
Sueli Gomes Ferreira

Influência do gênero nas alterações microcirculatórias e no processo inflamatório em modelo de morte encefálica em ratos

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

Programa de Cirurgia Torácica e Cardiovascular
Orientador: Prof. Dr. Luiz Felipe Pinho Moreira
Coorientadora: Dr^a. Ana Cristina Breithaupt Faloppa

São Paulo
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Ferreira, Sueli Gomes

Influência do gênero nas alterações microcirculatórias e no processo inflamatório em modelo de morte encefálica em ratos / Sueli Gomes Ferreira -- São Paulo, 2017.

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

Orientador: Luiz Felipe Pinho Moreira.

Coorientadora: Ana Cristina Breithaupt Faloppa.

Descritores: 1.Morte cerebral 2.Gender 3.Ratos 4.Inflamação 5.Pulmão
6.Microcirculação

USP/FM/DBD-182/17

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais amados, Diva Maria Ferreira e Milton Gomes Ferreira, se há algo que faz diferença na formação da personalidade e na vida de uma pessoa é o amor que ela recebe. Vocês me educaram com amor, se dedicaram à minha educação como ser humano. Vocês fizeram de mim a pessoa que sou hoje, e eu só tenho motivos para agradecer

Mesmo nos momentos em que vocês precisaram ser duros, vocês fizeram isso com amor e respeito. Vocês nunca usaram de autoridade comigo para me ensinar nada pela dor, vocês sempre usaram as vias do amor. Mais do que a educação formal que vocês me ofereceram e que sempre se esforçaram para que fosse a melhor, a formação humana foi o que de mais importante vocês fizeram por mim.

Às vezes penso no meu íntimo, como poderia um dia pagar tudo o que vocês fazem por mim, meus queridos pais. Como poderia, de alguma forma, compensar todo o esforço que sempre demonstraram, toda a dedicação que nunca deixou de existir. Mas por mais contas que se façam, por vários fatores que se meçam e se pesem, sei que a resposta será sempre a mesma: impossível.

Vocês ultrapassam sempre os deveres essenciais de pais. Não olham a meios, nem se poupam de trabalho, quando a questão é o meu bem-estar. O vosso carinho é extremamente agradável como um cobertor numa noite fria. E as palavras, os inúmeros conselhos da vossa parte, que sempre me guiam, são uma provisão amorosa inigualável.

Não há palavra que melhor se adegue do que um grande e sincero obrigado. Tudo o que vocês me dão é tanto, que eu nunca saberei o quanto.

Sou e serei eternamente grato por tudo que vocês dedicaram a mim. Eu tenho muito orgulho de ser filho de vocês e muita admiração pelos pais que tenho. Obrigado por tudo. Amo muito vocês! Vocês são minha razão de viver.

Agradecimentos

Á Deus, pela vida e por proporcionar-me diferentes caminhos, dando me sempre oportunidades de escolha e guiando-me através delas.

Ao Professor Luiz Felipe Pinho Moreira, pela orientação e suporte em todas as etapas desse projeto.

À Professora Paulina Sannomiya que enriqueceu de maneira significativa esse trabalho com sua sabedoria e conhecimento, sem esquecer do seu amor pelo ensino e a pesquisa, qualidades nas quais aumentaram minha admiração pessoal e profissional por ela.

Á Dr^a. Ana Cristina Breithaupt Faloppa pela coorientação e pelo direcionamento pessoal e profissional que dedicou a esse trabalho e a mim como pessoa, com certeza nunca esquecerei tudo que me ensinou.

Aos amigos do LIM 11, que jamais esquecerei pelo amor e apoio que se tornaram essenciais para que eu pudesse continuar e concluir essa etapa da minha vida.

As funcionárias da pós-graduação que sempre me atenderam com carinho e dedicação

RESUMO

Ferreira SG. Influência do gênero nas alterações microcirculatórias e no processo inflamatório em modelo de morte encefálica em ratos [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

INTRODUÇÃO: Evidências clínicas e experimentais ressaltam o impacto da morte encefálica sobre a viabilidade do órgão a ser transplantado e apontam para a importância do estado do doador nos resultados finais do transplante. Estudos clínicos evidenciam diferenças no prognóstico de curto e de longo prazo em transplantes de diferentes órgãos, devido ao gênero do doador. Os hormônios sexuais podem exercer atividade moduladora da resposta inflamatória e imune. Portanto, a partir da ideia de que o dimorfismo sexual existe na resposta do sistema imune à morte encefálica e que pode ser responsável pelas diferenças encontradas no prognóstico de transplantes de órgãos, este trabalho avaliou as diferenças existentes entre os gêneros nas alterações microcirculatórias e na evolução do processo inflamatório em modelo de morte encefálica em ratos. **MÉTODOS:** Foram utilizados ratos da linhagem Wistar machos e fêmeas, divididos nos seguintes grupos: Proestro (ratas na fase de proestro do ciclo estral), Estro (ratas na fase de estro do ciclo estral), Ovx (ratas submetidas a ovariectomia 10 dias antes dos experimentos) e Machos. Todos os animais foram submetidos à morte encefálica pela insuflação rápida de cateter de balão inserido no espaço intracranial e mantidos em ventilação mecânica durante 3 ou 6 h. Foram analisados o processo inflamatório sistêmico e local (pulmão e intestino) e as alterações microcirculatórias no mesentério. **RESULTADOS:** Os resultados mostraram que a mobilização celular da medula óssea para a circulação e para os órgãos (pulmão e intestino) foi exacerbada nas fêmeas em relação ao sexo masculino, evidenciando a importância do componente celular da resposta inflamatória nas fêmeas após a morte encefálica. No pulmão, além de maior infiltrado inflamatório, as fêmeas apresentaram maior edema, caracterizado pelo aumento de permeabilidade vascular. Em relação às alterações microcirculatórias decorrentes da morte encefálica, as fêmeas não

apresentaram a hipoperfusão demonstrada nos machos após a morte encefálica e mantiveram o fluxo nos microvasos do mesentério. CONCLUSÃO: Pudemos concluir que, os efeitos da morte encefálica diferem entre os gêneros em relação às alterações microcirculatórias e ao processo inflamatório, incluindo menor comprometimento microcirculatório seguido de um quadro inflamatório mais grave nos animais do sexo feminino, concomitantemente com a redução aguda das concentrações circulantes dos hormônios sexuais femininos.

Descritores: morte cerebral; gênero; ratos; inflamação, pulmão; microcirculação.

ABSTRACT

Ferreira SG. Gender influence on the microcirculatory repercussions and the inflammatory process in a model of brain death in rats [tese]. São Paulo: “Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo”; 2017.

INTRODUCTION: Clinical and experimental evidence highlight the impact of brain death on the viability of the organs to be transplanted and show the importance of the donor state in the results of this procedure. Clinical studies show differences in the prognosis of short and long-term follow-up after transplantation due to donor gender and sex hormones may exert modulatory role on the inflammatory and immune response. Therefore, based on the idea that sexual dimorphism exists in the immune response to brain death and can be responsible for the differences found in the prognosis of organ transplants, this study evaluated the differences between the genders regarding the microcirculatory changes and the evolution of the inflammatory process in different organs in a model of brain death in rats. **METHODS:** Wistar rats were divided in the following groups: Proestro (rats in the proestrus phase of the estral cycle), Estro (rats in the estrus phase of the estral cycle), OVx (rats submitted to ovariectomy 10 days before the experiments) and Male rats. All animals were submitted to brain death by rapid inflation of a balloon catheter inserted in the intracranial space and maintained under mechanical ventilation for three or six hours. Microcirculatory changes in the mesentery, and systemic and local inflammatory process (lung and intestine) were analyzed. **RESULTS:** The results showed that the mobilization of inflammatory cells from bone marrow to the circulation and to the lung and intestine was exacerbated in females in relation to males, evidencing the importance of the cellular component of inflammatory response in the females after brain death. In the lungs, besides the increase of leukocyte infiltrate, the female group presented superior edema, characterized by increased lung microvascular permeability. In relation to the mesenteric microvascular alterations after brain death, the female rats maintained the mesenteric microvascular blood flow, while mesenteric

hypoperfusion was observed in male animals after brain death. **CONCLUSION:** In conclusion, the brain death effects differ between genders in relation to microvascular changes and inflammatory process, including lower microvascular impairment associated with more severe inflammation in female animals, which occurs concomitantly with decreases in the levels of females sex hormones.

Descriptors: brain death; gender; rats; inflammation; lung; microcirculation.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	8
2.1 OBJETIVO GERAL	8
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
3. MATERIAIS E MÉTODOS	9
3.1 ANIMAIS	9
3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	9
3.3 OVARIETOMIA (Ovx)	10
3.4 DETERMINAÇÃO DO CICLO ESTRAL E VALIDAÇÃO DA EFICÁCIA DA OVARIETOMIA	10
3.5 MODELO CIRÚRGICO DE MORTE ENCEFÁLICA	11
3.6 PARÂMETROS HEMODINÂMICOS E GASOMETRIA	12
3.7 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS HORMONAIS, ESTRADIOL, PROGESTERONA E CORTECOSTERONA	12
3.8 DETERMINAÇÃO DO NÚMERO TOTAL DE LEUCÓCITOS CIRCULANTES, PLAQUETAS E ERITRÓCITOS	12
3.9 DETERMINAÇÃO DO NÚMERO TOTAL DE CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA	13
3.10 MICROSCOPIA INTRAVITAL DE MESENTÉRIO E ANÁLISE DO FLUXO SANGUÍNEO	13
3.11 CULTURA DE PULMÃO ISOLADO (EXPLANTE)	14
3.12 QUANTIFICAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS NO SORO E NO EXPLANTE PULMONAR	14
3.13 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA	15
3.14 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE MIELOPEROXIDASE	15
3.15 DETERMINAÇÃO DA PERMEABILIDADE VASCULAR	16
3.16 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA	16
3.16.1 PREPARO DOS CORTES HISTOLÓGICOS	16
3.16.2 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS DE ADESÃO NO TECIDO PULMONAR E NOS VASOS DO MESENTÉRIO	17
3.16.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA SINTASE DE ÓXIDO NÍTRICO ENDOTELIAL (eNOS) E DA ENDOTELINA-1 (ET-1) NOS TECIDOS PULMONAR E MESENTÉRICO	18
3.16.4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE MIELOPEROXIDASE NO TECIDO PULMONAR	18

3.16.5	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA SÍNTESE DE ÓXIDO NÍTRICO INDUZIDA (INOS) NO TECIDO PULMONAR	19
3.16.6	CAPTAÇÃO DE IMAGENS E ANÁLISE DAS REAÇÕES	19
3.16.7	DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA RELATIVA DE INOS, ENOS E ENDOTELINA-1 NO MESENTÉRIO E NO TECIDO PULMONAR	20
3.16.8	ANÁLISE DOS RESULTADOS	20
4.	<u>RESULTADOS</u>	21
4.1	ALTERAÇÕES HEMODINÂMICAS E GASOMÉTRICAS APÓS A MORTE ENCEFÁLICA.	21
4.2	EFEITO DA MORTE ENCEFÁLICA SOBRE AS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE ESTRADIOL, PROGESTERONA E CORTICOSTERONA	21
4.3	DIFERENÇAS ENTRE OS GÊNEROS NAS ALTERAÇÕES MICROCIRCULATORIAS NO MESENTÉRIO APÓS A MORTE ENCEFÁLICA	23
4.3.1	AVALIAÇÃO DA PERFUSÃO E DO FLUXO NA MICROCIRCULAÇÃO MESENTÉRICA;	23
4.3.2	AVALIAÇÃO DAS EXPRESSÕES PROTEICA E GÊNICA DA ENOS E DA ET-1 NO MESENTÉRIO	25
4.3.3	DIFERENÇAS ENTRE OS GÊNEROS NA INTERAÇÃO LEUCÓCITO ENDOTÉLIO	27
4.3.4	DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTEICA DAS MOLÉCULAS DE ADESÃO ENDOTELIAL ICAM-1 E PECAM-1 NOS MICROVASOS DO MESENTÉRIO	28
4.4	DIFERENÇAS ENTRE OS GÊNEROS NA INFLAMAÇÃO INTESTINAL APÓS A MORTE ENCEFÁLICA	29
4.4.1	AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO INTESTINO	29
4.4.2	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE MIELOPEROXIDASE NO INTESTINO	30
4.4.3	DETERMINAÇÃO DA PERMEABILIDADE VASCULAR NO INTESTINO	31
4.5	DIFERENÇAS ENTRE OS GÊNEROS NA CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS	31
4.6	CARACTERIZAÇÃO DAS DIFERENÇAS ENTRE OS GÊNEROS NAS ALTERAÇÕES CELULARES APÓS A MORTE ENCEFÁLICA;	33
4.6.1	CONTAGEM DO NÚMERO TOTAL E DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS CIRCULANTES, PLAQUETAS E HEMÁCIAS	33
4.6.2	CONTAGEM DE CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA	35
4.7	DIFERENÇAS ENTRE OS GÊNEROS NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA PULMONAR APÓS A MORTE ENCEFÁLICA.	36
4.7.1	DETERMINAÇÃO DA PERMEABILIDADE VASCULAR PULMONAR	36
4.7.2	AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DO PULMÃO	37
4.7.3	DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTEICA DAS MOLÉCULAS DE ADESÃO ICAM-1 E VCAM-1 NO PULMÃO	38

4.7.4	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE E DA EXPRESSÃO DE MIELOPEROXIDASE NO PULMÃO -----	40
4.7.5	DIFERENÇA ENTRE OS GÊNEROS NA LIBERAÇÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS PELO PULMÃO APÓS A MORTE ENCEFÁLICA -----	41
4.7.6	AVALIAÇÃO DAS EXPRESSÕES GÊNICA E PROTEICA DAS ISOFORMAS DA SINTASES DE ÓXIDO NÍTRICO (I NOS E e NOS) E DA ET-1 NO PULMÃO -----	43
5.	<u>DISCUSSÃO</u> -----	47
6.	<u>CONCLUSÃO</u> -----	57
7.	<u>ANEXO</u> -----	59
7.1	TABELA 7: GASOMETRIA 1A E 1B -----	59
7.2	AVALIAÇÃO DA PERFUSÃO NA MICROCIRCULAÇÃO MESENTÉRICA -----	60
7.3	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTEICA DE e NOS E ET-1 NO MESENTÉRIO -----	61
7.4	DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTEICA DAS MOLÉCULAS DE ADEÇÃO NO MESENTÉRIO (ICAM-1 E PECAM-1)-----	62
7.5	LEUCOGRAMA DIFERENCIAL -----	63
7.6	DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTEICA DAS MOLÉCULAS DE ADEÇÃO ICAM-1 E VCAM-1 NO PULMÃO FIGURA 12A -----	64
7.7	DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MPO NO PULMÃO-----	64
7.8	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTEICA DAS ISOFORMAS DE ÓXIDO NÍTRICO I NOS FIGURA 18A, e NOS FIGURA 18B E ET-1 FIGURA 18C, MEDIDAS REALIZADAS NO PULMÃO.-----	65
8.	<u>REFERENCIA</u> -----	68

Lista de abreviaturas e siglas

ABTO - Associação Brasileira de Transplante de Órgãos

AEC- 3-amino-9-etilcarbazol

Akt - Do inglês V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1

BE – Excesso de base

BSA - Albumina de soro bovino

Ca⁺ - Cálcio

cDNA - Ácido desoxirribonucleico complementar

CINC-1 - Quimioatraente para Neutrófilos Induzidos por Citocinas 1

Cl⁻ - Cloreto

DMEM – Meio de Eagle modificado por Dulbecco

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

eNOS - enzima óxido nítrico sintase endotelial

EPM - Erro padrão da média

ET-1 - Endotelina-1

EUA - Estados Unidos da América.

g/dL – Grama por decilitro

GAPDH - Gliceroldeido-3-Fosfato Desidrogenase

H/E - Hematoxilina e eosina

H₂O₂ - Peróxido de hidrogénio

Hb - Hemoglobina

HRP - Horseradish-peroxidase

ICAM - Intercellular Adhesion Molecule 1

IL-10 - Interleucina 10

IL-18 - Interleucina 18

IL-1 β - Interleucina 1 β

IL-6 - Interleucina 6

INF- γ - Interferon γ

iNOS - enzima óxido nítrico sintase induzível

K⁺ - Potássio

MAP - do inglês Mitogen Activated Protein

MCP-1 Proteína quimiotática para monócitos

ME – Morte encefálica
MHC-II - Complexo principal de histocompatibilidade classe II
MIP-1 α - Proteína Inflamatória Derivada de Macrófagos–1 alfa
MIP-2 Proteína inflamatória macrófaga-2
mm³ - Milímetro cubico
mmHg - Unidade de medida milímetros de mercúrio
mmol/L- Unidade de medida micromole por litro
Na⁺ - Sódio
NaCl⁻ - Cloreto de Sódio
ng/mL - Nanograma por mililitros
Ovx - Ovariectomia
PBS - Solução tampão fosfato
pCO₂ – Pressão de gás carbonico
PECAM - Molécula de adesão celular endotelial plaquetária
pg/mL - Picograma por mililitros
pH - Grandeza físico-química que mede o potencial de hidrogénio iónico
PI3K - Quinase fosfatidil inositol 3
pO₂ - Pressão de oxigênio
RBT - Registro Brasileiro de Transplantes
RNA – Ácido Ribonucleotidio
RT-PCR - Polimerização em cadeia da polimerase antecedita de transcrição reversa.
TBS-T - Solução Salina Tamponada com Tris e Tween
Th1/2 - Células T auxiliares do tipo 1 e 2
TNF α - Factores de Necrose Tumoral Alfa
TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa
VCAM – Molécula de adesão celular vascular
VEGF - Do inglês vascular endothelial growth factor, traduzido como fator de crescimento endotelial vascular.
v.o – Via Oral
 μ m² - Micrometro quadrado

Lista de figuras

<i>Figura 1: Concentração sérica de hormônios sexuais femininos.</i>	5
<i>Figura 2: Grupos experimentais e protocolo de pesquisa</i>	10
<i>Figura 3: Alterações hemodinâmicas.</i>	21
<i>Figura 4: Dosagem de Corticosterona.</i>	23
<i>Figura 5: Perfusão e fluxo da microcirculação mesentérica.</i>	24
<i>Figura 6: Análise de Imuno-histoquímica e da expressão gênica de eNOS no mesentério.</i>	25
<i>Figura 7: Análise de Imuno-histoquímica e da expressão gênica de ET-1 no mesentério.</i>	26
<i>Figura 8: Análise por Imuno-histoquímica da expressão proteica de ICAM-1 e PECAM-1 no mesentérico.</i>	28
<i>Figura 9: Avaliação histopatológica do intestino após a morte encefálica.</i>	29
<i>Figura 10: Fotomicrografias dos cortes histológicos de intestino após a morte encefálica.</i>	30
<i>Figura 11: Determinação da atividade de mieloperoxidase no intestino.</i>	30
<i>Figura 12: Determinação da permeabilidade vascular no intestino.</i>	31
<i>Figura 13: Contagem de células da medula óssea.</i>	35
<i>Figura 14: Determinação da permeabilidade vascular pulmonar.</i>	36
<i>Figura 15: Avaliação histopatológica do pulmão.</i>	37
<i>Figura 16: fotomicrografias dos cortes histológicos do pulmão.</i>	38
<i>Figura 17: Análise Imuno-histoquímica da expressão proteica de ICAM-1 e VCAM-1 no pulmão.</i>	39
<i>Figura 18: Determinação da atividade e da expressão de mieloperoxidase no pulmão.</i>	40
<i>Figura 19: Avaliação da expressão gênica e proteica das isoformas da sintase de óxido nítrico (iNOS e eNOS) e da ET-1 no pulmão.</i>	43
<i>Figura 20: Avaliação das expressões proteica e gênica da eNOS no pulmão.</i>	45
<i>Figura 21: Avaliação das expressões proteica e gênica da ET-1 no pulmão.</i>	46

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1: Concentrações séricas de estradiol e progesterona inicial e após a morte encefálica</i>	22
<i>Tabela 2: A avaliação da interação leucócito/endotélio</i>	27
<i>Tabela 3: Concentrações sistêmicas de mediadores inflamatórios após a morte encefálica</i>	32
<i>Tabela 4: Leucograma total, inicial e 6 h após a morte encefálica</i>	33
<i>Tabela 5: Alterações das contagens de plaquetas e hemácias após a morte encefálica</i>	34
<i>Tabela 6: Concentrações de fatores de crescimento, quimiocinas e citocinas no pulmão (Explante)</i>	42

1. INTRODUÇÃO

O transplante de órgãos é considerado tratamento de escolha para muitos pacientes em estágio final da doença. Ao longo do tempo, a frequência de sucesso do transplante de órgãos aumentou progressivamente, devido a melhor compreensão da falência orgânica e do processo de rejeição de órgãos, ao aprimoramento das técnicas cirúrgicas e ao desenvolvimento de tratamentos imunossupressivos mais adequados (Pratschke *et al.*, 2005; Skrabal *et al.*, 2005; McKay *et al.*, 2011). Cerca de 82,8% dos transplantes são realizados a partir de indivíduos em morte encefálica e a falta de doadores é um problema presente em todo o mundo. No Brasil, em média, 100 pacientes por ano em cada milhão de habitantes desenvolvem morte encefálica em consequência de acidentes ou de hemorragia intracerebral. Menos de um quarto destes pacientes são convertidos a doadores efetivos, acentuando o desequilíbrio entre a oferta e a demanda de órgãos. A lista de espera de pacientes chega a ser quase nove vezes maior do que o número de órgãos disponíveis (RBT - 2016 (JAN/JUN) – ABTO).

Evidências clínicas e experimentais ressaltam o impacto da ME sobre a viabilidade dos órgãos (Terasaki *et al.*, 1995; Wilhelm *et al.*, 2000; Pratschke *et al.*, 2005; Skrabal *et al.*, 2005; Chamorro *et al.*, 2009) e apontam a importância do estado físico do doador na taxa de sucesso do transplante (Feng *et al.*, 2006). Estudos demonstram que a sobrevivência do enxerto de rim obtidos a partir de doadores em morte encefálica é inferior a obtida com doadores vivos (Pratschke *et al.*, 2000; Pratschke *et al.*, 2001). Em estudos experimentais a sobrevivência de enxerto de coração, fígado e pulmões de doadores em morte encefálica é inferior quando comparada aos doadores vivos (Wilhelm *et al.*, 2000; Zweers *et al.*, 2004; Pratschke *et al.*, 2001). Portanto, a compreensão das alterações geradas pela ME pode contribuir para a otimização da conduta clínica e para a manutenção do estado/função dos órgãos para transplante.

A morte encefálica decorrente de trauma, infarto ou hemorragia intracraniana resulta na maioria das vezes, em um aumento da pressão intracraniana, seguida por instabilidade hemodinâmica, causada por aumento na concentração sérica de catecolaminas (tempestade autonômica), gerando

hipertensão, taquicardia e aumento da resistência sistêmica. Esta fase hipertensiva é seguida de um episódio hipotensivo, em grande parte consequente à dilatação dos vasos (Novitzky *et al.*, 1997), diminuindo a perfusão e a oxigenação nos tecidos, prejudicando a manutenção dos órgãos. A queda da perfusão e a diminuição na utilização de glicose, piruvato e palmitato coincidem com o acúmulo de lactato e ácidos graxos livres no plasma, indicando a troca de metabolismo aeróbico para anaeróbico (Cooper *et al.*, 1989).

Evidências apontam para a importância da ativação do processo inflamatório após a morte encefálica. A hipótese de que a morte encefálica aumenta a imunogenicidade dos órgãos sólidos é suportada pelos achados de que rins, corações e pâncreas transplantados de doadores em morte encefálica têm uma rápida ativação da população leucocitária e seus produtos associados antes e após o transplante (Pratschke *et al.*, 2005; Pratschke *et al.*, 1999a; Pratschke *et al.*, 1999b). Há aumento da expressão do complexo de histocompatibilidade MHC-II, de moléculas de adesão celular, da produção de interleucinas e citocinas e ativação endotelial da microcirculação (Wilhelm *et al.*, 2003; Marshall *et al.*, 2001; Koudstaal *et al.*, 2005; Stangl *et al.*, 2001; Nijboer *et al.*, 2005; Takada *et al.*, 2004)

Um dos eventos mais precoces do processo inflamatório é o aparecimento de grande número de neutrófilos na periferia dos vasos da microcirculação. O recrutamento dos leucócitos para o sítio de lesão 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 glicolípídeos (Rosen, 2004). A mobilização maciça de leucócitos para a periferia dos vasos da microcirculação com consequente transposição dessas células para o tecido, antes e após o transplante, é mediada por uma sequência de eventos que incluem o recrutamento de leucócitos para o local da lesão e o aumento da expressão de moléculas de adesão, tanto nos leucócitos quanto no endotélio (Granger *et al.*, 1994; Kubes *et al.*, 1996; Langer *et al.*, 2009; Gavins *et al.*, 2007). A interação das células

com o endotélio é de fundamental importância para que haja a quimiotaxia dos leucócitos para os tecidos, onde podem gerar lesões, amplificando o processo inflamatório nos órgãos (Mayadas *et al.*, 2005; Hoffmann *et al.*, 2006; Muller *et al.*, 2013).

Em trabalhos anteriores, a avaliação da microcirculação na ME mostrou ser uma ferramenta útil para avaliar alterações precoces do processo inflamatório gerado pela morte encefálica. Estes estudos descreveram alterações microcirculatórias em ratos submetidos à morte encefálica, que incluem o aumento da expressão de ICAM-1 e da migração leucocitária, associadas à redução significativa dos níveis de corticosterona endógena e à hipoperfusão mesentérica. Sugere-se que a hipoperfusão gerada pela morte encefálica, juntamente com a migração leucocitária, possa reduzir a viabilidade dos diversos órgãos (Simas *et al.*, 2012a; Simas *et al.*, 2012b).

Ao mesmo tempo, o processo de morte encefálica envolve mudanças hormonais decorrentes da falência hipofisária (Roelsgaard *et al.*, 1996). Essas alterações hormonais, observadas em modelos experimentais de morte encefálica, estão intimamente ligadas ao processo inflamatório (Watts *et al.*, 2013). Em modelo experimental de morte encefálica há queda dos hormônios sexuais femininos, que pode estar relacionado com um pior quadro inflamatório apresentado no grupo de animais do sexo feminino (Simão *et al.*, 2016; Breithaupt *et al.*, 2016).

Em geral, as fêmeas apresentam respostas inflamatórias de intensidade diferente dos machos (Klein *et al.*, 2000). Esta característica é positiva quando se considera a resposta de defesa à infecção e negativa em relação à maior incidência de doenças autoimunes em mulheres (Wizemann *et al.*, 2002; Oertelt-Prigione *et al.*, 2012; Pennell *et al.*, 2003). As diferenças entre os gêneros se tornam aparentes, principalmente após a puberdade e são relacionadas com os hormônios sexuais e suas concentrações séricas (Roberts *et al.*, 2001; Ackerman *et al.*, 2006; Draijer *et al.*, 2016). Nesse sentido os hormônios sexuais femininos são apontados como um fator de proteção nas fêmeas, devido a sua capacidade de modular a resposta orgânica ao trauma e o processo inflamatório. (Oberholzer *et al.*, 2000; Vagnerova *et al.*, 2008; Hurn *et al.*, 2000; Alkayed *et al.*, 1998). Estudos mostram que o sexo feminino sob

trauma gera menores níveis de IL-6 e IL-8 (Deitch *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2007) e que distúrbios cardiovasculares tem sua incidência aumentada em mulheres na pós-menopausa, quando há redução das concentrações dos hormônios sexuais femininos (Stangl *et al.*, 2002). Estudos clínicos também demonstram que mulheres apresentam menor incidência de pneumonia, sepse e falência de múltiplos órgãos em relação a homens (Grossman *et al.*, 1985; Olsen *et al.*, 1996; Schroder *et al.*, 2000). São vários os dados de literatura relatando a participação dos hormônios sexuais femininos na mediação das repercussões causadas pelo trauma seguido de choque hemorrágico (Angele *et al.*, 2000; Knöferl *et al.*, 2001; Knöferl *et al.*, 2002; Chaudry *et al.*, 2003; Angele *et al.*, 2006; Hildebrand *et al.*, 2006; Meldrum *et al.*, 2006; Frink *et al.*, 2007; Moeinpour *et al.*, 2007. Deitch *et al.*, 2008a; Deitch *et al.*, 2008b).

Os esteroides sexuais, conhecidos por seus efeitos no sistema reprodutor, exercem também inúmeros efeitos fisiológicos em outros sistemas, incluindo o sistema imune, o sistema cardiovascular e o sistema nervoso. Durante a vida reprodutiva das mulheres, os esteroides sexuais femininos, estradiol e progesterona, controlam as fases do ciclo menstrual, sob a regulação do eixo hipotálamo-hipófise-ovários. Este ciclo dura em média 28 dias e é dividido em duas fases: folicular e lútea. A fase folicular é caracterizada pela elevação da concentração sérica de estradiol e culmina na ovulação, que é marcada pelo pico de estradiol e ocorre em média no 14º dia do ciclo. Após a ovulação, inicia-se a fase lútea, na qual se observa a elevação da concentração de progesterona (Figura 1A). O término do período reprodutivo dá início à menopausa, que é caracterizada pela redução significativa dos níveis séricos tanto de estradiol quanto de progesterona (Tam *et al.*, 2011).

Em roedores, o ciclo reprodutivo tem duração de 4 a 5 dias e é conhecido como ciclo estral (Figura 1B). Este é dividido nas seguintes fases: proestro, estro, metaestro (ou diestro I) e diestro (ou diestro II), com duração média de 12-14h, 25-27h, 6-8h e 55-57h, respectivamente (Goldman *et al.*, 2007).

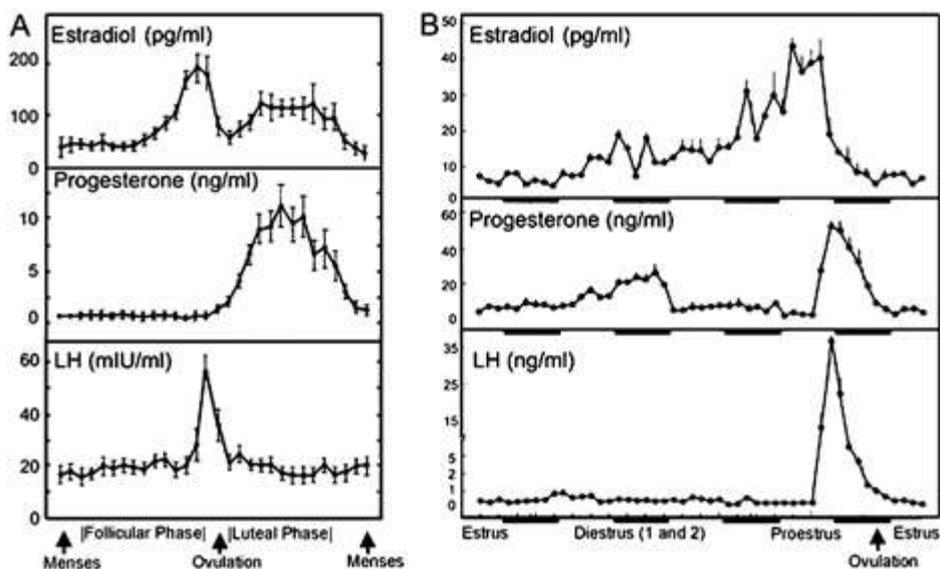


Figura 1: Concentração sérica de hormônios sexuais femininos. Ciclo reprodutivo humano (A) e de ratos (B). (Becker *et al.*, 2005; Goldman *et al.*, 2007)

Nas últimas décadas, pesquisas buscando esclarecer a interação dos hormônios sexuais femininos com o sistema imune e as diferenças na incidência de doenças entre os gêneros despertaram um grande interesse da ciência. Pesquisadores conseguiram demonstrar a presença de receptores de estradiol α e β em células como linfócitos, neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, tímócitos e células NK, o que sugere que os estrógenos podem ter um papel na regulação da imunocompetência e que os fatores endócrinos podem modular diretamente a expressão de genes alvo nas células do sistema imunológico (Cutolo *et al.*, 1995; Curran *et al.*, 2001; Erlandsson *et al.*, 2001; Fish *et al.*, 2008; Doucet *et al.*, 2010). Estudos mostraram que os hormônios sexuais femininos afetam a expressão de moléculas de adesão por leucócitos circulantes, exercendo também, efeitos na sua ativação (Chernyshov *et al.*, 2002). Além disso, pesquisas demonstraram que existem diferenças entre os gêneros em relação ao número de células residentes (Scotland *et al.*, 2011) e a sua função, no que tange à síntese de mediadores e fagocitose (Bouman *et al.*, 2004).

A flutuação das concentrações hormonais durante o ciclo menstrual pode influenciar o perfil dominante da resposta imune, Th1 ou Th2 (Fish *et al.*, 2008). Além disso, é importante mencionar que existem diferenças entre os

gêneros na regulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e estas têm sido atribuídas a influência dos esteroides gonadais (Seale *et al.*, 2004). Em ratos, as fêmeas apresentam aumento na secreção de corticosteroides em condições basais quando comparadas aos machos (Kitai *et al.*, 1961) e a remoção dos ovários reduz a secreção de corticosterona (Seale *et al.*, 2004). Em relação ao estradiol, é importante mencionar também seus efeitos moduladores no sistema cardiovascular. A incidência de doenças cardiovasculares em mulheres pré-menopausa é significativamente menor do que em homens da mesma faixa etária (Shaw *et al.*, 2006). Após a menopausa, essa diferença deixa de existir e alguns estudos mostram incidência maior de doenças cardiovasculares em mulheres, quando as doenças cardiovasculares se tornam a primeira causa de morte feminina (Rosamond *et al.*, 2008).

Apesar dos hormônios sexuais exercerem papel importante no perfil da resposta imune, os mecanismos responsáveis pelas diferenças observadas ainda não estão totalmente esclarecidos. Dentre este mecanismo está a modulação da expressão da sintase de óxido nítrico endotelial (eNOS), de sua atividade e da expressão gênica, (Novella *et al.*, 2012). Neste contexto, o gênero pode ser considerado um fator que influencia a incidência, as características e a progressão de diversas doenças com componentes inflamatórios, incluindo o processo inflamatório gerado na morte encefálica. Existem importantes interações dos sistemas imune e endócrino e, em doadores potenciais com morte encefálica, deve-se levar em consideração que as alterações endócrinas geradas pela perda do controle hipotalâmico resultam em alterações no controle endócrino e no sistema imune.

Roberts e colaboradores (2004), identificaram diferenças no prognóstico de transplantes de pulmão em relação ao gênero do doador e do receptor, e sugerem que diferenças hormonais podem influenciar o resultado do transplante. Sanfey (2005) afirma que o gênero do doador e do receptor afeta a sobrevida do paciente e a viabilidade do enxerto após o transplante. Em outro estudo, observou-se que o risco de perda do enxerto renal aumenta quando o doador é jovem e do sexo feminino, indicando uma possível correlação com o estado hormonal do doador (Zeier *et al.*, 2002). Considerando que os hormônios sexuais femininos participam da manutenção da atividade funcional

de órgãos e sistemas, estes podem ser considerados potenciais moduladores da inflamação após a morte encefálica.

Estudos confirmam o gênero do doador como um dos fatores que podem influenciar no resultado do transplante, evidenciando diferenças no prognóstico de curto e de longo prazo em transplantes de diferentes órgãos entre os gêneros (Zeier *et al.*, 2002; Sato *et al.*, 2006; Al-Khaldi *et al.*, 2006; Hibi *et al.*, 2012). Inoue *et al.*, (2002) examinaram 205 transplantes de rim realizados ao longo de um período de 13 anos e verificaram que a sobrevida de enxerto de longo prazo era melhor em mulheres do que em homens. Quando a sobrevida do enxerto foi analisada entre os quatro possíveis cenários combinados com base no sexo, o transplante de fêmea para fêmea teve a melhor sobrevida de enxerto, enquanto que o transplante feito de macho-para-macho, teve o pior resultado. Kahn *et al.*, (1993), relataram um risco 3,7 vezes maior de falha de enxerto em fígados de doadores do sexo feminino transplantados em pacientes do sexo masculino.

Em relação ao transplante de pulmão, a questão do gênero e suas implicações na função do enxerto e na sobrevivência em longo prazo não estão claramente estabelecidas. Estudos anteriores apontam para a diferença na resposta inflamatória entre os gêneros e indicam que as fêmeas possuem um quadro inflamatório maior do que machos, em órgãos como pulmão e coração. Ainda, após 6 h de morte encefálica, houve redução aguda das concentrações séricas de estradiol e progesterona (Simão *et al.*, 2016). Paralelamente evidenciamos que a morte encefálica em fêmeas resulta em maior infiltração de leucócitos e aumento de permeabilidade microvascular pulmonar, associados ao aumento das concentrações de VEGF e CINC-1 (Breithaupt *et al.*, 2016).

Portanto, o gênero pode ser considerado um fator que influencia a incidência, as características e a progressão de diversas doenças com componentes inflamatórios. A partir da ideia de que o dimorfismo sexual existe na resposta inflamatória gerada pela morte encefálica, o estudo das diferenças entre os gêneros e seus mecanismos pode contribuir para o estabelecimento de novas condutas e manobras terapêuticas para melhorar a qualidade dos órgãos para transplante.

2. OBJETIVOS

2.1 *Objetivo geral*

O objetivo deste estudo foi investigar as diferenças entre os gêneros nas alterações microcirculatórias e na evolução do processo inflamatório em ratos submetidos à morte encefálica.

2.2 *Objetivos específicos*

- Avaliar a perfusão de microvasos e as interações leucócito-endotélio na microcirculação mesentérica.
- Analisar a liberação de mediadores inflamatórios na circulação e no pulmão.
- Avaliar a mobilização leucocitária na medula óssea e na circulação.
- Avaliar as alterações da resposta inflamatória local no intestino e no pulmão.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e recebeu o número de protocolo 344/12. Todos os procedimentos foram realizados em conformidade com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Cirurgia Experimental/Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório e com a legislação brasileira vigente (Lei Federal no. 11.794, de 8 de outubro de 2008). Os experimentos foram conduzidos no laboratório de Cirurgia Cardiovascular e Fisiopatologia da Circulação (LIM/11).

3.1 *Animais*

Foram utilizados ratos Wistar, machos e fêmeas, provenientes do biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pesando entre 200 e 300 g (8 semanas). Os animais foram mantidos a $23 \pm 2^\circ\text{C}$, respeitando o período de claro e escuro de 12 h, sem restrições a ingestão de água e ração.

3.2 *Delineamento experimental*

Os grupos de estudo foram distribuídos da seguinte forma:

Proestro	Ratas na fase de proestro do ciclo estral no momento da indução da morte encefálica;
Estro	Ratas na fase de estro do ciclo estral no momento da indução da morte encefálica;
OVx	Ratas submetidas à ovariectomia 10 dias antes da indução da morte encefálica;
Machos	Ratos submetidos morte encefálica.

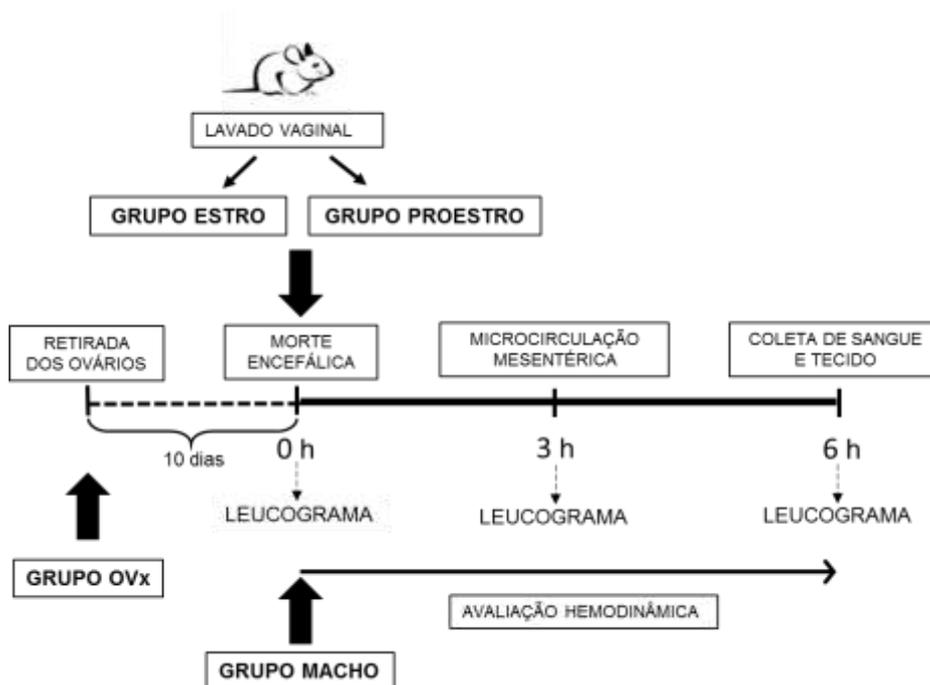


Figura 2: Grupos experimentais e protocolo de pesquisa

3.3 Ovariectomia (Ovx)

As ratas foram anestesiadas com isoflurano 3%, seguido de tricotomia e assepsia da parede abdominal com álcool iodado (3%). Foi realizada a laparotomia mediana e identificação dos ovários e removidos. A parede abdominal foi fechada em dois planos com sutura contínua com fio de nylon 4.0. Após a cirurgia foi administrado tramadol (5 mg/kg, i.p.) para a analgesia e pentabiótico (540 mg/kg, i.m.). A analgesia foi mantida por 3 dias consecutivos com paracetamol na água de beber (0,53 mg/ml, v.o).

3.4 Determinação do ciclo estral e validação da eficácia da ovariectomia

A determinação do ciclo estral das ratas foi realizada pela observação das características celulares encontradas no lavado vaginal. O proestro é marcado por elevadas concentrações séricas de estrógenos e lavado vaginal com predomínio de células epiteliais nucleadas. A fase que se segue é o estro, caracterizado por alteração no epitélio vaginal em que predominam as células

queratinizadas. Na sequência, inicia-se a fase de metaestro, na qual identifica-se a presença de leucócitos, juntamente com células cornificadas. A última fase corresponde ao diestro e é a mais longa, em que há predominância de leucócitos e muco no lavado vaginal. Nesta fase os níveis séricos de estrógenos e progesterona estão mais baixos (Goldman *et al.*, 2007). Foram selecionadas ratas nas fases de proestro e estro.

A validação da ovariectomia foi realizada após 10 dias, a partir do esfregaço vaginal e apenas ratas com aspecto celular de diestro foram utilizadas (95%). Posteriormente foi confirmada a queda na concentração dos hormônios e da redução da massa uterina.

3.5 *Modelo cirúrgico de morte encefálica*

Os animais foram sedados com uma mistura de isoflurano e oxigênio em câmara fechada. A seguir, foram submetidos à intubação oro-traqueal com jelco 16G, que foi conectado a um ventilador para roedores. O plano anestésico foi mantido com isoflurano a 2 % até a confirmação da morte encefálica. A ventilação foi realizada com FiO₂ de 100 %, volume corrente de 10 ml/kg e frequência de 70 ciclos/minuto. Os animais foram posicionados em plataforma cirúrgica com aquecimento local, para manutenção da temperatura (37°C). A artéria carótida esquerda e a veia jugular interna direita foram canuladas. O cateter da artéria foi conectado a um transdutor para o monitoramento da pressão arterial, enquanto que a veia jugular foi utilizada para infusão contínua de soro fisiológico a 2ml/h.

Após antissepsia, a calota craniana foi exposta e foi realizada perfuração total da tábua óssea na região parietal direita com broca esférica cirúrgica. A extremidade de um cateter de Fogarty® 4F foi inserida no espaço intracraniano. A morte encefálica foi induzida pela infusão rápida de 400-500 µL de NaCl a 0,9% no balão. A morte encefálica foi confirmada pela presença de pico hipertensivo, ausência de reflexos, midríase bilateral e apneia. Após a confirmação da morte encefálica o isoflurano foi interrompido e a ventilação mecânica mantida por períodos de 3 ou 6 h.

3.6 *Parâmetros hemodinâmicos e gasometria*

Para a avaliação dos parâmetros hemodinâmicos, a artéria carótida foi conectada a um transdutor de pressão (P23XL, Viggo-Spectramed Inc., Oxnard, CA, USA), ligado a um sistema multicanal de aquisição de dados biológicos (Acqknowledge – Biopac Systems, Inc., Goleta, CA, USA). Os parâmetros hemodinâmicos foram registrados continuamente. Para obtenção dos dados gasométricos, amostras de sangue foram coletadas da artéria carótida para determinação de pO₂, pCO₂, pH, íons: Na⁺, K⁺, Ca⁺⁺, Cl⁻, Hb e lactato em um analisador de gases no sangue (ABL555, Radiometer Medical ApS, Dinamarca).

3.7 *Determinação dos níveis séricos hormonais, estradiol, progesterona e corticosterona*

Foram coletadas amostras de sangue para realização de dosagens de estradiol (inicial e 6 h após a morte encefálica), progesterona (inicial e 6 h após a morte encefálica) e corticosterona (6 h após a morte encefálica). O sangue inicial foi coletado da artéria carótida e, após 6 h, da aorta abdominal. As concentrações circulantes dos hormônios foram determinadas utilizando kits comerciais, seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante (estradiol e progesterona: radioimunoensaio Coat a Count®, Siemens, USA; corticosterona: EIA Cayman, USA).

3.8 *Determinação do número total de leucócitos circulantes, plaquetas e eritrócitos*

Amostras de sangue (20µl) foram coletadas da cauda dos animais antes da indução da morte encefálica e após 6 h. Foi utilizada pipeta automática para coletar a amostra, que foi homogeneizada em diluente e submetida à contagem automática total em analisador hematológico (BC-2800vet, Mindray, China).

3.9 Determinação do número total de células da medula óssea

Após a eutanásia, o fêmur esquerdo foi cirurgicamente removido, ambas as extremidades foram abertas e o canal medular foi perfundido, a partir da extremidade distal, pela introdução de uma agulha acoplada à seringa contendo 10 ml de solução tampão fosfato (PBS, *phosphate buffered solution*). A suspensão medular centrifugada (15 min; 453 x g) e o botão celular ressuspendido em 1 ml de PBS. A seguir as células totais foram contadas em câmara de Neubauer em microscópio óptico. Para tanto, 90 µl da amostra foi acrescida de 10 µl de cristal violeta, seguido de duas diluições (1:10) em PBS, para que as células fossem expressas x10⁶/ml.

3.10 Microscopia intravital de mesentério e análise do fluxo sanguíneo

Para a observação da microcirculação mesentérica, após 3 horas da indução da morte encefálica, foi realizada uma incisão cutânea e muscular na porção lateral direita do abdome para a exteriorização do leito vascular mesentérico, conforme descrito anteriormente por Nakagawa *et al.*, (2006). 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 CaCl₂; H₂O; 25 NaHCO₃; 1,1 MgSO₄; 1,1 KH₂PO₄ e 5-glicose, saturada com uma mistura de gases (95% N₂ e 5% CO₂). O sistema consiste de um microscópio trinocular (Axioplan 2, Carl Zeiss Co., München-Hallbergmoos, Alemanha) acoplado a uma câmera digital para captura de imagens em movimento (Axiocam-HSB, Carl Zeiss Co., München-Hallbergmoos, Alemanha) e a um microcomputador. O percentual de vasos perfundidos na microcirculação mesentérica, foi determinado pela quantificação de vasos <30 µm de diâmetro, com fluxo contínuo, intermitente e sem fluxo, considerando o número total de vasos em área de 1,0 mm². A interação de leucócitos com a superfície luminal do endotélio vênular (vênulas pós-capilares de 20 a 25 µm de diâmetro) foi estudada conforme descrito anteriormente por

Farsky *et al.*, (1995). O número de leucócitos que se moveram na periferia, em contato com o endotélio, foi determinado durante 3 minutos. O número de células que permaneceram aderidas ao endotélio, por mais de 30 segundos em uma extensão de 100 μm de vênula, foi considerado aderido. Leucócitos migrados para o tecido perivascular foram contados em áreas equivalentes a 5000 μm^2 .

A determinação do fluxo sanguíneo na microcirculação mesentérica foi avaliada pela utilização de um probe (MNP110XP Fine Needle Probe) de 25 mm de extensão e 0,48 mm de diâmetro acoplado a fluxômetro a laser (IN191 Laser Doppler Flow Meter, AD Instruments, Colorado Springs, CO, USA). O sinal captado é proporcional ao fluxo de células sanguíneas através da microvasculatura.

3.11 *Cultura de pulmão isolado (explante)*

A cultura de pulmão foi realizada de acordo com Proust *et al.* (2003). Decorrido o tempo desejado após a morte cerebral (6 h), fragmentos de tecido pulmonar foram incubados em placas e mantidos em atmosfera úmida com 95% de O_2 e 5% de CO_2 , a 37 °C em meio de cultura DMEM, contendo 0,5% de Penicilina/Estreptomicina (10.000 U.I./10 mg por ml). Após 24 h o meio de cultura foi coletado e armazenado a -70°C e os fragmentos de pulmão colocados em estufa de secagem por 48 h para posterior obtenção de seu peso seco.

3.12 *Quantificação das concentrações de mediadores inflamatórios no soro e no explante pulmonar*

A determinação das concentrações de mediadores inflamatórios (fatores de crescimento: G-CSF, GM-CSF, VEGF; das quimiocinas: CINC-1, MIP-1, MIP-2, MCP-1, fractalcina e das citocinas: IL-1 β , IL-6, IL10, IL18, TNF- α , INF- γ) no soro e no meio de cultura do explante pulmonar foi realizada com a utilização do “kit” comercial (Milliplex®, Millipore). Os ensaios foram conduzidos

seguindo as especificações do fabricante. A leitura foi realizada com o equipamento (Luminex 200-Software xPonent/Analyst versão 4.2).

3.13 *Análise histopatológica*

Fragmentos de pulmão e intestino foram retirados, fixados em solução de formaldeído (10%) por 24 horas. Os tecidos foram processados, emblocados em parafina, cortados (4 µm) e os cortes corados com hematoxilina e eosina. As análises morfológicas convencionais foram realizadas (n=5 animais por grupo) por dois examinadores cegos em relação aos grupos. Os cortes de pulmão e intestino foram digitalizados em scanner para lâminas (Scanscope CS System, Aperio Technologies, Inc., Vista, CA). No pulmão, cinco áreas por imagem foram extraídas e exportadas em formato compatível com o software NIS Elements (NIS-elements, Nikon, Tokyo, Japan). Um retículo com 200 intersecções (17 x17 µm) foi utilizado, para a avaliação da proporção ar/tecido. Os parâmetros investigados no tecido pulmonar foram: infiltrado leucocitário (polimorfonucleares e linfomononucleares), edema e hemorragia. Para a avaliação do tecido intestinal, foram feitos cortes histológicos transversais. O número de leucócitos foi quantificado e expresso em relação ao comprimento das vilosidades intestinais; foram avaliadas de 6-12 alças por corte de 5 animais por grupo.

3.14 *Determinação da atividade de mieloperoxidase*

A determinação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) tecidual, foi realizada de acordo com o método descrito por Goldblum *et al.*, (1985). Decorridas 6 h da morte encefálica, os animais foram submetidos à laparotomia mediana e dessangrados a partir da aorta abdominal. A cavidade torácica foi aberta e o leito vascular pulmonar perfundido com 5 ml de PBS por uma cânula inserida na artéria pulmonar. Fragmentos de pulmão e mesentério foram extraídos e imediatamente congelados. Os tecidos foram pesados e homogeneizados em 3 ml/g de tampão fosfato pH 6,0 contendo 0,5% de brometo de hexadecil-tri-metil-amônio (HTAB) e 5 mM de ácido etilenodiamino

tetra-acético (EDTA) (gentleMACS™ Dissociator, Miltenyi Biotec, Germany). Os homogenatos foram centrifugados (12000 rpm durante 15 minutos a 4 °C) e o sobrenadante armazenado. O ensaio de atividade de MPO foi conduzido adicionando a placas de 96 wells: 185 µl de tampão fosfato pH 6.0, 50 µl de H₂O₂ (0,0005%), 50 µl de orto-dianisidina (1,75 mg/ml) e 20 µl do sobrenadante de cada amostra em duplicata. Decorrido o tempo de 10 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 50 µl de azida sódica (1,3%). A leitura foi feita em espectrofotômetro (VersaMax®) em comprimento de onda de 450 nm.

3.15 *Determinação da permeabilidade vascular*

A determinação da permeabilidade vascular para avaliação indireta do edema pulmonar e intestinal foi realizada por meio da técnica de determinação da concentração do corante azul de Evans (AE) (Sirois *et al.*, 1988). Para tanto, 25 mg/kg do corante foram injetados por via intravenosa, 20 minutos antes do término do experimento. Os animais foram dessangrados pela aorta abdominal, a circulação cardiopulmonar foi lavada com PBS, e em seguida, foram retirados fragmentos do parênquima pulmonar e tecido intestinal, esses fragmentos foram limpos e pesados. Um desses fragmentos de tecido foi incubado em formamida (4 ml/g de peso tecidual), à temperatura ambiente por 24 horas enquanto o outro foi mantido em estufa a 37 °C por 3 dias consecutivos, para determinação posterior de seu peso seco. A densidade óptica (DO) das amostras de AE extraído com formamida foi obtida em leitor de ELISA (VersaMax®) em comprimento de onda de 620 nm. A concentração de AE das amostras foi determinada com base em uma curva padrão de absorbância do corante. Os valores estão expressos em µg de AE/mg de peso seco de tecido.

3.16 *Análise Imuno-histoquímica*

3.16.1 Preparo dos cortes histológicos

A cavidade torácica foi aberta e o leito vascular pulmonar perfundido com 5 ml de PBS por meio de uma cânula inserida na artéria pulmonar.

Para obtenção de cortes congelados, o pulmão foi extraído, insuflado com solução 1:3 de OCT (Optimal Cutting Temperature Medium, Tissue-Tek®, Sakura Finetek Europe, Holanda) em PBS, imerso em hexano e congelado em nitrogênio líquido. O mesentério foi extraído, imerso em hexano e congelado em nitrogênio líquido. Cortes seriados de 8 µm foram colocados sobre lâminas silanizadas (Starfrost®, Knittelglass, Alemanha) e as amostras fixadas em acetona. Paralelamente, fragmentos de pulmão foram fixados em solução de formaldeído (10%) por 24 horas, processados, emblocados em parafina e cortados (4 µm).

3.16.2 Análise da expressão de moléculas de adesão no tecido pulmonar e nos vasos do mesentério

Lâminas com cortes congelados de pulmão e mesentério foram lavadas com solução tampão TRIS salina-tween (TBS-T), posteriormente permeabilizadas com TBS-T e triton X-100, seguido de bloqueio de sítios inespecíficos com tampão (1% BSA em TBS-T) e bloqueio da peroxidase endógena (solução de H₂O₂ 2%). Nos cortes de pulmão foi realizada imunodeteção com os anticorpos primários anti-ICAM-1 e anti-VCAM (Santa Cruz e BD Biosciences respectivamente, EUA), que foram diluídos (1:100) em solução de 1% BSA em TBS-T. Nos cortes de mesentério foi realizada imunodeteção com os anticorpos primários anti-ICAM-1, anti PECAM-1 e anti-P-selectina (Santa Cruz, Novus Biologicals e R&D Biosystems respectivamente, EUA) que foram diluídos (1:100, ICAM-1 e PECAM-1; 1:50. Pselectina) em solução de 1% BSA em TBS-T. Os cortes foram incubados com a solução de anticorpo primário por 1 h a 37°C em estufa úmida a 5% CO₂. As lâminas foram lavadas com TBS-T e incubadas com solução 1:200 de anticorpo secundário anti-camundongo ou anti-coelho IgGs associados a HRP (Horse Radish Peroxidase) (Millipore, Billerica, EUA) por 2 h a 37°C em estufa úmida a 5% CO₂. Como substrato enzimático para coloração foi utilizado AEC (3-amino-9-ethylcarbazole, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Por fim, as lâminas foram contracoradas com hematoxilina e montadas com meio de montagem aquoso (Vectamount, Vector, EUA).

3.16.3 Análise da expressão da sintase de óxido nítrico endotelial (eNOS) e da endotelina-1 (ET-1) nos tecidos pulmonar e mesentérico

Lâminas com cortes congelados de pulmão e mesentério foram lavadas com solução tampão TRIS salina-tween (TBS-T), posteriormente permeabilizadas com TBS-T e triton X-100, seguido de dois bloqueios, o primeiro para sítios inespecíficos com uma solução de BSA 1% em TBS-T e o segundo bloqueio da peroxidase endógena (solução de H₂O₂ a 2%). Para a imunodeteção, os anticorpos primários (anti-iNOS, anti-eNOS e anti-endotelin; Abcam, EUA) foram diluídos (1:100) em solução de 1% BSA em TBS-T e os cortes foram incubados por 1 h a 37°C. As lâminas foram lavadas com TBS-T e incubadas com solução 1:200 de anticorpo secundário anti-camundongo ou anti-coelho IgGs associados a HRP (Millipore, Billerica, MA, EUA) por 2 h a 37°C). Como substrato para coloração foi utilizado AEC (3-amino-9-ethylcarbazole, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Por fim, as lâminas foram contracoradas com hematoxilina e montadas com meio de montagem aquoso (Vectamount, Vector, EUA).

3.16.4 Análise da expressão de mieloperoxidase no tecido pulmonar

Cortes de pulmão foram desparafinizados em 3 banhos de xilol, reidratados em uma cadeia descendente de álcoois (100%, 90%, 70%), seguido de banho de água destilada. Para recuperação antigênica foi realizada incubação com solução de citrato (pH 6,0) aquecida a 100°C. As lâminas foram lavadas e imersas em solução para bloqueio de peroxidase endógena (H₂O₂ 3%) durante 10 minutos, seguido de 3 lavagens com água de torneira. Para bloqueio de sítios inespecíficos foi realizada incubação com soro de cabra (5%) em PBS por 1 h. Para imunodeteção de MPO foi utilizado anticorpo primário (anti-MPO, Santa Cruz) diluído (1:1000) em incubação *overnight*. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas por 5 minutos em PBS. Para marcação, foi utilizado o sistema de amplificação avidina-biotina associado a HRP e o

anticorpo secundário (1:400). Como substrato para coloração foi utilizado DAB (diaminobenzidina). Os cortes foram desidratados e as lâminas montadas com Entellan® (Merck, Alemanha).

3.16.5 Análise da expressão da síntese de óxido nítrico induzida (iNOS) no tecido pulmonar

Cortes de pulmão foram desparafinados em 3 banhos de xilol, reidratados em uma cadeia descendente de álcoois (100%, 90%, 70%), seguido de banho de água destilada. Para recuperação antigênica foi realizada incubação com solução de citrato (pH 6.0) aquecida a 100°C. Para bloqueio de sítios inespecíficos foi realizada incubação com soro de cabra (5%) em PBS por 1h. A marcação foi realizada com anticorpo primário anti-iNOS (Abcam, EUA). Os cortes foram incubados com a solução de anticorpo primário (1:100) por 1h. As lâminas foram lavadas e imersas em solução para bloqueio de peroxidase endógena (H₂O₂ 3%) durante 10 minutos, seguida de 3 lavagens com água e uma em PBS. Para marcação, foi utilizado o anticorpo secundário (1:200) (Millipore, EUA). Como substrato para coloração foi utilizado DAB (diaminobenzidina). Os cortes foram desidratados e as lâminas montadas com Entellan® (Merck, Alemanha).

3.16.6 Captação de imagens e análise das reações

Imagens das reações em cortes congelados foram captadas por meio de sistema de aquisição com câmera digital DS-Ri1 (Nikon, Tokyo, Japan), acoplada a microscópio (Nikon, Tokyo, Japan) e analisadas com auxílio do software NIS-Elements-BR (Nikon, Tokyo, Japan).

Imagens dos cortes em parafina foram analisadas com o auxílio do software Image J (NIH, EUA). Como controle negativo foram utilizadas imagens de cortes incubadas na ausência do anticorpo primário.

3.16.7 Determinação da expressão gênica relativa de iNOS, eNOS e endotelina-1 no mesentério e no tecido pulmonar

A técnica de PCR em tempo real, foi utilizada para avaliar a expressão gênica de iNOS, eNOS e endotelina, utilizando o aparelho 7500 Real-time PCR System (Applied Biosystem, EUA). A extração de RNA dos tecidos (pulmão e mesentério) foi realizada com a utilização de kit comercial (Mirvana®, Ambion), seguindo o protocolo do fabricante. O cDNA foi transcrito (High capacity reverse transcriptase kit, Applied Biosystem, EUA) e a reação de PCR em tempo real realizada. Os primers utilizados foram Taqman (Applied Biosystem, USA): GAPDH (Rn01775763_g1), β -actin (Rn00667869_m1*), iNOS (Rn00561646_m1*), eNOS (Rn02132634_s1*), ET-1 1 (Rn00561129_m1*). As condições de ciclagem foram: 2 min a 50°C, 10 minutos a 95°C seguido de 40 ciclos de 15 segundos 95°C e 1 min a 60°C.

3.16.8 Análise dos resultados

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). As análises estatísticas foram conduzidas com o software GraphPad Prism 6.0 e os dados foram submetidos ao teste Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn para múltiplas comparações. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significantes.

4. RESULTADOS

4.1 Alterações hemodinâmicas e gasométricas após a morte encefálica.

O gráfico a seguir (Figura 3) mostra que a morte encefálica induziu um pico na pressão arterial média, seguido de uma fase de hipotensão de aproximadamente 1 hora e da estabilização do quadro pressórico. Não houve diferença significativa entre os grupos analisados.

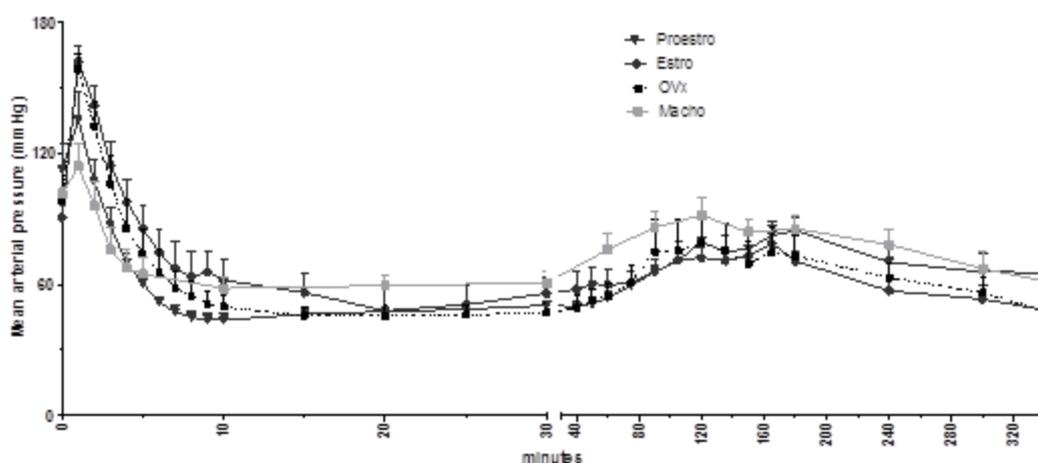


Figura 3: Alterações hemodinâmicas. Alterações hemodinâmicas e Gasométricas. Pressão arterial média de ratos machos, fêmeas em proestro, fêmeas em estro e fêmeas-ovariectomizadas (OVx) monitorizados do momento da insuflação do cateter (0) até o término do período experimental (6 h). Os dados representam a média \pm EPM de 8-10 animais por grupo. $p= 0.0711$

Paralelamente à monitorização da pressão, foram realizadas análises de gases no sangue em três momentos: Inicial, 3h e 6 h após a morte encefálica. Em relação aos parâmetros gasométricos analisados, também não foram encontradas diferenças significativas. **Anexo 7.1**

4.2 Efeito da morte encefálica sobre as concentrações séricas de estradiol, progesterona e corticosterona

Os resultados da quantificação da concentração de estradiol e progesterona indicaram redução significativa desses hormônios 6 h após a

morte encefálica em ratas (Tabela 1). No grupo dos machos foram quantificadas apenas as concentrações iniciais, que estavam significativamente baixas quando comparadas às fêmeas em proestro. Em relação às fêmeas ovariectomizadas, pudemos observar que estas já apresentavam concentrações iniciais semelhantes àquelas encontradas nos animais machos, confirmando a eficácia da ovariectomia.

Tabela 1: Concentrações séricas de estradiol e progesterona, determinadas por radioimunoensaio. Valores são média \pm EPM de 6 animais por grupo. As amostras foram coletadas antes da indução da morte encefálica e após 6 h

		<i>Inicial</i>	<i>6 h</i>
<i>Estradiol</i> (pg/mL)	Proestro	60,5 \pm 1,74	0,89 \pm 0,5 [†]
	Estro	19,9 \pm 4,03	3,32 \pm 2,74 [†]
	OVx	9,9 \pm 0,9*	2,7 \pm 2,7
	Macho	10,81 \pm 2,78	-
<i>Progesterona</i> (ng/mL)	Proestro	1362 \pm 379,2	230,6 \pm 103,8 [†]
	Estro	831,6 \pm 98,17	171,1 \pm 32,89 [†]
	OVx	331,2 \pm 112	55,7 \pm 9,2 [†]
	Macho	310,9 \pm 77,1	-

[†] $p < 0.05$ em relação aos respectivos valores iniciais; * $p < 0.05$ em relação aos valores iniciais do grupo Proestro.

Os valores referentes à corticosterona, obtidos em dosagem de amostras de soro coletadas após 6 h da indução da morte encefálica, mostraram uma diminuição significativa no grupo estro em relação à OVx (Figura 4).

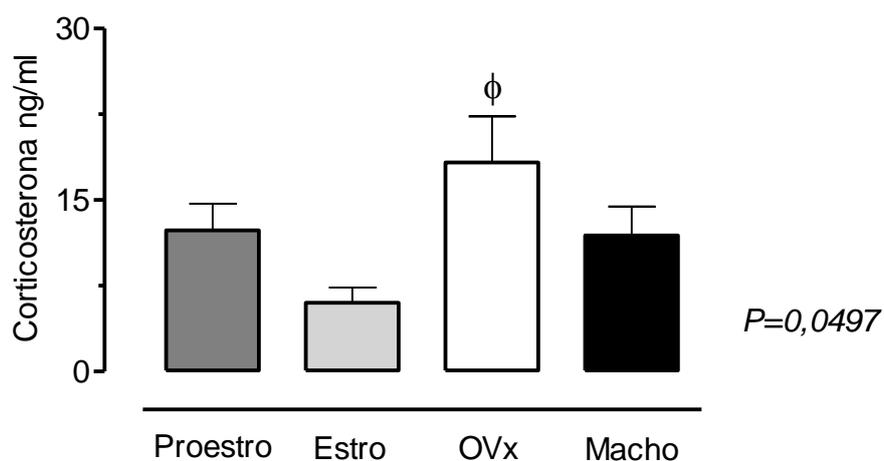


Figura 4: Dosagem de Corticosterona. Concentrações séricas de corticosterona determinadas por ELISA. Os valores basais foram obtidos de animais não submetidos à morte encefálica. Os valores dos animais no grupo de morte encefálica foram obtidos após 6h da morte encefálica. Os dados representam a média \pm EPM de 6 animais por grupo. $\phi p < 0,05$ em relação ao Estro.

4.3 *Diferenças entre os gêneros nas alterações microcirculatórias no mesentério após a morte encefálica*

4.3.1 Avaliação da perfusão e do fluxo na microcirculação mesentérica;

Os estudos por microscopia intravital foram realizados 3 h após a indução da morte encefálica. A análise da perfusão dos microvasos do mesentério mostrou que os animais do grupo Macho apresentaram redução da perfusão quando comparados aos animais do grupo Proestro (Figura 5A). Paralelamente, na avaliação do fluxo sanguíneo mesentérico por fluxometria a laser (Figura 5B), houve redução significativa do fluxo sanguíneo na região mesentérica dos animais Machos em relação às fêmeas em Proestro. Não encontramos diferenças entre os grupos de fêmeas.

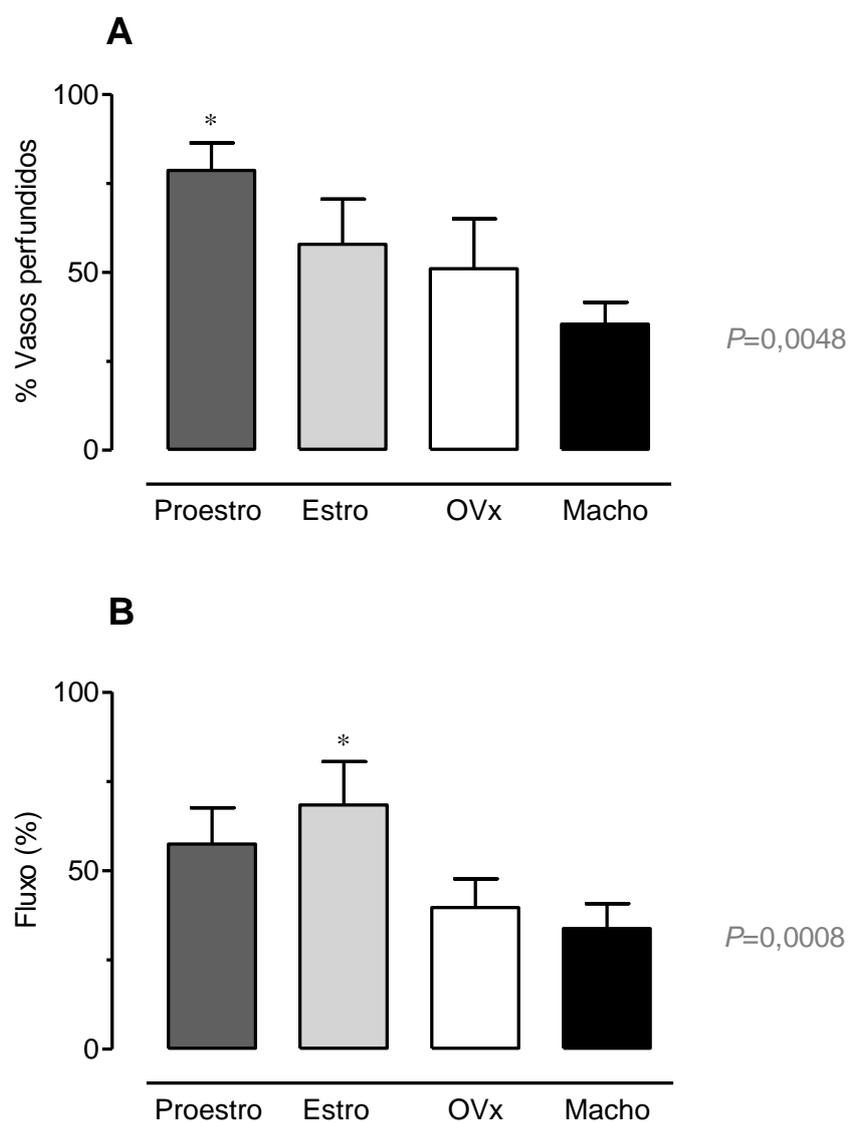


Figura 5: Perfusão e fluxo da microcirculação mesentérica. Determinação da porcentagem de microvasos perfundidos na microcirculação mesentérica (A) e do fluxo sanguíneo (B) nos animais 3 h após a indução da morte encefálica. Os dados representam a média \pm EPM. * $p < 0,05$ em relação ao Macho. **Fotomicrografias anexo 7.2**

4.3.2 Avaliação das expressões proteica e gênica da eNOS e da ET-1 no mesentério

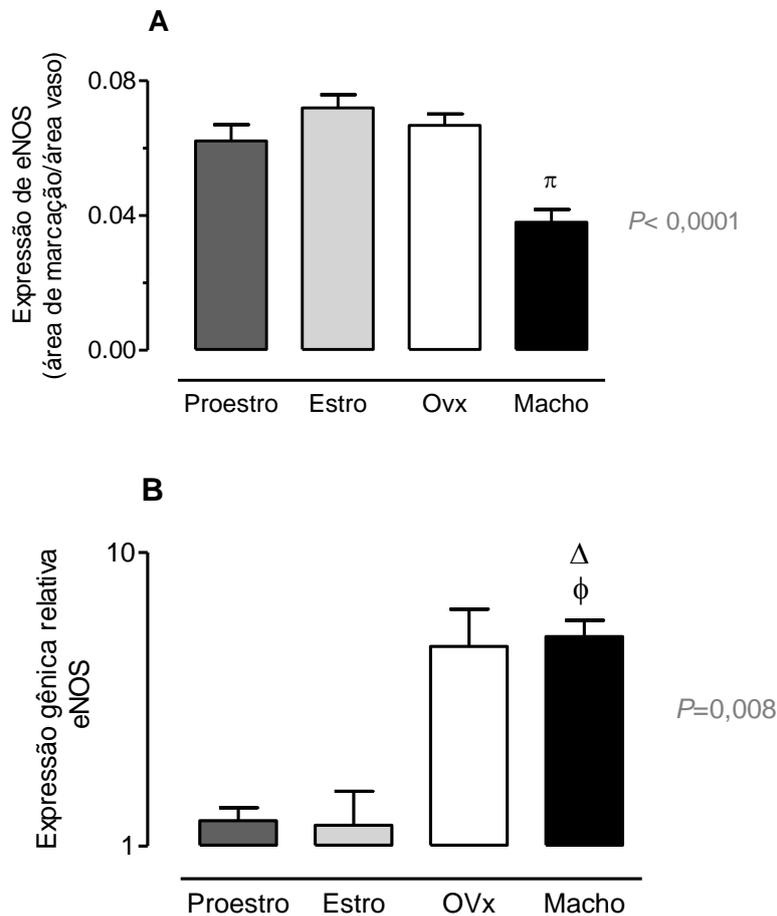


Figura 6: Análise de Imuno-histoquímica e da expressão gênica de eNOS no mesentério. Em (A) Imuno-histoquímica da expressão proteica de eNOS e em (B) avaliação da expressão gênica por RT-PCR de eNOS em tecido mesentérico de animais após 6 h de morte encefálica. Em (A), os dados representam a média \pm EPM da fração de área marcada em 5 áreas de 3 cortes de tecido mesentérico por animal e 4 animais por grupo. Em (B), os dados representam a média \pm EPM da expressão gênica de 5-7 animais em relação a animais machos, não submetidos a morte encefálica. $\pi P < 0,05$ em relação aos demais grupos; $\Delta P < 0,05$ em relação a proestro; $\phi p < 0,05$ em relação a estro. **Fotomicrografias anexo 7.3a**

As análises do tecido mesentérico foram realizadas após 6 h de morte encefálica. Na Figura 6A podemos observar os dados da expressão proteica de eNOS no mesentério. Os resultados mostraram redução de eNOS nos machos em relação aos grupos de fêmeas. Em relação à expressão gênica relativa de

eNOS (Figura 6B), observamos aumento nos machos, em relação às fêmeas em Estro e Proestro.

No caso da ET-1 houve um aumento na expressão proteica do grupo de fêmeas em proestro em relação aos demais grupos e observamos, ainda que, as fêmeas em Estro e OVx demonstraram aumento em relação ao grupo dos animais do sexo masculino (Figura 7A). Na avaliação da expressão gênica, não houve diferenças significativas entre os grupos (Figura 7B).

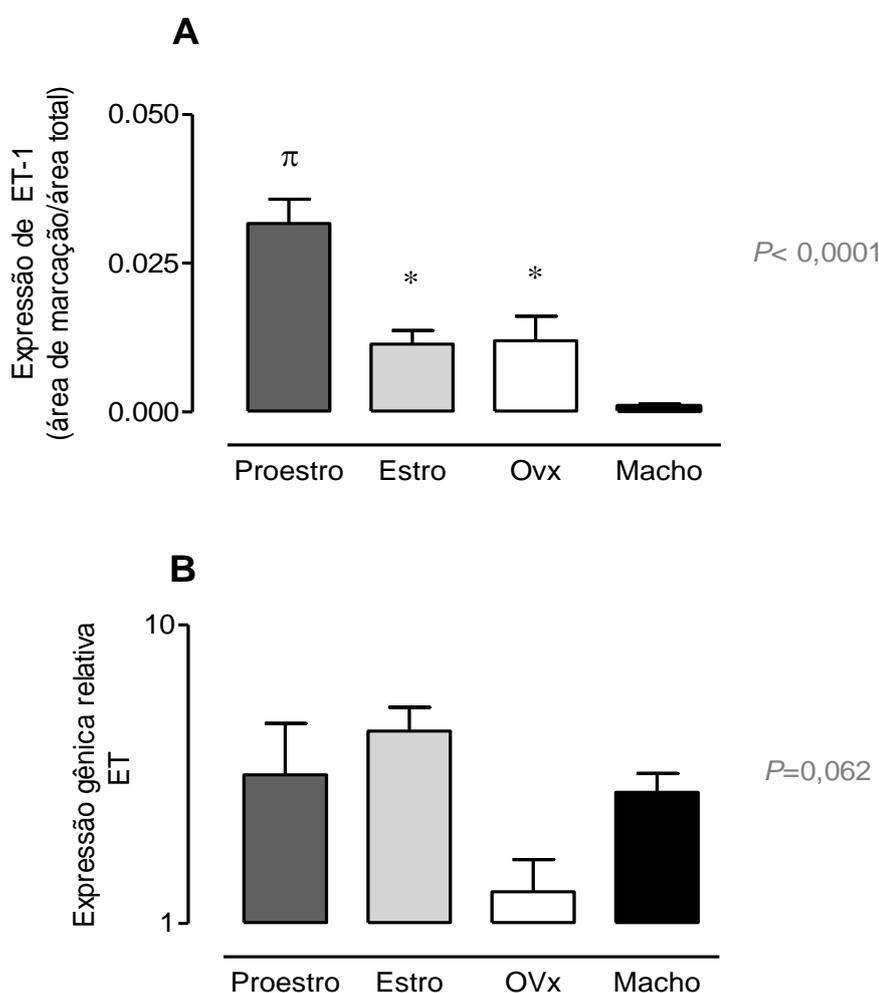


Figura 7: Análise de Imuno-histoquímica e da expressão gênica de ET-1 no mesentério. Análise por (A) Imuno-histoquímica da expressão proteica de ET-1 e por (B) RT-PCR da expressão gênica de ET-1 em tecido mesentérico de animais após 6 h de morte encefálica. Em (A), os dados representam a média \pm EPM da fração de área marcada em 5 áreas de 3 cortes de tecido mesentérico por animal e 4 animais por grupo. Em (B), os dados representam a média \pm EPM da expressão gênica de 5 animais por grupo em relação a animais machos, não

submetidos a morte encefálica. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Macho. ^π $p < 0,05$ em relação aos demais grupos. Fotomicrografias: **Anexo 7.3b**

4.3.3 Diferenças entre os gêneros na interação leucócito endotélio

Os estudos por microscopia intravital realizados 3 h após a indução da morte encefálica. Em relação ao número de leucócitos migrados, os dados evidenciaram diferenças no conjunto dos 4 grupos, porém o cálculo estatístico não apontou no pós-teste os grupos que especificamente diferiram (Tabela 2). Não encontramos diferenças entre os grupos em relação ao número de leucócitos aderidos, ao número de leucócitos circulantes e a relação entre neutrófilos e linfócitos no sangue.

Tabela 2: A avaliação da interação leucócito/endotélio após 3 h de morte encefálica. A avaliação da interação leucócito/endotélio após 3 h de morte encefálica, não demonstrou diferenças significativas em relação aos grupos analisados.

Interação leucócito/endotélio (microcirculação mesentérica)					
	Proestro	Estro	OVx	Macho	P
Leucócitos Aderidos (100 μm)	4,79 \pm 0,33	5,25 \pm 0,43	5,35 \pm 0,28	5,59 \pm 0,34	0,4097
Leucócitos Migrados (5000 μm^2)	3,29 \pm 0,33	2,13 \pm 0,30	2,79 \pm 0,32	2,09 \pm 0,25	0,0287
Leucócitos circulantes (cél/ mm^3)	14667 \pm 2001	11433 \pm 1268	11438 \pm 1183	111075 \pm 1097	0,600
Relação Neutrófilos/Linfócitos	2,47 \pm 0,48	2,48 \pm 0,42	2,62 \pm 0,57	2,19 \pm 0,31	0,849

Os dados representam a média \pm EPM de 5 animais.

4.3.4 Determinação da expressão proteica das moléculas de adesão endotelial ICAM-1 e PECAM-1 nos microvasos do mesentério

As análises do tecido mesentérico foram realizadas após 6 h de morte encefálica. Na avaliação da expressão proteica das moléculas de adesão no mesentério dos animais submetidos à morte encefálica, foi observado um aumento da expressão da molécula ICAM-1 no grupo Estro em relação aos demais grupos, contudo a expressão da molécula de adesão PECAM-1 não diferiu significativamente entre os grupos analisados (Figura 8).

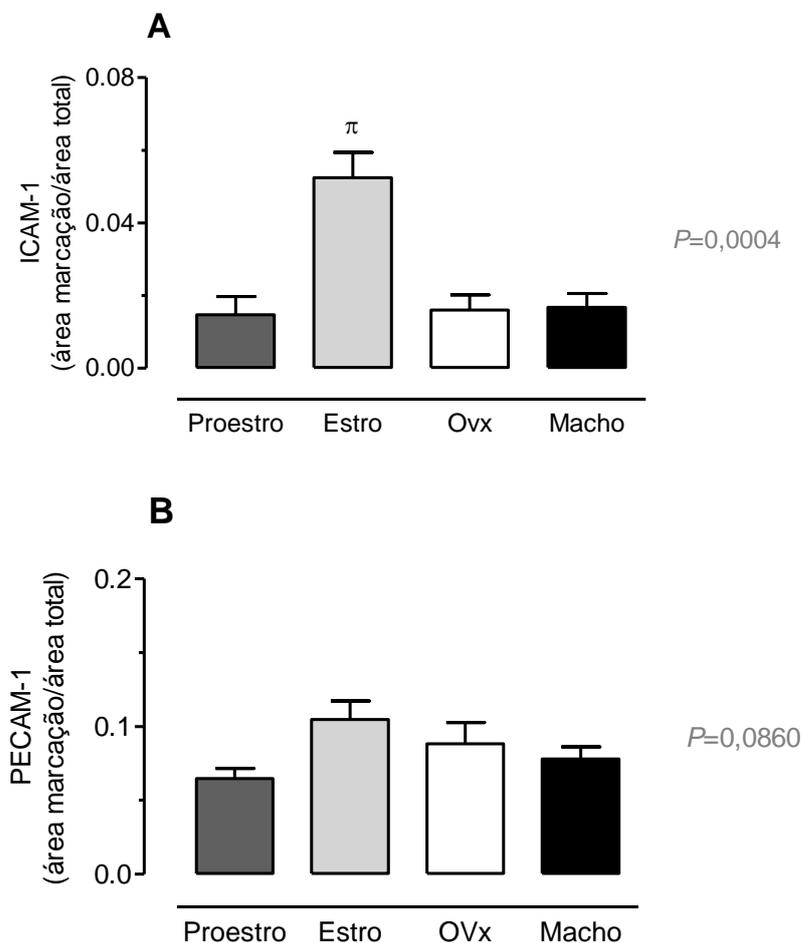


Figura 8: Análise por Imuno-histoquímica da expressão proteica de ICAM-1 e PECAM-1 no mesentérico. Em (A) expressão proteica de ICAM-1 e em (B) expressão proteica de PECAM-1 em tecido mesentérico de animais após 6 h de morte encefálica. Os dados de A e

B, representam a média \pm EPM da fração de área marcada em 5 áreas. $^{\pi}p < 0,05$ em relação aos demais grupos. **Fotomicrografia anexo 7.4**

4.4 Diferenças entre os gêneros na inflamação intestinal após a morte encefálica

4.4.1 Avaliação histológica do intestino

No tecido intestinal, avaliamos a presença de infiltrado leucocitário nas vilosidades da mucosa após 6 h de morte encefálica e os dados são apresentados na Figura 9 e ilustrados na Figura 10. Os três grupos do sexo feminino apresentaram maior número de leucócitos no intestino quando comparados ao grupo de machos.

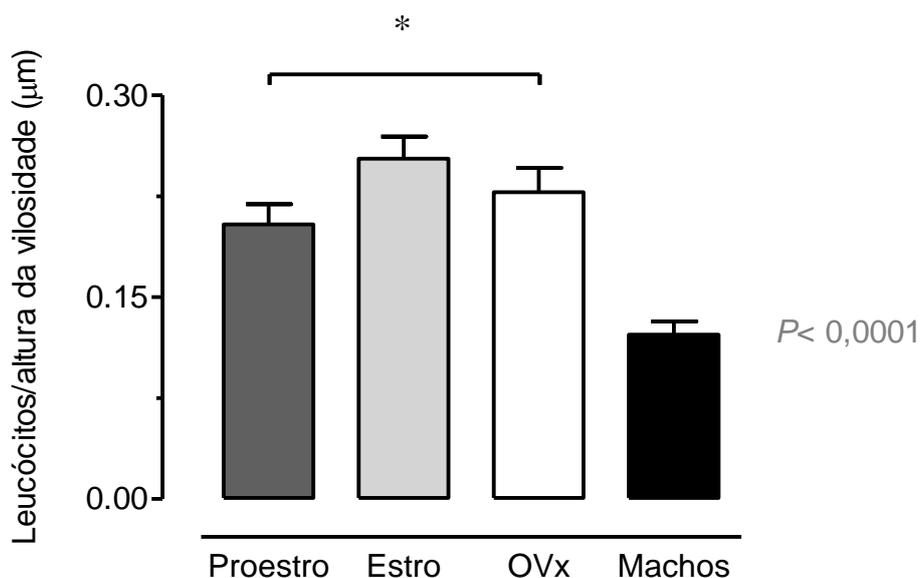


Figura 9: Avaliação histopatológica do intestino após a morte encefálica. Em cortes histológicos transversais foram contados os leucócitos presentes nas alças intestinais e os valores obtidos foram expressos em relação ao comprimento da alça em μm . Os dados representam a média \pm EPM de 6-12 alças por corte de 5 animais por grupo. $^*p < 0,05$ em relação ao Macho.

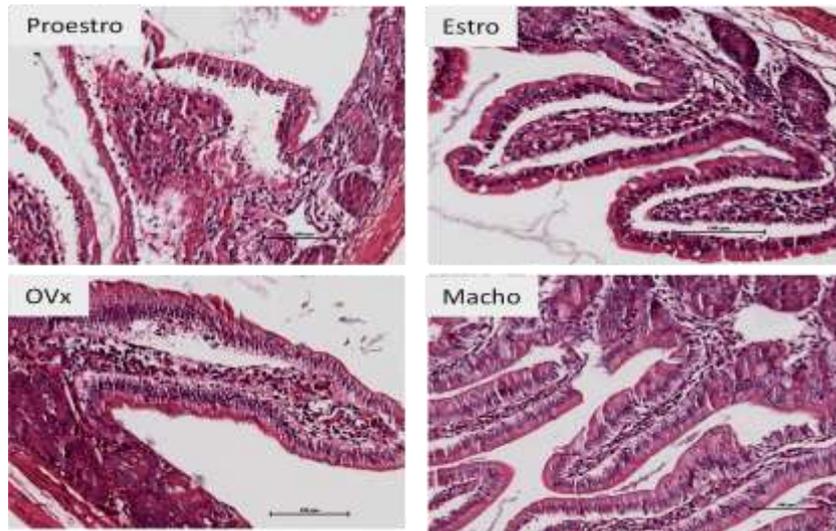


Figura 10: Fotomicrografias dos cortes histológicos de intestino após a morte encefálica. Coloração de H/E.

4.4.2 Determinação da atividade de mieloperoxidase no intestino

Para avaliar a presença/ativação de neutrófilos no intestino, medimos a atividade de mieloperoxidase após 6 h de morte encefálica. De acordo com os resultados obtidos (Figura 11); ocorreu aumento da atividade de MPO nas fêmeas nas em Estro em relação ao Proestro.

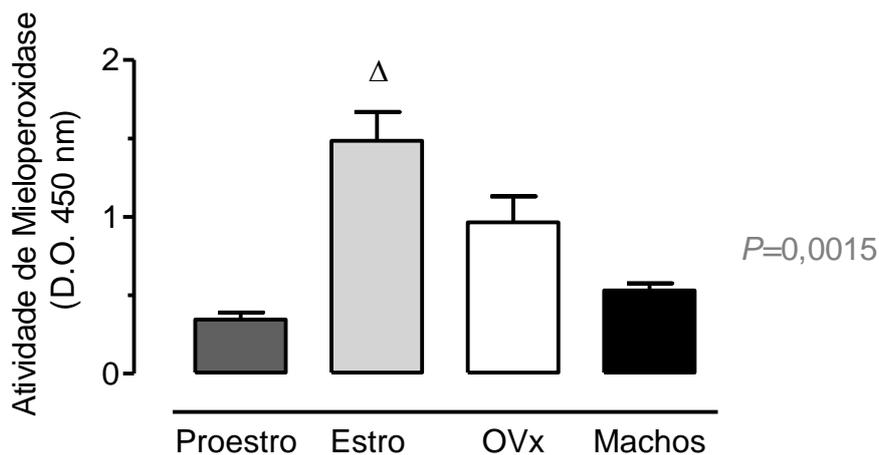


Figura 11: Determinação da atividade de mieloperoxidase no intestino. Os dados representam a média \pm EPM de 5 animais. Nos gráficos, $\Delta P < 0,05$ em relação ao grupo Proestro

4.4.3 Determinação da permeabilidade vascular no intestino

Para a determinação da permeabilidade no intestino foi utilizado a técnica de extravasamento do corante azul de Evans, que foi injetado 20 min antes do término do período de estudo (6 h). Os dados demonstraram um aumento na permeabilidade no grupo Proestro com diferença significativa em relação ao grupo de fêmeas ovariectomizadas (Figura 12).

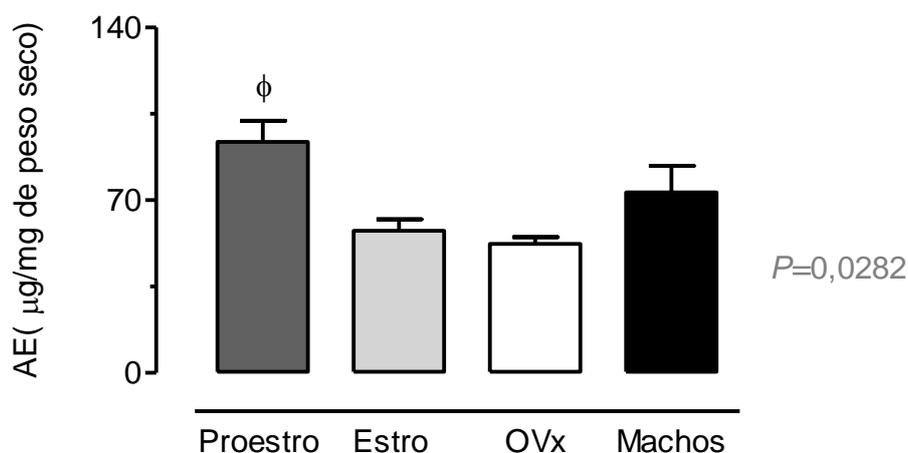


Figura 12: Determinação da permeabilidade vascular no intestino. Os dados representam a média \pm EPM de 5 animais. Nos gráficos, $\phi p < 0,05$ em relação ao grupo Ovx

4.5 Diferenças entre os gêneros na concentração sérica de mediadores inflamatórios

Com o objetivo de avaliar o quadro inflamatório sistêmico após a morte encefálica, quantificamos fatores de crescimento (G-CSF, GM-CSF e VEGF), quimiocinas (CINC-1, MIP-1A, MIP-2, MCP-1 e fractalcina) e citocinas (IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-18, TNF- α , INF- α) em amostras de soro obtidas após 6 h de morte encefálica. Os dados são apresentados na Tabela 3. Pode-se observar que não foram encontradas diferenças significativas na maioria dos mediadores estudados. Foram encontradas diferenças nas concentrações de VEGF entre os grupos Estro e Macho (Tabela 3).

Tabela 3: Concentrações sistêmicas de mediadores inflamatórios após a morte encefálica.

	PROESTRO	ESTRO	OVX	MACHO	P
FATORES DE CRESCIMENTO					
G-CSF	5,8 ± 0,3	6,2 ± 0,6	3,8 ± 0,4	5,2 ± 0,9	0,087
GM-CSF	16,1 ± 2,5	22,6 ± 6,6	11,0 ± 2,8	10,9 ± 2,3	0,131
VEGF	186,8 ± 29,3	385,5 ± 78,9*	199,3 ± 37,6	91,3 ± 20,9	0,009
QUIMIOCINAS					
CINC-1	2122 ± 851,6	2352 ± 1242	2243 ± 606,6	786,9 ± 207,1	0,278
MIP-1A	1380 ± 312,6	1557 ± 199	2352 ± 360,2	1746 ± 155,7	0,177
MIP-2	722 ± 312,4	401 ± 111,8	215,1±38,3	193 ± 35,5	0,391
MCP-1	1177± 2752	14756±3401	14382±2605	12931±1958	0,945
FRACTALCINA	234,6 ± 54,0	341,8 ± 66,9	613,6 ± 163,4	226,0 ± 43,5	0,120
CITOCINAS					
IL-1B	128,1 ± 31,3	267,0 ± 102,5	191,7 ± 57,9	130,9 ± 58,2	0,863
IL-6	2185 ± 1011	4832± 3142	10805±4118	9629 ± 5862	0,714
IL-10	881,4 ± 112,6	1122 ± 298,3	999,6 ± 223,4	642,3±178,6	0,053
IL-18	68,0 ± 6,6	114,7± 23,4	96,1 ± 15,7	75,0 ± 25,0	0,232
TNF- α	53,0 ± 13,7	54,9 ± 10,7	98,5 ± 19,7	88,6 ± 31,0	0,272
INF- γ	13,3 ± 6,2	12,2 ± 5,9	8,1 ± 3,7	3,7 ± 2,4	0,156

Os dados representam média ± EPM de 5-7 animais. * $p= 0,045$ em relação ao grupo dos machos.

4.6 Caracterização das diferenças entre os gêneros nas alterações celulares após a morte encefálica;

4.6.1 Contagem do número total e diferencial de leucócitos circulantes, plaquetas e hemácias

Os animais do grupo Macho apresentaram leucopenia 6 h após a morte encefálica (Tabela 4). Enquanto que os animais do sexo feminino, castrados ou não, não apresentaram redução no número total de leucócitos circulantes. Podemos observar também que os animais do grupo Estro apresentam 148,9 % de leucócitos circulantes em relação ao número inicial, o que aponta para a tendência de aumento do número dos leucócitos circulantes neste grupo. Paralelamente, foi realizada a contagem diferencial dos leucócitos, que não evidenciou diferença significativa nos grupos analisados. **Anexo 7.5**

Tabela 4: Leucograma total inicial e 6 h após a morte encefálica

<i>Leucograma total (células/mm³)</i>				
	Inicial	6 h	<i>P</i>	% do inicial
Proestro	11775,0± 763,2	12150,0 ± 601,0	0,999	103,2
Estro	11187,5 ± 763,3	16662,5 ± 2662,3	0,056	148,9
Ovx	12825,0 ± 674,5	12012,5 ± 1860,1	0,992	93,6
Macho	15062,5 ± 1067,4	8487,5 ± 778,8 [†]	0,016	56,3

Os dados representam a média ± EPM de 8 animais. [†]*p* em relação aos respectivos valores iniciais.

Também foi realizada a avaliação dos números de plaquetas e de eritrócitos circulantes (Tabela 5). Houve redução significativa no número de plaquetas após 6 h da morte encefálica nos grupos Proestro, Estro e Macho em relação aos valores iniciais. O grupo Ovx não apresentou essa redução no número total de plaquetas após 6 h de morte encefálica. Houve queda significativa no número de eritrócitos em todos os grupos estudados, com exceção do grupo Proestro.

Tabela 5: Alterações das contagens de plaquetas e hemácias. Os dados representam a média \pm EPM de 9-15 animais.

		<i>Inicial</i>	<i>6 h</i>	<i>P</i>
<i>Plaquetas (x10⁶/mL)</i>	Proestro	880,0 \pm 27,50	628,6 \pm 0,5 [†]	0,0006
	Estro	826,3 \pm 58,89	559,4 \pm 58,56 [†]	0,0001
	OVx	784,6 \pm 43,26	598,1 \pm 48,22	0,0684
	Macho	981,1 \pm 41,90	580,6 \pm 20,33 [†]	<0,0001
<i>Eritrócitos (ng/mL)</i>	Proestro	7,65 \pm 0,186	7,31 \pm 0,242	0,6568
	Estro	7,69 \pm 0,197	6,44 \pm 0,229 ^{†*}	0,0002
	OVx	7,75 \pm 0,178	6,75 \pm 0,176 [†]	0,0021
	Macho	7,66 \pm 0,173	6,51 \pm 0,190 ^{†*}	0,0002

[†] *p* em relação aos respectivos valores iniciais.

4.6.2 Contagem de células da medula óssea

As contagens foram realizadas após 6 h de morte encefálica. Os valores são apresentados na Figura 13. Observa-se redução significativa no grupo Estro em relação ao grupo Macho

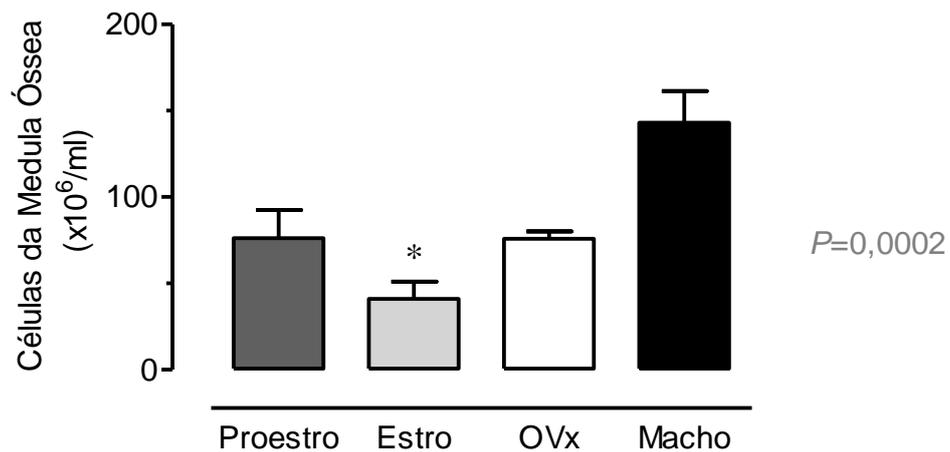


Figura 13: Contagem de células da medula óssea. Os dados representam a média \pm EPM de 8 animais. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Macho.

4.7 Diferenças entre os gêneros na resposta inflamatória pulmonar após a morte encefálica.

4.7.1 Determinação da permeabilidade vascular pulmonar

O edema pulmonar foi avaliado indiretamente por meio da alteração da permeabilidade pulmonar após 6 h de morte encefálica. Os dados estão representados na Figura 14. O gráfico indica significativo aumento da permeabilidade no pulmão das ratas do grupo Proestro submetidas à morte encefálica quando comparadas com o grupo Macho.

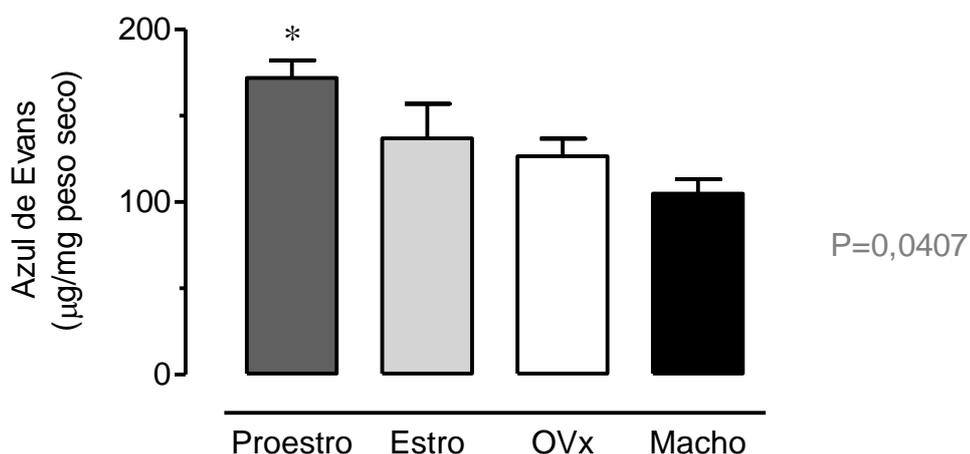


Figura 14: Determinação da permeabilidade vascular pulmonar. Diferenças entre os gêneros sobre o extravasamento do corante azul de Evans no pulmão. O corante foi injetado 20 min antes do término do período de estudo (6 h). Os dados representam a média \pm EPM de 5 animais. Nos gráficos, * $p < 0,05$ em relação ao grupo Macho.

4.7.2 Avaliação histopatológica do pulmão

Foi realizada a avaliação histopatológica dos pulmões após 6 h de morte encefálica em cortes corados com H/E. Foram feitas avaliações de infiltrado celular, hemorragia e edema. Os resultados são apresentados na Figura 15 e ilustrados na figura 16, onde foi observado um aumento no infiltrado leucocitário, tanto de linfomononucleares quanto de polimorfonucleares, no grupo das fêmeas em Estro quando comparado ao grupo dos Machos. Em relação ao edema no parênquima, não houve alteração significativa nos grupos, utilizando este método. Já a análise da hemorragia mostrou que as fêmeas ovariectomizadas apresentam maior presença de eritrócitos nos pulmões.

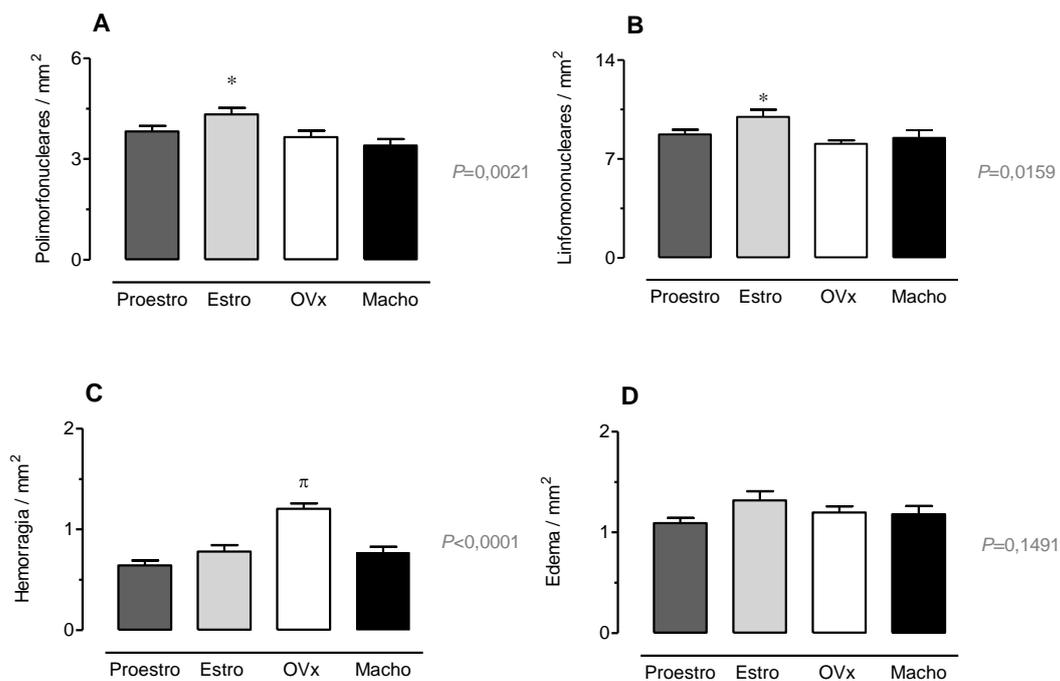


Figura 15: Avaliação histopatológica do pulmão. Foram analisados o número de polimorfonucleares (A), o número de linfomonucleares (B), a presença de hemorragia (C) e o edema intersticial (D). Os valores representam a média \pm EPM de 5 áreas analisadas por rato (n=5). * $p < 0,05$ em relação ao grupo Macho; $\pi p < 0,05$ em relação aos demais grupos.

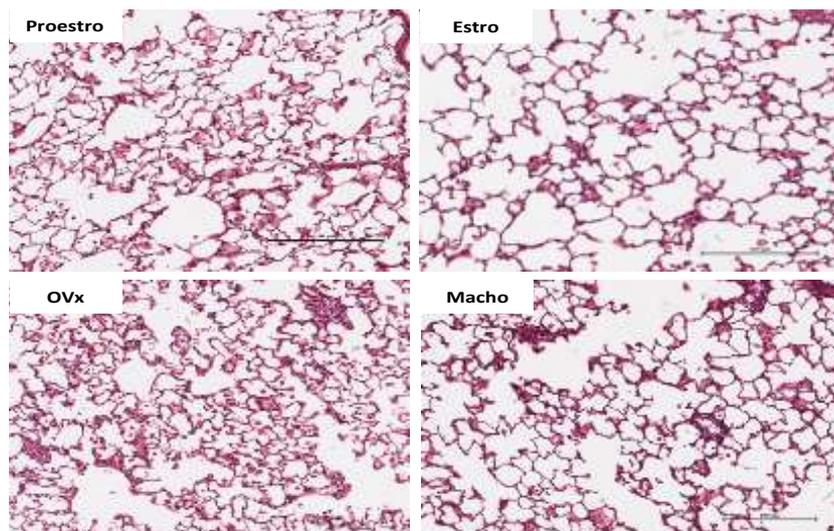


Figura 16: fotomicrografias dos cortes histológicos do pulmão. Análise histopatológica do pulmão após 6 h de morte encefálica. Coloração de H/E.

4.7.3 Determinação da expressão proteica das moléculas de adesão ICAM-1 e VCAM-1 no pulmão

Na figura 17A observamos aumento da expressão da molécula ICAM-1 no grupo Estro em relação aos grupos Proestro e Ovx. Em relação à expressão de VCAM-1, houve um aumento da expressão nos grupos Estro, Ovx e macho em relação ao grupo Proestro, figura 17B.

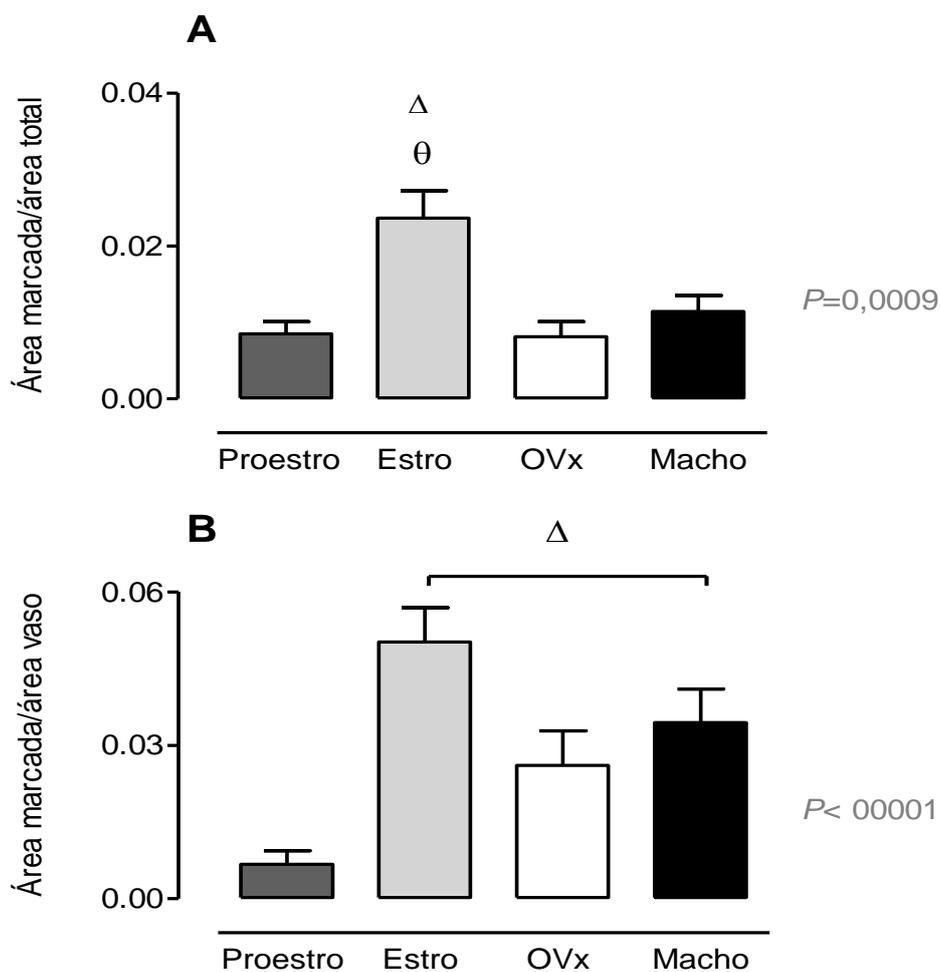


Figura 17: Análise Imuno-histoquímica da expressão proteica de ICAM-1 e VCAM-1 no pulmão. Análise da expressão proteica por Imuno-histoquímica de (A) ICAM-1 e (B) VCAM-1 em tecido pulmonar de animais após 6 h de morte encefálica. Os dados representam a média \pm EPM da fração de área marcada em 5 áreas de 2 cortes de tecido pulmonar por animal e 4 animais por grupo. ^Δ $P < 0,05$ em relação ao proestro; ^θ $P < 0,05$ em relação a Ov. **Fotomicrografias 7.6**

4.7.4 Determinação da atividade e da expressão de mieloperoxidase no pulmão

Para avaliar a presença/ativação de neutrófilos no pulmão, quantificamos a atividade de mieloperoxidase e sua expressão. Decorridos 6 h da indução da morte encefálica, não observamos diferenças entre os grupos na atividade de mieloperoxidase no pulmão (Figura 18A).

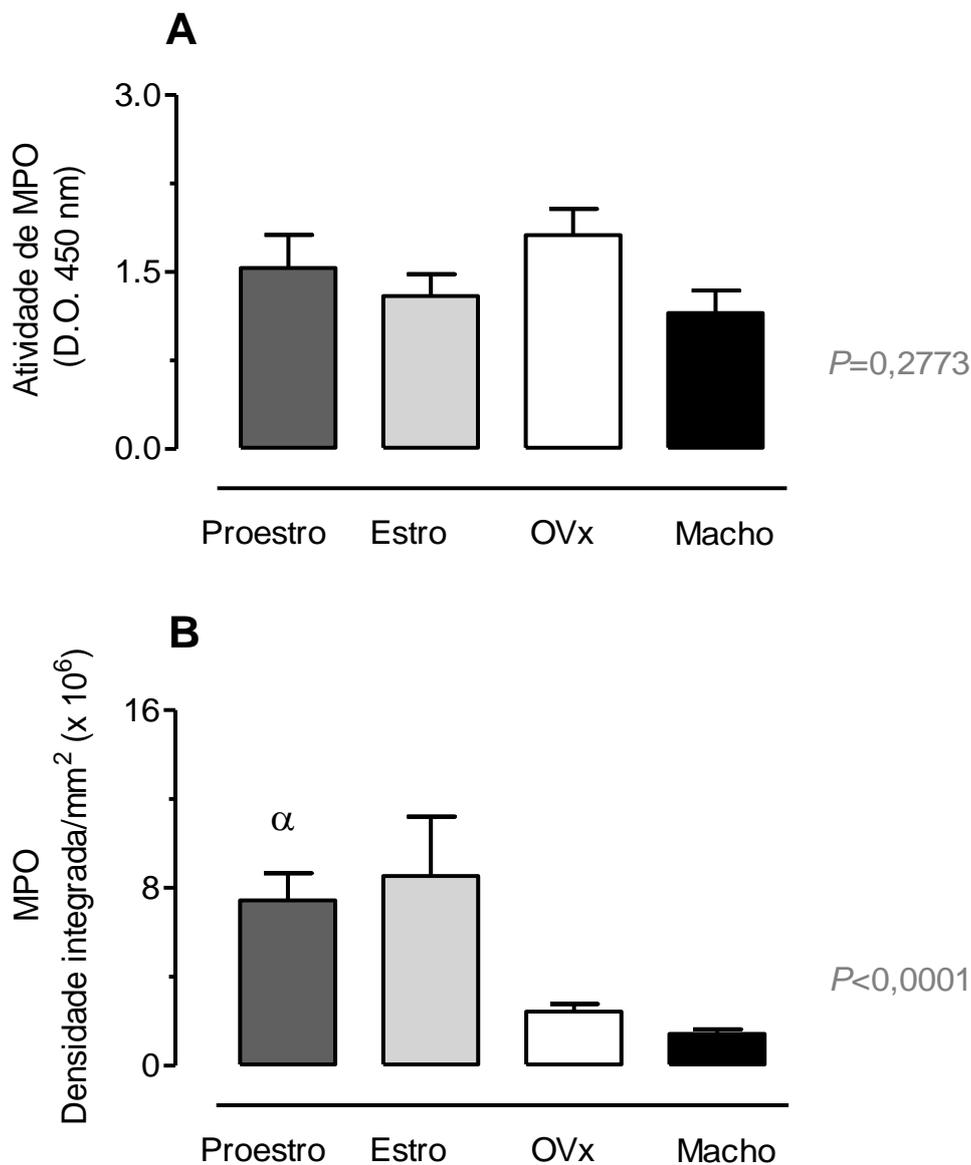


Figura 18: Determinação da atividade e da expressão de mieloperoxidase no pulmão. Diferenças entre os gêneros na atividade (A) e na expressão (B) de mieloperoxidase no pulmão após 6 h de morte encefálica. Em: (A) os dados representam a média \pm EPM de 5 animais e

(B) Imuno-histoquímica em 2 cortes de tecido pulmonar por animal e 5 animais por grupo. $^{\circ}P < 0,05$ em relação aos grupos Ovx e Macho. **Fotomicrografias anexo 7.7.**

4.7.5 Diferença entre os gêneros na liberação de mediadores inflamatórios pelo pulmão após a morte encefálica

Na Tabela 6 são mostrados os dados obtidos no ensaio de quantificação de mediadores inflamatórios presentes no meio de cultura do explante pulmonar. O explante é uma técnica que permite quantificar mediadores sintetizados localmente em concentrações maiores quando comparado com a técnica do homogenato tecidual. O tecido/órgão continua viável e liberando mediadores durante o período de cultivo.

Os dados obtidos não evidenciaram diferenças significativas nas comparações entre os grupos na maioria dos mediadores quantificados.

Tabela 6: Concentrações de fatores de crescimento, quimiocinas e citocinas no pulmão (Explante).

	<i>PROESTRO</i>	<i>ESTRO</i>	<i>OVX</i>	<i>MACHO</i>	<i>P</i>
Fatores de crescimento					
<i>G-CSF</i>	0,235 ± 0,1	0,099 ± 0,02	0,115 ± 0,04	0,07 ± 0,02	0,0703
<i>VEGF</i>	2800 ± 721,1	1644 ± 440,2	2014 ± 301,3	1590 ± 270	0,3032
Quimiocinas					
<i>CINC-1</i>	1204 ± 272,1	572,5 ± 254,9	1147±210,5	555 ± 71,7	0,0748
<i>MIP-1α</i>	246 ± 63,9	85,8 ± 25,5	115,5± 19,2	113,8 ± 24,4	0,0518
<i>MIP-2</i>	719,2 ± 299,4	310,7 ± 185,3	797,7±262,2	454,7±179,8	0,3159
<i>MCP-1</i>	2255 ± 645,9	1984 ±755,9	1161±246,8	1378± 438,3	0,5962
<i>Fractalcina</i>	22,5 ± 3,8	12,13 ± 2,3	14,4 ± 3,2	18,01 ± 3,1	0,2068
Citocinas					
<i>IL-1β</i>	86,53 ± 16,8	54,53 ± 12,1	47,0 ± 8,9	60,5 ± 15,3	0,8629
<i>IL-6</i>	26936±4881	36412 ± 7394	52456 ± 11273	51153 ± 5868	0,1072
<i>IL-10</i>	32,4 ± 16,7	26,3 ± 12,4	63,8 ± 23,3	37,9 ± 6,5	0,4737
<i>IL-18</i>	360,1 ± 75,9	170,6 ± 26,6	211,6 ± 43,4	246,3 ± 98	0,3316
<i>TNF-α</i>	7,3 ± 2,0	3,3 ± 1,9	3,58 ± 1,0	2,09 ± 0,5	0,2719
<i>INF-γ</i>	113,2 ± 54,7	59,7 ± 27	17,29 ± 3,5	29,0 ± 7,9	0,4499

Os dados representam a média \pm EPM de 5-7 animais.

4.7.6 Avaliação das expressões gênica e proteica das isoformas da sintases de óxido nítrico (iNOS e eNOS) e da ET-1 no pulmão

Com o objetivo de aprofundar os estudos acerca do papel do óxido nítrico na inflamação pulmonar gerada pela morte encefálica e sua geração pelas diferentes isoformas enzimáticas, analisamos a expressão proteica e gênica das sintases de óxido nítrico no pulmão.

Na Figura 19A podemos observar os dados da análise da expressão proteica da iNOS. Os resultados não mostraram diferenças entre os grupos. Em relação à expressão gênica de iNOS (Figura 19B), os resultados mostraram que todos os grupos apresentaram um aumento na expressão do gene da iNOS, uma vez que a expressão relativa aos animais controle se encontra acima de 1 em todos os grupos.

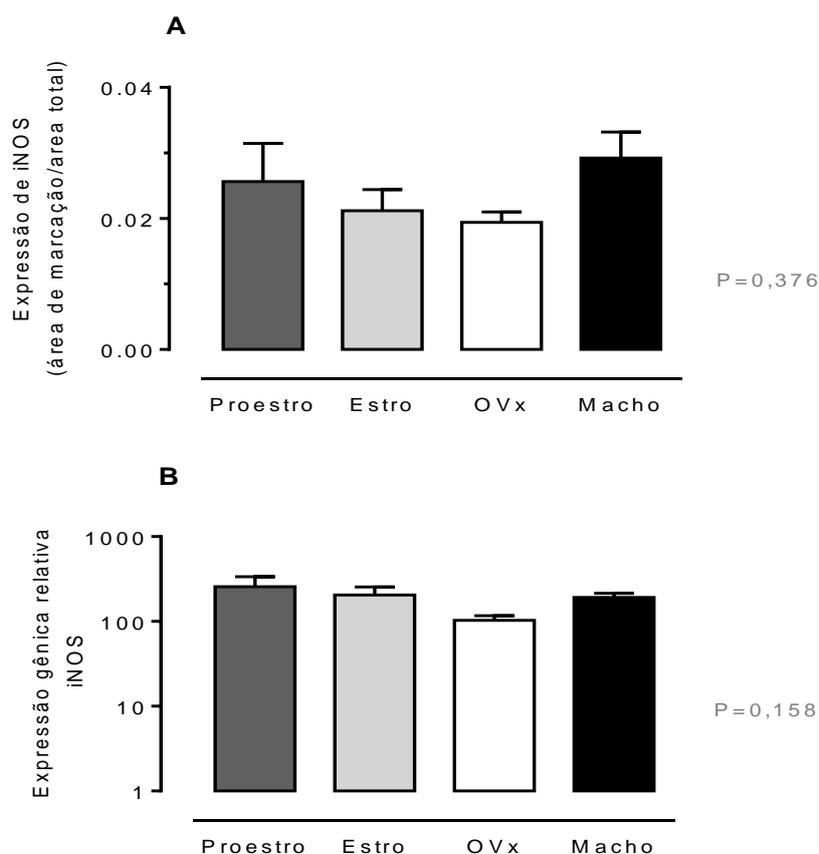


Figura 19: Avaliação da expressão gênica e proteica das isoformas da sintase de óxido nítrico (iNOS e eNOS) e da ET-1 no pulmão. Em (A) expressão proteica de iNOS e expressão gênica de iNOS por RT-PCR

(B) em tecido pulmonar de animais após 6 h de morte encefálica. Em (A) os dados representam a média \pm EPM fração da área marcada em 5 áreas de 2 cortes de tecido pulmonar por animal e 4 animais por grupo. Em (B) os dados representam a expressão gênica em relação aos valores obtidos em animais com as mesmas características (proestro, estro, Ovx e machos) não submetidos a morte encefálica.
Fotomicrografias anexo 7.8a

Nas Figuras 20A podemos observar os dados da análise Imuno-histoquímica da eNOS. Os resultados mostraram que não houve diferenças entre os grupos na expressão de eNOS nos vasos pulmonares. Também não encontramos diferenças na expressão gênica desta enzima entre os grupos, porém observamos que houve *downregulation* do gene da eNOS nos animais ovariectomizados e *up regulation* nos demais grupos (Figura 20B).

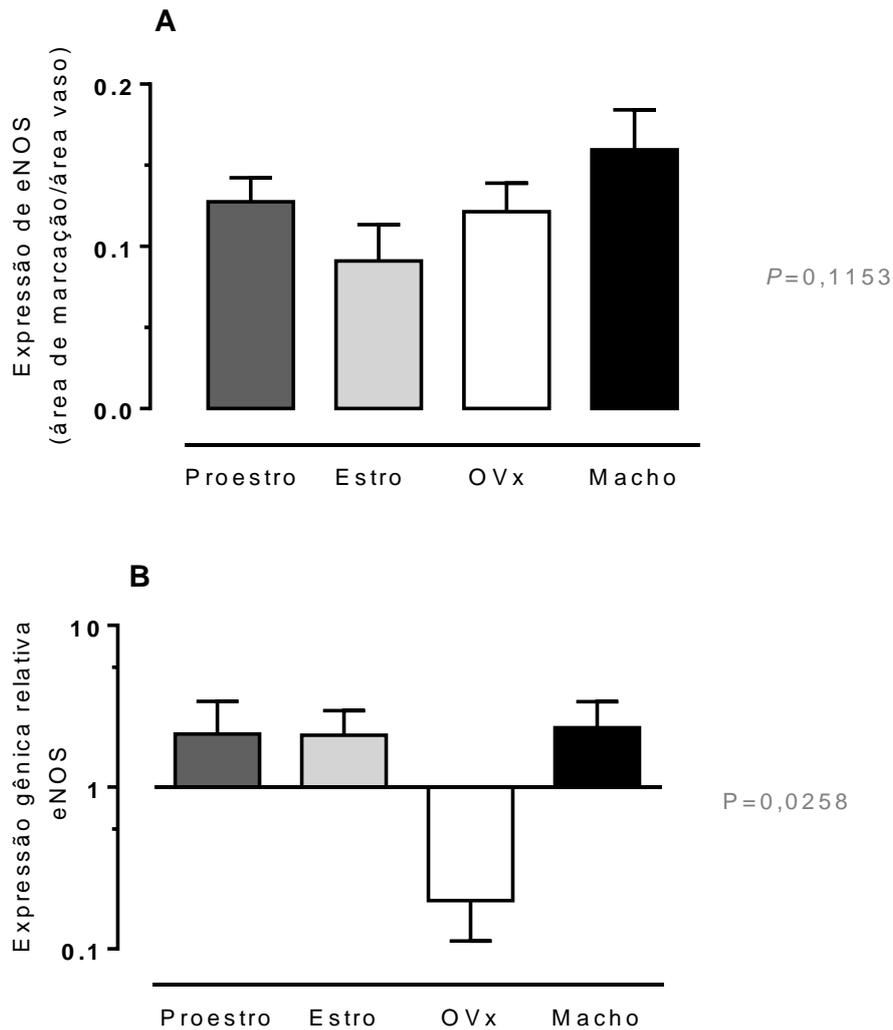


Figura 20: Avaliação das expressões proteica e gênica da eNOS no pulmão. Em (A) análise Imuno-histoquímica da expressão proteica de em (B) avaliação da expressão gênica de eNOS por RT-PCR no pulmonar de animais após 6 h de morte encefálica. Em (A), os dados representam a média \pm EPM fração da área marcada em 5 áreas de 2 cortes de tecido pulmonar por animal e 4 animais por grupo. Em (B), os dados representam a expressão gênica em relação aos valores obtidos em animais com as mesmas características (proestro, estro, OVx e machos) não submetidos a morte encefálica. **Fotomicrografias anexo 7.8b**

Avaliamos também a expressão proteica e gênica da ET-1 no tecido pulmonar. Na Figura 21A podemos observar os dados da análise Imuno-histoquímica da ET-1. Os resultados mostraram aumento significativo no grupo Estro em relação ao grupo Proestro e do grupo OVx em relação aos grupos Macho e Proestro. Em relação à expressão gênica de ET-1 (Figura 21B), não houve diferenças entre os grupos.

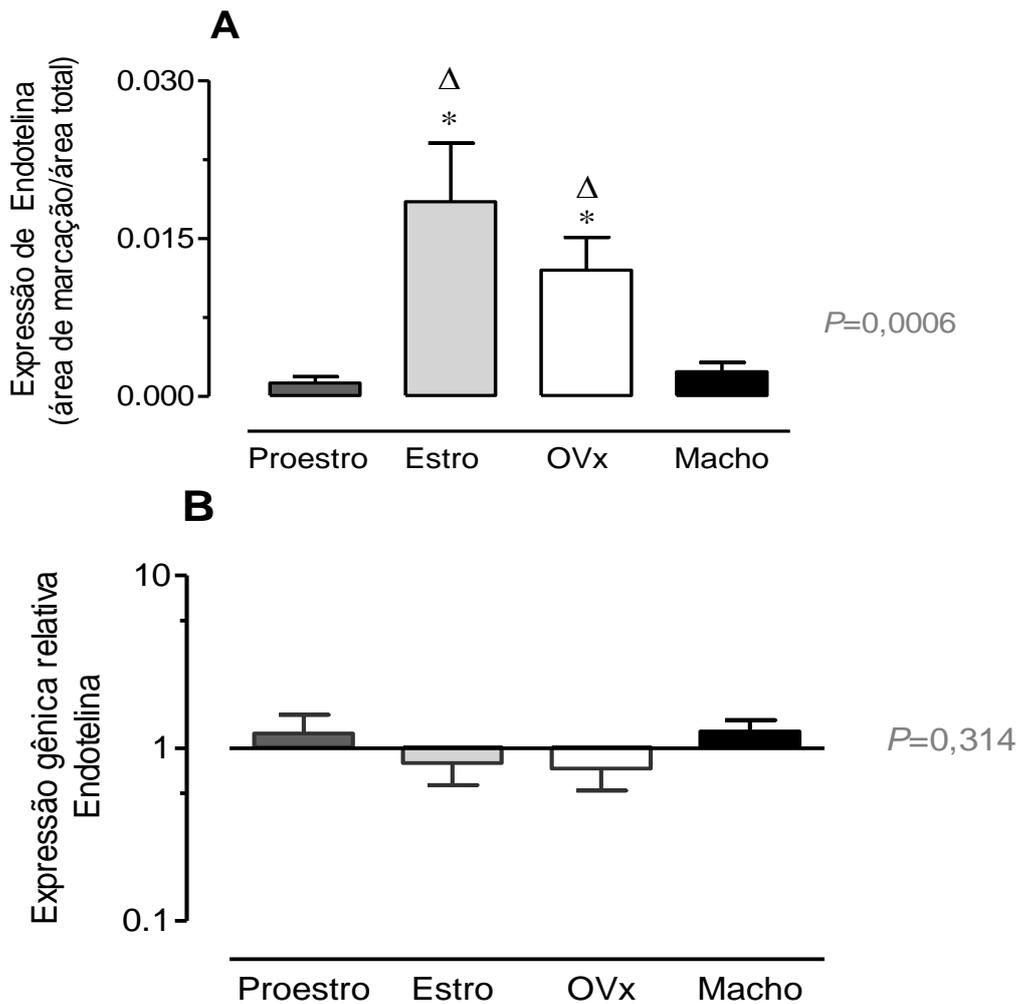


Figura 21: Avaliação das expressões proteica e gênica da ET-1 no pulmão. Em (A), os dados representam a média \pm EPM da fração de área marcada em 5 áreas de 2 cortes de tecido pulmonar por animal e 4 animais por grupo. Em (B), os dados representam a média \pm EPM da expressão gênica de 6 animais em relação aos valores obtidos em animais com as mesmas características (proestro, estro, Ovx e machos) não submetidos a morte encefálica. * $p < 0,05$ em relação ao Macho; $^{\Delta}p < 0,05$ em relação ao Proestro. **Fotomicrografias anexo 7.8c**

5. DISCUSSÃO

Os dados apresentados neste estudo evidenciam importantes diferenças entre os gêneros nas alterações microcirculatórias e na resposta inflamatória após a morte encefálica em ratos. 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). Em estudo anterior com o modelo de morte encefálica, observamos maior inflamação no pulmão de fêmeas em comparação aos machos, caracterizada por maior infiltrado inflamatório, aumento da permeabilidade vascular e liberação local e sistêmica de VEGF (Breithaupt-Faloppa *et al.*, 2016). Paralelamente, após a indução da morte encefálica, evidenciamos redução rápida nas concentrações séricas dos hormônios sexuais femininos, o que pode influenciar o desenvolvimento do processo inflamatório sistêmico e afetar órgãos como coração e pulmão (Simão *et al.*, 2016).

Neste trabalho, com o objetivo de ampliar a compreensão acerca da influência da concentração dos hormônios sexuais femininos na resposta à morte encefálica, separamos grupos de ratas fêmeas de acordo com as fases do ciclo estral, comparando-as a ratos machos. Conforme mencionado anteriormente, as fases do ciclo estral estão diretamente relacionadas à flutuação dos níveis dos hormônios sexuais femininos, estradiol e progesterona (Figura 1). Os dados apresentados apontam para aumento da inflamação no grupo de fêmeas na fase de estro após 6 horas de morte encefálica, caracterizado por maior infiltrado celular nos pulmões e no intestino e aumento na expressão de moléculas de adesão endotelial.

Os hormônios sexuais femininos exercem importante papel modulador da resposta orgânica ao trauma e muitos estudos apontam para seu papel protetor (Zaets *et al.*, 2004; Deitch *et al.*, 2007; Trentzsch *et al.*, 2014). O modelo de morte encefálica tem como consequência a redução aguda desses e de outros hormônios (Howlet *et al.*, 1989; Simas *et al.*, 2012; Breithaupt-Faloppa *et al.*, 2016). A fase de proestro é caracterizada por altas

concentrações iniciais de estradiol, enquanto que na fase de estro as concentrações de estradiol são reduzidas. Em relação à progesterona, durante o proestro, a partir de valores baixos, inicia-se a elevação das concentrações após o pico de estradiol e maiores concentrações são atingidas no final do período. Durante o estro, as concentrações de progesterona mantêm-se em valores intermediários que aumentam no final desta fase (Spornitz *et al.*, 1999).

Após 6 h de morte encefálica as fêmeas apresentaram redução significativa de estradiol e de progesterona. Existem importantes interações dos sistemas imune e endócrino e, em doadores potenciais com morte encefálica, deve-se levar em consideração que as alterações endócrinas se seguem à perda do controle hipotalâmico (Ranasinghe *et al.*, 2011). Neste sentido, a redução aguda dos hormônios sexuais femininos reveste-se de importância, podendo interferir nas alterações microcirculatórias, no controle do fluxo de células e síntese de mediadores inflamatórios.

Os mecanismos envolvidos nas alterações dos órgãos após a morte encefálica incluem instabilidade hemodinâmica, mudanças hormonais e alterações da resposta imune com liberação de citocinas e expressão de moléculas de adesão (Skrabal *et al.*, 2005). Estudos relatam que a instabilidade hemodinâmica resulta da hipovolemia e da hipotensão neurogênica, causadas pela morte encefálica e que há transição do metabolismo aeróbio para o anaeróbio, contribuindo para a hipotensão e a deterioração dos órgãos (Bugge *et al.*, 2009; Novitzky *et al.*, 1988). Nosso estudo está baseado em um modelo padronizado no qual a morte encefálica é induzida pelo rápido aumento da pressão intracraniana. Os resultados indicaram que a insuflação rápida do cateter resultou em crise hipertensiva transitória, seguida de período de hipotensão. Neste contexto, é importante ressaltar que não houve diferenças hemodinâmicas entre machos e fêmeas.

Visto que, um dos pré-requisitos para a adequada oxigenação dos tecidos e preservação da função do órgão é a manutenção da integridade da microcirculação (Ince *et al.*, 2005), trabalhos publicados pelo grupo avaliaram as alterações microcirculatórias geradas pela morte encefálica (Simas *et al.*, 2012a). Estes estudos evidenciaram que a morte encefálica induz hipoperfusão imediata e persistente da microcirculação mesentérica, causando inflamação

local em diferentes órgãos (Simas *et al.*, 2012a; Simas *et al.*, 2012b). Nossos dados confirmaram esse achado, porém as ratas em proestro (com elevados níveis de estradiol/progesterona) não apresentaram hipoperfusão e ratas em estro mantiveram o fluxo sanguíneo mesentérico, indicando possível influência dos hormônios femininos no controle vascular após a morte encefálica. Não houve diferenças entre os grupos de fêmeas em relação à perfusão e ao fluxo. A manutenção da perfusão e do fluxo sanguíneo microcirculatório nas fêmeas é consistente com os efeitos cardiovasculares conhecidos do estradiol (Yu *et al.*, 2007) e seu papel na vasodilatação e na melhora da perfusão em modelos de trauma/sepsis (Kuebler *et al.*, 2003; Sharawy *et al.*, 2013). Conforme mencionado, os grupos proestro e estro consistiam de ratas no pico de estradiol ou logo após o pico no momento em que a morte encefálica foi induzida. A preservação de perfusão adequada em órgãos durante fases de alta concentração de estradiol já foi observada em outros modelos (Deitch *et al.*, 2008; Capone *et al.*, 2009). Neste sentido, a manutenção da perfusão pode ser resultante do estado hormonal no momento da indução da morte encefálica e não ser afetada pela redução aguda dos hormônios. Não é possível afirmar se essa redução, ao longo de períodos mais longos, levaria a um quadro de hipoperfusão tardio.

O endotélio exerce papel importante na regulação do diâmetro dos vasos, a partir da liberação de óxido nítrico, prostanoídes vasoconstritores e peptídeos vasoativos e da indução de hiperpolarização dependente do endotélio (Sandoo *et al.*, 2010). Com o objetivo de compreender as diferenças entre os gêneros encontradas na perfusão da microcirculação, nós avaliamos a expressão vascular e gênica de eNOS e de endotelina no mesentério. Dados da literatura indicam que a liberação de substâncias vasodilatadoras, como o óxido nítrico e a prostaciclina, é estimulada pelo estradiol (Orshal *et al.*, 2004), enquanto que a vasoconstrição induzida pela endotelina é reduzida (Yokoyama *et al.*, 2003; Dubey *et al.*, 2001). A eNOS exerce importante papel protetor, regulando o tônus e a integridade vascular (Wu *et al.*, 2002). Laughlin *et al.* (2003) evidenciaram diferenças entre os gêneros na expressão e na ativação da eNOS, com maior expressão nos animais do sexo feminino. Há também evidência de que o tratamento com 17 β -estradiol aumente a expressão proteica

e a atividade de eNOS (Resta *et al.*, 2001), bem como o mRNA (Kleinert *et al.*, 1998). A progesterona também participa da regulação da síntese de NO pelas células endoteliais, compartilhando as mesmas vias do estradiol, incluindo a ativação de PI3K/Akt and MAP kinase (Pang *et al.*, 2015). Nossos dados evidenciaram maior expressão proteica de eNOS nos vasos mesentéricos em grupos de ratas em comparação com os ratos, independentemente da concentração hormonal. Esta diferença pode indicar que apesar da redução de estradiol após a morte encefálica e, mesmo, nas ratas previamente ovariectomizadas, a síntese de NO pelo endotélio em fêmeas possa ser mantida e influenciar positivamente a perfusão. Paralelamente, os resultados evidenciaram aumento da expressão gênica relativa de eNOS em machos e em fêmeas ovariectomizadas em relação às fêmeas dos grupos estro e proestro. Estes dados apontam para o aumento na sinalização para síntese de eNOS nesses grupos.

Em relação à expressão de ET-1 no mesentério, nossos dados apontam para maior presença de ET-1 no mesentério das fêmeas em relação aos machos, destaque para as fêmeas em proestro que diferem dos grupos estro e Ovx. Os efeitos vasoativos da endotelina-1 podem ser influenciados pelo estradiol, são órgão dependentes (Ba *et al.*, 2009), sendo o estradiol e seus metabólitos inibidores da síntese de endotelina-1 (Akishita *et al.*, 1996; Dubey *et al.*, 2001). Como as fêmeas, após a morte encefálica, apresentam redução aguda de estradiol e a síntese de endotelina-1 pode ser induzida em minutos, podemos sugerir a existência de uma relação direta entre a redução do estradiol e o aumento da expressão de endotelina-1 nos vasos do mesentério. A expressão gênica relativa de endotelina-1 no mesentério aumentou, mas não diferiu entre os grupos. É importante ressaltar, que a endotelina-1 contribui com o desenvolvimento da inflamação, induzindo a expressão de moléculas de adesão e favorecendo a agregação de neutrófilos (Kowalczyk *et al.*, 2015). Tomados em conjunto, os dados referentes à eNOS e à endotelina-1 apontam para a importância da eNOS no controle da perfusão mesentérica após a morte encefálica e para a possível participação da endotelina na indução da inflamação.

Em relação à avaliação da inflamação na região esplâncnica os resultados, em conjunto, apontam para maior quadro inflamatório nas fêmeas em estro após 6 h de morte encefálica. Os grupos de fêmeas apresentaram maior infiltrado leucocitário no tecido intestinal comparados aos machos, com o grupo estro apresentando maior expressão de ICAM-1 e atividade de mieloperoxidase. O aumento da atividade de mieloperoxidase no intestino das fêmeas em estro corrobora para a confirmação do quadro inflamatório, uma vez que a presença de mieloperoxidase indica indiretamente a maior presença/ativação de neutrófilos no tecido (Reumaux *et al.*, 2003). Ainda, a expressão de ICAM-1 indica ativação endotelial (Liao, 2013) e facilita o recrutamento de células inflamatórias para os tecidos (Ala *et al.*, 2003). A morte encefálica está associada a um quadro de inflamação sistêmica, no qual a mobilização leucocitária para os principais órgãos e a liberação de mediadores inflamatórios se destacam (Watts *et al.*, 2013). Neste contexto, o quadro inflamatório intestinal pode, paralelamente à geração de mediadores inflamatórios, permitir a exposição sistêmica a endotoxinas que contribuem para a exacerbação da resposta (Adrie *et al.*, 2010)

Em estudo anterior evidenciou-se que ratos machos submetidos à morte encefálica apresentaram importante leucopenia (Simas *et al.*, 2012a). Nossos dados confirmaram a leucopenia nos machos, porém a avaliação da celularidade sanguínea nas fêmeas mostrou que estas não apresentaram redução no número de leucócitos circulantes. Simultaneamente, observamos redução significativa nas contagens totais das células da medula óssea no grupo estro em relação aos machos. O estradiol exerce influência na medula óssea, promovendo maior divisão celular das células tronco-hematopoiéticas (Nakada *et al.*, 2014). Além disso, Illing e colaboradores (2012) relatam que o estradiol induz a retenção das células hematopoiéticas no nicho vascular da medula óssea, podendo também influenciar sua mobilização. A mobilização de leucócitos da medula óssea para o sangue é um evento chave para a resposta inflamatória e, neste contexto, a manutenção de maior número de células circulantes nas fêmeas pode contribuir para maior inflamação.

Após a morte encefálica há ativação da coagulação e agregação plaquetária. A coagulopatia é uma complicação comum nos doadores de

órgãos, cujos mecanismos sugeridos são a liberação maciça de tromboplastina pelo encéfalo após o trauma (Lustenberger *et al.*, 2010) e a fibrinólise reduzida (Lisman *et al.*, 2011). Não observamos diferenças entre os grupos no número de plaquetas no sangue, porém houve redução deste número após 6 h de morte encefálica, o que pode ser resultado do estado pró-coagulante, levando à formação de microtrombos e à adesão de plaquetas ao endotélio.

Resultados experimentais mostram que a morte encefálica leva a aumento significativo de mediadores inflamatórios imediatamente após sua indução (Barklin *et al.*, 2009; Takada 1998). Por outro lado, Damman (2011) mostrou que IL-1 β e TNF- α não mudaram significativamente ao longo do período de observação após a morte encefálica. Estudo clínico também analisou os níveis séricos de mediadores inflamatórios em doadores em morte encefálica e não evidenciou alterações significativas (Cypel *et al.*, 2011). Dados de trabalhos anteriores, realizados por nosso grupo, utilizando o modelo de morte encefálica em ratos machos, não evidenciou alteração nos mediadores inflamatórios: IL-1 β , TNF α , IL-6, IL-10, CINC-1 e CINC-2, em comparação com o grupo falso-operado, indicando que a geração de mediadores pode estar primariamente relacionada ao trauma cirúrgico e não propriamente à morte encefálica (Simas *et al.*, 2012a). Em nossos dados, dentre o painel de mediadores analisados, observamos o aumento da concentração sérica de VEGF nas fêmeas em estro, em relação aos machos. Esse dado está em linha com resultados anteriores (Breithaupt-Faloppa *et al.*, 2016), reforçando a importância do VEGF após a morte encefálica em fêmeas. O VEGF exerce influência sobre a migração de células hematopoiéticas para a circulação, aumentando a permeabilidade vascular medular (Bautz *et al.*, 2000). Além disso, é importante fator de crescimento, que não só induz a proliferação de células endoteliais, mas também modula a migração de células endoteliais e aumento da permeabilidade vascular (Keck *et al.*, 1989; Roberts *et al.*, 1995; Dvorak *et al.*, 1995). Portanto, podemos sugerir que o aumento de VEGF, em fêmeas, seja um dos mecanismos envolvidos na mobilização de células e no aumento da permeabilidade vascular.

Com o objetivo de avaliar as repercussões da morte encefálica em órgãos a serem utilizados para transplante, focamos nossas análises nos

pulmões. O transplante de pulmão é tratamento disponível para doenças pulmonares avançadas, porém, mesmo podendo melhorar a qualidade de vida e prolongar a sobrevivência, pode resultar em uma série de complicações e significativa morbidade. O pulmão é um dos órgãos mais afetados pelos efeitos da morte encefálica, podendo apresentar quadro de edema pulmonar neurogênico, em decorrência do aumento massivo da pressão hidrostática capilar causada pela vasoconstrição sistêmica, após a tempestade autonômica (Avlonitis *et al.*, 2003; Avlonitis *et al.*, 2005; Barklin *et al.*, 2009). Além disso, o tecido pulmonar desenvolve quadro inflamatório, com aumento de IL-1 β , IL-2, IL-6 e TNF- α (Takada *et al.*, 1998). Macrófagos alveolares liberam IL-1 β e TNF- α , mediadores envolvidos no desenvolvimento da lesão pulmonar aguda (Lentsch *et al.*, 2001) e participam da ativação das células endoteliais e da expressão de moléculas de adesão, como ICAM-1 e VCAM-1.

A avaliação do pulmão após 6 h de morte encefálica evidenciou aumento significativo no infiltrado leucocitário no grupo estro em relação aos machos, associado ao aumento da expressão das moléculas de adesão ICAM-1 e VCAM-1. Os hormônios sexuais femininos, estradiol e progesterona, são capazes de reduzir a expressão de moléculas de adesão endoteliais como ICAM-1 e VCAM-1 de maneira cumulativa (Hou *et al.*, 2015; Piercy *et al.*, 2002), reduzindo a ativação endotelial e a resposta inflamatória. Neste contexto, uma vez que as fêmeas em estro, no momento da indução da morte encefálica já apresentavam redução fisiológica das concentrações de estradiol e, além disso, perderam agudamente a progesterona, houve exacerbação do processo inflamatório.

Simultaneamente, com o objetivo de analisar características do infiltrado celular encontrado no pulmão, quantificamos a atividade e a expressão da enzima mieloperoxidase. Os dados não evidenciaram diferenças entre os grupos na atividade enzimática, mas a expressão de MPO aumentou no grupo proestro em relação aos machos. Nekrasova e colaboradores (2013) mostraram que os hormônios sexuais femininos são capazes de regular a atividade enzimática dos neutrófilos. Portanto, a perda dos hormônios pode ser capaz de influenciar o estresse oxidativo e a resposta inflamatória gerada após a morte encefálica nas fêmeas.

Além da avaliação do infiltrado leucocitário no pulmão, avaliamos também a presença de hemorragia no parênquima observando-se aumento no grupo das ratas ovariectomizadas. Estudos mostram que a ovariectomia leva à formação de novos vasos e a perda da proteção vascular conferida pelo estrógeno (Glinskii *et al.*, 2007). Estes novos vasos poderiam, portanto, ser mais propensos à lesão e ruptura, levando à hemorragia.

Conforme mencionado, os pulmões após a morte encefálica podem apresentar quadro de edema pulmonar (Novitzky *et al.*, 1987). A partir da análise histológica do parênquima, não observamos diferenças entre os grupos em relação à presença de edema. Por outro lado, a avaliação da permeabilidade microvascular pulmonar evidenciou aumento do extravasamento proteico nos pulmões do grupo proestro em relação aos machos, indicando a possibilidade de haver maior edema nesse grupo. Neste contexto, é provável que nesses animais isto indique presença de edema alveolar e não edema intersticial. Em modelo de isquemia/reperfusão intestinal não há aumento da permeabilidade vascular pulmonar em ratas, porém a castração prévia é capaz de alterar essa resposta, levando ao edema pulmonar. Além disso, o tratamento com estradiol reverte esta situação (Breithaupt-Faloppa *et al.*, 2013). Neste contexto, podemos sugerir que a perda aguda do estradiol nas ratas em proestro exacerbou o componente vascular da resposta inflamatória, favorecendo o edema pulmonar.

Pela quantificação da liberação local de mediadores inflamatórios em amostras de explante pulmonar não encontramos diferenças entre os grupos. Em estudo anterior, evidenciamos diferenças entre fêmeas e machos submetidos à morte encefálica na geração pulmonar de VEGF (Breithaupt-Faloppa *et al.*, 2016). Ainda Simas *et al.*, (2012a) mostraram que o trauma cirúrgico para a indução da morte encefálica neste modelo é capaz de induzir a liberação de mediadores inflamatórios, sendo sua concentração sérica semelhante aos animais falso-operados.

Com o objetivo de ampliar a compreensão sobre os mecanismos envolvidos no processo inflamatório pulmonar após a morte encefálica, avaliamos a expressão gênica e proteica das isoformas da sintase de óxido nítrico (eNOS e iNOS) e da endotelina-1 no tecido pulmonar. A iNOS é a

enzima responsável pela síntese de grandes quantidades de NO na resposta inflamatória e é expressa predominantemente em macrófagos. Sua expressão não é constitutiva e a regulação ocorre tanto no mRNA quanto a nível translacional, dependendo da população de macrófagos (Zamora, *et al.*, 2000). O aumento da expressão relativa de iNOS neste modelo indica ativação do processo inflamatório. Nossos dados mostraram um aumento na expressão do gene da iNOS em todos os grupos, indicando que a morte encefálica ativa a sinalização para a síntese e expressão de iNOS no tecido pulmonar. Em relação às fêmeas, a produção endógena de estradiol exerce importante papel protetor na inflamação aguda reduzindo marcadores específicos como a iNOS (Cuzzocrea *et al.*, 2001) e a progesterona exerce ação semelhante em células do sistema nervoso central, reduzindo a iNOS (Lei *et al.*, 2014). A expressão de iNOS após trauma difere entre os gêneros, sendo 3 a 4 vezes maior em machos do que em fêmeas (Caruso *et al.*, 2003). Em vista disso, podemos sugerir que, com a redução dos hormônios femininos na morte encefálica, a expressão de iNOS estaria aumentada, contribuindo para maior inflamação.

Quando avaliamos a expressão da isoforma constitutiva, houve também aumento na expressão do gene da eNOS, com exceção do grupo Ovx, sugerindo que a redução gradual dos hormônios sexuais femininos ao longo de 10 dias, altere a sinalização em relação a eNOS. Estes dados estão de acordo com a literatura (Breithaupt-Faloppa *et al.*, 2013). Mas é importante ressaltar que, a atuação do estradiol na proteção vascular não se restringe a sinalização para o aumento na expressão de eNOS. O estradiol pode ativar a via de geração do NO e levar ao aumento na sua biodisponibilidade, ativando a eNOS via PI3K/phosphokinase B (PKB/AKT) (Novella *et al.*, 2012).

Adicionalmente, no pulmão, outro elemento a ser considerado é a endotelina 1. O aumento na liberação de endotelina pela circulação pulmonar pode levar a hipertensão, hipoperfusão e lesão (Michel *et al.*, 2003). Ainda, a endotelina-1 induz a geração vascular de espécies reativas do oxigênio via ativação de NADPH oxidase, contribuindo com a inflamação (Romero *et al.*, 2010). Em relação às fêmeas, é importante mencionar que há interação do estradiol com a endotelina-1, interferindo na sua liberação no pulmão e na expressão de seus receptores (Gohar *et al.*, 2016). Nossos dados

evidenciaram maior expressão do gene da endotelina-1 nos animais dos grupos estro e Ovx. Não houve, diferentemente do que se observou no mesentério, aumento no grupo proestro, o que pode indicar diferenças entre a sinalização no pulmão e no mesentério.

Tomados em conjunto, os dados apresentados indicam que o dimorfismo sexual parece desempenhar papel relevante na resposta do organismo à morte encefálica. Além disso, no sexo feminino pode haver influência da fase do ciclo estral para o desencadeamento da resposta inflamatória associada a alterações predominantemente celulares, no estro, ou vasculares, no proestro.

6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, é possível concluir que na presença da morte cerebral em ratos:

- As fêmeas apresentaram um comprometimento menor da perfusão e do fluxo na microcirculação mesentérica, quando comparadas aos animais do sexo masculino, não sendo observadas diferenças importantes com relação à interação leucócito-endotélio.
- A liberação de mediadores inflamatórios sistêmicos e no tecido pulmonar foi semelhante nos grupos estudados, havendo apenas a liberação sistêmica aumentada do VEGF nas fêmeas em fase Estro.
- Houve maior mobilização das células da medula óssea para a circulação nas fêmeas em fase Estro.
- No intestino, as fêmeas na fase Estro apresentaram quadro inflamatório de maior intensidade em comparação aos demais grupos estudados, associado à maior elevação da expressão das moléculas de adesão no mesentério. Houve aumento da permeabilidade vascular no intestino nas fêmeas na fase Proestro.
- No tecido pulmonar, o quadro inflamatório foi mais intenso nas fêmeas na fase Estro, com maior elevação da expressão das moléculas de adesão, quando comparadas aos animais do sexo masculino. Não houve diferença nas expressões gênica e proteica das isoformas das sintases de óxido nítrico com relação ao gênero dos animais. As fêmeas na fase Estro também apresentaram elevação da expressão proteica da endotelina em comparação aos machos e às fêmeas na fase Proestro. Com relação à permeabilidade vascular, houve aumento deste parâmetro nas fêmeas na fase Proestro no tecido pulmonar, quando comparadas aos animais do sexo masculino.

O conjunto de dados gerados por essa pesquisa nos leva a acreditar que a resposta inflamatória em consequência da morte encefálica, difere não só entre os gêneros, mas também depende da fase do ciclo em que a fêmea se encontra no momento de sua indução.

7. ANEXO

7.1 Tabela 7: Gasometria 1A e 1B

Amostras de sangue da artéria carótida foram coletadas 3 e 6 h após a morte encefálica, para determinação dos parâmetros pH, pCO₂, pO₂, HCO₃⁻, BE, sO₂, Na⁺, K⁺, hemoglobina e lactato (Radiometer ABL 555, Radiometer Medical, Copenhagen, Denmark). Os dados avaliados não mostraram diferenças entre os grupos

1A	Estro			Proestro		
	Inicial	3 horas	6 horas	Inicial	3 horas	6 horas
pH	7,5 ± 0,01	7,4 ± 0,04	7,3 ± 0,04	7,4 ± 0,03	7,4 ± 0,03	7,3 ± 0,04
pCO₂ (mmHg)	26,6 ± 1,27	33,9 ± 5,02	36,4 ± 3,72	37,4 ± 10,11	33,0 ± 4,97	34,4 ± 5,25
pO₂ (mmHg)	321,7±17,87	299,3±28,80	286,5±29,61	354,7±25,90	302,9±36,11	251,8±29,89
HCO₃⁻ (mmol/L)	19,0 ± 0,37	18,6 ± 0,88	26,5 ± 10,07	18,7 ± 0,63	17,4 ± 1,00	17,7 ± 0,73
BE (mmol/L)	-4,7 ± 2,16	5,0 ± 0,55	7,5 ± 1,76	1,7 ± 1,02	2,7 ± 1,84	3,5 ± 1,92
sO₂ (%)	99,8 ± 0,01	99,6 ± 0,11	99,5 ± 0,19	99,7 ± 0,14	99,6 ± 0,14	99,6 ± 0,09
K⁺ (mmol/L)	4,3 ± 0,27	4,5 ± 0,25	4,4 ± 0,21	4,1 ± 0,21	4,5 ± 0,24	4,2 ± 0,21
Na⁺ (mmol/L)	147,4 ± 1,08	150,7±1,82	151,6 ± 1,45	147,6 ±1,29	152,4±1,00	155,6±1,55
Hemoglobina (g/dL)	11,2 ± 0,28	9,5 ± 0,38	7,3 ± 0,62	15,3 ± 4,01	8,6 ± 0,25	9,0 ± 0,40
Lactato (mmol/L)	3,6 ± 0,25	1,5 ± 0,20	2,3 ± 0,26	3,5 ± 0,26	1,2 ± 0,13	1,9 ± 0,22

1A- Dados dos grupos: Estro e Proestro; 1B- Dados dos grupos: Ovx e Macho. Os dados representam a média ±EPM de 5-10 animais.

1B	Ovx			Macho		
	Inicial	3 horas	6 horas	Inicial	3 horas	6 horas
pH	7,4 ± 0,03	7,4 ± 0,04	7,3 ± 0,02	7,5 ± 0,02	7,4 ± 0,02	7,3 ± 0,03
pCO ₂ (mmHg)	26,2 ± 1,83	31,6 ± 3,58	34,3 ± 3,80	25,7 ± 1,60	30,0 ± 3,23	32,2 ± 3,30
pO ₂ (mmHg)	317,6±25,60	280,8±41,50	231,6±35,25	355,1±25,60	290,4±52,20	288,9±22,50
HCO ₃ ⁻ (mmol/L)	20,6 ± 0,72	37,7 ± 18,31	37,5 ± 18,68	20,7 ± 1,23	19,3 ± 1,00	17,5 ± 0,94
BE (mmol/L)	0,6 ± 0,92	1,5 ± 1,8	5,5 ± 0,81	0,4 ± 1,07	3,1 ± 1,17	6,4 ± 1,13
sO ₂ (%)	99,9 ± 0,02	99,4 ± 0,31	99,7 ± 0,07	99,8 ± 0,02	99,7 ± 0,10	99,7 ± 0,06
K ⁺ (mmol/L)	5,0 ± 0,47	3,8 ± 0,16	4,0 ± 0,13	4,9 ± 0,53	5,0 ± 0,49	4,4 ± 0,29
Na ⁺ (mmol/L)	146,8 ±1,32	151,3±1,76	151,4±1,08	143,6±1,80	149,8±1,16	151,3±1,49
Hemoglobina g/dL	11,2 ± 0,34	9,7 ± 0,38	7,9 ± 0,54	11,9 ± 0,44	11,8 ± 1,71	8,3 ± 0,74
Lactato (mmol/L)	4,0 ± 0,23	1,8 ± 0,16	1,8 ± 0,11	4,1 ± 0,34	1,8 ± 0,29	2,8 ± 0,95

1B- Dados dos grupos: Ovx e Macho. Os dados representam a média ±EPM de 5-10 animais.

7.2 Avaliação da perfusão na microcirculação mesentérica

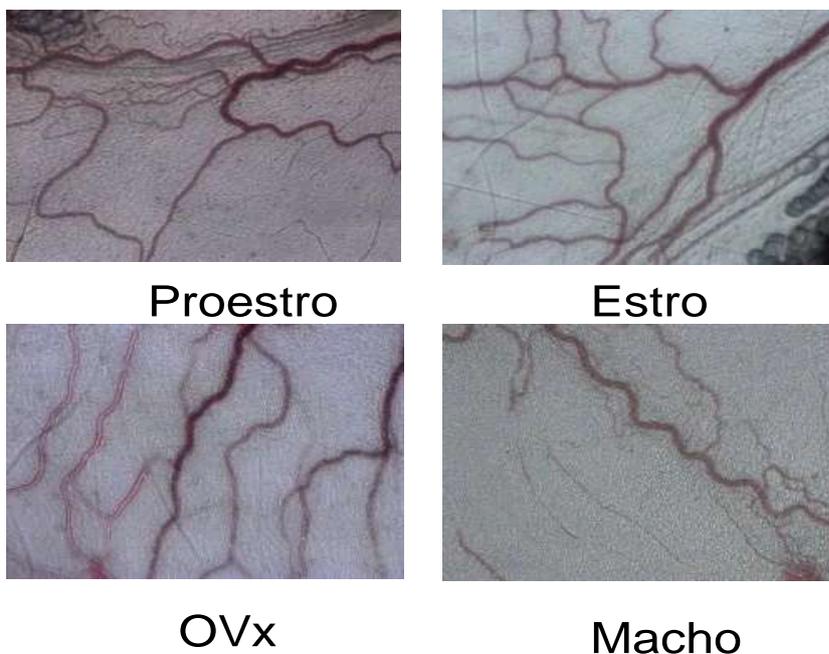


Figura 22: Fotomicrografias da perfusão de microvasos do mesentério após 3 horas da indução da morte encefálica. Os grupos analisados foram: Proestro, Estro, Ovariectomizadas e Macho. Os dados no gráfico acima representam a média ± EPM de 5 animais. No gráfico, *p<0,05 em relação ao grupo de machos

7.3 Avaliação da expressão proteica de eNOS e ET-1 no Mesentério

a) eNOS

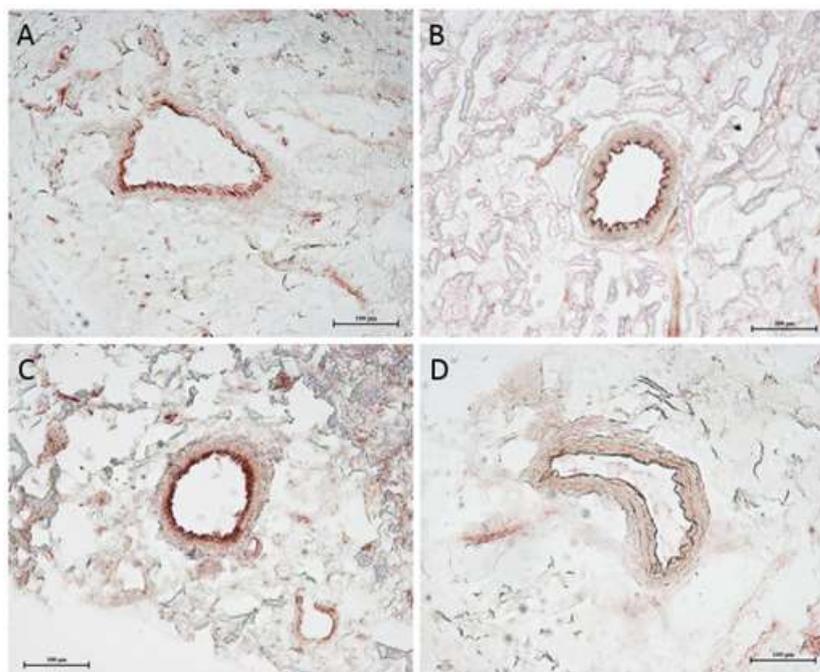


Figura 23: Fotomicrografias de lâminas Imuno-histoquímica de eNOS. Os grupos analisados foram: Proestro (A), estro (B), ovariectomizado (C) e macho (D). Dados representam a média \pm EPM fração da área marcada em 5 áreas de 2 cortes de tecido pulmonar por animal e 4 animais por grupo

b) Endotelina

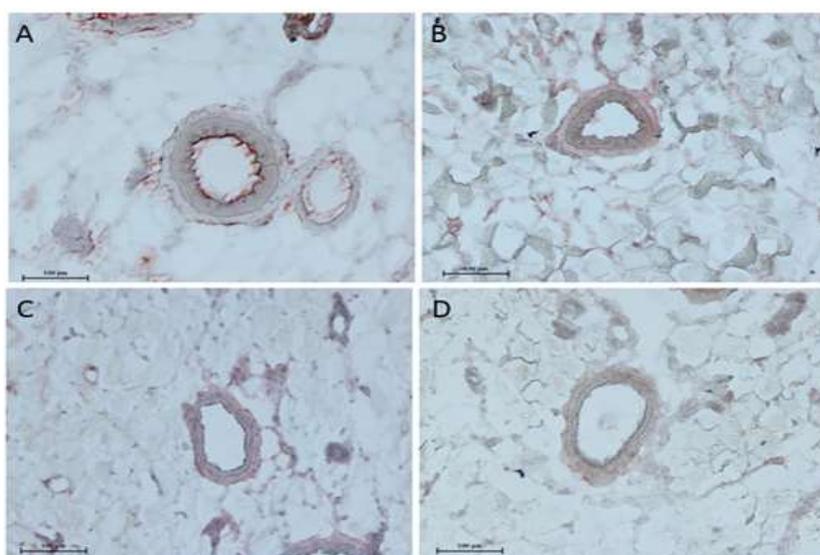


Figura 30: Fotomicrografias de tecido mesentérico após ensaio imunohistoquímico para avaliar a expressão de endotelina. Os grupos

analisados foram: Proestro (A), Estro (B), Ovariectomizadas (C) e Macho (D). Dados representam a média \pm EPM fração da área marcada em 5 áreas de 2 cortes de tecido pulmonar por animal e 4 animais por grupo.

7.4 Determinação da expressão proteica das moléculas de adesão no Mesentério (ICAM-1 e PECAM-1)

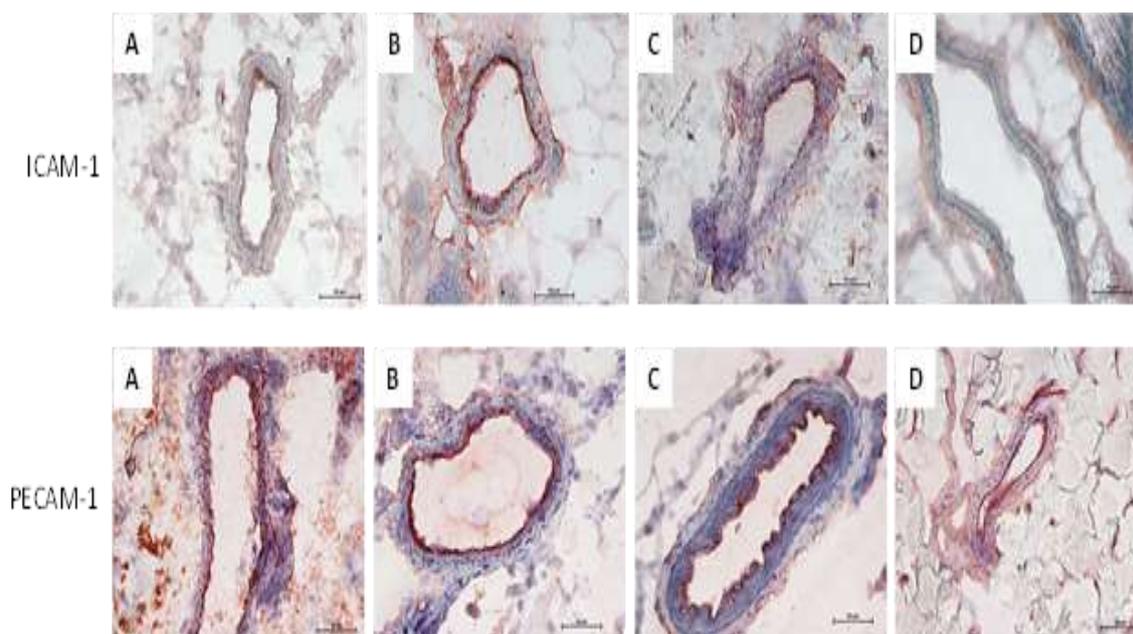


Figura 24: Fotomicrografias de tecido mesentérico após ensaio imunohistoquímico para avaliar a expressão de moléculas de adesão. Os grupos analisados foram: Proestro (A), Estro (B), Ovariectomizado (C) e Macho (D). Dados representam a média \pm EPM fração da área marcada em 5 áreas de 2 cortes de tecido pulmonar por animal e 4 animais por grupo

7.5 Leucograma diferencial

	Total	Linfócitos	Granulócitos	Monócitos
PROESTRO				
Inicial	12773±891,1	6641,7±564,4	5608,3±499,9	483,3±42,3
3 h	14667±2001	4391,7±792,8	10166,7±1633,5†	366,7±67,8
6 h	10992±1293	3900±424,8	8758,3±2554,7	308,3±63,3
ESTRO				
Inicial	11389±457,5	6360±538,4	4470±353,9	380±38,9
3 h	11433±1268	3636±393,9†	7290±1050,8†	460±68,6
6 h	9067±1408	3000±295,5†	4930±1117,8	1080±794
OVX				
Inicial	12488±1053	6900±422,2	5150±915,5	437,5±49,8
3 h	11438±1183	3537±697,4†	7600±1050,2	300±46,3
6 h	12300±1785	3637,5±435,5†	8200±1435,3†	462,5±98,1
MACHO				
Inicial	13475±920	8287,5±769,1	4700±434,2	487,5±39,8
3 h	11075±1097	3687,5±595,4†	7137,5±674,3†	250±26,7
6 h	9588±1174	3400±537,9†	5875±804,8	312,5±76,6

† $p < 0,05$ em relação aos valores iniciais.

7.6 *Determinação da expressão proteica das moléculas de adesão ICAM-1 e VCAM-1 no pulmão figura 12A*

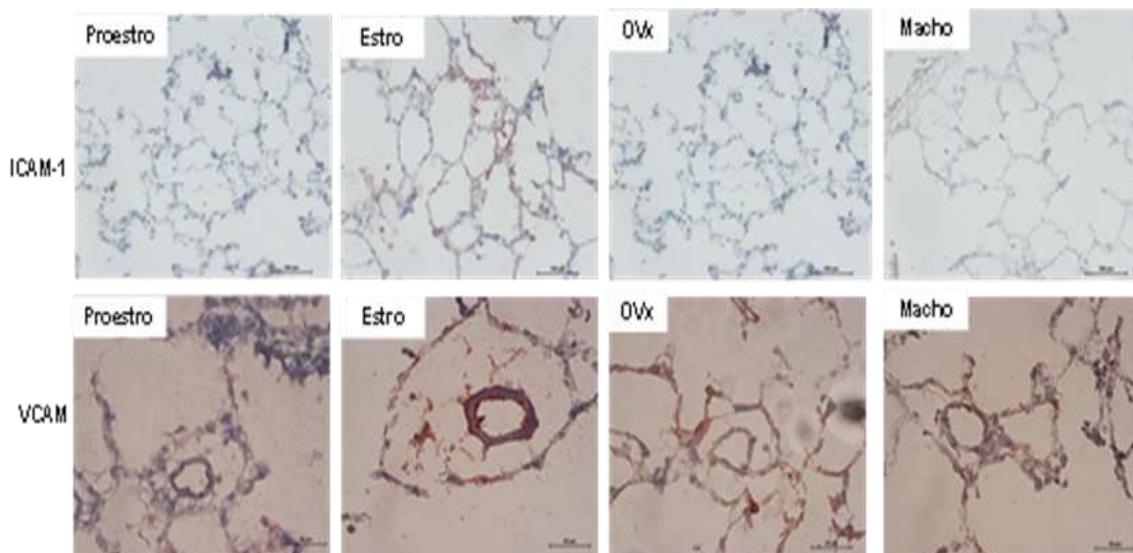


Figura 17A e 17B: Fotomicrografias de tecido pulmonar após ensaio imunohistoquímico para avaliar a expressão de moléculas de adesão. Os grupos analisados foram: Proestro (A), Estro (B), Ovariectomizado (C) e Macho (D). Dados representam a média \pm EPM fração da área marcada em 5 áreas de 2 cortes de tecido pulmonar por animal e 4 animais por grupo.

7.7 *Determinação da expressão de MPO no pulmão*

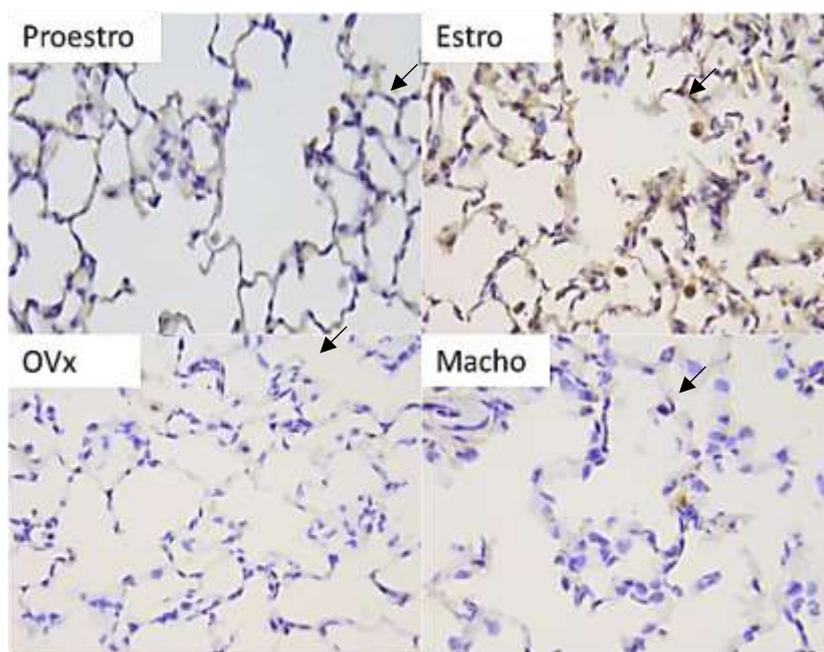


Figura 15B: Fotomicrografias de tecido pulmonar após ensaio imunohistoquímico para avaliar a expressão de MPO. Os grupos analisados

foram: Macho, Estro, Proestro e Ratas ovariectomizadas (ovx). Dados representam a média \pm EPM fração da área marcada em 5 áreas por corte, 2 cortes de tecido pulmonar por animal e 5 animais por grupo.

7.8 *Avaliação da expressão proteica das isoformas de óxido nítrico iNOS figura 18A, eNOS figura 18B e ET-1 figura 18C, medidas realizadas no pulmão.*

a) iNOS

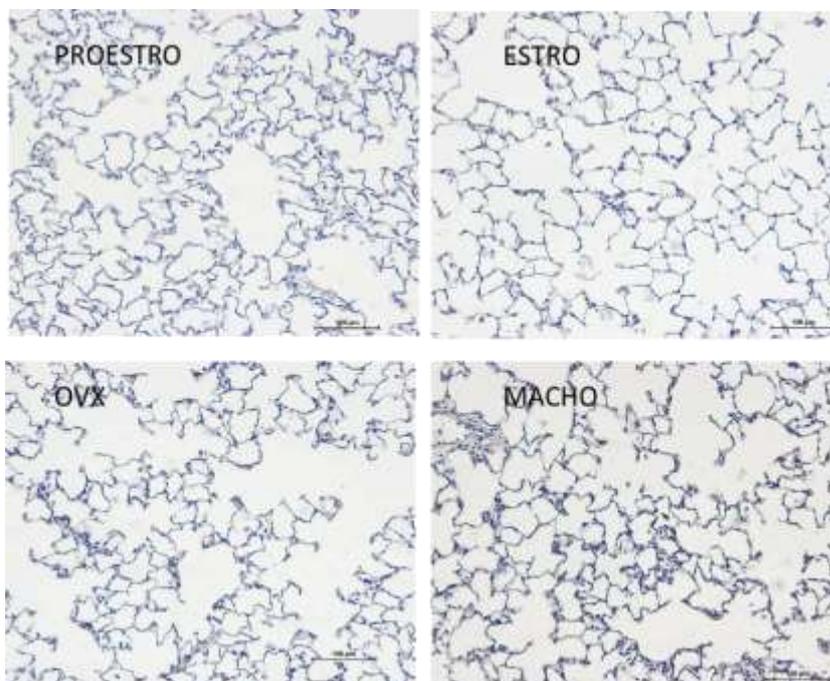


Figura 18A: Fotomicrografias de tecido mesentérico após ensaio imunohistoquímico para avaliar a expressão de iNOS. Os grupos analisados foram: Proestro (A), estro (B), ovariectomizado (C) e macho (D). As setas indicam áreas marcadas. Dados representam a média \pm EPM fração da área marcada em 5 áreas de 2 cortes de tecido pulmonar por animal e 4 animais por grupo

b) eNOS

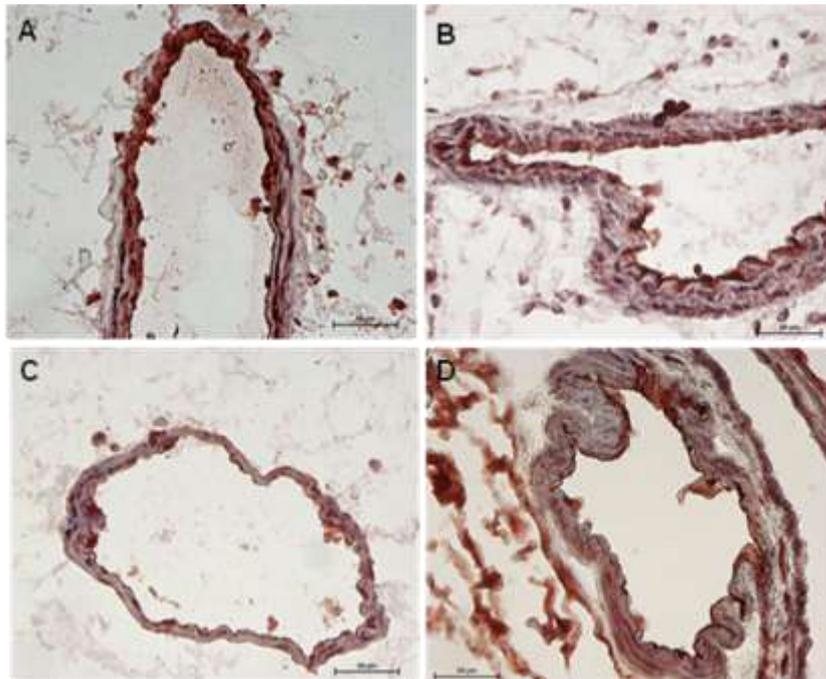


Figura 18B Fotomicrografias de tecido pulmonar após ensaio imunohistoquímico para avaliar a expressão de eNOS. Os grupos analisados foram: Proestro (A), Estro (B), Ovariectomizado (C) e Macho (D). Dados representam a média \pm EPM fração da área marcada em 5 áreas de 2 cortes de tecido pulmonar por animal e 4 animais por grupo.

c) ET-1

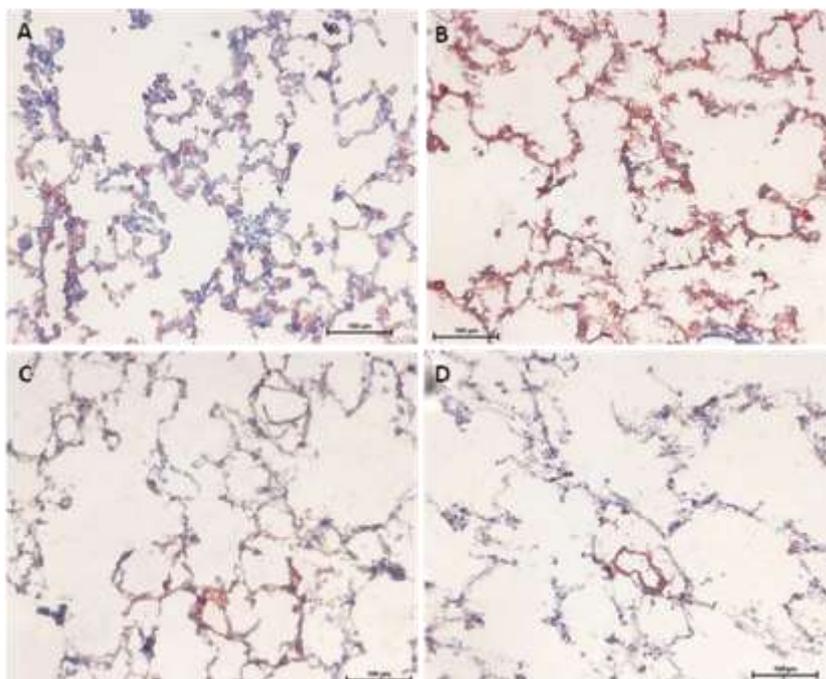


Figura 18C Fotomicrografias de tecido pulmonar após ensaio imunohistoquímico para avaliar a expressão de ET-1. Os grupos analisados

foram: Proestro (A), Estro (B), Ovariectomizado (C) e Macho (D). Dados representam a média \pm EPM fração da área marcada em 5 áreas de 2 cortes de tecido pulmonar por animal e 4 animais por grupo.

8. REFERENCIA

Ackerman LS. Sex hormones and the genesis of autoimmunity. *Arch Dermatol*. 2006; 142(3):371-6.

Adrie C, Monchi M, Fulgencio JP, Cottias P, Haouache H, Alvarez-Gonzalvez A, Guerrini P, Cavaillon JM, Adib-Conquy M. Immune status and apoptosis activation during brain death. *Shock*. 2010; 33(4):353-62.

Akishita M, Ouchi Y, Miyoshi H, Orimo A, Kozaki K, Eto M, Ishikawa M, Kim S, Toba K, Orimo H. Estrogen inhibits endothelin-1 production and c-fos gene expression in rat aorta. *Atherosclerosis*. 1996; 125: 27-38.

Alkayed NJ, Harukuni I, Kimes AS, London ED, Traystman RJ, Hurn PD. Gender-linked brain injury in experimental stroke. *Stroke*. 1998; 29(1):159-65.
Al-Khaldi A, Oyer PE, Robbins RC. Outcome analysis of donor gender in heart transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2006; 25(4):461-8.

Angele MK, Frantz MC, Chaudry IH. Gender and sex hormone influence the response to trauma and sepsis - potential therapeutic approaches. *Clinics*. 2006; 61: 479-88.

Angele MK, Schwacha MG, Ayala A, Chaudry IH. Effect of gender and sex hormones on immune responses following shock. *Shock*. 2000; 14:81-90.

Avlonitis V, Wigfield C, Kirby J, Dark J. The hemodynamic mechanism of lung injury and systemic inflammatory response following brain death in the transplant donor. *Am J Transplant*. 2005; 5(4Pt1):684-693.

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.
Barklin A. Systemic inflammation in the brain-dead organ donor. *Acta*

Ba ZF1, Lu A, Shimizu T, Szalay L, Schwacha MG, Rue LW 3rd, Bland KI, Chaudry IH. 17beta-Estradiol modulates vasoconstriction induced by endothelin-1 following trauma-hemorrhage. *Anaesthesiol Scand*. 2009; 53(4):425-35.

Bautz F, Rafii S, Kanz L, Möhle R. Expression and secretion of vascular endothelial growth factor-A by cytokine-stimulated hematopoietic progenitor cells. Possible role in the hematopoietic microenvironment. *Exp Hematol*. 2000; 28(6):700-6.

Becker JB, Arnold AP, Berkley KJ, Blaustein JD, Eckel LA, Hampson E, Herman JP, Marts S, Sadee W, Steiner M, Taylor J, Young E. Strategies and methods for research on sex differences in brain and behavior. *Endocrinology*. 2005; 146(4):1650-73.

Bouman A, Schipper M, Heineman MJ, Faas MM. Gender difference in the non-specific and specific immune response in humans. *Am J Reprod Immunol*. 2004; 52(1):19-26.

Breithaupt-Faloppa AC, Fantozzi ET, de Assis Ramos MM, Vitoretti LB, Couto GK, Lino-dos-Santos-Franco A, Rossoni LV, Oliveira-Filho RM, Vargaftig BB, Tavares-de-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 AC, Ferreira SG, Kudo GK, Armstrong R Jr, Tavares-de-Lima W, da Silva LF, Sannomiya P, Moreira LF. Sex-related differences in lung inflammation after brain death. *J Surg*. 2016; 200(2):714-21.

Bugge JF. Brain death and its implications for management of the potential organ donor. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2009; 53(10):1239-50.

Capone C, Anrather J, Milner TA, Iadecola C. Estrous cycle-dependent neurovascular dysfunction induced by angiotensin II in the mouse neocortex. *Hypertension*. 2009; 54: 302-307.

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

Chaudry IH, Samy TS, Schwacha MG, Wang P, Rue LW, Bland KI. Endocrine targets in experimental shock. *J Trauma*. 2003; 54:118-25.

Chernyshov VP, Vodiannyk MO, Hrekova SP. Effect of female steroid hormones on expression of adhesion molecules by peripheral blood leukocytes. *Fiziol Zh*. 2002; 48(6):46-53.

Cooper DKC, Novitzky D, Wicomb WN. The pathophysiological effects of brain death on potential donor organs, with particular reference to the heart. *Ann Roy Coll Surg*. 1989; 71:261-266.

Curran EM, Berghaus LJ, Verneti NJ, Saporita AJ, Lubahn DB, Estes DM. Natural killer cells express estrogen receptor-alpha and estrogen receptor-beta and can respond to estrogen via a non-estrogen receptor-alpha-mediated pathway. *Cel Immunol*. 2001; 214:12-20.

Cutolo M, Sulli A, Serio B, Accardo S, Mais AT. Estrogens, the immune response and autoimmunity. *Clin Exp Rheumatol*. 1995; 13:217-26.

Cuzzocrea S, Mazzon E, Sautebin L, Serraino I, Dugo L, Calabró G, Caputi AP, Maggi A. The protective role of endogenous estrogens in carrageenan-induced lung injury in the rat. *Mol Med*. 2001; 7(7):478-87.

Cypel M, Kaneda H, Yeung JC, et al. Increased levels of interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α in donor lungs rejected for transplantation. *Journal of Heart and Lung Transplantation*. 2011; 30(4):452–459.

Damman J, Daha MR, Van Son WJ, Leuvenink HG, Ploeg RJ, Seelen MA. Crosstalk between complement and toll-like receptor activation in relation to donor brain death and renal ischemia-reperfusion injury. *American Journal of Transplantation*. 2011; 11(4):660–669.

Deitch EA, Chu H, Xu DZ. Organ blood flow and the central hemodynamic response are better preserved in female, as opposed to the male rats, after trauma-hemorrhagic shock. *J Trauma*. 2008a; 65(3):566-72.

Deitch EA, Feketeova E, Lu Q, Zaets S, Berezina TL, Machiedo GW, Hauser CJ, Livingston DH, Xu DZ. Resistance of the female, as opposed to the male, intestine to I/R-mediated injury is associated with increased resistance to gut-induced distant organ injury. *Shock*. 2008b; 29:78-83.

Deitch EA, Livingston DH, Lavery RF, Monaghan SF, Bongu A, Machiedo GW. Hormonally active women tolerate shock-trauma better than do men: A prospective study of over 4000 trauma patients. *Ann Surg*. 2007; 246:447-53.

Doucet DR, Bonitz RP, Feinman R, Colorado I, Ramanathan M, Feketeova E, Condon M, Machiedo GW, Hauser CJ, Xu DZ, Deitch EA. Estrogenic hormone modulation abrogates changes in red blood cell deformability and neutrophil activation in trauma hemorrhagic shock. *J Trauma*. 2010; 68(1):35-41.

Draijer C, Hylkema MN, Boorsma CE, Klok PA, Robbe P, Timens W, Postma DS, Greene CM, Melgert BN. Sexual maturation protects against development of lung inflammation through estrogen. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2016; 310(2):L166-74.

Dubey RK, Jackson EK, Keller PJ, et al.: Estradiol metabolites inhibit endothelin synthesis by an estrogen receptor-independent mechanism. *Hypertension* 2001, 37:640–644.

Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol*. 1995; 146:1029–1039.

Erlandsson MC, Ohlsson C, Gustafsson JA, Carlsten H. Role of oestrogen receptors alpha and beta in immune organ development and in oestrogen-mediated effects on thymus. *Immunology*. 2001; 103:17-25.

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.

Fish EN. The X-files in immunity: sex-based differences predispose immune responses. *Nature Rev Immunol*. 2008; 8:737-44.

Frink M, Thobe BM, Hsieh YC, Choudhry MA, Schwacha MG, Bland KI, Chaudry IH. 17beta-estradiol inhibits keratinocyte-derived chemokine

production following trauma-hemorrhage. *Am J Physiol. Lung Cel Mol Physiol.* 2007; 292:585-91.

Gavins F, Yilmaz G, Granger DN. The evolving paradigm for blood cell-endothelial cell interactions in the cerebral microcirculation. *Microcirculation.* 2007; 14: 667-81.

Glinskii OV, Abraha TW, Turk JR, Rubin LJ, Huxley VH, Glinsky VV. Microvascular network remodeling in dura mater of ovariectomized pigs: role for angiopoietin-1 in estrogen-dependent control of vascular stability. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007; 293(2):H1131-7.

Gohar EY, Yusuf C, Pollock DM. Ovarian hormones modulate endothelin A and B receptor expression. *Life Sci.* 2016; 159:148-52.

Goldblum SE, Wu KM, Jay M Lung myeloperoxidase as a measure of pulmonary leukostasis in rabbits. *J Appl Physiol.* 1985;59(6):1978-85.

Goldman JM, Murr AS, Cooper RL. The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol.* 2007; 80(2):84-97.

Granger, Dn yr. The microcirculation and inflammation - modulation of leukocyte-endothelial cell-adhesion. *Journal of leukocyte biology.* 1994; 55(5):662 -675.

Grossman CJ. Interactions between the gonadal steroids and the immune system. *Science.* 1985; 227:257-61.

Hibi T, Sageshima J, Molina E, Ciancio G, Nishida S, Chen L, Arosemena L, Mattiazzi A, Guerra G, Kupin W, Tekin A, Selvaggi G, Levi D, Ruiz P, Livingstone As, Roth D, Martin P, Tzakis A, Burke Gw. Predisposing Factors of Diminished Survival in Simultaneous Liver/Kidney Transplantation. *Am J Transplant.* 2012; 12 (11):2966-73.

Hildebrand F, Hubbard WJ, Choudhry MA, Thobe BM, Pape HC, Chaudry IH. Effects of 17beta-estradiol and flutamide on inflammatory response and distant organ damage following trauma-hemorrhage in metestrus females. *J Leukoc Biol.* 2006; 80:759-65.

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: 426-430.

Hou X, Pei F. Estradiol Inhibits Cytokine-Induced Expression of VCAM-1 and ICAM-1 in Cultured Human Endothelial Cells Via AMPK/PPAR α Activation. *Cell Biochem Biophys.* 2015;72(3):709-17.

Howlett TA, Keogh AM, Perry L, Touzel R, Rees LH () Anterior and posterior pituitary function in brain-stem-dead donors. A possible role for hormonal replacement therapy. *Transplantation*. 1989; 47:828-34.

Hurn PD, Macrae IM. Estrogen as a neuroprotectant in stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2000; 20:631-652.

Illing A, Liu P, Ostermay S, et al. Estradiol increases hematopoietic stem and progenitor cells independent of its actions on bone. *Haematologica*. 2012; 97(8):1131-1135.

Ince C. The microcirculation is the motor of sepsis. *Critical Care*. 2005; 9(Suppl 4):S13-S19.

Inoue S, Yamada Y, Kuzuhara K, Ubara Y, Hara S, Ootubo O. Are women privileged organ recipients? *Transplant Proc*. 2002; 34:2775-6.

Kahn D, Gavalier JS, Makowka L, van Thiel DH. Gender of donor influences outcome after orthotopic liver transplantation in adults. *Dig Dis Sci*. 1993; 38:1485-8.

Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, Sanzo K, Warren T, Feder J, Connolly DT. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science*. 1989; 246(4935):1309-12

Kitai JI. Sex differences in adrenal cortical secretion in the rat. *Endocrinology*. 1961; 68:818-24.

Klein SL. The effects of hormones on sex differences in infection: from genes to behavior. *Neurosci Biobehav Rev*. 2000; 24: 627-638.

Kleinert H, Wallerath T, Euchenhofer C, Ihrig-Biedert I, Li H, Förstermann U. Estrogens increase transcription of the human endothelial NO synthase gene: analysis of the transcription factors involved. *Hypertension*. 1998;31: 582-588.

Knöferl MW, Angele MK, Diodato MD, Schwacha MG, Ayala A, Cioffi WG, Bland KI, Chaudry IH. Female sex hormones regulate macrophage function after trauma-hemorrhage and prevent increased death rate from subsequent sepsis. *Ann Surg*. 2002; 235:105-12.

Knöferl MW, Jarrar D, Angele MK, Ayala A, Schwacha MG, Bland KI, Chaudry IH. 17beta-estradiol normalizes immune responses in ovariectomized females after trauma-hemorrhage. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001; 281:1131-8

Koudstaal LG, Hart NA, Berg A, Olinga P, Goor H, Ploeg RJ *et al*. Brain Death Causes Structural and Inflammatory Changes in Donor Intestine. *Transplant Proc* 2005; 37: 448-9.

Kowalczyk A, Kleniewska P, Kolodziejczyk M, Skibska B, Goraca A. The role of endothelin-1 and endothelin receptor antagonists in inflammatory response and sepsis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2015; 63: 41-52.

-
- Kubes P, Granger DN. Leukocyte-endothelial cell interactions evoked by mast cells. *Cardiovasc Res*. 1996; 32: 699-708.
- Kuebler JF, Toth B, Rue LW, 3rd, Wang P, Bland KI, Chaudry IH. Differential fluid regulation during and after soft tissue trauma and hemorrhagic shock in males and proestrus females. *Shock*. 2003; 20:144–8.
- Langer HF, Chavakis T. Leukocyte-endothelial interactions in inflammation. *J Cell Mol Med*. 2009; 13: 1211-20.
- Laughlin MH, Welshons WV, Sturek M, Rush JW, Turk JR, Taylor JA, Judy BM, Henderson KK, Ganjam VK. Gender, exercise training, and eNOS expression in porcine skeletal muscle arteries. *J Appl Physiol* (1985). 2003; 95(1):250-64.
- Lei B, Mace B, Dawson HN, Warner DS, Laskowitz DT, James ML. Anti-inflammatory effects of progesterone in lipopolysaccharide-stimulated BV-2 microglia. *PLoS One*. 2014; 9(7).
- Lentsch AB, Ward PA. Regulation of experimental lung inflammation. *Respir Physiol*. 2001; 128(1):17-22.
- Liao JK. Linking endothelial dysfunction with endothelial cell activation. *The Journal of Clinical Investigation*. 2013; 123(2):540-541.
- Lisman T, Leuvenink HG, Porte RJ, Ploeg RJ. Activation of hemostasis in brain dead organ donors: an observational study. *J Thromb Haemost*. 2011; 9(10):1959-65.
- Lustenberger T, Talving P, Kobayashi L, Barmparas G, Inaba K, Lam L, Branco BC, Demetriades D. Early coagulopathy after isolated severe traumatic brain injury: relationship with hypoperfusion challenged. *J Trauma*. 2010; 69(6):1410-4.
- Marshall VC. Pathophysiology of Brain Death: Effects on Allograft Function. *Transplant Proc*. 2001; 33:845-6.
- Mayadas TN, Cullere X. Neutrophil beta2 integrins: moderators of life or death decisions. *Trends Immunol*. 2005; 26:388-95.
- McKay DB. The role of innate immunity in donor organ procurement. *Semin Immunopathol*. 2011; 33:169–84.
- Meldrum DR. Estrogen increases protective proteins following trauma and hemorrhage. *Am J Physiol Regul, Integ Corp Physiol*. 2006; 290:809-11.
- Michel RP, Langleben D, Dupuis J. The endothelin system in pulmonary hypertension. *Can J Physiol Pharmacol Review*. 2003; 81(6):542-54.

Moeinpour F, Choudhry MA, Kawasaki T, Timares L, Schwacha MG, Bland KI, Chaudry IH. 17beta-estradiol normalizes Toll receptor 4, mitogen activated protein kinases and inflammatory response in epidermal keratinocytes following trauma-hemorrhage. *Molec Immunol*. 2007; 44:3317-23.

Muller WA. Getting Leukocytes to the Site of Inflammation. *Veterinary pathology*. 2013; 50(1):7-22.

Nakada D, et al. Oestrogen increases haematopoietic stem-cell self-renewal in females and during pregnancy. *Nature*. 2014; 505(7484):555–558

Nakagawa NK, Nogueira RA, Correia CJ, Shiwa SR, Cruz JWC, Poli de Figueiredo LF, et al. Leukocyte-endothelium interactions after hemorrhagic shock/reperfusion and cecal ligation/puncture: an intravital microscopic study in rat mesentery. *Shock*. 2006; 26:180-6.

Nekrasova IV, Shirshov SV. Female sex steroid hormones in regulation of neutrophil enzymatic activity. *Dokl Biochem Biophys*. 2013; 453:312-5.

Nijboer WN, Schuurs TA, Hoeven JAB, Leuvenink HGD, Heid JJH, Goor H *et al*. Effects of Brain Death on Stress and Inflammatory Response in the Human Donor Kidney. *Transplant Proc*. 2005; 37:367-9.

Novella S, Dantas AP, Segarra G, Medina P, Hermenegildo C. Vascular Aging in Women: is Estrogen the Fountain of Youth? *Front Physiol*. 2012; 6(3): 165.
Novitzky D, Cooper DK, Morrell D, et al. Change from aerobic to anaerobic metabolism after brain death, and reversal following triiodothyronine therapy. *Transplantation*. 1988; 45: 32-6.

Novitzky D, Wicomb WN, Rose AG, Cooper DK, Reichart B. Pathophysiology of pulmonary edema following experimental brain death in the chacma baboon. *Ann Thorac Surg*. 1987; 43(3):288-9

Novitzky D. Detrimental effects of brain death on the potential organ donor. *Transplant Proceed*. 1997; 29:3770-72.

Oberholzer A, Keel M, Zellweger R, Steckholzer U, Trentz O, Ertel W. Incidence of septic complications and multiple organ failure in severely injured patients is sex specific. *J Trauma*. 2000; 48:932-7.

Oertelt-Prigione S. The influence of sex and gender on the immune response. *Autoimmun Rev*. 2012; 11(6-7):A479-85.

Olsen NJ, Kovacs WJ. Gonadal steroids and immunity. *Endocr. Rev*. 1996; 17:369-84.

Orshal JM, Khalil RA. Gender, sex hormones, and vascular tone. *Am J Physiol*. 2004; 286:R233–R249.

Pennell LM, Galligan CL, Fish EN. Sex affects immunity. *J Autoimmun* 38(2-3):J282-91, 2012.plant. 2002; 21:950-70 port—2003. *J Heart Lung Transplant*. 2003; 22:625-35.

Piercy KT, Donnell RL, Kirkpatrick SS, Timaran CH, Stevens SL, Freeman MB, Goldman MH. Effects of estrogen, progesterone, and combination exposure on interleukin-1 beta-induced expression of VCAM-1, ICAM-1, PECAM, and E-selectin by human female iliac artery endothelial cells. *J Surg Res*. 2002 Jun 15;105(2):215-9.

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

Pratschke J, Wilhelm MJ, Kusaka M, Basker M, Cooper DKC, Hancock WW *et al*. Brain Death and its Influence on Donor Organ Quality and Outcome After Transplantation. *Transplantation*. 1999b; 67(3):343-8. 46.

Pratschke J, Wilhelm MJ, Kusaka M, et al. Accelerated Rejection of Renal Allografts from Brain-Dead Donors. *Annals of Surgery*. 2000; 232(2):263-271.

Pratschke J, Wilhelm MJ, Kusaka M, Hancock WW, Tilney NL. Activation of proinflammatory genes in somatic organs as a consequence of Brain Death. *Transplant Proc*. 1999a; 31:1003-5.

Pratschke J, Wilhelm MJ, Laskowski I, Kusaka M, Beato F, Tullius SG, Neuhaus P, Hancock WW, Tilney NL. Influence of donor brain death on chronic rejection of renal transplants in rats. *J Am Soc Nephrol*. 2001; 12 (11): 2474–81.

Ranasinghe A.M., Bonser R.S. Endocrine changes in brain death and transplantation. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2011; 25 (5):799-812.

Resta TC, Kanagy NL, Walker BR. Estradiol-induced attenuation of pulmonary hypertension is not associated with altered eNOS expression. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001;280(1):L88-97

Reumaux D, de Boer M, Meijer AB, Duthilleul P, Roos D. Expression of myeloperoxidase (MPO) by neutrophils is necessary for their activation by anti-neutrophil cytoplasm autoantibodies (ANCA) against MPO. *J Leukoc Biol*. 2003 Jun;73(6):841-9.

Roberts CW, Walker W, Alexander J. Sex-associated hormones and immunity to protozoan parasites. *Clin Microbiol Rev*. 2001; 14(3):476-88.

Roberts DH, Wain JC, Chang Y, Ginns LC. Donor-recipient gender mismatch in lung transplantation: impact on obliterative bronchiolitis and survival. *J Heart Lung Transplant*. 2004; 23(11):1252-9.

Roberts WG, Palade GE. Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *J Cell Sci.* 1995; 108:2369.

Roelsgaard K, Botker HE, Stodkilde-Jorgensen H, Andreasen F, Jensen SL, Keiding S. Effects of brain death and glucose infusion on hepatic glycogen and blood hormones in the pig. *Hepatology.* 1996; 24(4):871-5.

Romero M, Jiménez R, Sánchez M, López-Sepúlveda R, Zarzuelo A, Tamargo J, Pérez-Vizcaíno F, Duarte J. Vascular superoxide production by endothelin-1 requires Src non-receptor protein tyrosine kinase and MAPK activation. *Atherosclerosis.* 2010; 212(1):78-85.

Rosamond W, Flegal K, Furie K, Go A, Greenlund K, Haase N, Hailpern SM, Ho M, Howard V, Kissela B, Kittner S, Lloyd-Jones D, McDermott M, Meigs J, Moy C, Nichol G, O'Donnell C, Roger V, Sorlie P, Steinberger J, Thom T, Wilson M, Hong Y; American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics-2008 update: a report from the *American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee Circulation.* 2008; 117(4):e25-146.

Rosen SD. Ligands for L-selectin: homing, inflammation, and beyond. *Annu Rev Immunol;* 22:129-56, 2004.

Sanfey H. Gender-specific issues in liver and kidney failure and transplantation: a review. *J Womens Health.* 2005; 14(7):617-26.

Sato M, Gutierrez C, Kaneda H, Liu M, Waddell TK, Keshavjee S. The effect of gender combinations on outcome in human lung transplantation: the International Society of Heart and Lung Transplantation Registry experience. *J Heart Lung Transplant.* 2006; 25(6):634-7.

Schroder J, Kahlke V, Book M, Stuber F. Gender differences in sepsis: genetically determined? *Shock.* 2000; 14:307-10.

Scotland RS, Stables MJ, Madalli S, Watson P, Gilroy DW. Sex differences in resident immune cell phenotype underlie more efficient acute inflammatory responses in female mice. *Blood.* 2011; 118(22):5918-27.

Seale JV, Wood SA, Atkinson HC, Bate E, Lightman SL, Ingram CD, Jessop DS, Harbuz MS. Gonadectomy reverses the sexually diergic patterns of circadian and stress-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in male and female rats. *J Neuroendocrinol.* 2004; 16(6):516-24.

Sharawy N, Ribback S, Al-Banna N, Lehmann C, Kern H, Wendt M, Cerny V, Dombrowski F, Pavlovic D. Estradiol receptors agonists induced effects in rat intestinal microcirculation during sepsis. *Microvasc Res.* 2013; 85:118–27.

Shaw LJ, Bairey Merz CN, Pepine CJ, Reis SE, Bittner V, Kelsey SF, Olson M, Johnson BD, Mankad S, Sharaf BL, Rogers WJ, Wessel TR, Arant CB, Pohost GM, Lerman A, Quyyumi AA, Sopko G; WISE Investigators. Insights from the NHLBI-Sponsored Women's Ischemia Syndrome Evaluation (WISE) Study: Part I: gender differences in traditional and novel risk factors, symptom evaluation, and gender-optimized diagnostic strategies. *J Am Coll Cardiol.* 2006; 7;47(3 Suppl): S4-S20.

Simão Raif Restivo, Ferreira Sueli Gomes, Kudo Guilherme Konishi, Armstrong Junior Roberto, Silva Luiz Fernando Ferraz, Sannomiya Paulina et al. Sex differences on solid organ histological characteristics after brain death¹. *Acta Cir. Bras.* 2016; 31(4): 278-285.

Simas R, Kogiso DH, Correia CJ, Silva LFF, Silva IA, Cruz JWMC, Sannomiya P, Moreira LFP. Influence of brain death and associated trauma on solid organ histological characteristics. *Acta Cir Bras.* 2012b; 27(7):465-70.

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

Sirois MG, Jancar S, Braquet P, Plante GE, Sirois P. PAF increases vascular permeability in selected tissues: effect of BN-52021 and L-655,240. *Prostaglandins.* 1988;36(5):631-44.

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; 123:118-125.

Spornitz U. M., Socin C. D. & David A. A. Estrous stage determination in rats by means of scanning electron microscopic images of uterine surface epithelium. *The Anat. Rec.* 1999; 254: 116-126.

Stangl M, Zerkaulen T, Theodorakis J, Illner W, Schneeberger H, Land W *et al*. Influence of Brain Death on Cytokine Release in Organ Donors and Renal Transplants. *Transplant Proc.* 2001; 33:1284-5. 44.

Stangl V, Baumann G, Stangl K. Coronary atherogenic risk factors in women. *Eur. Heart. J.* 2002; 23:1738-52.

Takada M, Nadeau KC, Hancock WW, Mackenzie HS, Shaw GD, Waaga AM, et al. Effects of explosive brain death on cytokine activation of peripheral organs in the rat. *Transplantation.* 1998;65(12):1533-42.

Takada M, Toyama H, Suzuki Y, Kuroda Y. Augmentation of interleukin-10 in pancreatic islets after Brain Death. *Transplant Proc.* 2004; 36:1534-6.

Tam, A.; Morrish, D.; Wadsworth, S.; et al. The role of female hormones on lung function in chronic lung diseases. *BMC women's health*. 2011; 11:24.

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 333: 333-336.

Trentzsch H, Nienaber U, Behnke M, Lefering R, Piltz S. Female Sex Protects From Organ Failure And Sepsis After Major Trauma Haemorrhage. *Injury*. 2014; 45(3):S20-8.

Vagnerova, Kamila MD; Koerner, Ines P. MD, PhD; Hurn, Patricia D. PhD. Gender and the Injured Brain. *Anesth Analg*. 2008; 107(1): 201-214.

Watts RP, Thom O, Fraser JF: Inflammatory signalling associated with brain dead organ donation: From brain injury to brain, stem death and posttransplant ischaemia reperfusion injury. *J Transplant*. 2013; 2013: 521369.

Wilhelm MJ, Pratschke J, Beato F, Taal M, Kusaka M, Hancock WW, Tilney NL. Activation of the heart by donor brain death accelerates acute rejection after transplantation. *Circulation*. 2000; 102 (19): 2426–33.

Wilhelm MJ, Pratschke J, Laskowski I, Tilney NL. Ischemia and Reperfusion Injury. *Transplant Review*. 2003; 17(3):140-57. 34.

Wizemann TM, Pardue. Exploring the Biological Contributions to Human Health: Does Sex Matter? Institute of Medicine (US) Committee on Understanding the Biology of Sex and Gender Differences. March 28, 2011; Last Update: April 18, 2016. Women privileged organ recipients? *Transplant Proc*. 2002; 34:2775-6.

Wu KK. Regulation of endothelial nitric oxide synthase activity and gene expression. *Ann NY Acad Sci*. 2002; 962:122–130.

Yu HP, Hsieh YC, Suzuki T, Choudhry MA, Schwacha MG, Bland KI, Chaudry IH. Mechanism of the nongenomic effects of estrogen on intestinal myeloperoxidase activity following trauma-hemorrhage: up-regulation of the PI-3K/Akt pathway. *J. Leukoc. Biol*. 2007; 82:774-80.

Zaets SB, Berezina TL, Xu DZ, Lu Q, Cohen D, Deitch EA, Machiedo GW. Female sex hormones protect red blood cells from damage after trauma-hemorrhagic shock. *Surg Infect*. 2004;5(1):51-9.

Zamora R, Vodovotz Y, Billiar TR. Inducible nitric oxide synthase and inflammatory diseases. *Mol Med*. 2000; 6(5):347-73.

Zeier M, Döhler B, Opelz G, Ritz B. The effect of donor gender on graft survival. *J Am Soc Nephrol*. 2002; 13: 2570-76.

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.