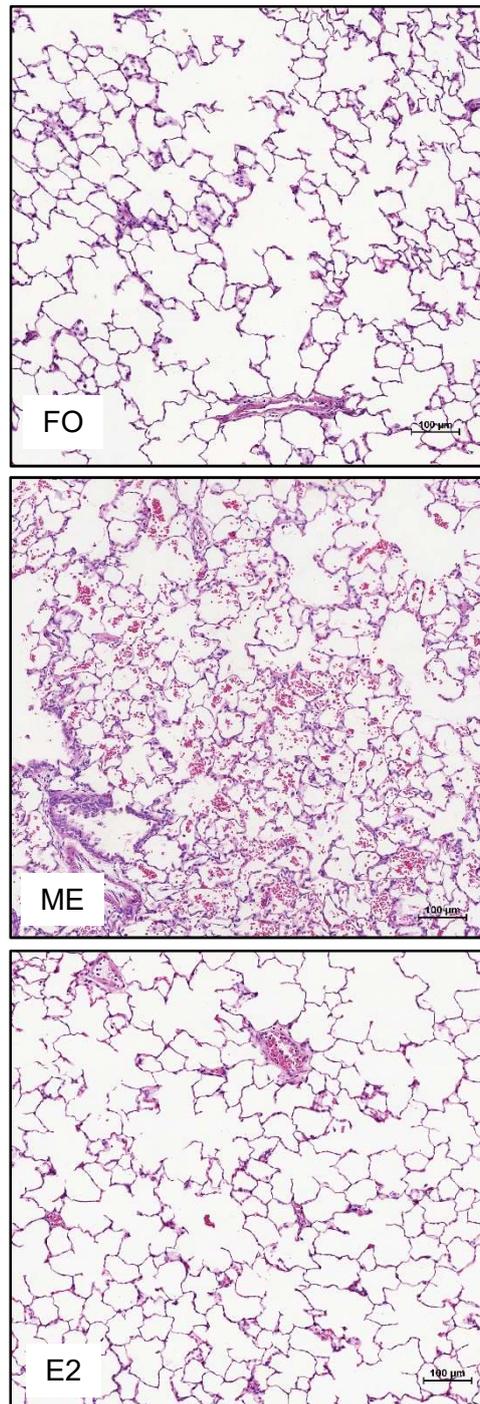


**Figura 9** - Fotomicrografias e quantificação da expressão proteica de VCAM-1 nos microvasos do mesentério de ratos FO, falso operados; ME, submetidos à morte encefálica; E2, tratados com  $17\beta$ -estradiol. Os valores representam a média $\pm$ EPM de 03 amostras/rato e 04 ratos/grupo. Kruskal-Wallis seguido de teste de Dunn para múltiplas comparações. \* $p=0,0034$  E2 versus ME.

Considerando-se o acometimento pulmonar associado à ME, procedeu-se a análise histológica do parênquima pulmonar. Conforme demonstrado na Figura 10, observou-se maior edema e hemorragia nos pulmões oriundos de ratos submetidos à ME. O tratamento com o 17 $\beta$ -estradiol reverteu as alterações descritas. Em relação ao infiltrado inflamatório, não houve diferença entre os grupos. Fotomicrografias representativas encontram-se ilustradas na Figura 11.

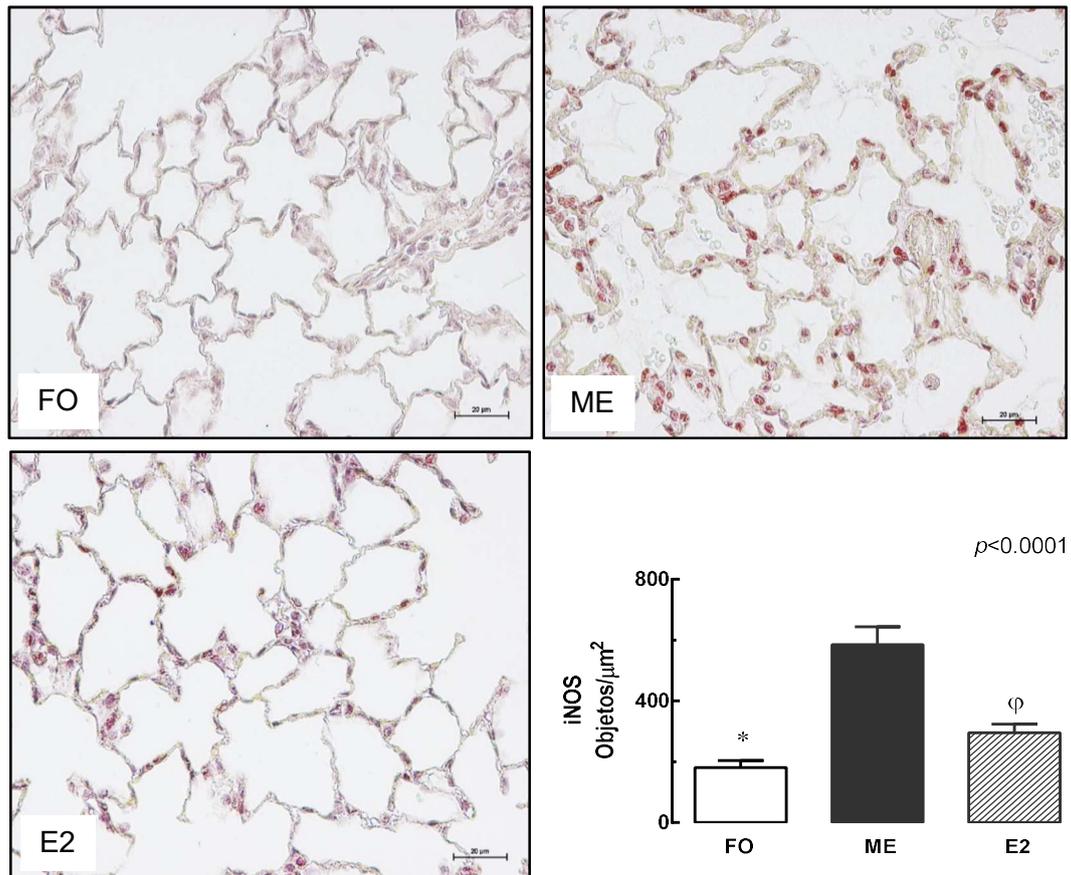


**Figura 10** - Análise histomorfométrica do edema, hemorragia e infiltrado inflamatório pulmonar. Ratos falso-operados (FO), submetidos à morte encefálica (ME) e tratados com 17 $\beta$ -estradiol (E2). Os valores representam a média $\pm$ EPM de 05 amostras/rato e 06 ratos/grupo. ANOVA seguida de teste de Dunnett para múltiplas comparações.  $\phi$ p < 0,0001 e  $\lambda$ p = 0,0077 FO versus ME; \*p < 0,0001 e  $\delta$ p < 0,0001 E2 versus ME.



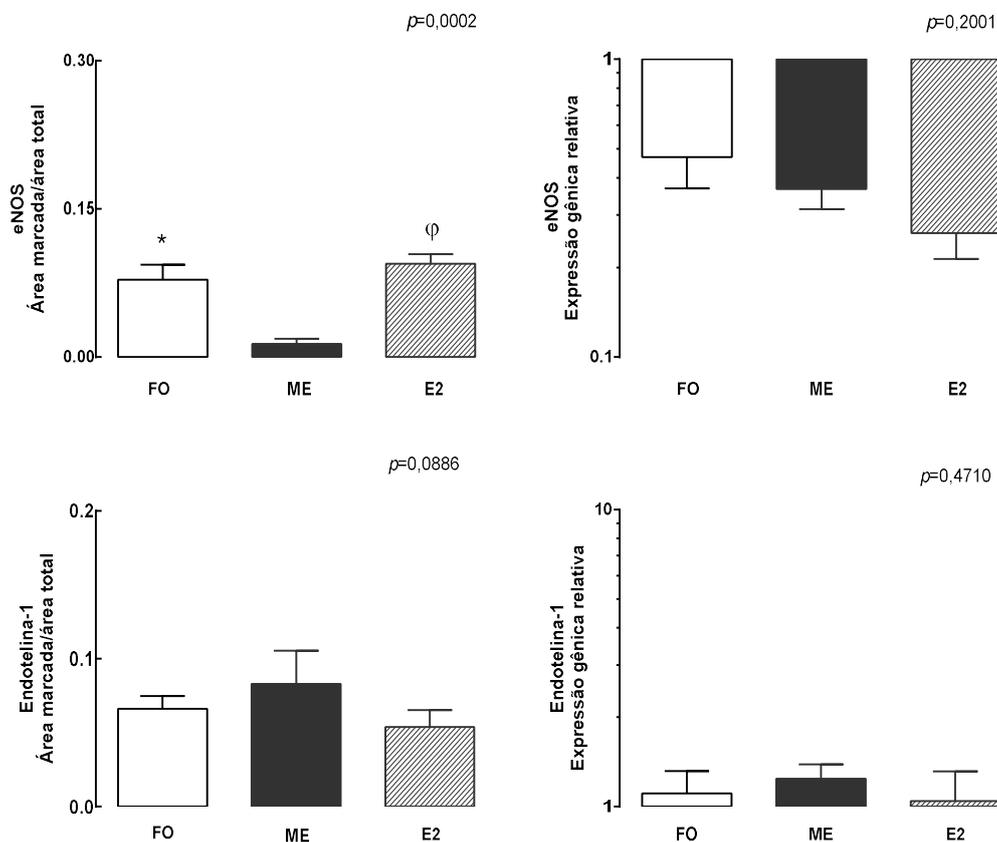
**Figura 11** - Fotomicrografias representativas do parênquima pulmonar de ratos falso-operado (FO), submetido à morte encefálica (ME) e tratado com 17 $\beta$ -estradiol (E2). Aumento final de 200x.

Procedendo-se a análise da expressão proteica da iNOS no parênquima pulmonar verificou-se maior expressão da enzima no grupo ME em relação ao grupo FO. O tratamento dos animais com o hormônio determinou redução significativa da expressão da iNOS (Fig. 12).



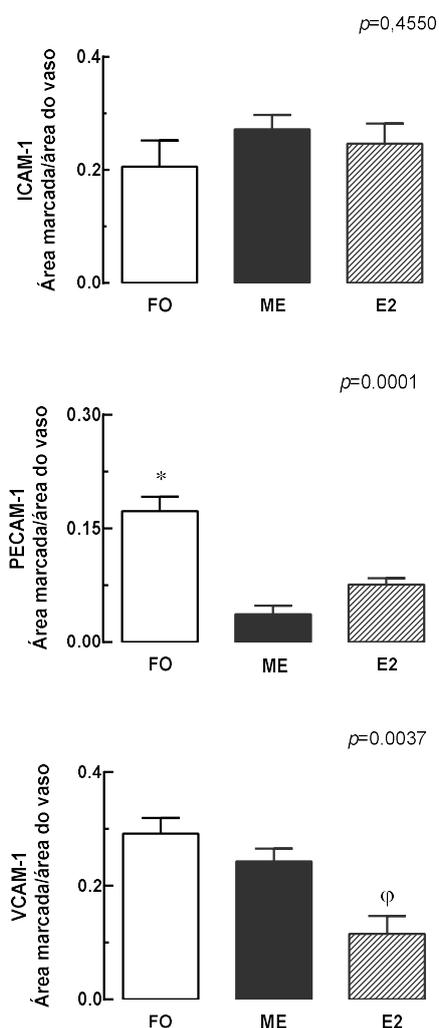
**Figura 12** - Fotomicrografias e quantificação da expressão proteica de iNOS no parênquima pulmonar de ratos FO, falso operados; ME, submetidos à morte encefálica; E2, tratados com  $17\beta$ -estradiol. Os valores representam a média $\pm$ EPM de 01 amostra/rato e 05 ratos/grupo. Kruskal-Wallis seguido de teste de Dunn para múltiplas comparações. \* $p < 0,0001$  FO versus ME e  $\phi p = 0,0035$  E2 versus ME.

Com o propósito de investigar a participação da eNOS e endotelina-1 no pulmão, procedeu-se a pesquisa da expressão proteica e gênica destas moléculas. Verificou-se redução significativa da expressão proteica da eNOS no grupo ME comparado ao FO. Esta situação foi revertida pelo tratamento com o 17 $\beta$ -estradiol (Fig. 13). A expressão proteica da endotelina-1 não variou entre os grupos. Não houve diferenças significativas entre os grupos quanto à expressão gênica destas moléculas (Fig. 13).



**Figura 13** - Quantificação das expressões proteica e gênica de eNOS e endotelina-1 no pulmão. Ratos falso-operados (FO), submetidos à morte encefálica (ME) e ratos tratados com 17 $\beta$ -estradiol (E2). Os valores representam a média $\pm$ EPM para 02 amostras/rato, 05 ratos/grupo (imunohistoquímica) e 5 a 6 ratos/grupo (RT-PCR). Os dados da expressão gênica são relativos aos valores obtidos de ratos naïve. Teste de Kruskal Wallis seguido de teste de Dunn para múltiplas comparações. \* $p=0,0055$  FO versus ME e  $\phi p=0,0003$  E2 versus ME.

Na sequência, pesquisou-se a expressão proteica de ICAM-1, PECAM-1 e VCAM-1 no pulmão. Conforme ilustrado na Figura 14, não houve diferenças significativas entre os grupos com relação à expressão de ICAM-1. Observou-se redução na expressão de PECAM-1 pulmonar no grupo ME comparado ao FO. A expressão de VCAM-1 reduziu-se no grupo tratado com 17 $\beta$ -estradiol.



**Figura 14** - Quantificação da expressão proteica de ICAM-1, PECAM-1 e VCAM-1 no pulmão de ratos FO, falso operados; ME, submetidos à morte encefálica; E2, tratados com 17 $\beta$ -estradiol. Os valores representam a média $\pm$ EPM de 02 amostras/rato e 05 ratos/grupo. Kruskal-Wallis seguido de teste de Dunn para múltiplas comparações. \* $p<0,0001$  FO versus ME; <sup>φ</sup> $p=0,0482$  E2 versus ME.

Avaliando-se a participação de citocinas e quimiocinas no curso do processo inflamatório pulmonar, observou-se um aumento na concentração de IL-10 no grupo ME em relação ao grupo FO. Ainda, em relação ao grupo ME, não houve diferenças significativas nas concentrações de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , CINC-1 e VEGF (Tabela 2).

**Tabela 2** - Dosagem de citocinas no pulmão

	FO	ME	E2	P
<b>TNF-<math>\alpha</math></b> (pg/mL)	378,1 $\pm$ 89,62	565,1 $\pm$ 93,85	264,2 $\pm$ 85,02	0,1373
<b>IL-1<math>\beta</math></b> (pg/mL)	5892 $\pm$ 993,2	7711 $\pm$ 506,7	6359 $\pm$ 1417	0,3928
<b>IL-10</b> (pg/mL)	158,5 $\pm$ 23,23*	420,1 $\pm$ 73,81	205,8 $\pm$ 57,89	0,0168
<b>VEGF</b> (pg/mL)	1836 $\pm$ 433,4	856,5 $\pm$ 212	1409 $\pm$ 367	0,1279
<b>CINC-1</b> (pg/mL)	1860 $\pm$ 162,5	1417 $\pm$ 99,60	1200 $\pm$ 165,8	0,0136

Ratos falso-operados (FO); ratos submetidos à morte encefálica (ME) e ratos tratados com 17 $\beta$ -estradiol (E2). TNF- $\alpha$ , fator de necrose tumoral; IL, interleucina; VEGF, fator de crescimento do endotélio vascular; CINC-1, quimiocina para neutrófilo induzida por citocina. Os valores representam a média $\pm$ EPM de 4 a 6 ratos/grupo. Kruskal Wallis seguido de teste de Dunn para múltiplas comparações. \* $p=0,0217$  FO *versus* ME.

Procedendo-se a dosagem de mediadores inflamatórios sistêmicos, observou-se aumento das concentrações de TNF- $\alpha$  e MIP-1 $\alpha$  e redução na concentração de VEGF no grupo ME em comparação ao grupo FO. Com relação ao tratamento dos animais com 17 $\beta$ -estradiol, verificou-se redução de

CINC-1 e aumento de MCP-1 comparado ao grupo ME. Avaliando-se a participação de IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10 observou-se significância estatística apenas com relação à IL-10 (Tabela 3).

**Tabela 3** - Dosagem de citocinas séricas

	FO	ME	E2	P
<b>TNF-<math>\alpha</math></b> (pg/mL)	1,63 $\pm$ 0,35*	18,22 $\pm$ 3,23	9,63 $\pm$ 5,66	0,0004
<b>IL-1<math>\beta</math></b> (pg/mL)	1,74 $\pm$ 0,69	1,14 $\pm$ 0,43	3,62 $\pm$ 1,36	0,2400
<b>IL-10</b> (pg/mL)	73,18 $\pm$ 19,31	219,2 $\pm$ 61,68	73,28 $\pm$ 29,29	0,0431
<b>IL-6</b> (pg/mL)	595,4 $\pm$ 179,6	1541 $\pm$ 572,2	475,5 $\pm$ 121,2	0,2109
<b>VEGF</b> (pg/mL)	51,29 $\pm$ 17,94 $\phi$	7,38 $\pm$ 3,1	22,68 $\pm$ 13,07	0,0380
<b>MIP-1<math>\alpha</math></b> (pg/mL)	103,9 $\pm$ 24,21 $\phi$	297,7 $\pm$ 45,46	183,9 $\pm$ 54,75	0,0532
<b>MCP-1</b> (pg/mL)	846,4 $\pm$ 71,28	1141 $\pm$ 317,2	2774 $\pm$ 666,5 $\psi$	0,0094
<b>CINC-1</b> (pg/mL)	452,8 $\pm$ 95,65	542,6 $\pm$ 239,5	39,40 $\pm$ 6,26 $\dagger$	0,0020

Ratos falso-operados (FO); ratos submetidos à morte encefálica (ME) e ratos tratados com 17 $\beta$ -estradiol (E2). TNF- $\alpha$ , fator de necrose tumoral; IL, interleucina; VEGF, fator de crescimento do endotélio vascular; MIP-1 $\alpha$ , proteína inflamatória de macrófago; MCP-1, proteína quimiotática de macrófago; CINC-1, quimiocina para neutrófilo induzida por citocina. Os valores representam a média $\pm$ EPM. Teste de Kruskal Wallis seguido de Teste de Dunn para múltiplas comparações. \* $p=0,0029$ ,  $\phi p=0,0285$ ,  $\psi p=0,0386$  FO versus ME e  $\psi p=0,0429$ ,  $\dagger p=0,0157$  E2 versus ME.

## **5. Discussão**

---

Os dados apresentados sugerem que o tratamento com 17 $\beta$ -estradiol restaura a perfusão na microcirculação mesentérica e reduz a lesão pulmonar induzidas pela morte encefálica em ratos machos.

O comportamento hemodinâmico, caracterizado por pico hipertensivo seguido de período hipotensivo, é semelhante ao observado em estudos experimentais que utilizam o modelo de indução rápida de morte encefálica, em diferentes espécies animais (Barklin et al., 2008; Simas et al., 2012a; Wauters et al., 2013; Zhou et al., 2013).

No presente estudo, verificou-se que os ratos em morte encefálica apresentaram hipoperfusão persistente da microcirculação mesentérica, mesmo após a normalização da pressão arterial. O mesmo fenômeno foi descrito na microcirculação sublingual e conjuntiva de pacientes em morte encefálica (Tamosuitis et al., 2016) e em modelos experimentais, incluindo a observação da microcirculação hepática, pancreática e mesentérica de ratos (Okamoto et al., 1999; Obermaier et al., 2004; Simas et al., 2012a).

O tratamento com 17 $\beta$ -estradiol restaurou a perfusão na microcirculação mesentérica sem modificar o fluxo sanguíneo local. Este resultado difere de estudo anterior em modelo de isquemia aórtica, no qual o estradiol aumenta o fluxo, mas não interfere com a perfusão na microcirculação mesentérica (Rocha de Sousa et al., 2017). Em contraste, Kuebler et al. (2002) observaram aumento da perfusão intestinal, hepática e adrenal após o uso de 17 $\beta$ -estradiol em modelo de trauma-hemorragia e sepse. Provavelmente, diferentes modelos, técnicas e leitos microvasculares investigados sejam os elementos responsáveis pelas diferenças registradas, embora prevaleça o efeito benéfico do hormônio sobre a microcirculação.

Considerando que a hipoperfusão mesentérica persistente, induzida pela morte encefálica, não é influenciada pela inibição da tempestade autonômica (Simas et al., 2015a), investigou-se a participação de eNOS e endotelina-1 nos microvasos mesentéricos. Conforme demonstrado no presente estudo, não houve alteração na expressão proteica e gênica de eNOS e de endotelina-1 nos ratos submetidos à morte encefálica. Todavia, Oczkowicz et al. (2014) relatam maior expressão de eNOS e endotelina-1 em biópsias renais de suínos em morte encefálica. Deve-se considerar, entretanto, a participação de outras substâncias vasoativas, como prostaciclina e tromboxano por exemplo, na regulação da perfusão microvascular.

Na tentativa de investigar os mecanismos subjacentes aos efeitos do  $17\beta$ -estradiol na microcirculação mesentérica, avaliou-se a influência do hormônio sobre a expressão proteica da eNOS e da endotelina-1. O tratamento com  $17\beta$ -estradiol promoveu aumento da expressão da eNOS sem alterar a expressão da endotelina-1, restaurando a perfusão no mesentério. De fato, este efeito protetor do estrogênio é descrito em modelos de lesão de isquemia e reperfusão, através de sua ação na expressão e atividade da eNOS, responsável pelo aumento da produção de NO (Vacca et al., 1999; Breithaupt-Faloppa et al., 2013; Rocha de Sousa et al., 2017).

A redução na expressão de substâncias vasoconstritoras poderia, também, contribuir para a restauração da perfusão associada ao  $17\beta$ -estradiol. Estudos clínicos e experimentais demonstram que este hormônio está envolvido com a redução da síntese e dos efeitos da endotelina-1 (Akishita et al., 1998; Lee et al., 2002; Ho et al., 2015). Entretanto, neste estudo, o  $17\beta$ -estradiol não interferiu com a expressão proteica da endotelina-1.

Estudo recente do nosso grupo (Simas et al., 2015b) demonstrou, por técnica de microscopia intravital (epi-iluminação), redução da perfusão na microcirculação pulmonar, 3 horas após a indução da morte encefálica em ratos machos. No presente estudo, observou-se redução significativa da expressão proteica de eNOS, sem alteração da endotelina-1, no pulmão de animais submetidos à morte encefálica. Estudos experimentais apontam, de modo semelhante, o comprometimento da eNOS pulmonar após lesão de isquemia/reperfusão no pulmão (Dolkart et al., 2014) e no fígado (Lin et al., 2006). Além do mais, em estudo realizado em pulmões, impróprios para transplante e submetidos à perfusão *ex vivo*, evidenciou-se associação entre o aumento precoce da eNOS e a melhora da função pulmonar (George et al., 2013).

No presente estudo, o tratamento dos animais com o hormônio 17 $\beta$ -estradiol restaurou, por completo, a expressão da eNOS sem modificar a expressão da endotelina-1 pulmonar. De modo semelhante, Kan et al. (2008) relatam que o estradiol reduz a lesão pulmonar pelo aumento da expressão da eNOS em modelo de choque hemorrágico. O mesmo foi observado no pulmão de ratas ovariectomizadas e tratadas com 17 $\beta$ -estradiol em modelo de isquemia/reperfusão intestinal (Breithaupt-Faloppa et al., 2013).

Na prática clínica, a lesão pulmonar associada à morte encefálica é responsável pela baixa utilização deste órgão, sendo que menos de 20% são considerados adequados para transplante (Van Raemdonck et al., 2009). Os dados, apresentados neste estudo, demonstraram comprometimento acentuado do parênquima pulmonar no grupo submetido à morte encefálica, evidenciado pela presença de edema intersticial e hemorragia, embora sem

alterações significativas quanto ao número de células polimorfonucleares e linfomononucleares no tecido pulmonar. Estes achados estão de acordo com estudos experimentais que relatam congestão vascular, edema alveolar, aumento da permeabilidade capilar pulmonar e hemorragia intra-alveolar (Rostron et al., 2008; Simas et al., 2012b; Wauters et al., 2013; Zhou et al., 2013), alterações vasculares precoces da lesão inflamatória pulmonar. Neste contexto, macrófagos residentes e neutrófilos migrados para o pulmão, quando ativados, passam a expressar a sintase induzível do óxido nítrico (Förstermann e Sessa, 2012).

Investigando-se a expressão de iNOS no parênquima pulmonar, constatou-se aumento expressivo desta enzima nos ratos em morte encefálica, a semelhança do que se observa em modelos de trauma/hemorragia e isquemia/reperfusão (Lin et al., 2006; Yu et al., 2006). Além do mais, o aumento da iNOS no parênquima pulmonar associado à morte encefálica indica que a inflamação está em curso, embora não se observe, ainda, diferença significativa em relação ao infiltrado inflamatório pulmonar.

O tratamento com o hormônio  $17\beta$ -estradiol foi efetivo em restringir a evolução do edema e hemorragia pulmonar após a morte encefálica em ratos machos. Além disso, reduziu-se a expressão de iNOS no parênquima pulmonar sob o efeito do hormônio. Este achado está em consonância com estudo anterior que associa o  $17\beta$ -estradiol à redução da expressão de iNOS pulmonar em modelo de trauma/hemorragia (Yu et al., 2006). De fato, o estradiol exibe efeito protetor pulmonar em modelos de trauma/hemorragia e de isquemia/reperfusão (Yu et al., 2006; Hamidi et al., 2011; Hsu et al., 2013; Breithaupt-Faloppa et al., 2014).

A disfunção da microcirculação associada à morte encefálica deflagra a ativação endotelial resultante, em grande parte, da queda acentuada da concentração sérica de corticosterona, desencadeando a inflamação sistêmica (Barklin, 2009; Floerchinger et al., 2012; Simas et al. 2012a; Ritschl et al., 2016). A liberação de citocinas, quimiocinas e a expressão diferenciada de moléculas de adesão endoteliais, determinam o recrutamento de neutrófilos, linfócitos e monócitos para os tecidos ampliando, desta forma, a inflamação nos diferentes órgãos (Cypel et al., 2011). De fato, no presente estudo verificou-se aumento da expressão de ICAM-1 no mesentério e redução da PECAM-1 no pulmão de ratos submetidos à morte encefálica. Não houve, entretanto, alteração significativa nos níveis de P-selectina (mesentério), ICAM-1 (pulmão) e VCAM-1 (mesentério e pulmão). Em estudo anterior, Simas et al. (2012a) demonstraram aumento da expressão de ICAM-1 na microcirculação mesentérica de ratos em morte encefálica. Zweers et al. (2004) observaram que a morte encefálica está associada ao aumento da expressão de VCAM-1 no pulmão, sem alteração da expressão de ICAM-1 pulmonar. Além disso, evidência clínica sugere que a expressão de ambas moléculas, ICAM-1 e VCAM-1, relaciona-se a pior prognóstico no transplante renal (Nijboer et al., 2005).

Considerando que a inflamação sistêmica deflagrada pela morte encefálica em ratos machos está associada, de modo paradoxal, à leucopenia persistente (Simas et al., 2012a) e que a redução da atividade da medula óssea não está relacionada a alterações na expressão de moléculas de adesão granulocíticas (Menegat et al., 2017), sugere-se que a inflamação sistêmica e

progressiva observada em doadores em morte encefálica depende, essencialmente, da ativação da célula endotelial.

Conforme demonstrado, o  $17\beta$ -estradiol reduziu a expressão de VCAM-1 no mesentério e pulmão, sem modificar a expressão das demais moléculas investigadas. Em modelo de isquemia intestinal verificou-se que o  $17\beta$ -estradiol reduz a expressão de ICAM-1 e VCAM-1 pulmonar (Breithaupt-Faloppa et al., 2014). Rocha de Sousa et al. (2017) demonstraram que o hormônio reduz a expressão de ICAM-1 e P-selectina no mesentério de ratos em modelo de oclusão aórtica. Em cultura de células endoteliais oriundas de aorta humana Hou e Pei (2015) relataram menor expressão de ICAM-1 e VCAM-1 sob efeito do  $17\beta$ -estradiol, sendo este efeito mais proeminente sobre a molécula VCAM-1. Portanto, atuando a nível da microcirculação o hormônio  $17\beta$ -estradiol reduz, de um modo geral, a ativação endotelial associada à morte encefálica.

Evidências clínicas e experimentais demonstram aumento das concentrações séricas de citocinas e a presença de infiltrado inflamatório em diferentes órgãos na vigência da morte encefálica (Zweers et al., 2004; Stoica et al., 2005; Skrabal et al., 2005; Avlonitis et al., 2005; Carpenter et al., 2017). Estudos conduzidos em modelo de morte encefálica relatam elevação sérica de IL- $1\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e CINC-1 (Skrabal et al., 2005; Rostron et al., 2008). Neste estudo, verificou-se aumento de TNF- $\alpha$  e MIP-1 $\alpha$  e redução de VEGF no soro com aumento de IL-10 no pulmão de ratos em morte encefálica.

O tratamento dos animais com  $17\beta$ -estradiol promoveu aumento de MCP-1 e redução de CINC-1 séricos. Em adição, observou-se no pulmão alteração significativa da concentração de CINC-1 sob influência do hormônio. Estudos prévios demonstram que o hormônio  $17\beta$ -estradiol reduz a

concentração da quimiocina CINC-1 em modelos experimentais de pancreatite (Yang et al., 2011) e de isquemia-reperfusão (Shimizu et al., 2008; Breithaupt-Faloppa et al., 2014; Ricardo-da-Silva et al., 2017).

Conforme demonstrado, a dose de  $17\beta$ -estradiol (280  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) atingiu concentração sérica efetiva. A definição da dose baseou-se em resultados de estudos prévios, com ratos machos, em modelos de isquemia/reperfusão e oclusão aórtica (Breithaupt-Faloppa et al., 2014; Rocha de Sousa et al., 2017), apesar da ampla variação de doses descritas na literatura (Kuebler et al., 2002; Doucet et al., 2010; Sharawy et al., 2011).

Ao se considerar os efeitos do hormônio  $17\beta$ -estradiol sobre as alterações decorrentes da morte encefálica, restaurando a perfusão mesentérica e reduzindo a inflamação pulmonar, sugere-se que a ação benéfica do estradiol reside na modulação das sintases do óxido nítrico, eNOS e iNOS. De fato, o hormônio aumenta a expressão proteica e gênica da eNOS na microcirculação mesentérica e a expressão proteica da eNOS na microcirculação pulmonar, favorecendo a perfusão tecidual. Ao mesmo tempo, a expressão de iNOS no parênquima pulmonar reduz-se sob a influência do  $17\beta$ -estradiol, reduzindo a lesão pulmonar.

Considerando os resultados obtidos, sugere-se que os efeitos vasculares do  $17\beta$ -estradiol sobre a microcirculação mesentérica e pulmonar envolvem vias de sinalização rápida, decorrentes da ativação de receptores do hormônio localizados na membrana plasmática da célula endotelial (Menazza e Murphy, 2016), embora o hormônio tenha promovido aumento incipiente da expressão gênica de eNOS no mesentério.

Em suma, os efeitos vasculares protetores e as propriedades anti-inflamatórias do  $17\beta$ -estradiol, demonstrados neste estudo, sugerem que o hormônio pode ser considerado terapia promissora na manutenção da função orgânica do doador de órgãos.

## **6. Conclusões**

---

Com base nos resultados obtidos, é possível concluir que a administração de  $17\beta$ -estradiol a ratos machos, em morte encefálica:

- Restaurou a perfusão na microcirculação mesentérica;
- Restringiu o edema e a hemorragia pulmonar;
- Reduziu a expressão de iNOS no pulmão;
- Aumentou a expressão proteica de eNOS na microcirculação mesentérica e pulmonar, sem alterar a expressão proteica de endotelina-1;
- Aumentou a expressão gênica de eNOS no mesentério, sem alterar a expressão gênica de endotelina-1;
- Reduziu a expressão de VCAM-1 no mesentério e pulmão;
- Aumentou as concentrações séricas de MCP-1 e reduziu CINC-1 no soro e pulmão.

## **7. Referências**

---

Akishita M, Kozaki K, Eto M, Yoshizumi M, Ishikawa M, Toba K, Orimo H, Ouchi Y. Estrogen attenuates endothelin-1 production by bovine endothelial cells via estrogen receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;251(1):17-21.

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

Avlonitis VS, Wigfield CH, Kirby JA, Dark JH. The hemodynamic mechanism of lung injury and systemic inflammatory response following brain death in the transplant donor. *Am J Transplant*. 2005;5:684-93.

Barklin A, Larsson A, Vestergaard C, Kjaergaard A, Wogensen L, Schmitz O, Tonnesen E. Insulin alters cytokine content in two pivotal organs after brain death: a porcine model. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2008;52:628-34.

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

Belhaj A, Dewachter L, Rorive S, Remmelink M, Weynand B, Melot C, Hupkens E, Dewachter C, Creteur J, Mc Entee J, Naeije R, Rondelet B. Mechanical versus humoral determinants of brain death-induced lung injury. *Plos one*. 2017;12(7):1-22.

Breithaupt-Faloppa A, Fantozzi E, Assis-Ramos M, Vitoretti L, Couto G, Rossoni L, Oliveira-Filho R, Vargaftig B, Lima W. Protective effect of estradiol on acute lung inflammation induced by an intestinal ischemic insult is dependent on nitric oxide. *Shock*. 2013;40(3), 203-9.

Breithaupt-Faloppa A, Fantozzi E, Romero D, Rodrigues A, De Sousa P, Franco A, Oliveira-Filho R, Vargaftig B, Lima W. Acute effects of estradiol on lung inflammation due to intestinal ischemic insult in male rats. *Shock*. 2014;41(3), 208-13.

Bullard MK, Bir N, Kwan R, Cureton E, Knudson P, Harken A. Women rule. *Surgery*. 2010;147:134-7.

Burkhardt M, Slotta E, Garcia P, Seekamp A, Menger M, Pohlemann T. The effect of estrogen on hepatic microcirculation after ischemia/reperfusion. *Int J Colorectal Dis*. 2008;23:113-9.

Carpenter DJ, Granot T, Matsuoka N, Senda T, Kumar BV, Thome JJC, Gordon CL, Miron M, Weiner J, Connors T, Lerner H, Friedman A, Kato T, Griesemer AD, Farber DL. Human immunology studies using organ donors: Impact of clinical variations on immune parameters in tissues and circulation. *Am J Transplant*. 2017; [Epub ahead of print].

Chamorro C, Falcón JA, Michelena JC. Controversial Points in Organ Donor Management. *Transplant Proc*. 2009;41: 3473–5.

Cooper DKC, Novitsky D, Wicom WN. The pathophysiological effects of brain death on potential donor organs, with particular reference to the heart. *Ann R Coll Surg Engl*. 1989;71: 261-6.

Cypel M, Yeung JC, Keshavjee S. Novel approaches to expanding the lung donor pool: donation after cardiac death and ex vivo conditioning. *Clin Chest Med*. 2011;32:233-44.

Dolkart O, Amar E, Shapira S, Marmor S, Goryainov P, Weinbroum AA. Temporal determination of lung NO system and COX-2 upregulation following ischemia-reperfusion injury. *Exp Lung Res*. 2014;40(1):22-9.

Domínguez-Roldán JM, García-Alfaro C, Jiménez-González PI, Hernández-Hazañas F, Gascón Castillo MIY, Egea Guerrero JJ. Muerte encefálica: repercussion sobre órganos y tejidos. *Med Intensiva*. 2009;33(9):434-41.

Doucet D, Badami C, Palange D, Bonitz RP, Lu Q, Xu DZ, Kannan KB, Colorado I, Feinman R, Deitch EA. Estrogen receptor hormone agonists limit trauma hemorrhage shock-induced gut and lung injury in rats. *PLoS One*. 2010;5:9421.

Dupuis S, Amiel JA, Desgroseilliers M, Williamson D, Thiboutot Z, Serri K, Perreault M, Marsolais P, Frenette J. Corticosteroids in the management of brain-dead potential organ donors: a systematic review. *Br J Anaesth*. 2014;113(3):346-59.

Feng S, Goodrich NP, Bragg-Gresham JL, Dykstra DM, Punch JD, Debroy MA, Greenstein SM, Merion RM. Characteristics associated with liver graft failure: the concept of a donor risk index. *Am J Transplant*. 2006;6(4):783-90.

Floerchinger B, Ge X, Lee YL, Jurisch A, Padera RF, Schmid C, Tullius SG. Graft-specific immune cells communicate inflammatory immune responses after brain death. *J Heart Lung Transplant*. 2012;31(12):1293-300.

Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J*. 2012;33:829-37.

Frink M, Pape H-C, Van Griensven M, Krettek C, Chaudry IH, Hildebrand F. Influence of sex and age on MODS and cytokines after multiple injuries. *Shock*. 2007;27(2):151-6.

George TJ, Arnaoutakis GJ, Beaty CA, Jandu SK, Santhanam L, Berkowitz DE, Shah AS. A physiologic and biochemical profile of clinically rejected lungs on a normothermic ex-vivo lung perfusion platform. *J Surg Res*. 2013;183(1):75-83.

Hamidi, SA, Dickman KG, Berisha H, Said SI. 17 $\beta$ -Estradiol Protects the Lung against Acute Injury: Possible Mediation by Vasoactive Intestinal Polypeptide. *Endocrinology*. 2011;152(12): 4729–37.

Ho HL, Lee FY, Hsu SJ, Wang SS<sup>4</sup>, Hsin IF, Huang HC, Lee JY, Lin HC, Lee SD. The ability of 17  $\beta$ -estradiol to attenuate intrahepatic vasoconstriction to endothelin-1 in female rats is lost in cirrhosis. *Ann Hepatol.* 2015;14(3):404-13.

Hoffmann JN, Fertmann JM, Jauch KW. Microcirculatory disorders in sepsis and transplantation: therapy with natural coagulatory inhibitors antithrombin and activated protein C. *Curr Opin Crit Care.* 2006;12:426-30.

Homma H, Hoy E, Xu DZ, Lu Q, Feinman R, Deitch EA. The female intestine is more resistant than the male intestine to gut injury and inflammation when subjected to conditions associated with shock states. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2005;288:466-72.

Hou X, Pei F. Estradiol inhibits cytokine-induced expression of VCAM-1 and ICAM-1 in cultured human endothelial cells via AMPK/PPAR $\alpha$  activation. *Cell Biochem Biophys.* 2015;72(3):709-17.

Hsu JT, Yeh HC, Chen TH, Kuo CJ, Lin CJ, Chiang KC, Yeh TS, Hwang TL, Chaudry II. Role of Akt/HO-1 pathway in estrogen-mediated attenuation of trauma-hemorrhage-induced lung injury. *J Surg Res.* 2013;182(2):319-25

Ince C. The microcirculation is the motor of sepsis. *Crit Care.* 2005;9:S13-9.

Iorga A, Cunningham CM, Moazeni S, Ruffenach G, Umar S, Eghbali M. The protective role of estrogen and estrogen receptors in cardiovascular disease and the controversial use of estrogen therapy. *Biol Sex Differ.* 2017;24;8(1):33.

Kan WH, Hsu JT, Schwacha MG, Choudhry MA, Bland KI, Chaudry IH. Estrogen ameliorates trauma-hemorrhage-induced lung injury via endothelial nitric oxide synthase-dependent activation of protein kinase G. *Ann Surg.* 2008;248(2):294-302.

Kawasaki T, Chaudry IH. The effects of estrogen on various organs: therapeutic approach for sepsis, trauma, and reperfusion injury. Part 1: central nervous system, lung and heart. *J Anesth.* 2012;26(6):883-91.

Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(3):159-75.

Krutsinger D, Reed R, Blevins A, Puri V, De Oliveira NC, Zych B, Bolukbas S, Van Raemdonck D, Snell GI, Eberlein M. Lung transplantation from donation after cardiocirculatory death: a systematic review and meta-analysis. *J Heart Lung Transplant.* 2015;(34):675-684.

Kuebler JF, Jarrar D, Toth B, Bland KI, Rue L, Wang P, Chaudry IH. Estradiol administration improves splanchnic perfusion following trauma-hemorrhage and sepsis. *Arch Surg.* 2002;137:74-9.

Kypreos KE, Zafirovic S, Petropoulou PI, Bjelogric P, Resanovic I, Traish A, Isenovic ER. Regulation of endothelial nitric oxide synthase and high-density lipoprotein quality by estradiol in cardiovascular pathology. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2014;19(3):256-68.

Lee TM, Su SF, Tsai CH. Oestrogen attenuates coronary vasoconstriction after angioplasty: role of endothelin-1. *Eur J Clin Invest.* 2002;32:141–147.

Lin HI, Chou SJ, Wang D, Feng NH, Feng E, Chen CF. Reperfusion liver injury induces down-regulation of eNOS and up-regulation of iNOS in lung tissues. *Transplant Proc.* 2006;38(7):2203-6.

Ma XL, Gao F, Chen J, Christopher TA, Lopez BL, Ohlstein EH, Yue T. Endothelial protective and antishock effects of a selective estrogen receptor modulator in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001;280:876-84.

Machuca TN, Cypel M, Keshavjee S. Advances in lung preservation. *Surg Clin N Am.* 2013;93:1373-1394.

Mariani AW, Pêgo-Fernandes PM, Abdalla LG, Jatene FB. Ex vivo lung reconditioning: a new era for lung transplantation. *J Bras Pneumol.* 2012;38(6):776-785.

Mascia L, Mastromauro I, Viberti S, Vincenzi M, Zanello M. Management to optimize organ procurement in brain dead donors. *Minerva Anesthesiol.* 2009;75:125-33.

McKay DB. The role of innate immunity in donor organ procurement. *Semin Immunopathol.* 2011;33:169-84.

Mckeown DW, Bonser RS, Kellum JA. Management of the heartbeating brain-dead organ donor. *Br J Anaesth.* 2012;108(1):96-107.

Menazza S, Murphy E. The expanding complexity of estrogen receptor signalling in the cardiovascular system. *Circ Res.* 2016;118(6):994-1007.

Menegat L, Simas R, Caliman JM, Zanoni FL, Jacysyn JF, da Silva LFF, Borelli P, Moreira LFP, Sannomiya P. Evidence of bone marrow downregulation in brain-dead rats. *Int J Exp Pathol.* 2017;98(3):158-165.

Meyer Mr, Haas E, Barton M. Gender differences of cardiovascular disease: new perspectives for estrogen receptor signaling. *Hypertension.* 2006;47:1019-26.

Nijboer WN, Schuurs TA, Van der Hoeven JA, Leuvenink HG, Van der Heide JJ, van Goor H, Ploeg RJ. Effects of brain death on stress and inflammatory response in the human donor kidney. *Transplant Proc.* 2005;37(1):367-9.

Novella S, Heras M, Hermenegildo C, Dantas AP. Effects of estrogen on vascular inflammation: a matter of timing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32(8):2035-42.

Novitsky D. Detrimental effects of brain death on the potential organ donor. *Transplant Proc.* 1997;29:3770-2.

Novitzky D, Mi Z, Sun Q, Collins JF Cooper DK. Thyroid hormone therapy in the management of 63,593 brain-dead organ donors: a retrospective analysis. *Transplantation.* 2014;98(10):1119-27.

Obermaier R, Von Dobschuetz E, Keck T, Hopp HH, Drognitz O, Schareck W, Hopt UT, Benz S. Brain death impairs pancreatic microcirculation. *Am J Transplant.* 2004;4:210-15.

Oczkowicz G, Caban A, Budzinski G, Siszka-Switek A, Dolinska B, Czech E, Wiaderkiewicz R, Ryszka F, Cierpka L. Comparison of endothelial nitric oxide synthase and endothelin-1 levels in kidney removed from living pigs after cardiac arrest and brain death. *Transplant Proc.* 2014;46:2542-44.

Okamoto S, Corso CO, Kondo T, Leiderer R, Rascher W, Yamamoto Y, Yamaoka Y, Messmer K. Changes in hepatic microcirculation and histomorphology in brain-dead organ donors: an experimental study in rats. *Eur J Surg.* 1999;165:759-66.

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

Ranasinghe AM, Bonser RS. Endocrine changes in brain death and transplantation. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2011;25(5):799-812.

Rech TH, Moraes RB, Crispim D, Czepielewski MA, Leitão CB. Management of the brain-dead organ donor: a systematic review and meta-analysis. *Transplantation*. 2013;95(7):966-74.

Ricardo-da-Silva FY, Fantozzi ET, Rodrigues-Garbin S, Oliveira-Filho RM, Vargaftig BB, Breithaupt-Faloppa AC, Tavares de Lima W. Estradiol Modulates Local Gut Injury Induced by Intestinal Ischemia-Reperfusion in Male Rats. *Shock*. 2017;48(4):477-483.

Ritschl PV, Ashraf MI, Oberhuber R, Mellitzer V, Fabritius C, Resch T, Ebner S, Sauter M, Klingel K, Pratschke J, Kotsch K. Donor brain death leads to differential immune activation in solid organs but does not accelerate ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol*. 2016;239(1):84-96.

Rocha de Sousa PT, Breithaupt-Faloppa AC, Correia C, Simão RR, Ferreira SG, Fiorelli AI, Moreira LFP, Sannomiya P. 17 $\beta$ -Estradiol prevents mesenteric injury induced by occlusion of the proximal descending aorta in male rats. *J Vasc Surg*. 2017;3(17):3017-24.

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.

Sharawy N, Pavlovic D, Wendt M, Cerny V, Lehmann C. Evaluation of the effects of gender and estradiol treatment on the intestinal microcirculation during experimental sepsis. *Microvasc Res*. 2011;82(3):397-403.

Shimizu T, Suzuki T, Yu HP, Yokoyama Y, Choudhry MA, Bland KI, Chaudry IH. The role of estrogen receptor subtypes on hepatic neutrophil accumulation following trauma-hemorrhage: direct modulation of CINC-1 production by Kupffer cells. *Cytokine*. 2008;43(1):88-92.

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

Simas R, Kogiso DH, Correia CJ, Silva LFF, Silva IA, Cruz JW, Sannomiya P, Moreira LFP. Influence of brain death and associated trauma on solid organ histological characteristics. *Acta Cirurgica*. 2012b;27(7).

Simas R, Ferreira SG, Menegat L, Zanoni FL, Correia CJ, Silva IA, Sannomiya P, Moreira LF. Mesenteric hypoperfusion and inflammation induced by brain death are not affected by inhibition of the autonomic storm in rats. *Clinics (Sao Paulo)*;70(6):446-52, 2015a.

Simas R, Zanoni FL, Menegat L, Sannomiya P, Moreira LF. Pulmonary microcirculation compromise after brain-dead induction in rats: an intravital microscopy study. *Transpl Int*. 2015b; 28(S4): 150.

Skrabal CA, Thompson LO, Potapov EJ, Southard RE, Joyce DL, Youker KA, Noon GP, Loeb M. Organ-specific regulation of pro-inflammatory molecules in heart, lung and kidney following brain death. *J Surg Res*. 2005;123:118-25.

Steen S, Sjöberg T, Liao Q, Bozovic G, Wohlfart B. Pharmacological normalization of circulation after acute brain death. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2012;56(8):1006-12.

Stoica SC, Atkinson C, Satchithananda DK, Charman S, Goddard M, Redington AN, Large SR. Endothelial activation in the transplanted human heart from organ retrieval to 3 months after transplantation: an observational study. *J Heart Lung Transplant*. 2005;24(5):593-601.

Straub R. The complex role of estrogens in inflammation. *Endocr Rev.* 2007;28(5):521-74.

Takada M, Nadeau KC, Hancock WW, Mackenzie HS, Shaw GD, Waaga AM, Chandraker A, Sayegh MH, Tilney NL. Effects of explosive brain death on cytokine activation of peripheral organs in the rat. *Transplantation.* 1998;65:1533-42.

Tamosuitis T, Pranskunas A, Balciuniene, Pilvinis V, Boerma EC. Conjunctival microcirculatory blood flow is altered but not abolished in brain dead patients: a prospective observational study. *BMC Neurology.* 2016;16:95-101.

Terasaki PI, Cecka JM, Gjertson DW, Takemoto S. High survival rates of kidney transplants from spousal and living unrelated donors. *N Engl J Med.* 1995;37:333-6.

Vacca G, Battaglia A, Grossini E, Mary DA, Molinari C, Surico N. The effect of 17beta-oestradiol on regional blood flow in anaesthetized pigs. *J Physiol.* 1999;1:875-84.

Van Der Hoeven JAB, Ploeg RJ, Postema F, Molema I, De Vos P, Girbes ARJ, Van Suylichem PTR, Van Schilfgaarde R, Ter Horst GJ. Induction of organ dysfunction and up-regulation of inflammatory markers in the liver and kidneys of hypotensive brain dead rats: a model to study marginal organ donors. *Transplantation.* 1999;68:1884-90.

Van Raemdonck D, Neyrinck A, Verleden GM, Dupont L, Coosemans W, Decaluwé H, Decker G, De Leyn P, Nafteux P, Lerut T. Lung donor selection and management. *Proc Am Thorac Soc.* 2009;6(1):28-38.

Wauters S, Somers J, De Vleeschauwer S, Verbeken E, Verleden GM, Van Loon J, Van Raemdonck EM. Evaluating lung injury at increasing time intervals in a murine brain death model. *J Surg Res*. 2013;183:419-26.

Weymann A, Schmack B, Szabó G. Pathophysiological consequences of brain death. *Applied Cardiopulmonary Pathophysiology*. 2011;15:184-190.

Wilhelm MJ, Pratschke J, Beato F, Taal M, Kusaka M, Hancock WW, Tilney NL. Activation of the heart by donor brain death accelerates acute rejection after transplantation. *Circulation*. 2000;10:2426-33.

Wood K, McCartney J. Management of the potential organ donor. *Transplantation Reviews*. 2007;21:204-18.

Yang SJ, Chen HM, Hsieh CH, Hsu JT, Yeh CN, Yeh TS, Hwang TL, Jan YY, Chen MF. Akt pathway is required for oestrogen-mediated attenuation of lung injury in a rodent model of cerulein-induced acute pancreatitis. *Injury*. 2011;42(7):638-42.

Yang X, Qin L, Liu J, Tian L, Qian H. 17 $\beta$ -Estradiol protects the liver against cold ischemia/reperfusion injury through the Akt kinase pathway. *J Surg Res*. 2012;178:996-1002.

Yount S, Greer DM. Brain death and management of a potential organ donor in the intensive care unit. *Crit Care Clin*. 2014;30(4):813-31.

Yu HP, Hsieh YC, Suzuki T, Shimizu T, Choudhry MA, Schwacha MG, Chaudry IH. Salutary effects of estrogen receptor-beta agonist on lung injury after trauma-hemorrhage. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006;290(5):1004-9.

Zarbock A, Ley A, McEver RP, Hidalgo A. Leukocyte ligands for endothelial selectins: specialized glycoconjugates that mediate rolling and signaling under flow. *Blood*. 2011;118(26):6743-51.

Zhou H, Fu Z, Wei Y, Liu J, Cui X, Yang W, Ding W, Pan P, Li W. Hydrogen inhalation decreases lung graft injury in brain dead donor rats. *J Heart Lung Transplant*. 2013;32(2):251-8.

Zweers N, Petersen AH, Van der Hoeven JA, De Haan A, Ploeg RJ, De Leij LF, Prop J. Donor brain death aggravates chronic rejection after lung transplantation in rats. *Transplantation*. 2004;78(9):1251-8.