

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA

BRUNELLA VALBÃO FLORA AGOSTINHO

Avaliação dos efeitos do tratamento com progesterona nas alterações
mesentéricas e intestinais em modelo experimental de isquemia e
reperfusão por oclusão aórtica em ratos machos

SÃO PAULO
2025

BRUNELLA VALBÃO FLORA AGOSTINHO

**Avaliação dos efeitos do tratamento com progesterona nas alterações
mesentéricas e intestinais em modelo experimental de isquemia e
reperfusão por oclusão aórtica em ratos machos**

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

Programa de Cirurgia Torácica e Cardiovascular

Orientador: Prof^o. Dr. Luiz Felipe Minho Moreira

Co-orientador: Dr. Cristiano de Jesus Correia

SÃO PAULO

2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Agostinho, Brunella Valbão Flora

Avaliação dos efeitos do tratamento com progesterona nas alterações mesentéricas e intestinais em modelo experimental de isquemia e reperfusão por oclusão aórtica em ratos machos / Brunella Valbão Flora Agostinho; Luiz Felipe Minho Moreira, orientador; Cristiano de Jesus Correia, coorientador. -- São Paulo, 2025.

Tese (Doutorado) -- Programa de Cirurgia Torácica e Cardiovascular. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2025.

1.Progesterona 2.Isquemia miocárdia 3.Reperfusão 4.Mesentério
I.Moreira, Luiz Felipe Minho, orient. II.Correia, Cristiano de Jesus, coorient. III.Título

USP/FM/DBD-050/25

Responsável: Daniela Amaral Barbosa, CRB-8 7533

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação ao meu Deus por ter concedido a mim mais uma conquista. Dedico também à minha mãe Luduvina pelo apoio incondicional e ao meu pai Dr. Almir (in memoriam). Dedico também ao meu marido Thiago por todo incentivo, paciência e amor e às minhas irmãs Thaís e Princia pelo companheirismo e carinho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar a Deus, fonte de toda a minha fé, força, sabedoria e inspiração. A Deus, rendo toda a minha gratidão e louvor, pois sem Ele nada disso seria possível. Foi em Sua presença que encontrei força nos dias difíceis, serenidade e esperança nos momentos de dúvida, quando a jornada parecia árdua demais. Em cada passo deste caminho senti Sua mão me sustentando, renovando minhas forças e enchendo meu coração da paz que excede todo o entendimento. Sua fidelidade me ensinou que os desafios não são obstáculos, mas oportunidades para confiar ainda mais em Seu propósito perfeito para minha vida. Cada conquista, cada aprendizado e cada superação refletem o Seu amor infinito e a Sua graça, que me sustentam além das minhas limitações humanas. Sou profundamente grata por Sua palavra que me deu coragem para sonhar e tranquilidade para confiar que tudo acontece no tempo certo. Agradeço a Deus por ser minha fonte inesgotável de coragem, por trazer luz nos momentos de escuridão, por enxugar as minhas lágrimas e por muitas vezes não deixá-las cair. Por me ensinar que os sonhos que Ele planta em nosso coração são possíveis quando colocamos nossa confiança n'Ele. A Ele dedico não apenas esta realização, mas toda a minha vida, com a certeza de que Seu plano para mim é sempre maior e melhor do que tudo que eu possa imaginar. A Ele, toda honra, toda glória e todo o meu amor.

À minha querida mãe, Luduvina Valbão, cujo amor transcende palavras e cujos gestos de cuidado e dedicação foram a base que sustentou cada passo. Sua força inabalável, seu apoio constante, seus sábios conselhos e suas orações me guiaram até aqui. Seu amor incondicional e sua entrega sem medidas foram o alicerce que me permitiu viver tudo isso. Sua presença em minha vida é uma dádiva que jamais poderei retribuir à altura. Você é minha maior inspiração e o exemplo mais lindo que eu tenho na vida! Sou profundamente honrada e abençoada por ter você como minha mãe. Esta conquista é tão sua quanto minha, pois sem você, nada disso teria sido possível.

Ao meu amado marido Thiago Agostinho, meu companheiro de vida, meu maior incentivador e meu porto seguro. Não há palavras suficientes para expressar o quanto você significa para mim. Você esteve ao meu lado em todos os momentos, oferecendo seu amor incondicional, sua paciência infinita e seu apoio. Quando eu duvidei de mim mesma, você acreditou por nós dois e me lembrou quem eu sou; quando as dificuldades pareciam insuperáveis, você me ergueu com sua força e me lembrou que tudo é possível para quem crê.

Sua presença é o maior presente que Deus me deu. Seu cuidado, suas palavras de encorajamento e sua capacidade de me fazer sorrir todos os dias, mesmo nos mais desafiadores foram essenciais para que eu chegasse até aqui. Não apenas sou grata por tudo o que você fez por mim, mas também por quem você é: um homem íntegro, generoso e cheio de amor, quem me faz sentir amada todos os dias! Eu não saberia caminhar tão longe sem você ao meu lado. Meu amor e minha gratidão por você são imensuráveis, e eu me sinto abençoada além do que mereço por ter você. Obrigada por acreditar nos meus sonhos, mesmo quando eles pareciam distantes, por me incentivar a persistir e por estar sempre ao meu lado, celebrando cada pequena vitória. Meu amor e minha gratidão por você ultrapassam qualquer entendimento.

Às minhas irmãs Thaís e Princia por serem minhas companheiras, por me ouvirem e me apoiarem. Além dos lindos exemplos, agradeço por terem trazido ao mundo meus presentinhos: Maria, Júlia, Selena e Rebeca. Agradeço também aos meus familiares, a minha amiga Dra. Laís Rufino e ao meu amigo Dr. Rodrigo Rufino.

Aos meus amigos de trabalho do Curso de Medicina da Universidade Municipal de São Caetano do Sul e das áreas da saúde na Universidade Cidade de São Paulo, aos meus alunos, todos sempre me incentivaram e encorajaram.

Agradeço aos meus amigos do LIM 11 por todo apoio, almoços e sessões de terapia. Minha vida é muito mais leve com vocês! Ao Sérgio Lopes, Patrícia Santos, Elizabeth Miola e Beatriz Reis.

Ao Lucas Ferreira por ser um amigo leal, que me ajudou em todas as etapas durante todos esses anos. Obrigada pelas risadas genuínas e pelas fofocas, por estar sempre disposto em ajudar todas as vezes que eu precisei. Você é uma benção na minha vida, agradeço a Deus por ter colocado você ao meu lado. Eu não aguentaria muita coisa se não fosse por você. Obrigada por ouvir minhas reclamações e por reclamar comigo, você mora no meu coração.

A Dra. Fernanda Yamamoto, que desde o primeiro dia até a confecção desta tese, com todo seu entusiasmo e conhecimento imenso, me ofereceu suporte. Suas explicações nos mínimos detalhes, pro atividade, paciência e generosidade me marcaram muito. Você é brilhante, especial e faz a diferença para todos que convivem com você. Sou profundamente grata por você existir. Obrigada por todo carinho e atenção que sempre teve comigo.

A Marina Vidal, sem ela eu não encontraria o laboratório e não embarcaria nesta incrível jornada. Me orgulho muito da mulher fantástica que você se tornou, não era para menos, sempre foi a melhor aluna da sala. Ver tudo o que você tem conquistado enche meu coração de alegria, sua resiliência, inteligência e coragem são notáveis. Obrigada por toda amizade nesses longos anos, você é única e eu amo ter você por perto.

Ao Pedro Zonta, cuja dedicação, conhecimento e empenho foram fundamentais para a realização desta tese. Seu apoio constante, paciência e generosidade em compartilhar seu tempo e expertise foram além do que eu poderia esperar. Este trabalho é, em grande parte, fruto de seu esforço e comprometimento. Tenho muito orgulho de ter contado com sua colaboração ao longo deste processo, sei que não foi fácil, muito obrigada.

A Mayara Ramos, cuja competência, experiência e coragem motivam a todos. Uma pessoa que não tem medo de enfrentar desafios e sempre busca o que deseja com determinação, isso é inspirador. Sua sinceridade e autenticidade fazem toda a diferença, agradeço muito pela parceria, pelo apoio constante e pelas conversas sobre o futuro. Você merece toda a felicidade e fico feliz em poder contar com você.

Agradeço e quero expressar minha profunda admiração à Dra. Ana Cristina Breithaupt Faloppa, pelo auxílio e colaboração excepcionais. Sua inteligência, dedicação e visão científica foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho. Aprecio imensamente suas contribuições valiosas e o conhecimento que me proporcionou. Sou muito feliz por ter tido seu apoio ao longo deste processo. Você é extraordinária e inspiradora, obrigada por todo carinho.

Agradeço de todo o coração ao meu co-orientador, Dr. Cristiano de Jesus Correia, por sua orientação preciosa e apoio constante. Sua experiência, paciência e sugestões enriquecedoras foram essenciais para o desenvolvimento desta pesquisa. Agradeço imensamente por sua dedicação, por sempre me incentivar, puxar minha orelha quando necessário e por me ajudar a crescer profissionalmente. Foi um privilégio contar com você pois o aprendizado ao longo desses anos foi inestimável, algo que levarei por toda a vida tenha certeza disso. Você é um homem incrível e agradeço por sempre estar disposto a dividir o que sabe e por me orientar com tanto cuidado e atenção.

Agradeço especialmente ao meu querido orientador Dr. Luiz Felipe Pinho Moreira, pela oportunidade de pertencer ao seu grupo de pesquisa, por sempre oferecer direcionamentos precisos e apoio incondicional. Sua visão estratégica, competência e capacidade de analisar cada detalhe com exatidão foram essenciais e são admiráveis. Sou grata por ter contado com seu incentivo constante e pela maneira única com que compartilha seu vasto conhecimento com todos. Seu impacto na minha formação profissional é imensurável e serei eternamente grata por toda atenção que sempre teve comigo, pela paciência, dedicação e por sua empatia. Foi uma honra ser sua aluna.

EPIGRAFE

“Confia no Senhor de todo o teu coração, e não te apoies no teu próprio entendimento. Reconhece-o em todos os teus caminhos, e Ele endireitará as tuas veredas. Não sejas sábio aos teus próprios olhos; teme ao Senhor e aparta-te do mal. Isso dará saúde ao teu corpo e vigor aos teus ossos.”

(Provérbios 3:5-8)

RESUMO

Agostinho BVF. Avaliação dos efeitos do tratamento com progesterona nas alterações mesentéricas e intestinais em modelo experimental de isquemia e reperfusão por oclusão aórtica em ratos machos [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2025

Introdução: A isquemia é caracterizada pela redução do fluxo sanguíneo para uma área ou órgão específico. O baixo fluxo leva a diminuição de oxigênio e nutrientes e a não reversão deste quadro pode levar à morte celular. A restauração do fluxo, reperfusão, pode agravar danos já estabelecidos durante a isquemia. Dentre os órgãos do sistema gastrointestinal, o intestino é possivelmente o mais sensível, por conter células lábeis facilmente lesadas pela isquemia. Estudos recentes indicam diferenças na resposta ao choque, trauma ou sepse entre machos e fêmeas, constatando que fêmeas são mais resistentes que machos. Trabalhos indicam que hormônios sexuais, como a progesterona, modulam lesões inflamatórias, reduzindo inflamação, estresse oxidativo e apoptose. Portanto o objetivo do projeto foi investigar o efeito do tratamento com progesterona na lesão mesentérica e intestinal em modelo de isquemia e reperfusão ocasionado por oclusão aórtica. **Métodos:** Ratos Wistar machos foram randomizados em quatro grupos: Sham (falso operados, n=12), IR (isquemia por 30 min e reperfusão por 2h, n=12), Pré P4 (progesterona 2 mg/kg, i.v., 30 min antes da isquemia, n=12) e Pós P4 (progesterona 2 mg/kg, i.v., na desocclusão, n=12). Foram avaliados: motilidade, permeabilidade intestinal e microvascular, atividade de mieloperoxidase, morfometria intestinal, mediadores inflamatórios séricos, interação leucócito-endotélio por microscopia intravital, expressão proteica (imunohistoquímica) e gênica (PCR em tempo real) de moléculas relacionadas à inflamação. **Resultados:** Os animais do grupo Pós P4 apresentaram redução significativa da quimiocina CINC-1 no soro em relação ao grupo IR ($P<0,001$). Observamos a diminuição do trânsito gastrointestinal no grupo IR em comparação ao Sham, que foi restabelecida no grupo Pós P4 em relação ao IR ($P= 0,005$). A permeabilidade da barreira intestinal aumentou no grupo IR em relação ao Sham e foi reduzida no grupo Pré P4 em comparação ao IR ($P=0,004$). Já em relação à permeabilidade microvascular, os animais do grupo Pós P4 exibiram um menor extravasamento em comparação ao IR ($P= 0,250$). No mesentério, observamos que o número de leucócitos aderidos e migrados aumentou no grupo IR em relação ao Sham ($P<0,001$) e foi reduzido nos grupos tratados com progesterona. A expressão de P-selectina nos vasos mesentéricos diminuiu no grupo Pós P4 em relação ao IR

($P = 0,037$). Ainda, a atividade de MPO intestinal foi menor no grupo Pré P4 ($P = 0,064$) e sua expressão proteica foi reduzida nos dois grupos tratados ($P < 0,001$). Houve uma redução de Caspase-3 nos animais do grupo Pré P4 em relação ao IR ($P = 0,004$). A expressão de eNOS mesentérica no grupo Pré P4 aumentou comparativamente ao IR ($P = 0,002$). **Conclusão:** A administração de progesterona apresentou benefícios no trânsito gastrointestinal, preservando a barreira intestinal e a perfusão microcirculatória mesentérica. Também modulou a inflamação, reduzindo a interação leucócito-endotélio e a liberação de mediadores inflamatórios. A progesterona não mostrou impacto significativo nas alterações morfológicas da mucosa intestinal, entretanto, foi capaz de reduzir os marcadores apoptóticos. Finalmente, a variação dos efeitos conforme o momento da administração destaca a necessidade de estudos futuros otimizando os protocolos terapêuticos.

Palavras chaves: Progesterona. Isquemia miocárdia. Reperfusão. Mesentério

ABSTRACT

Agostinho BVF. Evaluation of progesterone treatment effects on mesenteric and intestinal changes in an experimental model of ischemia and reperfusion by aortic occlusion in male rats [thesis]. Sao Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2025

Introduction: Ischemia is characterized by a reduction in blood flow to a specific area or organ. Reduced blood flow leads to a decrease in oxygen and nutrients, and the failure to reverse this condition can result in cell death. The restoration of blood flow, reperfusion, may exacerbate the damage already established during ischemia. Among the organs of the gastrointestinal system, the intestine is possibly the most sensitive due to its labile cells, which are easily damaged by ischemia. Recent studies suggest differences in the response to shock, trauma, or sepsis between males and females, with females demonstrating greater resistance than males. Research indicates that sex hormones, such as progesterone, modulate inflammatory injuries by reducing inflammation, oxidative stress, and apoptosis. Therefore, the objective of this study was to investigate the effect of progesterone treatment on mesenteric and intestinal injury in a model of ischemia and reperfusion induced by aortic occlusion. **Methods** Male Wistar rats were randomized into four groups: Sham (sham-operated, n=12), IR (ischemia for 30 min and reperfusion for 2 hours, n=12), Pre P4 (progesterone 2 mg/kg, i.v., 30 min before ischemia, n=12), and Post P4 (progesterone 2 mg/kg, i.v., at reperfusion, n=12). The following parameters were evaluated: intestinal and microvascular permeability, intestinal motility, myeloperoxidase activity, intestinal morphometry, serum inflammatory mediators, leukocyte-endothelium interaction via intravital microscopy, protein (immunohistochemistry) and gene (real-time PCR) expression of inflammation-related molecules. **Results:** The animals in the Post P4 group showed a significant reduction in serum CINC-1 chemokine levels compared to the IR group ($P<0.001$). Gastrointestinal transit was decreased in the IR group compared to the Sham group, but it was restored in the Post P4 group relative to IR ($P=0.005$). Intestinal barrier permeability increased in the IR group compared to Sham and was reduced in the Pre P4 group compared to IR ($P=0.004$). Regarding microvascular permeability, animals in the Post P4 group exhibited less leakage compared to the IR group ($P=0.250$). In the mesentery, the number of adhered and migrated leukocytes increased in the IR group compared to Sham ($P<0.001$) and was reduced in the progesterone-treated groups. P-selectin expression in mesenteric vessels decreased in the Post P4 group compared to IR ($P=0.037$). Additionally, intestinal MPO activity was lower in

the Pre P4 group ($P=0.064$), and its protein expression was reduced in both progesterone-treated groups ($P<0.001$). Caspase-3 levels were reduced in the Pre P4 group compared to IR ($P=0.004$). Mesenteric eNOS expression increased in the Pre P4 group compared to IR ($P=0.002$). **Conclusion:** The administration of progesterone demonstrated benefits for gastrointestinal transit, preserving the intestinal barrier and mesenteric microcirculatory perfusion. It also modulated inflammation by reducing leukocyte-endothelium interactions and the release of inflammatory mediators. While progesterone did not significantly impact morphometric changes in the intestinal mucosa, however, it effectively reduced apoptotic markers. Finally, the variation in effects depending on the timing of administration underscores the need for future studies to optimize therapeutic protocols.

Keywords: Progesterone. Myocardial ischemia. Reperfusion. Mesentery

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Delineamento experimental	29
Figura 2: Procedimento cirúrgico	31
Figura 3: Registro das pressões das artérias, caudal (PAM distal, Figura A) e carótida esquerda retrogradamente (PAM proximal, Figura B) dos grupos: Sham, animais submetidos apenas aos procedimentos cirúrgicos; Isquemia e Reperusão (IR), animais submetidos aos procedimentos cirúrgicos seguidos por isquemia e reperusão; Pré P4, animais tratados com Progesterona (P4, 2mg/kg) antes da indução da isquemia; Pós P4, animais tratados com Progesterona (P4, 2mg/kg) no momento da desocclusão aórtica. A seta preta indica o momento da oclusão da aorta e a seta branca o início da reperusão. Os valores representam a média±EPM (n=7). *P<0,05 em relação ao grupo Sham.	39
Figura 4: Concentrações séricas de progesterona e corticosterona dos grupos: Sham, animais submetidos apenas aos procedimentos cirúrgicos; Isquemia e Reperusão (IR), animais submetidos aos procedimentos cirúrgicos seguidos por isquemia e reperusão; Pré P4, animais tratados com progesterona (P4, 2mg/kg) antes da indução da isquemia; Pós P4, animais tratados com progesterona (P4, 2mg/kg) no momento da desocclusão aórtica. Os valores representam a média±EPM (n=7). P ^{ANOVA} Progesterona 0,003 e P ^{Kruskal-Wallis} Corticosterona 0,343.	40
Figura 5: Contagem do número total de leucócitos na medula óssea dos grupos: Sham, animais submetidos apenas aos procedimentos cirúrgicos; Isquemia e Reperusão (IR), animais submetidos aos procedimentos cirúrgicos seguidos por isquemia e reperusão; Pré P4, animais tratados com progesterona (P4, 2mg/kg) antes da indução da isquemia; Pós P4, animais tratados com progesterona (P4, 2mg/kg) no momento da desocclusão aórtica. Os valores representam a média±EPM (n=7). P ^{ANOVA} 0,464.	42
Figura 6: Alteração da motilidade intestinal dos grupos: Sham, animais submetidos apenas aos procedimentos cirúrgicos; Isquemia e Reperusão (IR), animais submetidos aos procedimentos	

cirúrgicos seguidos por isquemia e reperfusão; Pré P4, animais tratados com progesterona (P4, 2mg/kg) antes da indução da isquemia; Pós P4, animais tratados com progesterona (P4, 2mg/kg) no momento da desocclusão aórtica. Os valores representam a média±EPM (n=7). P ^{ANOVA} 0,005.44

Figura 7: Quantificação da permeabilidade intestinal dos grupos: Sham, animais submetidos apenas aos procedimentos cirúrgicos; Isquemia e Reperfusão (IR), animais submetidos aos procedimentos cirúrgicos seguidos por isquemia e reperfusão; Pré P4, animais tratados com progesterona (P4, 2mg/kg) antes da indução da isquemia; Pós P4, animais tratados com progesterona (P4, 2mg/kg) no momento da desocclusão aórtica. Os valores representam a média±EPM (n=5). P ^{ANOVA} 0,004.45

Figura 8: Avaliação da permeabilidade vascular medida em ug/mg, na relação peso úmido/seco, entre os grupos: Sham, animais submetidos apenas aos procedimentos cirúrgicos; Isquemia e Reperfusão (IR), animais submetidos aos procedimentos cirúrgicos seguidos por isquemia e reperfusão; Pré P4, animais tratados com progesterona (P4, 2mg/kg) antes da indução da isquemia; Pós P4, animais tratados com progesterona (P4, 2mg/kg) no momento da desocclusão aórtica. Os valores representam a média±EPM (n=7). P ^{Kruskal-Wallis} 0,250.46

Figura 9: Análise do fluxo sanguíneo mesentérico dos animais: Sham, animais submetidos apenas aos procedimentos cirúrgicos; Isquemia e Reperfusão (IR), animais submetidos aos procedimentos cirúrgicos seguidos por isquemia e reperfusão; Pré P4, animais tratados com progesterona (P4, 2mg/kg) antes da indução da isquemia; Pós P4, animais tratados com progesterona (P4, 2mg/kg) no momento da desocclusão aórtica. Os valores representam a média±EPM (n=5). P ^{Kruskal-Wallis} 0,023.47

Figura 10: Análise da perfusão microcirculatória dos animais: Sham, animais submetidos apenas aos procedimentos cirúrgicos; Isquemia e Reperfusão (IR), animais submetidos aos procedimentos cirúrgicos seguidos por isquemia e reperfusão; Pré P4, animais tratados com progesterona (P4, 2mg/kg) antes da indução da isquemia; Pós P4, animais tratados com progesterona (P4, 2mg/kg) no momento da desocclusão aórtica. Os valores representam a média±EPM (n=5). P ^{Kruskal-Wallis} 0,081.48

Figura 11: Imagens representativas do leito mesentérico dos animais: Sham, animais submetidos apenas aos procedimentos cirúrgicos; Isquemia e Reperusão (IR), animais submetidos aos procedimentos cirúrgicos seguidos por isquemia e reperusão; Pré P4, animais tratados com progesterona (P4, 2mg/kg) antes da indução da isquemia; Pós P4, animais tratados com progesterona (P4, 2mg/kg) no momento da desocclusão aórtica.48

Figura 12: Expressão protéica das isoformas da sintase do óxido nítrico endotelial (eNOS) (A), induzida (iNOS) (B) e ET-1 (C) nos grupos: Sham, animais submetidos apenas aos procedimentos cirúrgicos; Isquemia e Reperusão (IR), animais submetidos aos procedimentos cirúrgicos seguidos por isquemia e reperusão; Pré P4, animais tratados com progesterona (P4, 2mg/kg) antes da indução da isquemia; Pós P4, animais tratados com progesterona (P4, 2mg/kg) no momento da desocclusão aórtica. Os valores representam a média±EPM de 5 animais por grupo, 1 corte por animal, 10 imagens analisadas. P ^{Kruskal-Wallis} eNOS 0,002, iNOS 0,006 e ET-1 0,248.....49

Figura 13: Expressão gênica relativa das isoformas da sintase do óxido nítrico endotelial (eNOS) (A) induzido (iNOS) (B) e de Endotelina-1 (C) nos grupos: Sham, animais submetidos apenas aos procedimentos cirúrgicos; Isquemia e Reperusão (IR), animais submetidos aos procedimentos cirúrgicos seguidos por isquemia e reperusão; Pré P4, animais tratados com progesterona (P4, 2mg/kg) antes da indução da isquemia; Pós P4, animais tratados com progesterona (P4, 2mg/kg) no momento da desocclusão aórtica. Os valores representam a média±EPM (n=5). P ^{Kruskal-Wallis} eNOS 0,733; iNOS 0,970 e ET-1 0,174.....50

Figura 14: Contagem de leucócitos rolantes (*rollers*), (A), aderidos (B) e migrados (C) nos vasos mesentéricos: Sham, animais submetidos apenas aos procedimentos cirúrgicos; Isquemia e Reperusão (IR), animais submetidos aos procedimentos cirúrgicos seguidos por isquemia e reperusão; Pré P4, animais tratados com progesterona (P4, 2mg/kg) antes da indução da isquemia; Pós P4, animais tratados com progesterona (P4, 2mg/kg) no momento da desocclusão aórtica. Os valores representam a média±EPM (n=5). P ^{Kruskal-Wallis} *rollers* 0,332; P ^{ANOVA} aderidos <0,001 e migrados <0,001.51

Figura 15: Análise da atividade (A) e expressão (B) de mieloperoxidase no intestino nos grupos: Sham, animais submetidos apenas aos procedimentos cirúrgicos; Isquemia e Reperusão (IR), animais submetidos aos procedimentos cirúrgicos seguidos por isquemia e

reperfusão; Pré P4, animais tratados com progesterona (P4, 2mg/kg) antes da indução da isquemia; Pós P4, animais tratados com progesterona (P4, 2mg/kg) no momento da desocclusão aórtica. Os valores representam a média±EPM de 5 animais por grupo (atividade) e expressão 5 animais por grupo, 1 corte por animal, 10 imagens analisadas. P^{Kruskal-Wallis} Atividade: 0,073 e Expressão p <0,001.....52

Figura 16: Quantificação da expressão das moléculas ICAM-1(A), VCAM-1(B), P-selectina e (C) PECAM-1 (D) nos vasos da microcirculação mesentérica nos grupos: : Sham, animais submetidos apenas aos procedimentos cirúrgicos; Isquemia e Reperfusão (IR), animais submetidos aos procedimentos cirúrgicos seguidos por isquemia e reperfusão; Pré P4, animais tratados com progesterona (P4, 2mg/kg) antes da indução da isquemia; Pós P4, animais tratados com progesterona (P4, 2mg/kg) no momento da desocclusão aórtica. Os valores representam a média±EPM de 5 animais por grupo, 1 corte por animal, 10 imagens analisadas. P^{ANOVA} ICAM-1 0,050; VCAM-1 0,859; P-selectina 0,037 e PECAM-1 0,122.....53

Figura 17: Imagens ilustrativas de imunohistoquímica das moléculas de adesão ICAM-1(A), VCAM-1(B), P-selectina (C) e PECAM-1 (D) nos vasos da microcirculação mesentérica nos grupos: Sham, animais submetidos apenas aos procedimentos cirúrgicos; Isquemia e Reperfusão (IR), animais submetidos aos procedimentos cirúrgicos seguidos por isquemia e reperfusão; Pré P4, animais tratados com progesterona (P4, 2mg/kg) antes da indução da isquemia; Pós P4, animais tratados com progesterona (P4, 2mg/kg) no momento da desocclusão aórtica.....54

Figura 18: Análise histomorfométrica de intestino: (A) representa altura das vilosidades; (B) profundidade de cripta; (C) espessura total da mucosa e (D) relação altura da vilosidade/profundidade de cripta, nos grupos: : Sham, animais submetidos apenas aos procedimentos cirúrgicos; Isquemia e Reperfusão (IR), animais submetidos aos procedimentos cirúrgicos seguidos por isquemia e reperfusão; Pré P4, animais tratados com progesterona (P4, 2mg/kg) antes da indução da isquemia; Pós P4, animais tratados com progesterona (P4, 2mg/kg) no momento da desocclusão aórtica. Os valores representam a média±EPM de 5 animais por grupo, 1 corte por animal, 10 imagens analisadas. P^{ANOVA}, altura das vilosidades 0,002; profundidade da cripta 0,980; altura da mucosa 0,123; razão da altura da vilosidade e cripta p<0,001.55

Figura 19: Fotomicrografias representativas de intestino dos grupos: Sham, animais submetidos apenas aos procedimentos cirúrgicos; Isquemia e Reperfusão (IR), animais submetidos aos procedimentos cirúrgicos seguidos por isquemia e reperfusão; Pré P4, animais tratados com progesterona (P4, 2mg/kg) antes da indução da isquemia; Pós P4, animais tratados com progesterona (P4, 2mg/kg) no momento da desoclusão aórtica. Aumento final de 100x ...56

Figura 20: Expressão protéica de Bcl-2 e Caspase-3 nos grupos: Sham, animais submetidos apenas aos procedimentos cirúrgicos; Isquemia e Reperfusão (IR), animais submetidos aos procedimentos cirúrgicos seguidos por isquemia e reperfusão; Pré P4, animais tratados com progesterona (P4, 2mg/kg) antes da indução da isquemia; Pós P4, animais tratados com progesterona (P4, 2mg/kg) no momento da desoclusão aórtica. Os valores representam a média±EPM de 5 animais por grupo, 1 corte por animal, 10 imagens analisadas. P ^{Kruskal-Wallis} Caspase-3 0,004 e Bcl-2 0,325.57

Figura 21: Imunofluorescência para a expressão proteica de óxido nítrico síntase neuronal (nNOS), densidade (A), perfil celular (B) e fotomicrografias representativas (400x) das reações realizadas nas células neuronais do plexo miontérico, nos grupos: Sham, animais submetidos apenas aos procedimentos cirúrgicos; Isquemia e Reperfusão (IR), animais submetidos aos procedimentos cirúrgicos seguidos por isquemia e reperfusão; Pré P4, animais tratados com progesterona (P4, 2mg/kg) antes da indução da isquemia; Pós P4, animais tratados com progesterona (P4, 2mg/kg) no momento da desoclusão aórtica. Os valores representam a média±EPM de 5 animais por grupo, 1 corte por animal, 30 imagens analisadas. P ^{ANOVA} densidade 0,960 e perfil 0,042.58

Figura 22: Imunofluorescência para a expressão proteica do receptor P2X7 nas células neuronais do plexo miontérico, análise da densidade nos grupos: Sham, animais submetidos apenas aos procedimentos cirúrgicos; Isquemia e Reperfusão (IR), animais submetidos aos procedimentos cirúrgicos seguidos por isquemia e reperfusão; Pré P4, animais tratados com progesterona (P4, 2mg/kg) antes da indução da isquemia; Pós P4, animais tratados com progesterona (P4, 2mg/kg) no momento da desoclusão aórtica. Os valores representam a média±EPM de 5 animais por grupo, 1 corte por animal, 30 imagens analisadas. P ^{Kruskal-Wallis} 0,866.....59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Número total e diferencial de leucócitos e de plaquetas circulantes41

Tabela 2: Quantificação da concentração sérica dos mediadores inflamatórios TNF- α ; IL-6; IL-10; CINC-1 e HIF-143

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	- adenosina difosfato
AE	- Azul de Evans
AEC	- 3-amino-9-ethylcarbazole
BCL-2	- B-cell lymphoma protein-2
BDNF	- Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
BSA	- albumina sérica bovina
CAMs	- moléculas de adesão celular
CEUA	- Comissão de Ética no Uso Animal
cGMP	- guanosina monofosfato cíclico
CINC-1	- quimiocina para neutrófilo induzida por citocina-1
CONCEA	- Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DBCA	- Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica
DNA	- ácido desoxirribonucleico
DO	- densidade óptica
EDTA	- ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	- ensaio de imunoabsorção enzimática
eNOS	- óxido nítrico sintase endotelial
EPM	- erro padrão da média
ET-1	- endotelina-1
FiO2	- fração inspirada de oxigênio
FITC	- isotiocianato de fluoresceína
HIF-1	- Fator induzível por hipóxia
HTAB	- brometo de hexadecil-tri-metil-amônio
I/R	- isquemia e reperfusão
ICAM-1	- molécula de adesão intercelular-1
IFN- γ	- interferon- γ
IL	- Interleucina

iNOS	- óxido nítrico sintase induzida
IR	- Isquemia e reperfusão (grupo experimental)
LIM	- Laboratório de Investigação Médica
MDA	- malondialdeído
MPO	- mieloperoxidase
mPR	- receptor de membrana da progesterona
NF- κ B	- Fator Kappa B
nNOS	- óxido nítrico sintase neuronal
NO	- óxido nítrico
OCT	- composto de temperatura de corte ideal
P4	- Progesterona
PAM	- pressão arterial média
PBS	- tampão fosfato salina
PCR	- Reação em cadeia da Polimerase
PE	- politetrafluoretileno
PECAM-1	- molécula de adesão celular endotelial plaquetária
PMN	- polimorfonucleares
PR	- receptor nuclear da progesterona
RNA	- ácido ribonucleico
ROS	- espécies reativas de oxigênio
SNE	- Sistema Nervoso Entérico
TAS	- status antioxidante total
TBS-T	- TRIS salina tamponada
TNF- α	- Fator de necrose tumoral- α
TOS	- status oxidante total
TRIS	- Tris (Hidroximetil) Aminometano
VCAM-1	- molécula de adesão de célula vascular-1

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 OBJETIVO	28
2.1 OBJETIVO GERAL	28
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	29
4 MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 Animais.....	30
4.2 Anestesia e preparo dos animais.....	30
4.3 Indução da isquemia e reperfusão	30
4.4 Parâmetros hemodinâmicos	31
4.5 Determinação do número total e diferencial de leucócitos e plaquetas circulantes.....	32
4.6 Determinação do número total de células na medula óssea.....	32
4.7 Determinação das concentrações plasmáticas de mediadores inflamatórios e hormônios .	32
4.8 Estudo do trânsito intestinal.....	33
4.9 Estudo de permeabilidade da mucosa intestinal	33
4.10 Ensaio de permeabilidade vascular.....	33
4.11 Análise histomorfométrica.....	34
4.12 Microscopia intravital in situ de mesentério e análise do fluxo sanguíneo.....	34
4.14 Imunohistoquímica para pesquisa de sintases do óxido nítrico e moléculas de adesão, endotelina 1, MPO, Bcl-2 e Caspase-3.....	35
4.15 Real time PCR para expressão gênica de iNOS, eNOS e endotelina-1.....	36
4.16 Estudo do receptor P2X7 e nNOS no tecido intestinal	37
4.16.1 Preparação do material para imunohistoquímica	37
4.16.2 Método de Imunofluorescência.....	37
4.16.3 Análises morfoquantitativas dos neurônios mioentéricos	38
4.17 Análise dos resultados	38
5 RESULTADOS.....	38
5.1 Parâmetros Hemodinâmicos.....	38
5.2 Concentração sérica de Progesterona e Corticosterona	39
5.3 Alterações leucocitárias na circulação e celularidade de medula	40
5.4 Concentração sérica de mediadores inflamatórios TNF- α ; IL10 e IL-6 ,HIF-1 e CINC-1	42
5.5 Alterações do trânsito intestinal	43
5.6 Permeabilidade da barreira intestinal	44

5.7 Alterações na permeabilidade microvascular	45
5.8 Análise do fluxo sanguíneo no leito mesentérico	46
5.9 Análise da perfusão microcirculatória.....	47
5.10 Expressão proteica das isoformas da sintase do óxido nítrico endotelial (eNOS) e induzida (iNOS), e Endotelina-1 (ET-1) nos vasos do mesentério.....	49
5.11 Expressão Gênica Relativa das isoformas da sintase do óxido nítrico endotelial (eNOS) e induzida (iNOS), e Endotelina-1 (ET-1) no mesentério	50
5.12 Interação leucócito-endotélio	50
5.13 Análise da atividade e expressão de mieloperoxidase.....	51
5.14 Análise de Moléculas de Adesão Intercelular.....	52
5.15 Análise histológica	54
5.16 Análise de moléculas envolvidas na morte celular por apoptose	57
5.17 Expressão de nNOS e receptor P2X7 nos neurônios do plexo mioentérico.....	57
6 DISCUSSÃO	59
7 CONCLUSÃO	69
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
9 ANEXOS.....	80

1 INTRODUÇÃO

As doenças do sistema circulatório permanecem como uma das principais causas de mortalidade no mundo. No Brasil em 2023 (DATASUS/Ministério da saúde), foram registradas 386.086 mortes relacionadas a essas patologias, sendo as doenças isquêmicas do coração responsáveis por 117.192 óbitos e outras doenças cardíacas por 79.423. As doenças das artérias, arteríolas e capilares, incluindo aneurismas e dissecções da aorta (15.695 e 8.673, respectivamente), totalizaram 24.368 mortes. Esses dados destacam a relevância de investigações contínuas para aprimorar as estratégias terapêuticas e preventivas, visando reduzir a mortalidade associada a essas condições; especialmente em cirurgias que requerem a interrupção do fluxo aórtico, tal como transplantes de órgãos, correções de aneurismas aórticos, substituições valvares, dissecções de aorta e revascularização miocárdica, onde a manipulação da aorta é frequentemente necessária.

No entanto, essa abordagem pode resultar em transtornos isquêmicos, não apenas em órgãos próximos à área de oclusão, mas também naqueles mais distantes, podendo comprometer o suprimento de oxigênio e nutrientes para os tecidos, levando assim, à consequências isquêmicas em diferentes regiões do corpo. (Netala et al., 2024). A oclusão aórtica tem efeitos significativos nos órgãos do sistema gastrointestinal, levando rapidamente à hipóxia aguda nos tecidos, devido à súbita diminuição do suprimento sanguíneo nas artérias celíaca, mesentérica superior ou mesentérica inferior. Essa privação de oxigênio pode gerar complicações e consequências graves para a função desses órgãos (Katseni et al., 2015; Mallick *et al.*, 2004).

A ausência de oxigênio impede a fosforilação oxidativa na mitocôndria, de modo que a glicólise anaeróbica torna-se o meio de obtenção de energia, sendo entretanto, menos eficiente para a reposição do trifosfato de adenosina (ATP). O déficit de ATP prejudica o transporte ativo de íons através da membrana, levando a um acúmulo de sódio e água no interior da célula (edema) e aumento da permeabilidade ao cálcio para dentro da célula. Este, por sua vez, é potencializado pela diminuição de seu transporte ativo para o meio extracelular, processo dependente de ATP (Blikslager, 2008). A não formação de ATP e o acúmulo de ADP (adenosina difosfato) apresenta vários efeitos deletérios, incluindo alteração da forma da célula, por contração de seu esqueleto; ativação de fosfolipases, com consequente liberação de metabólitos do ácido araquidônico a partir da membrana celular e das organelas. Todos estes efeitos contribuem para a possibilidade de morte celular, caso não haja a reversão deste quadro tornando, essencial, o restabelecimento do fluxo sanguíneo para a área afetada (Ikhlas e

Atherton 2023). Porém apesar de ser crucial para interromper os efeitos deletérios, a restauração do fluxo sanguíneo após um quadro isquêmico também pode agravar os danos já estabelecidos durante a isquemia. Durante a reperfusão, ocorre a disseminação sistêmica de produtos tóxicos gerados durante a fase de isquemia tecidual, quando há o restabelecimento da circulação e consequente oxigenação (Yao et al., 2019; Zhang et al., 2024).

Entre os órgãos do sistema gastrointestinal, o intestino é possivelmente o mais sensível, pois é composto por células lábeis que são facilmente lesadas por episódios de isquemia. Durante a fase de reperfusão, o intestino é significativamente afetado, especialmente em suas camadas mucosa e submucosa. Essa sequência de eventos pode resultar na ativação de vias inflamatórias sistêmicas (Clair & Beach, 2016). Evidências experimentais indicam que a isquemia mesentérica está associada a danos na mucosa intestinal e à diminuição da função da barreira intestinal, que sob condições fisiológicas normais, protege o organismo contra a translocação de bactérias do lúmen intestinal para a circulação (Bala et al., 2020; Brandt et al., 2021).

Os eventos mais importantes que induzem a lesão intestinal após o processo de isquemia e reperfusão (I/R), são a geração de espécies reativas de oxigênio, prostaglandinas e ativação de neutrófilos, além da ativação estimulação dos mecanismos inflamatórios através da migração de leucócitos. (Eltzsching & Collard, 2004; Cerqueira et al., 2005). As espécies reativas de oxigênio atuam promovendo a peroxidação lipídica lesando as membranas celulares, promovendo a ativação e migração de leucócitos e liberando o ácido araquidônico, que é transformado em tromboxanos, prostaglandinas e leucotrienos. (Portugal-Cohen & Kohen R 2009).

O processo de I/R provoca disfunção endotelial, na qual as células endoteliais liberam moduladores da resposta vascular, como o óxido nítrico (NO) e a endotelina (ET). O NO é uma molécula presente naturalmente no organismo e desempenha um papel fundamental como vasodilatador, além de inibir a agregação de plaquetas e a adesão de neutrófilos às células endoteliais, contribuindo para a proteção vascular (Durakbasa et al., 1998; Mallick et al., 2004). Por outro lado, as endotelinas são peptídeos produzidos pelo endotélio que atuam como potentes vasoconstritores, regulando o tônus vascular, a pressão sanguínea e promovendo a proliferação celular nos vasos (Mallick et al., 2004; Girn et al., 2007). O equilíbrio entre esses mediadores é essencial para a manutenção da homeostase vascular.

Como parte da resposta inflamatória, há um aumento na produção e liberação de moléculas de adesão celular (CAMs) e quimiocinas, que promovem maior interação entre leucócitos e outras células. Este processo leva ao recrutamento sequencial dos leucócitos,

incluindo captura, rolamento, adesão ao endotélio e diapedese, que são mediadas por moléculas como as selectinas, membros da superfamília das imunoglobulinas, e integrinas (Danese et al., 2005). A ativação dessas moléculas de adesão e o subsequente recrutamento de leucócitos contribuem para a amplificação da resposta inflamatória, exacerbando a lesão tecidual, o que sublinha a complexidade da resposta imune associada à I/R e sua repercussão sistêmica em múltiplos órgãos. Os neutrófilos são as células efetoras da lesão de I/R e análises de tecidos expostos à lesão de isquemia e reperfusão, por técnica de microscopia intravital, revelam resposta inflamatória aguda caracterizada pelo aumento da aderência e migração de leucócitos polimorfonucleares a nível de vênulas pós-capilares, associado a aumento da permeabilidade vascular à proteínas (Granger & Korthuis, 1995; Mallick et al., 2004). Os neutrófilos contêm enzimas que reduzem o oxigênio molecular a íon superóxido e produzem ácido hipocloroso, fornecendo fonte adicional de metabólitos reativos do oxigênio (Nalini et al., 1993; Mallick et al., 2004).

Durante a I/R, há também uma intensificação na produção de citocinas pró-inflamatórias, como interleucina (IL)-1 β , fator de necrose tumoral (TNF)- α e interferon (IFN)- γ , produzidas por leucócitos e células endoteliais. Esses mediadores inflamatórios desempenham um papel crucial na fisiopatologia da lesão tecidual associada à I/R, evidenciando a complexidade da interação entre mecanismos vasodilatadores, vasoconstritores e a ativação imunológica, que levam a alteração endotelial nesse contexto. A produção de citocinas após a lesão de I/R desempenha um papel crucial na modulação da função e integridade tanto dos órgãos diretamente afetados quanto de órgãos distantes do local do dano (Durakbasa et al., 1998; Mallick et al., 2004; Flessas et al., 2011).

Em modelos de I/R mesentérica, observa-se que diversas células, incluindo células musculares lisas, células gliais entéricas e neurônios, podem sofrer deterioração significativa ao longo do processo. Dentre essas, destacam-se os neurônios do Sistema Nervoso Entérico (SNE), especialmente aqueles localizados nos plexos mioentéricos, que demonstram alta sensibilidade ao estresse oxidativo e podem ser irreversivelmente danificados pela ação da forma induzível da sintase do óxido nítrico (iNOS) (Filpa et al., 2017). O SNE é organizado de maneira complexa e desempenha um papel crítico na regulação da motilidade intestinal, fluxo sanguíneo, absorção de nutrientes, secreção, além de participar de processos imunológicos e inflamatórios locais (Grisham et al., 1999; Furness, 2000). A lesão resultante do processo de I/R intestinal não apenas induz inflamação, mas também provoca alterações significativas nos neurônios mioentéricos, comprometendo a função motora intestinal e levando a uma redução da motilidade, o que pode ter consequências sistêmicas importantes (Filpa et al., 2017). Esses efeitos são fundamentais para

compreender as disfunções gastrointestinais associadas à I/R e o impacto na homeostase do trato gastrointestinal.

Desta forma a inflamação intestinal está associada à dismotilidade gastrointestinal que pode persistir, prejudicando a qualidade de vida de pacientes e contribuir para morbidade em diversas patologias (Spear & Mawe, 2019). Estudos experimentais mostraram alterações no tamanho e na forma de neurônios mioentéricos e da parede intestinal, associadas ao aumento da permeabilidade vascular, disfunção da barreira mucosa e inflamação (Rivera et al., 2009; Thacker et al., 2011). Nesse contexto, receptores específicos desempenham papéis importantes na regulação dessas respostas. A família dos receptores purinérgicos P2X, presente em cerca de 80 a 90% dos neurônios do plexo mioentérico (Baraja-López et al., 1996), está intimamente relacionada ao controle da motilidade intestinal (Galligan et al., 2000;) e pode ser influenciada por alterações na homeostase celular decorrentes da isquemia e reperfusão. Os receptores P2X quando interagem com ATP podem determinar eventos associados à ativação da inflamação (Booth et al., 2012; Li et al., 2012), como a liberação de IL-1 β e TNF- α e ativação do fator de transcrição NF-Kappa B (Hide et al., 2000; Di Virgiglio et al., 2017). Este receptor de membrana é ativado por altas concentrações de ATP é expresso por células que compõem a imunidade adaptativa e exerce um importante papel em doenças do sistema nervoso, bem como doenças cardiovasculares (Wei et al., 2008; Chen et al., 2018) e sua inibição pode levar a diminuição da inflamação em lesão de I/R pulmonar reduzindo citocinas pró-inflamatórias (Duan et al., 2018), bem como reduzir a lesão de I/R cerebral em ratos (Chen et al., 2018). Assim, alternativas terapêuticas que modulem a expressão destes receptores na região mesentérica podem contribuir reduzindo o processo inflamatório gerado pela I/R.

Desta forma, é apontado na literatura que tipos de traumas e choques graves, potencialmente iniciam uma cascata de eventos intestinais como a intensa produção de citocinas, aumento da permeabilidade intestinal, translocação de bactérias, liberação de endotoxinas intestinais e apoptose (Grotz et al., 1999; Chen. et al., 2008). Além disso, são descritos danos acentuados na estrutura da mucosa intestinal, que inclui a lesão de células epiteliais e das vilosidades, ulceração focal, fusão de vilosidades adjacentes, atrofia da mucosa e diminuição das junções de adesão dos enterócitos (Chen. et al., 2008).

Nos últimos anos, uma série de estudos têm evidenciado diferenças na resposta entre os sexos em situações de choque hemorrágico, trauma e sepse, com fêmeas apresentando uma maior resistência comparada aos machos. Essa variação na resistência tem sido associada à influência dos hormônios sexuais no curso da lesão inflamatória. Evidências clínicas e experimentais demonstram que a administração de hormônios femininos em ratos machos resulta em uma

significativa redução da inflamação e na preservação da integridade intestinal (Rocha de Sousa et al., 2018). Este efeito protetor dos esteróides sexuais têm sido corroborado em diversos modelos experimentais, incluindo estudos com ratos castrados e intactos, especificamente em modelos de lesão intestinal (Homma et al., 2005; Deitch et al., 2006; Proctor, 2008; Doucet et al., 2010). Estes achados sugerem que os hormônios sexuais desempenham um papel crucial na modulação da resposta inflamatória e na proteção do tecido intestinal durante eventos de isquemia e reperfusão.

Portanto, tem se observado o papel protetor e regenerador de esteróides sexuais que influenciam o processo da lesão inflamatória com destaque para a progesterona (P4), onde trabalhos sugerem que sua administração em pós-trauma encefálico poderia suprimir a inflamação intestinal, proteger a estrutura da mucosa, reduzir a apoptose (Chen. et al., 2008); bem como agir com suas potentes propriedades neuroprotetoras em modelos experimentais de lesão medular, lesão cerebral e isquemia (Pettus et al., 2005; Vandenberg et al., 2013).

A progesterona é um hormônio esteroide produzido principalmente pelo corpo lúteo nos ovários, além de ser secretada pelas adrenais e pela placenta durante a gestação. Em homens, a progesterona é sintetizada principalmente pelas glândulas adrenais e, em menor extensão, pelos testículos, desempenhando um papel importante na regulação da produção de testosterona e em várias funções do sistema nervoso. Ela modula diversos processos fisiológicos por meio de sua interação com receptores específicos. Existem dois principais tipos de receptores de progesterona, PR-A e PR-B, que são produtos do mesmo gene, mas apresentam diferentes funções na regulação da resposta tecidual (Pang et al., 2015; You Y et al., 2020). O receptor PR-A está relacionado principalmente à modulação de atividades inflamatórias e efeitos antiproliferativos, enquanto o PR-B está envolvido na estimulação da proliferação e diferenciação celular em tecidos alvo, como o endométrio e as glândulas mamárias. Além disso, a progesterona também se liga a receptores não-genômicos, como o receptor de membrana da progesterona (mPR), que medeia respostas rápidas em diferentes tipos celulares, inclusive no sistema nervoso central e em células do sistema imunológico. Em estudos de lesão tecidual, a progesterona tem demonstrado efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes, modulando a apoptose e a resposta ao estresse oxidativo, o que sugere um potencial terapêutico em situações de lesão induzida por I/R (Li et al., 2012; Güleç Başer et al., 2018).

Os efeitos da progesterona são amplamente observados em diversos modelos experimentais, destacando sua ação através de diferentes mecanismos. Em modelos de I/R cardíaca, a administração de progesterona tem demonstrado efeito cardioprotetor, caracterizado por uma redução da inflamação, neutralização dos radicais livres e aprimoramento da função

contrátil miocárdica (Dhote & Balaraman, 2007). Além disso, estudos revelam que a progesterona promove proteção cardíaca por meio do aumento da expressão do gene anti-apoptótico Bcl-xl, evidenciando seu papel na prevenção da morte celular programada (Morrissy et al., 2010). Em modelos de I/R ovariana, o tratamento pré-operatório com progesterona tem demonstrado efeitos protetores, atuando na redução da apoptose e na mitigação do estresse oxidativo. Este efeito é mediado pela modulação dos níveis de status antioxidante total (TAS) e status oxidante total (TOS), apontando o potencial da progesterona na preservação da integridade tecidual (Başer et al., 2018). Esses achados ressaltam a progesterona como um agente terapêutico promissor em estratégias de proteção tecidual contra danos gerados pela I/R.

Reforçando o papel protetor da progesterona, Hend Jarras e colaboradores (2019) investigaram seu impacto no modelo da Doença de Parkinson em ratos, evidenciando a capacidade da progesterona de atuar como um agente anti-inflamatório e neuroprotetor. A administração de progesterona resultou na diminuição do número de macrófagos e na consequente redução da liberação de óxido nítrico e fator de necrose tumoral α (TNF- α), além de promover um aumento nos níveis de BDNF (Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro) e na supressão do Fator Kappa B (NF- κ B). Esses resultados indicam que a progesterona pode modular a resposta inflamatória, tanto no plexo mioentérico quanto no cérebro, exercendo efeitos anti-inflamatórios e neuroprotetores significativos. Com base nessas evidências, este trabalho investigou os efeitos do tratamento com progesterona nas alterações mesentéricas e intestinais provocadas pela isquemia e reperfusão, utilizando um modelo experimental de oclusão aórtica em ratos machos.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

O estudo tem por objetivo avaliar os efeitos do tratamento com progesterona nas alterações mesentéricas e intestinais em modelo experimental de isquemia e reperfusão por oclusão aórtica em ratos machos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 2.1.1 Investigar as repercussões sobre o quadro funcional do intestino e a integridade da barreira intestinal;
- 2.1.2 Estudar as alterações da microcirculação mesentérica e as interações leucócito-

endotélio;

2.1.3 Avaliar o efeito na reação inflamatória local e sistêmica;

2.1.4 Investigar as alterações morfológicas e celulares no intestino;

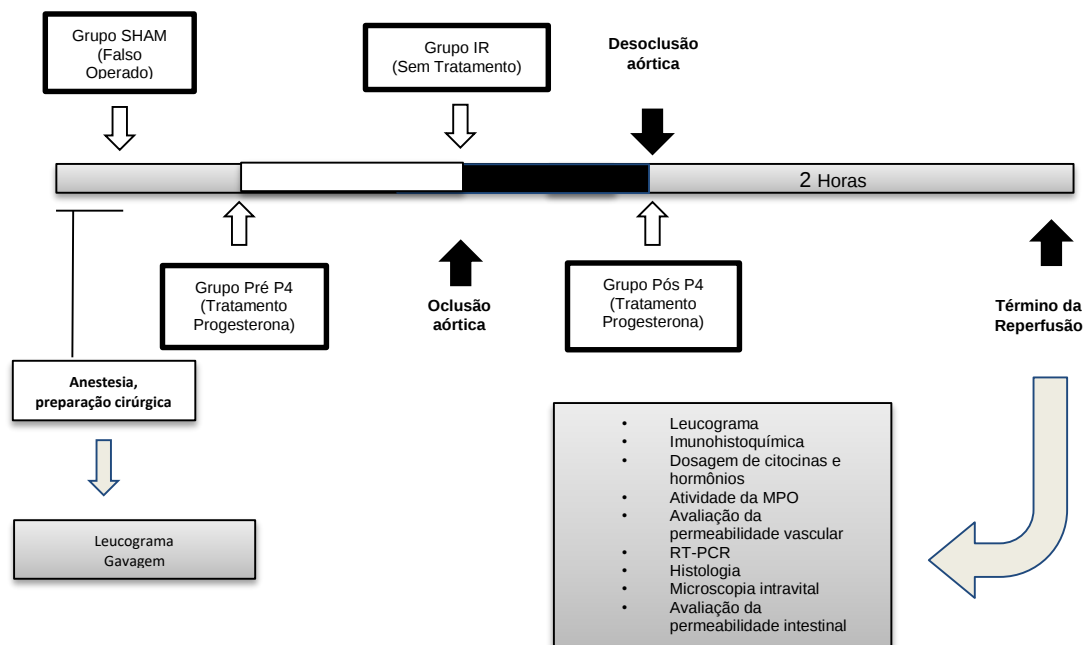
2.1.5 Avaliar o impacto nos neurônios do plexo mioentérico.

3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os animais foram divididos nos seguintes grupos:

- **Grupo Sham (falso-operado)** - animais submetidos à manipulação cirúrgica, porém sem indução da lesão de isquemia e reperfusão e sem infusão intravenosa de progesterona (n=12).
- **Grupo IR** - animais submetidos à manipulação cirúrgica, e à isquemia aórtica por 30 minutos (n=12).
- **Grupo Pré P4 (progesterona pré-isquemia)** - 30 minutos antes da isquemia aórtica foi administrada, por via intravenosa, a dose de 2mg/kg de progesterona (n=12).
- **Grupo Pós P4 (progesterona pós-isquemia)** - foi administrada, por via intravenosa, a dose de 2mg/kg de progesterona no momento do despinçamento aórtico (reperfusão) (n=12).

Figura 1: Delineamento experimental.



4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

O presente projeto de estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Coordenadoria de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (SDC: 4989/20/018 CEUA: 1425/2020). Os experimentos foram realizados no Laboratório de Investigação Médica (LIM)-11 do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os animais foram manipulados de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica – DBCA (2016) do CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal). Neste estudo foram utilizados 56 ratos machos Wistar, provenientes do biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pesando entre 250 e 350 g. Os animais foram mantidos a $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, período de claro e escuro de 12 h, sem restrições à ingestão de água e ração. Os experimentos foram divididos em duas etapas compostas de 7 animais por grupo para coleta de material biológico e 5 animais por grupo para microscopia intravital.

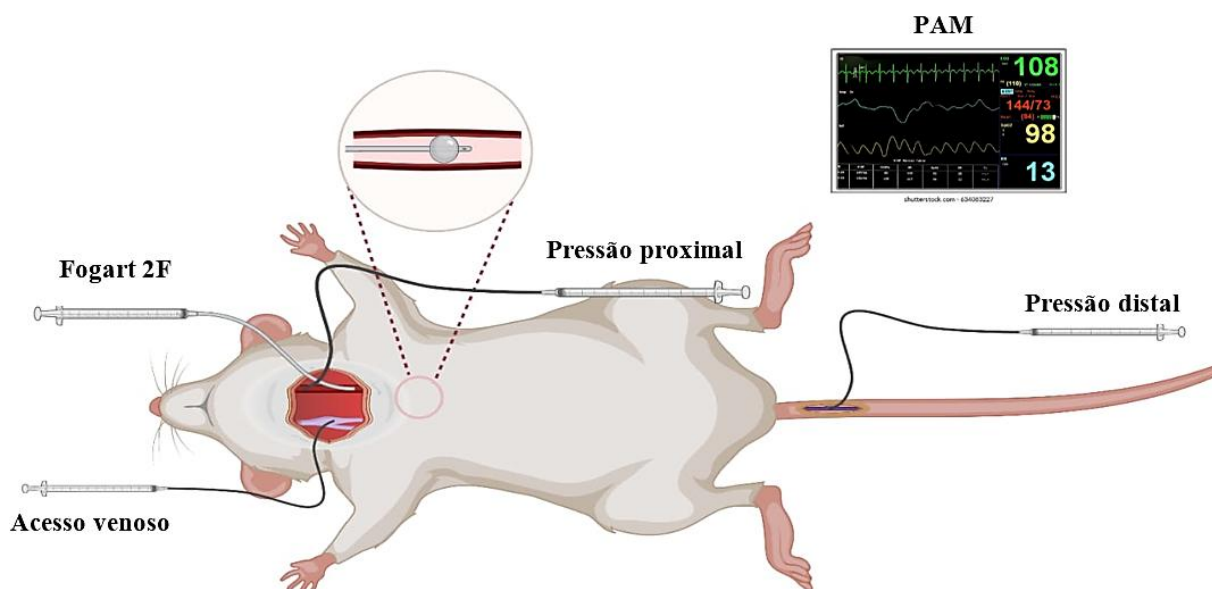
4.2 Anestesia e preparo dos animais

A anestesia foi induzida em câmara fechada com isoflurano a 5 %, seguida de intubação e ventilação mecânica através de ventilador para roedores (Harvard 683, Harvard Apparatus, Inc, EUA). O plano anestésico foi mantido com isoflurano a 2 %. A ventilação foi realizada com FiO_2 de 60 %, volume corrente de 10 mL/kg e frequência de 70 ciclos por minuto. Os animais foram colocados em decúbito dorsal horizontal, passaram por tricotomia e antissepsia da região cervical ventral e na região ventral próximo à inserção da cauda no abdome. Em seguida, os animais foram posicionados em plataforma cirúrgica com aquecimento local, para manutenção da temperatura (37°C). Foi realizada a dissecação e cateterização da artéria caudal com um cateter tipo politetrafluoretileno (PE) 10 para monitorização da pressão arterial distal. O controle da pressão arterial proximal foi feito de maneira indireta através da dissecação e cateterização da artéria carótida comum esquerda com um cateter tipo PE 50.

4.3 Indução da isquemia e reperfusão

Para a indução da isquemia, utilizamos o modelo descrito por Rocha de Sousa e colaboradores (2018). O procedimento consistiu na introdução de um cateter de Fogarty® 2F (Edwards Lifesciences LLC, EUA) pela artéria carótida comum esquerda, aproveitando a mesma incisão realizada para a monitorização da pressão arterial proximal. O cateter foi avançado cerca de 10 a 12 mm em sentido caudal até a aorta descendente proximal. Em seguida, realizou-se a insuflação parcial do balão com 0,04 mL de solução fisiológica a 0,9%, seguida de uma leve tração em sentido cranial, posicionando corretamente o balão no óstio da artéria carótida comum esquerda. Nessa posição consegue-se, também, a oclusão do óstio da artéria subclávia esquerda – importante via de circulação colateral – o balão foi completamente insuflado até a oclusão total da aorta (aproximadamente 0,08 a 0,1 mL de solução fisiológica a 0,9%). A aorta permaneceu ocluída por um período total de 30 minutos sem correção adicional da pressão arterial proximal. Para a eficiência da oclusão da aorta, observou-se uma imediata e sustentada perda de qualquer detecção de pressão arterial distal (próximo de zero). Foram realizadas, ainda, mensurações pressóricas seriadas durante a oclusão da aorta (isquemia) e durante a reperfusão (desinsuflação/retirada do cateter de Fogarty) (Figura 2). Os animais foram mantidos e monitorados em reperfusão durante 2 horas.

Figura 2: Procedimento cirúrgico.



4.4 Parâmetros hemodinâmicos

Para a avaliação dos parâmetros hemodinâmicos, a artéria carótida direita e a artéria

caudal foram canuladas e os cateteres ligadas ao transdutor de pressão (P23XL, Viggo-Spectramed Inc., EUA), conectados a um sistema de multicanal de aquisição de dados biológicos (Acqknowledge – Biopac Systems Inc., EUA). Os parâmetros hemodinâmicos foram obtidos continuamente ao longo do experimento.

4.5 Determinação do número total e diferencial de leucócitos e plaquetas circulantes

Amostras de sangue (20 µl) foram coletadas da cauda dos animais, ao início do procedimento cirúrgico após a intubação (basal), após o período de isquemia (isquemia) e ao término do período de reperfusão (final). Contagens total e diferencial das células foram realizadas com auxílio de um analisador hematológico (BC-2800vet, Mindray, China).

4.6 Determinação do número total de células na medula óssea

Após o período de 2 h de reperfusão, os animais foram submetidos à eutanásia e 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 a uma seringa contendo 10 mL de PBS. As amostras foram centrifugadas durante 15 min a 453 x g, o pellet foi suspenso em 1 mL de PBS. Alíquotas de 20 µl da suspensão foram submetidas a contagem em analisador hematológico (BC-2800vet, Mindray, China) e expressas como células x10⁹/L.

4.7 Determinação das concentrações plasmáticas de mediadores inflamatórios e hormônios

Após o fim do experimento, a quantificação dos mediadores inflamatórios (TNF- α , IL1- β , IL-6, IL-10 e HIF-1) foi realizada com a utilização de kits comerciais (Duo SET, R&D Systems® EUA). Os ensaios foram conduzidos seguindo as especificações do fabricante e a densidade óptica obtida em espectrofotômetro (SpectraMax®, Molecular Devices, EUA). A quantificação dos hormônios (corticosterona e progesterona) também foi realizada com a utilização de kits comerciais (Cayman Chemical, EUA). Os ensaios foram conduzidos seguindo as especificações do fabricante e a densidade óptica obtida em espectrofotômetro (SpectraMax®, Molecular Devices, EUA).

4.8 Estudo do trânsito intestinal

Os animais receberam imediatamente antes do procedimento anestésico por gavagem o volume de 1 mL da suspensão de carvão ativo a 20% (Lafan Química Fina LTDA, BR). Decorrido o período de IR intestinal, os animais foram submetidos à eutanásia e um segmento compreendido do piloro até o início do ceco foi removido para avaliação da distância percorrida pelo carvão (Ruwart et al., 1980). A distância foi determinada do piloro até o ceco, ou seja, do intestino delgado, que contiver pelo menos 1 cm contínuo de carvão. A distância foi calculada em relação ao comprimento total do intestino delgado e expressa em porcentagem.

4.9 Estudo de permeabilidade da mucosa intestinal

Animais destinados ao estudo da microscopia intravital receberam, antes do procedimento anestésico, por gavagem, o volume de 1 mL de salina tamponada com fosfato (PBS) contendo 50mg/kg de Dextran-FITC (4kD, Sigma-Aldrich, EUA). Ao final do experimento os animais foram exsanguinados e amostras de soro foram obtidas, protegidas da luz e armazenadas a -80°C, para posterior leitura em espectrometria de fluorescência (495nm). As concentrações de Dextran-FITC nas amostras foram obtidas através de uma curva padrão 2000-0.24 ng/mL na diluição seriada de 1:2. Objetivo desta técnica é quantificar quanto do Dextran-FITC extravasa do sistema gastrointestinal para a corrente sanguínea.

4.10 Ensaio de permeabilidade vascular

A quantificação da permeabilidade vascular, para a avaliação do edema no intestino, foi realizada por meio da determinação da concentração do corante azul de Evans (AE), conforme técnica descrita por Sirois e colaboradores (1988). Para tanto, solução contendo 25 mg/kg do corante foram injetados por via endovenosa, no início da reperusão. Ao final do experimento, fragmentos do intestino foram retirados, incubados em formamida (4 mL/g de peso do tecido), à temperatura ambiente por 24 horas, enquanto outros fragmentos, do mesmo animal, foram mantidos em estufa a 37°C por 3 dias consecutivos, para a determinação posterior de seu peso seco. A densidade óptica (DO) das amostras de AE extraído com formamida foi obtida em espectrofotômetro (SpectraMax®, Molecular Devices EUA) em comprimento de onda de 620 nm. A concentração de AE das amostras foi determinada com base na curva padrão de absorbância do corante. Os valores foram expressos em µg de AE/g de peso seco de tecido.

4.11 Análise histomorfométrica

Fragmentos do intestino foram fixados em solução de formaldeído (10%). Os tecidos foram então processados, emblocados em parafina, cortados (4 μm) e corados (hematoxilina/eosina) para análise histopatológica em microscópio óptico. Análises morfométricas convencionais foram realizadas em um corte por animal ($n= 5$ por grupo). A espessura total da mucosa, altura das vilosidades, profundidade da cripta e relação altura-profundidade das vilosidades foram avaliadas por histomorfometria em 10 áreas adquiridas aleatoriamente de cada corte e dois observadores realizaram as avaliações, foi utilizado Software NIS Elements (Nikon, Tóquio, Japão) e os valores médios de cada um foram analisados por testes de correlação para determinar a variabilidade entre os observadores.

4.12 Microscopia intravital in situ de mesentério e análise do fluxo sanguíneo

Para a observação da microcirculação mesentérica após o final do período de reperfusão, 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 e colaboradores (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 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 25 NaHCO_3 ; 1,1 MgSO_4 ; 1,1 KH_2PO_4 e 5 glicose, saturada com uma mistura de gases (95% N_2 5% CO_2). O sistema consiste de microscópio triocular (Axioplan 2, Carl Zeiss Co., Alemanha) acoplado a uma câmara digital para captura de imagens em movimento (AxioCam-HSB, Carl Zeiss Co., Alemanha) e microcomputador. O aumento é de 425x. A interação dos leucócitos com a superfície luminal do endotélio venular (vênulas pós-capilares de 20 a 25 μm de diâmetro) foi estudada em segmento escolhido do vaso, conforme descrito anteriormente (Farsky et al., 1995). O número de leucócitos que se movem na periferia, em contato com o endotélio, foi determinado durante 10 minutos. O número de células que permanecerem aderidas ao endotélio, por mais de 30 segundos, foi determinado em extensão de 100 μm da vênula. Leucócitos migrados para o tecido perivascular foram contados em áreas equivalentes a 5.000 μm^2 . O percentual de perfusão da microcirculação mesentérica foi determinado pela quantificação de vasos (<30 μm de diâmetro) com fluxo normal, dividido pelo número total de vasos em uma área de 1,0 cm^2 .

A determinação do fluxo sanguíneo na microcirculação mesentérica *in situ* e *in vivo* foi avaliada pela utilização de probe (MNP110XP Fine Needle Probe) de 25 mm de extensão e 0.48 mm de diâmetro acoplado a fluxômetro a laser (IN191 Laser Doppler Flowmetry, AD Instruments, EUA). O sinal captado é proporcional ao fluxo de células sanguíneas através da microvasculatura. Portanto, a perfusão microvascular é o produto da velocidade média das células sanguíneas e do número médio de células sanguíneas presentes no tecido sob incidência do laser. Os sinais são registados como unidades de perfusão sanguínea.

4.13 Determinação da presença de neutrófilos pela atividade da mieloperoxidase

A atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) no intestino foi baseada na metodologia descrita em Goldblum et al. (1985). Decorrido o período de reperusão, os animais foram submetidos à laparotomia mediana e exsanguinados pela secção da aorta abdominal. Fragmentos de intestino foram removidos e congelados. Os tecidos foram pesados e homogeneizados em 1 mL de tampão fosfato salina (PBS), 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, Alemanha). As amostras foram centrifugadas a 80 x g durante 15 minutos a 4°C, e o sobrenadante utilizado para determinar a atividade da MPO. O ensaio foi conduzido adicionando a placas de 96 poços: 185 µL de PBS, pH 6,0, 50 µL de H₂O₂ (0,0005%), 50 µL de orto-dianisidina (1,75 mg/mL) e 20 µL das amostras. 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 (SpectraMax®, Molecular Devices, EUA) em comprimento de onda de 450 nm.

4.14 Imunohistoquímica para pesquisa de sintases do óxido nítrico e moléculas de adesão, endotelina 1, MPO, Bcl-2 e Caspase-3

Ao término do experimento, o mesentério foi cuidadosamente removido, imerso em hexano, submetido ao congelamento em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C, preservando suas características para análises posteriores. Foram realizados cortes em série do mesentério (10 µm), colocados sobre lâminas silanizadas (Starfrost®, Knittelglass, Alemanha) posteriormente fixados em acetona fria durante 10 min. As lâminas foram lavadas com solução tampão TRIS salina-tween (TBS-T), seguido de bloqueio de sítios inespecíficos com tampão de bloqueio (2% BSA em TBS-T) e bloqueio da peroxidase endógena (solução de H₂O₂ 2%).

Para a imunodeteção, os anticorpos primários anti-iNOS, anti-eNOS, anti-ICAM-1, anti-VCAM-1, anti-Pselectina, anti-PECAM (1:100; Abcam; EUA), em solução de 2% BSA em TBS-T e os cortes foram incubados *overnight* a 4°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 (Abcam e Boster, respectivamente, EUA) por 1 h a 37°C). Como substrato para coloração foi utilizado AEC (3-amino-9-ethylcarbazole, Vector Laboratories, Burlingame, EUA). Nas reações com marcações fluorescentes utilizou-se um anticorpo secundário biotinilado (ICAM-1) ou conjugado com TRITC (P-selectina) 1:400 em solução TBS-T contendo 1% de BSA durante 2 horas a 37°C. As lâminas foram lavadas com TBS-T, incubadas com 1:200 de estreptavidina-FITC (ICAM-1) (Southern Technologies), durante 2 h a 37°C. Após a lavagem com TBS-T, as lâminas foram tratadas com meio de montagem contendo iodeto de propídio (Vectashield®, Vector Laboratories, EUA).

Para investigar a expressão da mieloperoxidase (MPO), Caspase-3 e Bcl-2 do intestino delgado, os tecidos foram embebidos em parafina e seccionados a 4 mm, reidratados e incubados com tampão citrato (pH 6,0) por 20 minutos a 100°C para recuperação do antígeno. Posteriormente, os cortes foram lavados, bloqueados e enxaguados conforme descrito anteriormente, e incubados por 12 horas em temperatura ambiente com anticorpos de coelho para MPO e Bcl-2 de rato (1:100; BosterBio) e anticorpos de coelho para Caspase-3 de rato (1:100; Abcam). Após a lavagem com TBS-T, as seções foram incubadas por 1 hora a 37°C com anticorpos secundários anti-coelho ligados a HRP (1:100; Boster), lavadas, coradas com AEC (Vector Laboratories) por 5 a 10 minutos e contracoradas com hematoxilina. A marcação no tecido mesentérico foi identificada e a análise foi realizada através de sistema de aquisição de imagens com câmera digital DS-Ri1 (Nikon, Tokyo, Japan), acoplada a microscópio (Nikon) e auxílio do software NIS-Elements-BR (Nikon). Como controle negativo foram utilizadas imagens de cortes incubadas na ausência do anticorpo primário. Foram utilizados 5 animais por grupo, 1 corte por animal e 10 imagens analisadas.

4.15 Real time PCR para expressão gênica de iNOS, eNOS e endotelina-1

Os genes foram quantificados quanto à expressão através de PCR em tempo real, em aparelho StepOne Plus® (Applied Biosystem, EUA). A extração de RNA do mesentério foi realizada com a utilização de kit comercial (Mirvana®, EUA), seguindo o protocolo do fabricante. O cDNA foi transcrito (High capacity Reversetranscriptase kit, Applied Biosystem, EUA) e a reação de PCR em tempo real realizada. Os primers utilizados foram Taqman

(Applied Biosystem, EUA): GAPDH (Rn01775763_g1), β -actin (Rn00667869_m1*), iNOS (Rn00561646_m1*), eNOS (Rn02132634_s1*), endothelin-1 (Rn00561129_m1*). As condições de ciclagem são de 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C seguido de 40 ciclos de 15 segundos 95°C e 1 minuto a 60°C.

4.16 Estudo do receptor P2X7 e nNOS no tecido intestinal

4.16.1 Preparação do material para imunohistoquímica

Os seguimentos intestinais foram obtidos dos animais submetidos aos procedimentos descritos no item 3. Os segmentos do intestino foram colocados em PBS 0,01M. Os segmentos foram limpos de seus conteúdos, abertos ao longo da borda mesentérica e colocados em balsas de isopor com a mucosa voltada para baixo, e esticados por meio de alfinetes. A fixação foi realizada em solução 4% de paraformaldeído em 0,1M de tampão fosfato de sódio, pH 7,0 a 4°C, por uma noite. A seguir, os tecidos foram clareados através de 3 lavagens de 10 minutos cada, em dimetilsufóxido, seguido de 3 lavagens de 10 minutos cada em PBS. Os tecidos foram armazenados em PBS contendo sódio-azida (0,1%) e mantidos a 4°C.

4.16.2 Método de Imunofluorescência

Segmentos do íleo, foram coletados e lavados em PBS 0,1 M (pH 7,4) seguida por fixação de 3 horas em solução de paraformaldeído a 4% (pH 7,4). Após a fixação e clareamento dos tecidos, o material foi seccionado em fragmentos de cerca de 1cm² com o auxílio da lâmina de bisturi. Para o procedimento de dissecação, foi utilizado microscópio e para obtenção dos preparados de membrana os tecidos foram dissecados em camadas, removendo as camadas mucosa, submucosa, e a camada muscular, mantendo somente a camada muscular longitudinal com o plexo mioentérico. O preparado de membrana foi cortado ao meio, resultando em 2 preparados por animal, de 0,5cm² cada. Foram utilizados 5 animais para cada um dos grupos: Sham, IR, Pré P4 e Pós P4, para cada imunoreatividade, para detectar a subpopulação de neurônios nitrérgicos (nNOS+) e o receptor de membrana da família do P2X7.

As membranas foram lavadas três vezes em PBS 0,1 M (pH 7,4) com Triton a 0,5% e durante o processo mantidos sob agitação, após as lavagens os segmentos foram submetidos ao bloqueio de ligações inespecíficas. Para este fim, foram incubadas por uma hora na solução constituída por PBS com Triton-X100 0,5%, albumina de soro bovino a 2% e soro de cabra não imune a 10%. Seguido disso, as membranas foram submetidas a incubação com os anticorpos

primários, sendo eles: anti-nNOS (Boster, EUA) e P2X7 (Novus Biologicals, EUA), diluídos em PBS com Triton-X100 0,1%, 2% de BSA e 2% de soro de cabra (1:1000; e 1:200) , sob agitação durante 48 horas em temperatura ambiente. Após a incubação com anticorpos primários, as membranas foram lavadas novamente por três vezes por 5 minutos cada lavagem em PBS 0,1 M (pH 7,4) com Triton-X100 a 0,1% e incubadas em anticorpo secundário biotinizados: anti-rabbit (Boster, EUA) em diluição 1:400, durante 2 horas. Após a lavagem, as lâminas foram incubadas com estreptoavidina FITC 1:200, por 20 minutos. Após nova lavagem, foram montadas com Vectashild® (Vector, EUA), e armazenadas sob refrigeração, protegidas da luz.

4.16.3 Análises morfoquantitativas dos neurônios mioentéricos

Para a análise da densidade dos neurônios imunorreativos a nNOS e P2X7, foram capturadas 30 imagens de cada animal dos preparados de membrana do plexo mioentérico. A marcação no tecido intestinal foi identificada e a análise através de sistema de aquisição de imagens com câmera digital DS-Ri1 (Nikon, Tokyo, Japan), acoplada a microscópio (Nikon) e analisadas com auxílio do software NIS-Elements-BR (Nikon). Foram contados todos os neurônios presentes nas 30 imagens e os resultados estão expressos como neurônios/cm². Com a ajuda deste mesmo programa a análise morfométrica foi realizada através da medida do perfil de 100 corpos de neurônios de cada animal. Os resultados morfométricos foram expressos em μm^2 .

4.17 Análise dos resultados

Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) ou mediana e intervalos interquartis. Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, seguida dos testes de Tukey ou Bonferroni para comparações múltiplas ou teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn para comparações múltiplas. As análises estatísticas foram conduzidas utilizando GraphPad Prism Software v.9.0.

5 RESULTADOS

5.1 Parâmetros Hemodinâmicos

A indução da isquemia deu-se pela oclusão da aorta descendente, na altura da subclávia esquerda, por um período de 30 minutos, podendo-se observar que houve um aumento transitório desta pressão nos grupos submetidos a isquemia. A efetiva oclusão pode ser observada pela imediata e sustentada diminuição da PAM distal (+/- 10 mmHg), durante os 30 minutos de isquemia. No momento da oclusão há uma inversão das pressões, sendo que a PAM proximal se elevou, enquanto a PAM distal diminuiu. Ao desinsuflar do balão (reperusão), as PAM's invertem-se novamente (Figura 3). Durante todo o período de estudo, houve diferenças entre as pressões do grupo I/R em relação aos animais do grupo Sham.

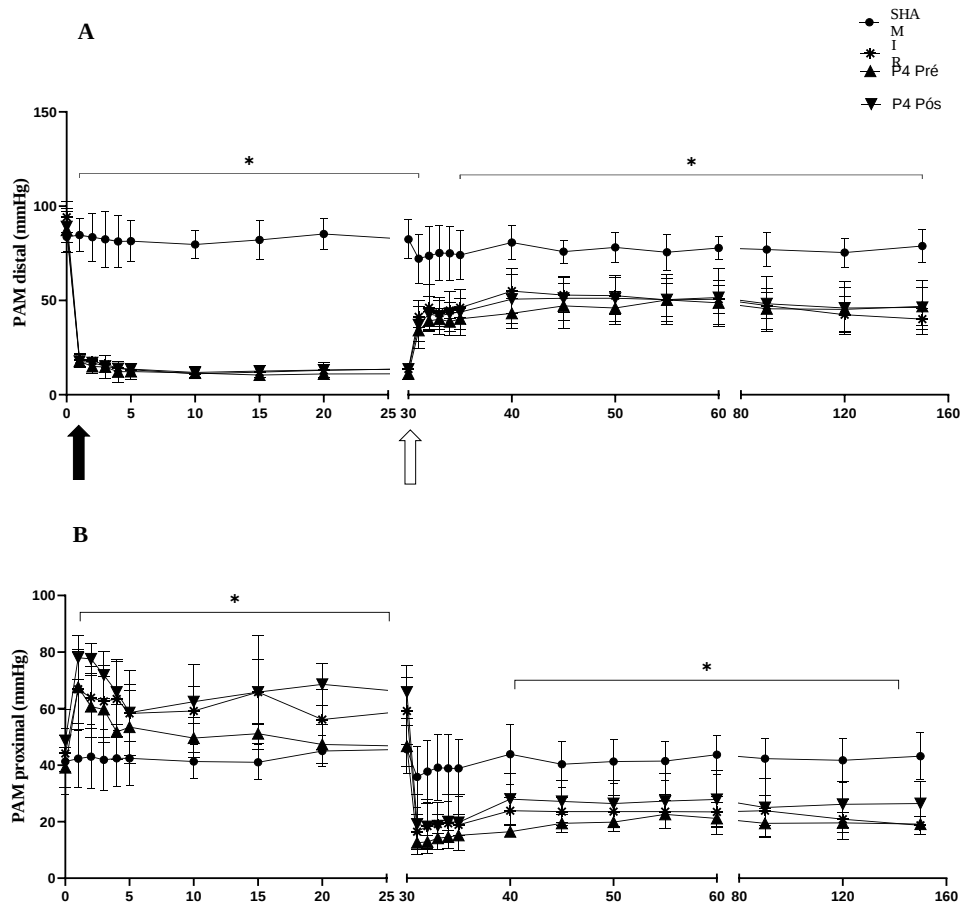


Figura 3: Sham, animais submetidos apenas aos procedimentos cirúrgicos; Isquemia e Reperusão (IR), animais submetidos aos procedimentos cirúrgicos seguidos por isquemia e reperusão; Pré P4, animais tratados com Progesterona (P4, 2mg/kg) antes da indução da isquemia; Pós P4, animais tratados com Progesterona (P4, 2mg/kg) no momento da desocclusão aórtica. A seta preta indica o momento da oclusão da aorta e a seta branca o início da reperusão. Os valores representam a média±EPM (n=7). *P<0,05 em relação ao grupo Sham.

5.2 Concentração sérica de Progesterona e Corticosterona

Foi analisada a concentração de progesterona ao término das 2 horas de reperusão para a confirmação do tratamento, como mostrado na Figura 4. Os animais do grupo Sham e

animais submetidos a I/R apresentaram baixa concentração sérica de progesterona. Entretanto, os animais dos grupos tratados que receberam a progesterona Pré P4 e Pós P4 apresentaram aumento na concentração sérica do hormônio. Paralelamente, foi quantificada a concentração sérica de corticosterona. Como todos os grupos foram submetidos ao estresse cirúrgico e à ventilação mecânica, não evidenciamos diferenças significativas entre eles.

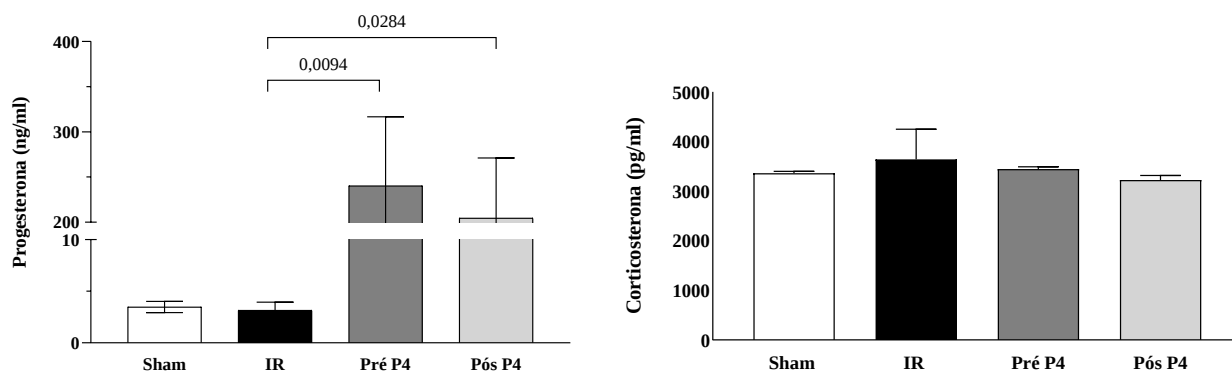


Figura 4: Concentrações séricas de progesterona e corticosterona dos grupos: Sham, animais submetidos apenas aos procedimentos cirúrgicos; Isquemia e Reperusão (IR), animais submetidos aos procedimentos cirúrgicos seguidos por isquemia e reperusão; Pré P4, animais tratados com progesterona (P4, 2mg/kg) antes da indução da isquemia; Pós P4, animais tratados com progesterona (P4, 2mg/kg) no momento da desocclusão aórtica. Os valores representam a média±EPM (n=7). P^{ANOVA} Progesterona 0,003 e $P^{\text{Kruskal-Wallis}}$ Corticosterona 0,343.

5.3 Alterações leucocitárias na circulação e celularidade de medula

Foram analisados os números totais de leucócitos circulantes e paralelamente, foi realizada a análise diferencial. Os resultados são observados na Tabela 1. Observamos aumento significativo no número total de leucócitos circulantes após a manipulação cirúrgica (Final - Sham) bem como em comparação com o grupo IR, predominantemente essa diferença se dá pelo número de granulócitos. Observamos também, a diminuição da quantidade de leucócitos totais e monócitos no tempo final quando comparado com o inicial (basal), em todos os grupos que passaram pelo processo de I/R.

Adicionalmente, todos os grupos submetidos ao processo de I/R apresentaram redução no número de plaquetas no decorrer do experimento. No presente estudo, o componente celular da inflamação foi investigado inicialmente no compartimento sistêmico (sangue e medula). Não foram encontradas alterações no número de células presentes na medula óssea (Figura 5).

Tabela 1 - Número total e diferencial de leucócitos e de plaquetas circulantes

Leucócitos/cm ³						Plaquetas x 10 ⁶ /mL
		Total	Linfócitos	Monócitos	Granulócitos	
Sham	Basal	19800 ± 2275,75	13557,14±1462,68	1028,57±112,78	5414,28±987,16	555,85±39,05
	Isquemia	16028,57±1904,09	8271,42±1104,69	771,42±101,68	6 985,71±1437,16	500,71±27,51
	Final	35457,14±3238,59 * ^α	6042,85±535,79*	1628,57±385,89	28200±2798,12* ^α	497,42±62,02
IR	Basal	26600±2645,571	15957,14±1355,21	1471,42±189,88	8342,85±1888,16	522,28±58,75
	Isquemia	24071,42±3750,09	12057,14±1576,29	1585,71±305,05	10428,57±2226,54	495,7±56
	Final	19042,85±1677,84 *	10728,57±2131,58	828,57±106,26*	7485,71±1338,51	344,28±89,28*
Pré P4	Basal	24828,57±2319,45	16114,28±1621,49	1257,14±161,62	7457,14±904,71	520,42±30,67
	Isquemia	22000 ±2858,82	14157,14±2121,64	1157,14±259,90	6700±1221,24	438,28±52,96
	Final	15200±1917,46 *	7942,85±719,74*	671,42±96,89*	6585,71±1906,30	304,14±100,84*
Pós P4	Basal	20085,71±646,39	11714,28±665,27	1257,14±61,16	7114,28±472,79	686,71±48,57
	Isquemia	19600±1078,35	12228,57±969,22	1300±87,28	6342,85±428,09	550,85±51,83
	Final	14985,71±1598,42*	9142,85±1216,72	657,14±102,02*	5185,71±1396,32	441,71±88,41*
P 2-way ANOVA	P _{tempo} /	0,325	<0,001	0,043	<0,001	0,001
	P _{isquemia} /	0,030	0,030	0,478	<0,001	0,090
	P _{interação}	<0,001	0,129	0,001	<0,001	0,706

Tabela 1: Número total e diferencial de leucócitos e de plaquetas circulantes dos grupos: Sham, animais submetidos apenas aos procedimentos cirúrgicos; Isquemia e Reperfusão (IR), animais submetidos aos procedimentos cirúrgicos seguidos por isquemia e reperfusão; Pré P4, animais tratados com progesterona (P4, 2mg/kg) antes da indução da isquemia; Pós P4, animais tratados com progesterona (P4, 2mg/kg) no momento da desocclusão aórtica. 7 animais por grupo. P tempo *p<0,05 em relação ao valor basal (inicial) do mesmo grupo, ^αp<0,05 em relação ao grupo IR.

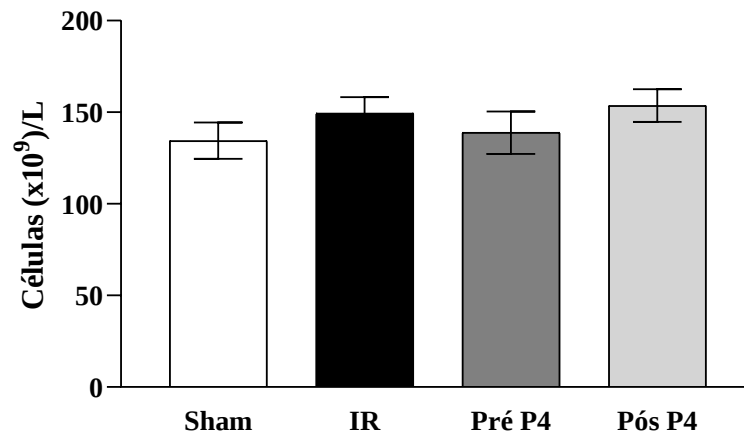


Figura 5: Contagem do número total de leucócitos na medula óssea dos grupos: Sham, animais submetidos apenas aos procedimentos cirúrgicos; Isquemia e Reperusão (IR), animais submetidos aos procedimentos cirúrgicos seguidos por isquemia e reperusão; Pré P4, animais tratados com progesterona (P4, 2mg/kg) antes da indução da isquemia; Pós P4, animais tratados com progesterona (P4, 2mg/kg) no momento da desoclusão aórtica. Os valores representam a média $\pm$ EPM (n=7). P^{ANOVA} 0,464.

5.4 Concentração sérica de mediadores inflamatórios TNF- α ; IL10 e IL-6 ,HIF-1 e CINC-1

Podemos observar na tabela 2 as concentrações de mediadores inflamatórios após a I/R. Notamos que houve aumento na quantidade de TNF- α e IL-6 nos animais do grupo IR quando comparados aos animais do grupo Sham, contudo, os tratamentos com progesterona (grupos Pré P4 e Pós P4) não foram capazes de reduzir a quantidade dessas citocinas pró-inflamatórias.

Na análise de IL-10 vemos um aumento nos animais do grupo IR em relação ao grupo Sham, mas sem diferença nos grupos que receberam tratamento com progesterona antes e após o processo de isquemia (Pré P4 e Pós P4). Ao analisarmos a quantificação de HIF-1 (fator induzível por hipóxia) também não observamos diferenças nas concentrações, em nenhum dos nossos grupos experimentais. Por fim, analisando CINC-1, uma quimiocina análoga a IL-8 nós observamos valores semelhantes dos animais Sham e IR e uma redução no grupo Pós P4 quando comparado ao grupo IR.

Tabela 2 - Quantificação da concentração sérica dos mediadores inflamatórios TNF- α ; IL-6; IL-10; CINC-1 e HIF-1

Mediadores Inflamatórios					
	TNF-α	IL-6	IL-10	CINC-1	HIF-1
Grupos	pg/mL				
Sham	4,26 $\pm$ 2,49	193,5 $\pm$ 86,5	6,9 $\pm$ 3,4	453,1 $\pm$ 83,65	61,42 $\pm$ 9,12
IR	15,5 $\pm$ 6,02	22300 $\pm$ 6575*	942,8 $\pm$ 253*	235,6 $\pm$ 32,42	109,5 $\pm$ 25,29
Pré P4	18,03 $\pm$ 7,02	55350 $\pm$ 7116 $^{\Omega}$	457,3 $\pm$ 74,6	157,1 $\pm$ 8,339	141,8 $\pm$ 60,25
Pós P4	7,63 $\pm$ 2,64	38443 $\pm$ 8903	376,3 $\pm$ 91,1	86,04 $\pm$ 8,356 $^{\#}$	54,53 $\pm$ 10,14
P anova	0,145	0,0003	0,0004	0,0001	0,5232

* representa IR versus Sham (TNF- α $P=0,043$; IL-6 $P=0,031$ e IL-10 $P=<0,0001$).

$^{\#}$ representa IR versus P4 Pós (CINC-1 $P=0,004$)

$^{\Omega}$ representa IR versus Pré (IL-6 $P=0,046$)

Tabela 2: Quantificação da concentração sérica dos mediadores inflamatórios TNF- α ; IL-6; IL-10; CINC-1 e HIF-1 dos grupos: Sham, animais submetidos apenas aos procedimentos cirúrgicos; Isquemia e Reperusão (IR), animais submetidos aos procedimentos cirúrgicos seguidos por isquemia e reperusão; Pré P4, animais tratados com progesterona (P4, 2mg/kg) antes da indução da isquemia; Pós P4, animais tratados com progesterona (P4, 2mg/kg) no momento da desocclusão aórtica. 7 animais por grupo.

5.5 Alterações do trânsito intestinal

Analizamos de modo indireto a motilidade gastrointestinal, avaliando o trânsito de partículas de carvão ativado. Podemos observar na Figura 6, que os animais submetidos ao processo de isquemia e reperusão, grupo IR, apresentaram redução do trânsito gastrointestinal quando comparados aos animais do grupo Sham. Já os animais tratados com progesterona do grupo Pós P4 tiveram uma melhora neste parâmetro em relação ao grupo IR. Não observamos diferença no grupo Pré P4.

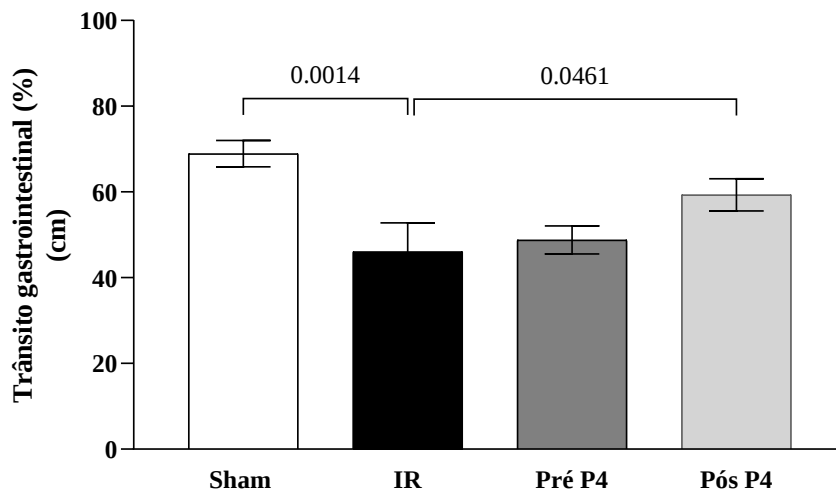


Figura 6: Alteração da motilidade intestinal dos grupos: Sham, animais submetidos apenas aos procedimentos cirúrgicos; Isquemia e Reperusão (IR), animais submetidos aos procedimentos cirúrgicos seguidos por isquemia e reperusão; Pré P4, animais tratados com progesterona (P4, 2mg/kg) antes da indução da isquemia; Pós P4, animais tratados com progesterona (P4, 2mg/kg) no momento da desocclusão aórtica. Os valores representam a média±EPM (n=7). P^{ANOVA} 0,005.

5.6 Permeabilidade da barreira intestinal

Para a avaliação da permeabilidade da barreira intestinal durante o processo de IR, foi administrado aos animais antes do início do procedimento o polissacarídeo Dextran (4kD) associado ao isotiocianato de fluoresceína (FITC) por meio de gavagem. Podemos observar (Figura 7), o aumento da quantidade deste marcador fluorescente no soro dos animais do grupo IR, quando comparado ao grupo Sham, e a diminuição da quantidade do marcador no soro dos animais do grupo Pré P4, mas não no grupo Pós P4.

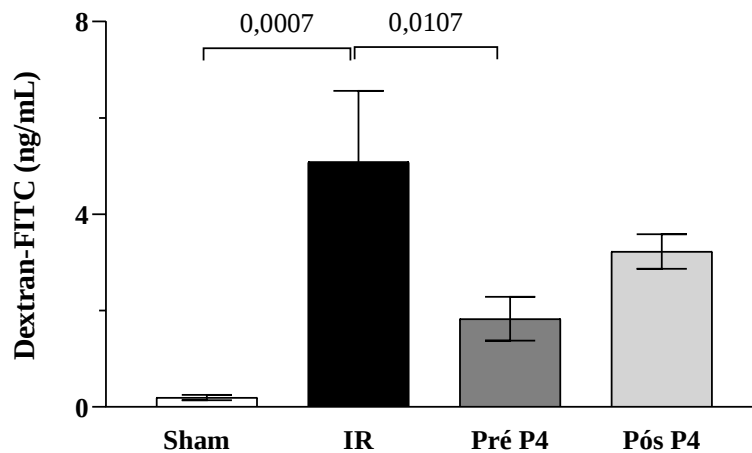


Figura 7: Quantificação da permeabilidade intestinal dos grupos: Sham, animais submetidos apenas aos procedimentos cirúrgicos; Isquemia e Reperusão (IR), animais submetidos aos procedimentos cirúrgicos seguidos por isquemia e reperusão; Pré P4, animais tratados com progesterona (P4, 2mg/kg) antes da indução da isquemia; Pós P4, animais tratados com progesterona (P4, 2mg/kg) no momento da desoclusão aórtica. Os valores representam a média±EPM (n=5). P^{ANOVA} 0,004

5.7 Alterações na permeabilidade microvascular

A permeabilidade vascular foi avaliada por meio da técnica do extravasamento do corante azul de evans (AE) (Figura 8). Os animais do grupo Pós P4 apresentaram valores menores de AE em comparação com os animais do grupo IR, indicando que o tratamento com progesterona após a isquemia e reperusão modulou positivamente as alterações na permeabilidade microvascular gerada pelo processo. Não observamos diferenças nos animais do grupo Pré P4.

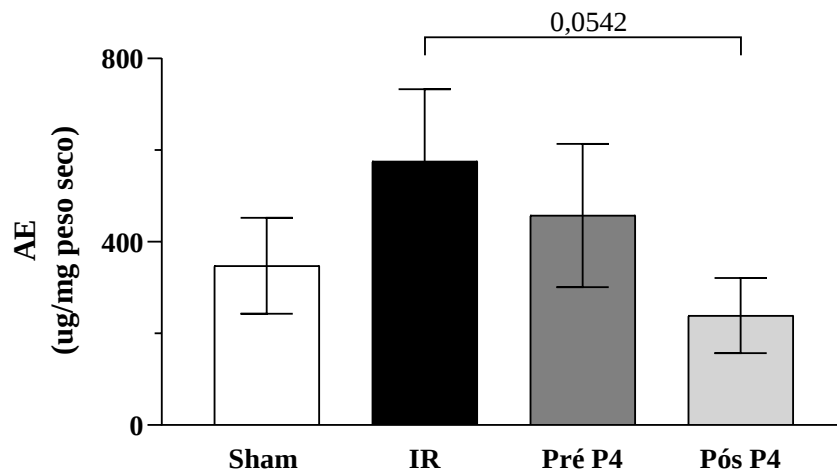


Figura 8: Avaliação da permeabilidade vascular medida em ug/mg, na relação peso úmido/seco, entre os grupos: Sham, animais submetidos apenas aos procedimentos cirúrgicos; Isquemia e Reperusão (IR), animais submetidos aos procedimentos cirúrgicos seguidos por isquemia e reperusão; Pré P4, animais tratados com progesterona (P4, 2mg/kg) antes da indução da isquemia; Pós P4, animais tratados com progesterona (P4, 2mg/kg) no momento da desoclusão aórtica. Os valores representam a média±EPM (n=7). $P_{\text{Kruskal-Wallis}} 0,250$.

5.8 Análise do fluxo sanguíneo no leito mesentérico

O percentual de perfusão da microcirculação mesentérica foi observado a partir de um fluxômetro e nossos resultados destacados na Figura 9, mostram a diminuição da porcentagem de fluxo nos vasos perfundidos nos animais do grupo IR em comparação com o grupo Sham. Porém, nós também observamos que nenhum dos nossos tratamentos (Pré P4 e Pós P4) foram capazes de influenciar no restabelecimento do fluxo sanguíneo no leito mesentérico, uma vez que não foram observadas diferenças significantes com o grupo IR.

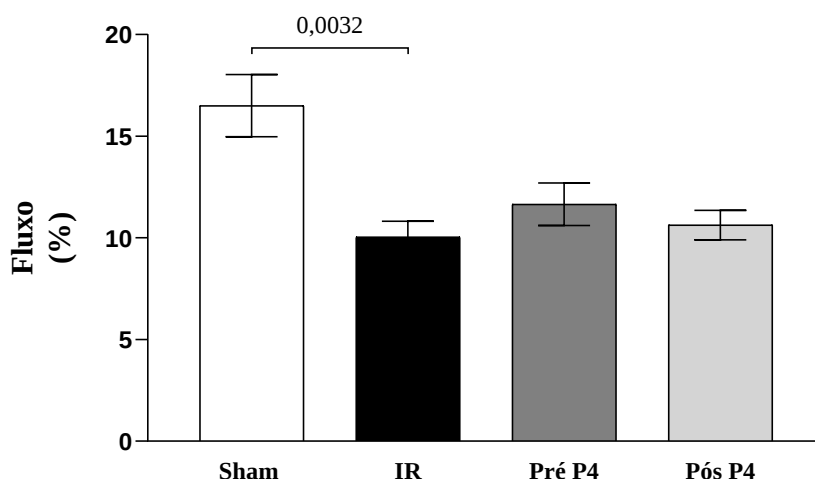


Figura 9: Análise do fluxo sanguíneo mesentérico dos animais: Sham, animais submetidos apenas aos procedimentos cirúrgicos; Isquemia e Reperusão (IR), animais submetidos aos procedimentos cirúrgicos seguidos por isquemia e reperusão; Pré P4, animais tratados com progesterona (P4, 2mg/kg) antes da indução da isquemia; Pós P4, animais tratados com progesterona (P4, 2mg/kg) no momento da desoclusão aórtica. Os valores representam a média±EPM (n=5). P Kruskal-Wallis 0,023.

5.9 Análise da perfusão microcirculatória

Para a análise da microcirculação mesentérica foi utilizada a técnica de microscopia intravital e como demonstrado na Figura 10, observamos uma diminuição na porcentagem de vasos perfundidos nos animais que passaram pelo processo de I/R (grupo IR), em comparação com os animais do grupo Sham. Entretanto, observamos o aumento na porcentagem desses vasos nos animais que receberam o tratamento com progesterona previamente à lesão (Pré P4). Não observamos diferenças significativas nos animais do grupo Pós P4. Na Figura 10 estão as fotomicrografias representativas de vasos no leito mesentérico.

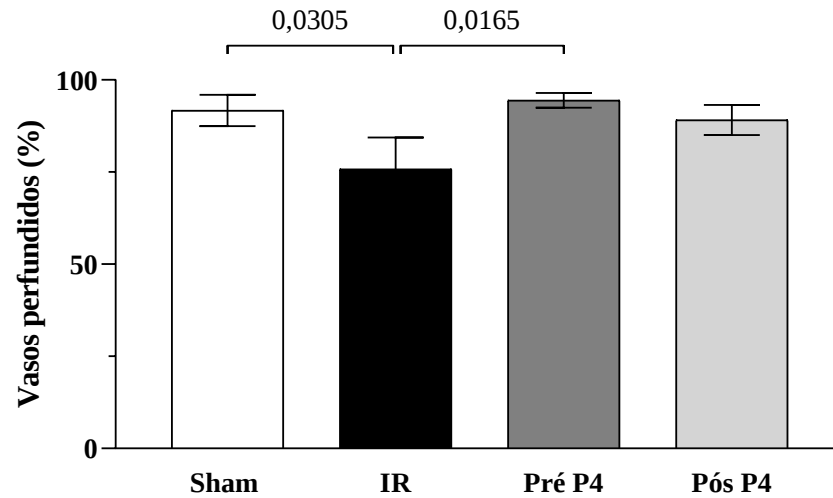


Figura 10: Análise da perfusão microcirculatória dos animais: Sham, animais submetidos apenas aos procedimentos cirúrgicos; Isquemia e Reperusão (IR), animais submetidos aos procedimentos cirúrgicos seguidos por isquemia e reperusão; Pré P4, animais tratados com progesterona (P4, 2mg/kg) antes da indução da isquemia; Pós P4, animais tratados com progesterona (P4, 2mg/kg) no momento da desoclusão aórtica. Os valores representam a média±EPM (n=5). $P_{\text{Kruskal-Wallis}}$ 0,081.

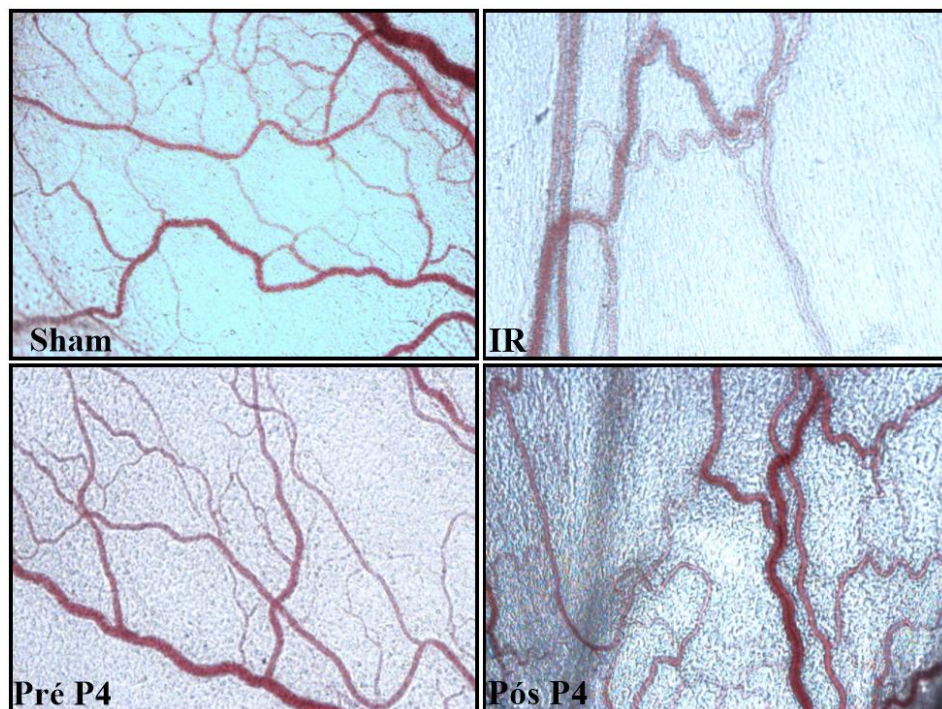


Figura 11: Imagens representativas do leito mesentérico dos animais: Sham, animais submetidos apenas aos procedimentos cirúrgicos; Isquemia e Reperusão (IR), animais submetidos aos procedimentos cirúrgicos seguidos por isquemia e reperusão; Pré P4, animais tratados com progesterona (P4, 2mg/kg) antes da indução da isquemia; Pós P4, animais tratados com progesterona (P4, 2mg/kg) no momento da desoclusão aórtica.

5. 10 Expressão proteica das isoformas da sintase do óxido nítrico endotelial (eNOS) e induzida (iNOS), e Endotelina-1 (ET-1) nos vasos do mesentério

Quantificamos a expressão proteica das isoformas das sintases do NO e ET-1 por imunohistoquímica. Conforme mostrado na Figura 12, podemos observar um aumento na expressão de eNOS (A) nos vasos do mesentério dos animais do grupo Pós P4 em relação aos animais do grupo IR. Não encontramos diferenças nos animais do grupo P4 Pré. Em relação à iNOS (B), notamos o aumento na porcentagem de células positivas nos animais do grupo IR em relação aos animais do grupo Sham. Os tratamentos com progesterona não tiveram nenhum efeito sobre a iNOS. Observamos também, um aumento de (ET-1) (C) nos vasos do mesentério dos animais do grupo Pós P4 quando comparados aos animais do grupo IR. Nenhuma diferença foi observada nos animais do grupo Pré P4.

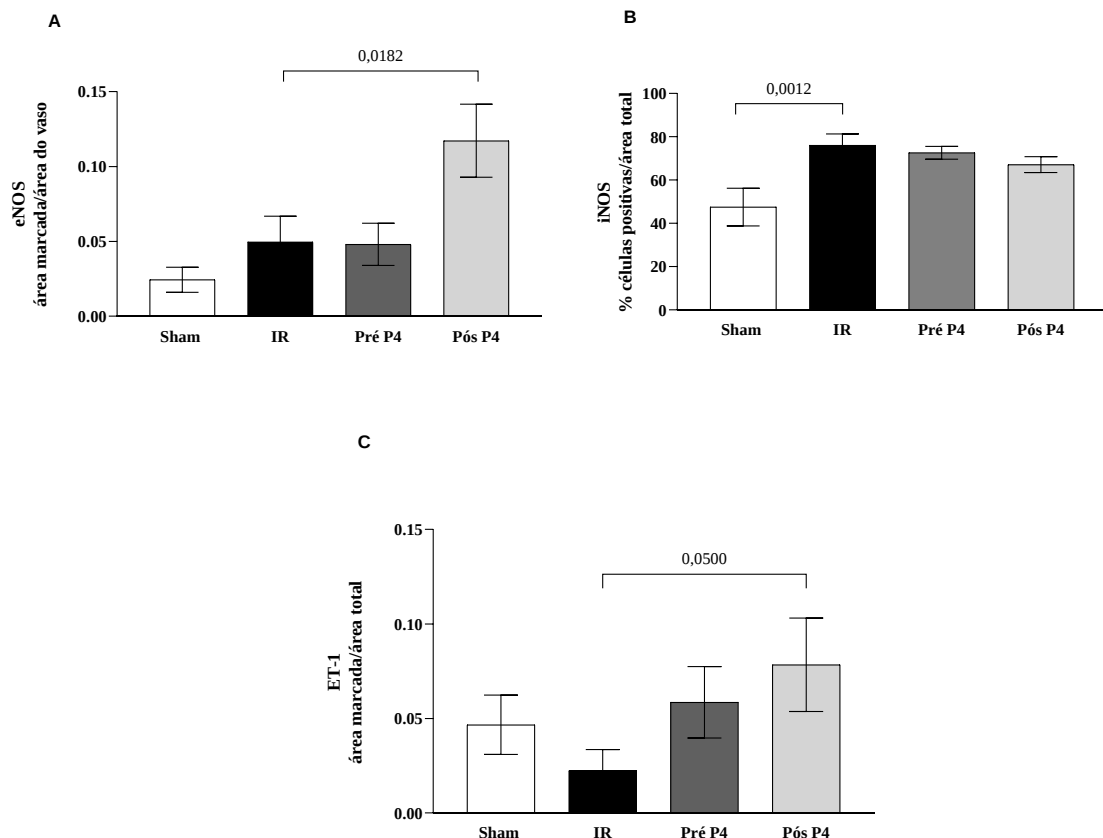


Figura 12: Expressão protéica das isoformas da sintase do óxido nítrico endotelial (eNOS) (A), induzida (iNOS) (B) e ET-1 (C) nos grupos: Sham, animais submetidos apenas aos procedimentos cirúrgicos; Isquemia e Reperusão (IR), animais submetidos aos procedimentos cirúrgicos seguidos por isquemia e reperusão; Pré P4, animais tratados com progesterona (P4, 2mg/kg) antes da indução da isquemia; Pós P4, animais tratados com progesterona (P4, 2mg/kg) no momento da desoclusão aórtica. Os valores representam a média±EPM de 5 animais por grupo, 1 corte por animal, 10 imagens analisadas. P Kruskal-Wallis eNOS 0,002, iNOS 0,006 e ET-1 0,248.

5.11 Expressão Gênica Relativa das isoformas da sintase do óxido nítrico endotelial (eNOS) e induzida (iNOS), e Endotelina-1 (ET-1) no mesentério

Complementarmente à análise da expressão proteica de eNOS, iNOS, e ET-1, foi observada a expressão gênica relativa destas moléculas através da técnica de PCR. Os nossos dados demonstram não haver diferença estatística na expressão gênica das moléculas analisadas, em nenhum dos nossos grupos experimentais (Figura 13).

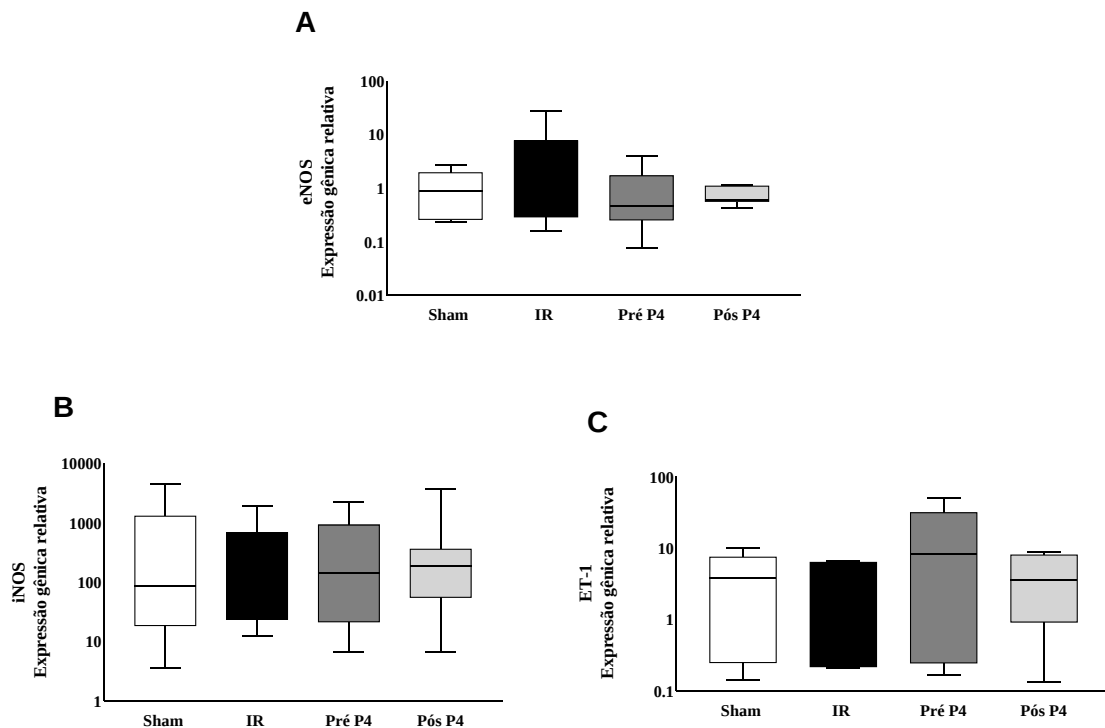


Figura 13: Expressão gênica relativa das isoformas da sintase do óxido nítrico endotelial (eNOS) (A) induzido (iNOS) (B) e de Endotelina-1 (C) nos grupos: Sham, animais submetidos apenas aos procedimentos cirúrgicos; Isquemia e Reperusão (IR), animais submetidos aos procedimentos cirúrgicos seguidos por isquemia e reperusão; Pré P4, animais tratados com progesterona (P4, 2mg/kg) antes da indução da isquemia; Pós P4, animais tratados com progesterona (P4, 2mg/kg) no momento da desocclusão aórtica. Os valores representam a média±EPM (n=5). $P^{\text{Kruskal-Wallis}}$ eNOS 0,733; iNOS 0,970 e ET-1 0,174.

5.12 Interação leucócito-endotélio

Com o intuito de avaliar o comportamento celular nos vasos do mesentério, utilizamos microscopia intravital. Conforme mostrado na Figura 14, nossos resultados indicam que não houve diferença significativa na quantidade de leucócitos em rolamento (*Rollers*, A) nos vasos mesentéricos em nenhum dos grupos experimentais. Apesar disso, encontramos um aumento

na quantidade de leucócitos aderidos nos vasos dos animais do grupo IR quando comparados ao grupo Sham (B). Também é possível observar que tanto os animais do grupo Pré P4 quanto do grupo Pós P4, apresentaram diminuição na quantidade desses leucócitos aderidos em relação ao IR. Adicionalmente vemos o aumento do número de leucócitos migrados (C) nos animais do grupo IR em comparação com o grupo Sham e também notamos, que os animais que receberam ambos os tratamentos (Pré P4 e Pós P4), tiveram uma diminuição na quantidade destes leucócitos migrados em relação ao grupo IR.

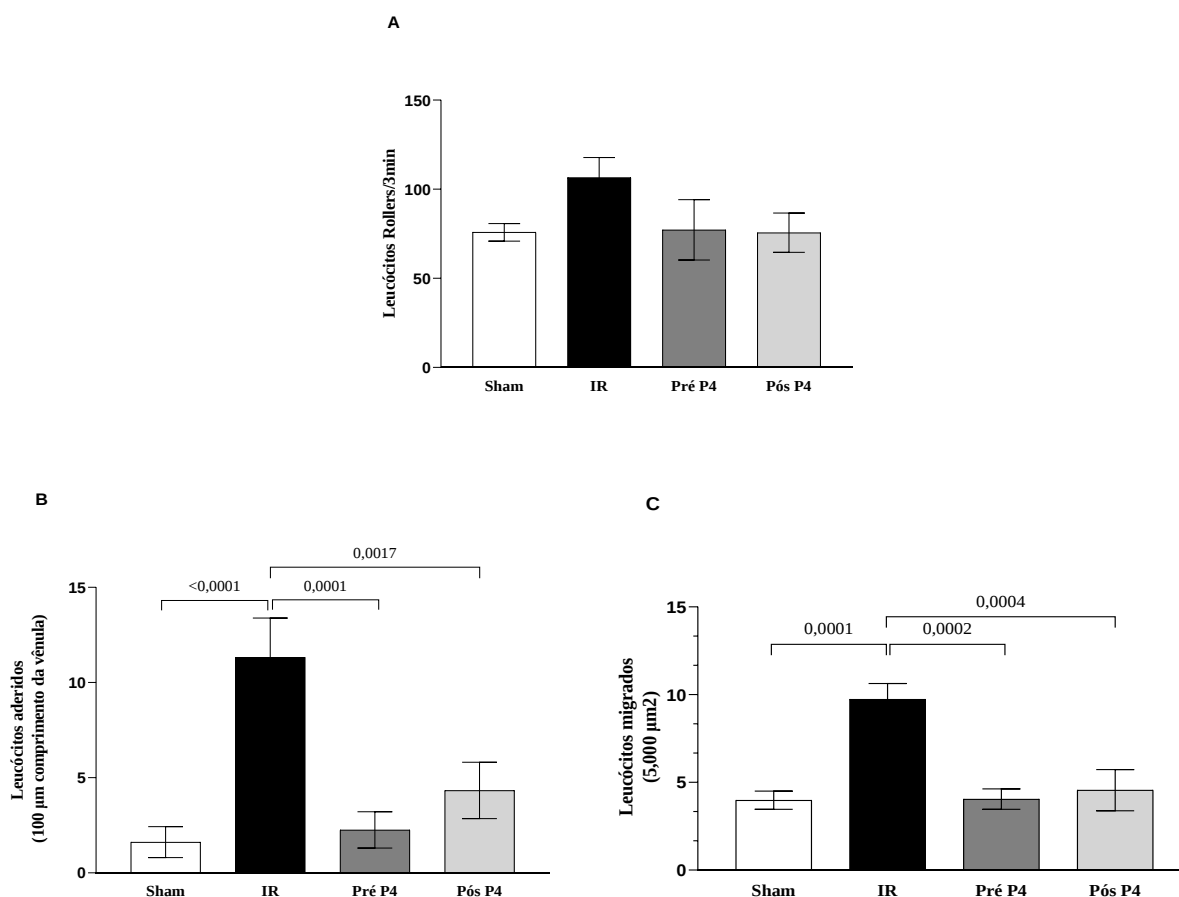


Figura 14: Contagem de leucócitos rolantes (rollers) (A), aderidos (B) e migrados (C) nos vasos mesentéricos: Sham, animais submetidos apenas aos procedimentos cirúrgicos; Isquemia e Reperusão (IR), animais submetidos aos procedimentos cirúrgicos seguidos por isquemia e reperusão; Pré P4, animais tratados com progesterona (P4, 2mg/kg) antes da indução da isquemia; Pós P4, animais tratados com progesterona (P4, 2mg/kg) no momento da desocclusão aórtica. Os valores representam a média±EPM (n=5). P^{Kruskal-Wallis} rollers 0,332; P^{ANOVA} aderidos <0,001 e migrados <0,001.

5.13 Análise da atividade e expressão de mieloperoxidase

Com o objetivo de avaliar a presença/ativação de neutrófilos no intestino avaliamos a enzima mieloperoxidase. A análise da atividade de MPO, bem como sua expressão proteica,

estão apresentadas na Figura 15. Nossos dados indicam aumento da atividade (A) de MPO no íleo dos animais do grupo IR, apontando que houve recrutamento ou ativação de neutrófilos em decorrência da isquemia e reperfusão. Por outro lado, observamos o efeito positivo da progesterona nos dois grupos tratados, prevenindo o aumento de atividade de MPO. Na expressão, vemos um aumento nos animais do grupo IR em comparação com o grupo Sham e a diminuição nos dois grupos que receberam a progesterona em comparação com o grupo IR.

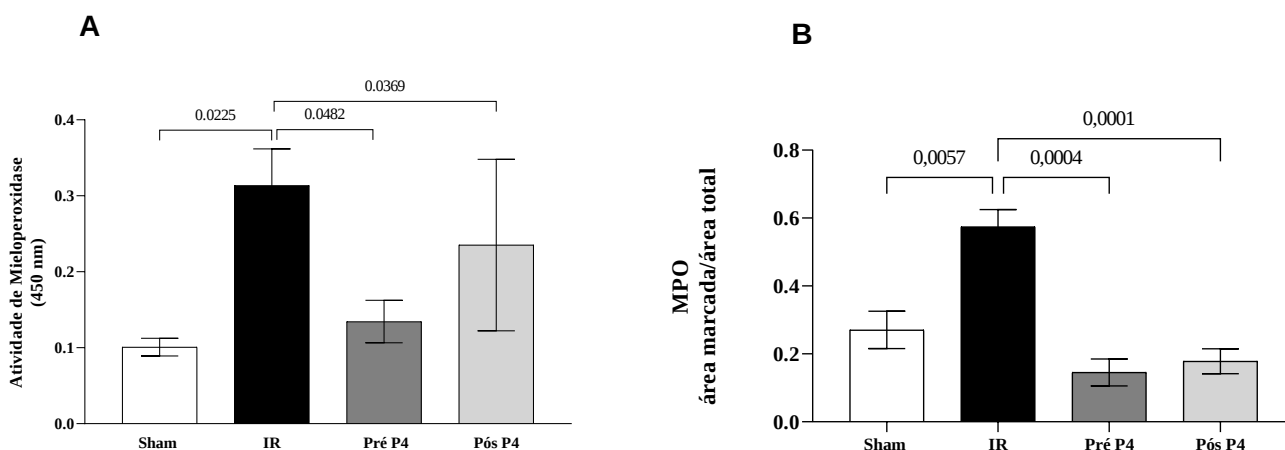


Figura 15: Análise da atividade (A) e expressão (B) de mieloperoxidase no intestino nos grupos: Sham, animais submetidos apenas aos procedimentos cirúrgicos; Isquemia e Reperfusão (IR), animais submetidos aos procedimentos cirúrgicos seguidos por isquemia e reperfusão; Pré P4, animais tratados com progesterona (P4, 2mg/kg) antes da indução da isquemia; Pós P4, animais tratados com progesterona (P4, 2mg/kg) no momento da desocclusão aórtica. Os valores representam a média±EPM de 5 animais por grupo (atividade) e expressão 5 animais por grupo, 1 corte por animal, 10 imagens analisadas. $P_{\text{Kruskal-Wallis}}$ Atividade: 0,073 e Expressão $p < 0,001$.

5.14 Análise de Moléculas de Adesão Intercelular

Foram avaliadas as moléculas ICAM-1 (molécula de adesão intercelular-1), VCAM-1 (molécula de adesão de célula vascular-1), PECAM-1 (molécula de adesão celular endotelial plaquetária) e P-selectina. Os resultados expostos na Figura 16, mostram não haver diferenças na expressão de VCAM-1 (B) em nenhum dos nossos grupos experimentais. Na análise de ICAM-1 (A) notamos o aumento na expressão desta molécula nos animais do grupo IR quando comparados ao grupo Sham, mas nenhuma diferença dos grupos tratados com progesterona em relação ao IR.

Contudo, ao analisarmos a expressão de P-selectina (C), vemos um aumento no grupo dos animais que passaram pelo processo de IR em comparação com os animais Sham, e que o tratamento após a IR (grupo Pós P4) foi capaz de diminuir a expressão da molécula nas células

endoteliais, não havendo diferença no grupo tratado previamente (Pré P4). Resultados semelhantes foram encontrados na análise de PECAM-1 (D), em que vemos nos animais do grupo Pré P4 uma diminuição na expressão desta molécula de adesão, quando comparada ao grupo IR, mas não no grupo Pós P4. Na figura 17 estão as fotomicrografias representativas da imunohistoquímica para as moléculas de adesão.

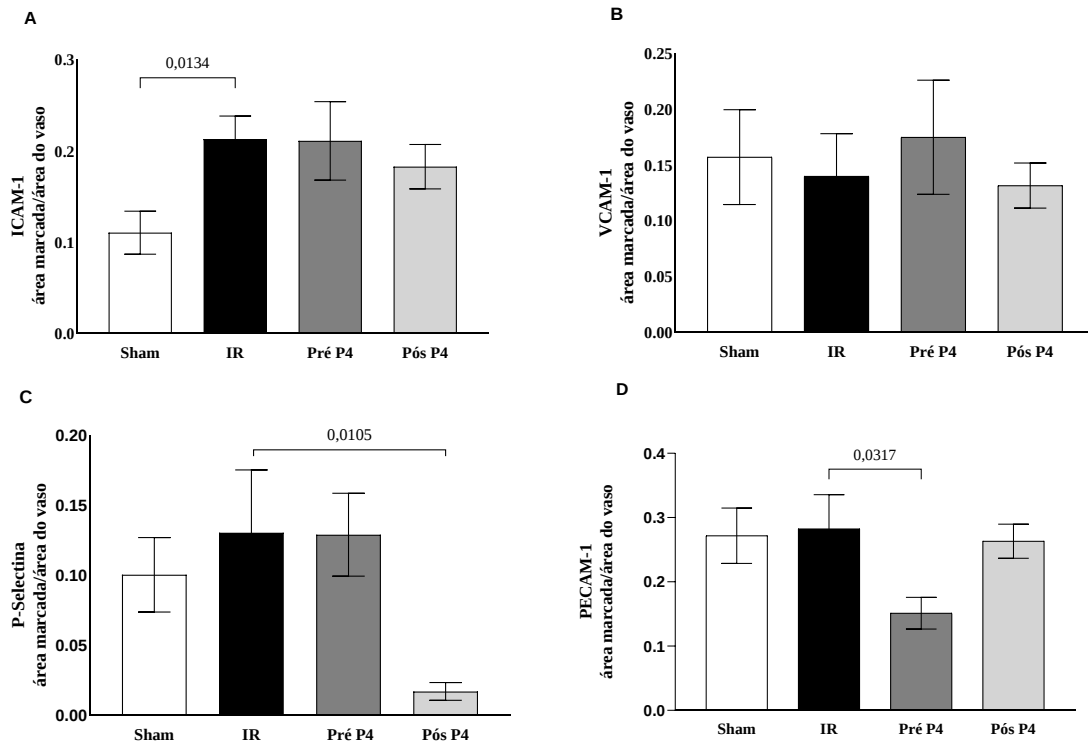


Figura 16: Quantificação da expressão das moléculas ICAM-1(A), VCAM-1(B), P-selectina e (C) PECAM-1 (D) nos vasos da microcirculação mesentérica nos grupos: Sham, animais submetidos apenas aos procedimentos cirúrgicos; Isquemia e Reperusão (IR), animais submetidos aos procedimentos cirúrgicos seguidos por isquemia e reperusão; Pré P4, animais tratados com progesterona (P4, 2mg/kg) antes da indução da isquemia; Pós P4, animais tratados com progesterona (P4, 2mg/kg) no momento da desocclusão aórtica. Os valores representam a média±EPM de 5 animais por grupo, 1 corte por animal, 10 imagens analisadas. P^{ANOVA} ICAM-1 0,050; VCAM-1 0,859; P-selectina 0,037 e PECAM-1 0,122.

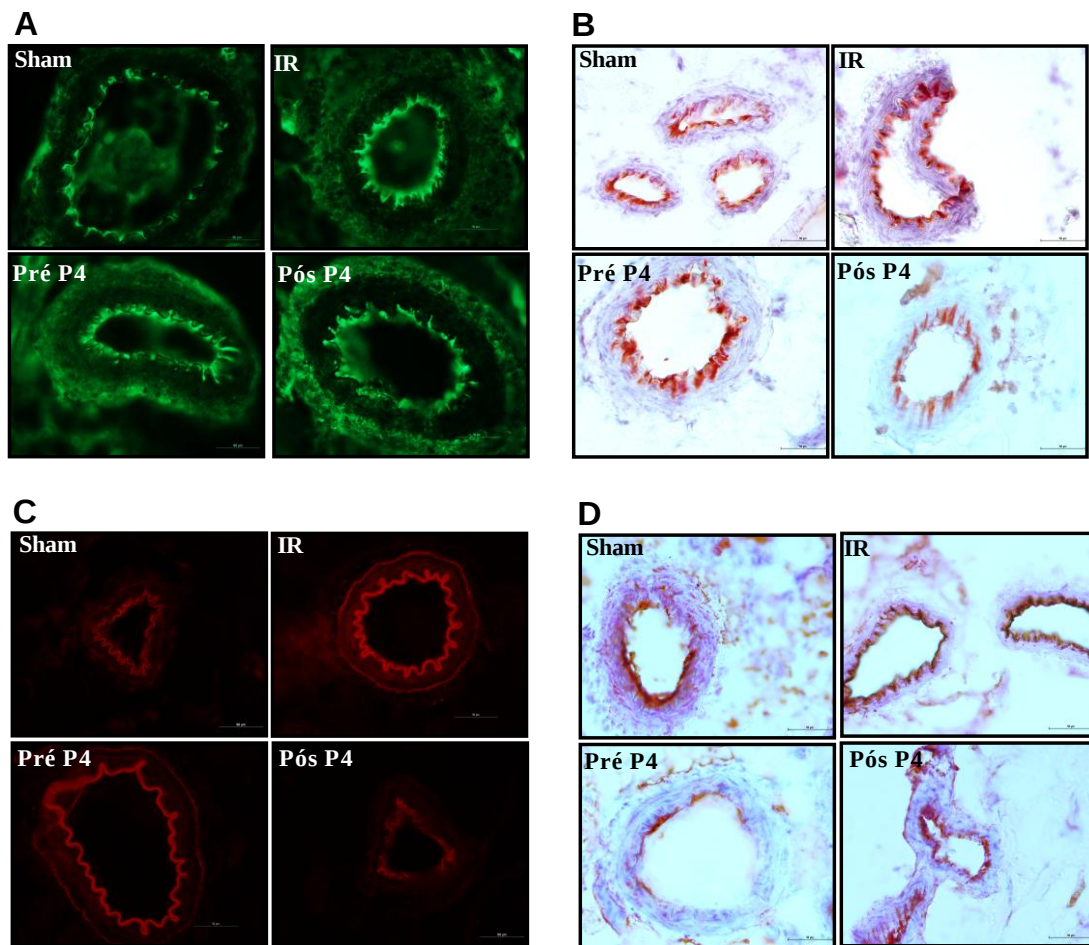


Figura 17: Imagens ilustrativas de imunohistoquímica das moléculas de adesão ICAM-1(A), VCAM-1(B), P-selectina (C) e PECAM-1 (D) nos vasos da microcirculação mesentérica nos grupos: Sham, animais submetidos apenas aos procedimentos cirúrgicos; Isquemia e Reperusão (IR), animais submetidos aos procedimentos cirúrgicos seguidos por isquemia e reperusão; Pré P4, animais tratados com progesterona (P4, 2mg/kg) antes da indução da isquemia; Pós P4, animais tratados com progesterona (P4, 2mg/kg) no momento da desoclusão aórtica.

5.15 Análise histológica

A análise histomorfométrica do intestino permitiu avaliar o comprometimento da mucosa intestinal em nosso modelo. Nossos dados estão ilustrados na Figura 18 em que podemos observar que os ratos submetidos à lesão de I/R apresentam diminuição da altura das vilosidades (A), da espessura total da mucosa (C), e também na razão da altura das vilosidades e cripta (D), quando comparados aos animais do grupo Sham. Não encontramos diferença na profundidade das criptas (B). Contudo, não foram observados efeitos positivos da progesterona em nenhum dos grupos tratados. Na Figura 19 estão as fotomicrografias representativas de intestino, aumento final de 100x.

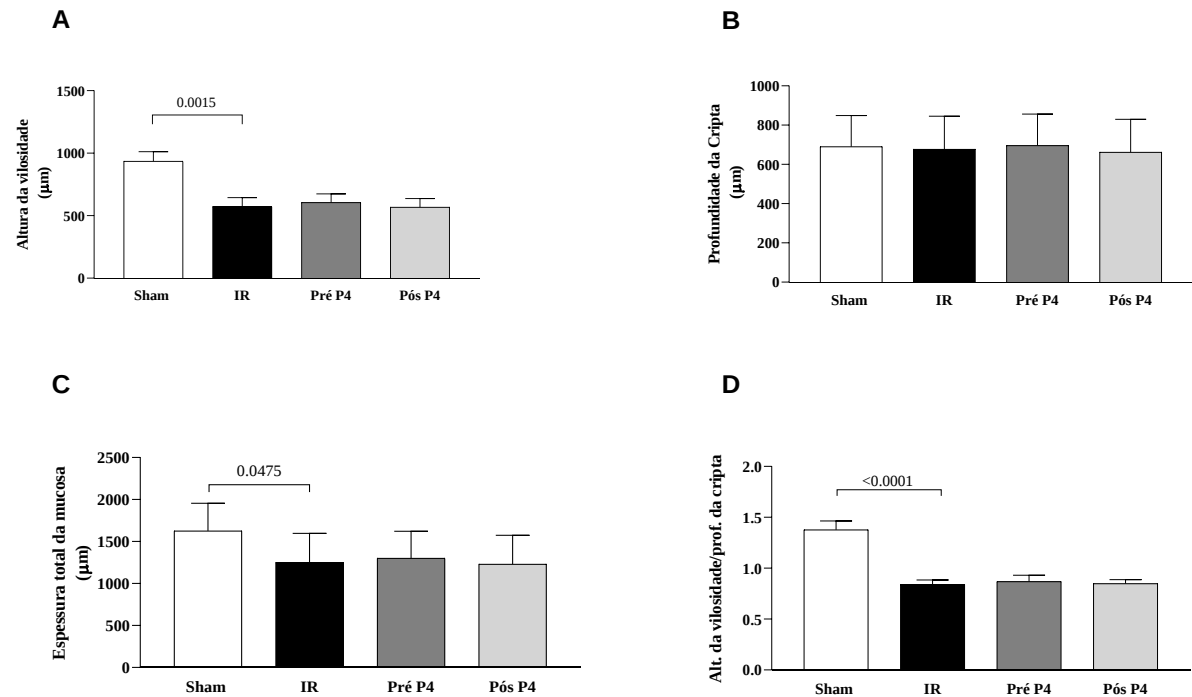


Figura 18: Análise histomorfométrica de intestino: (A) representa altura das vilosidades; (B) profundidade de cripta; (C) espessura total da mucosa e (D) relação altura da vilosidade/profundidade de cripta, nos grupos: : Sham, animais submetidos apenas aos procedimentos cirúrgicos; Isquemia e Reperusão (IR), animais submetidos aos procedimentos cirúrgicos seguidos por isquemia e reperusão; Pré P4, animais tratados com progesterona (P4, 2mg/kg) antes da indução da isquemia; Pós P4, animais tratados com progesterona (P4, 2mg/kg) no momento da desoclusão aórtica. Os valores representam a média±EPM de 5 animais por grupo, 1 corte por animal, 10 imagens analisadas. P^{ANOVA} , altura das vilosidades 0,002; profundidade da cripta 0,980; altura da mucosa 0,123; razão da altura da vilosidade e cripta $p < 0,001$.

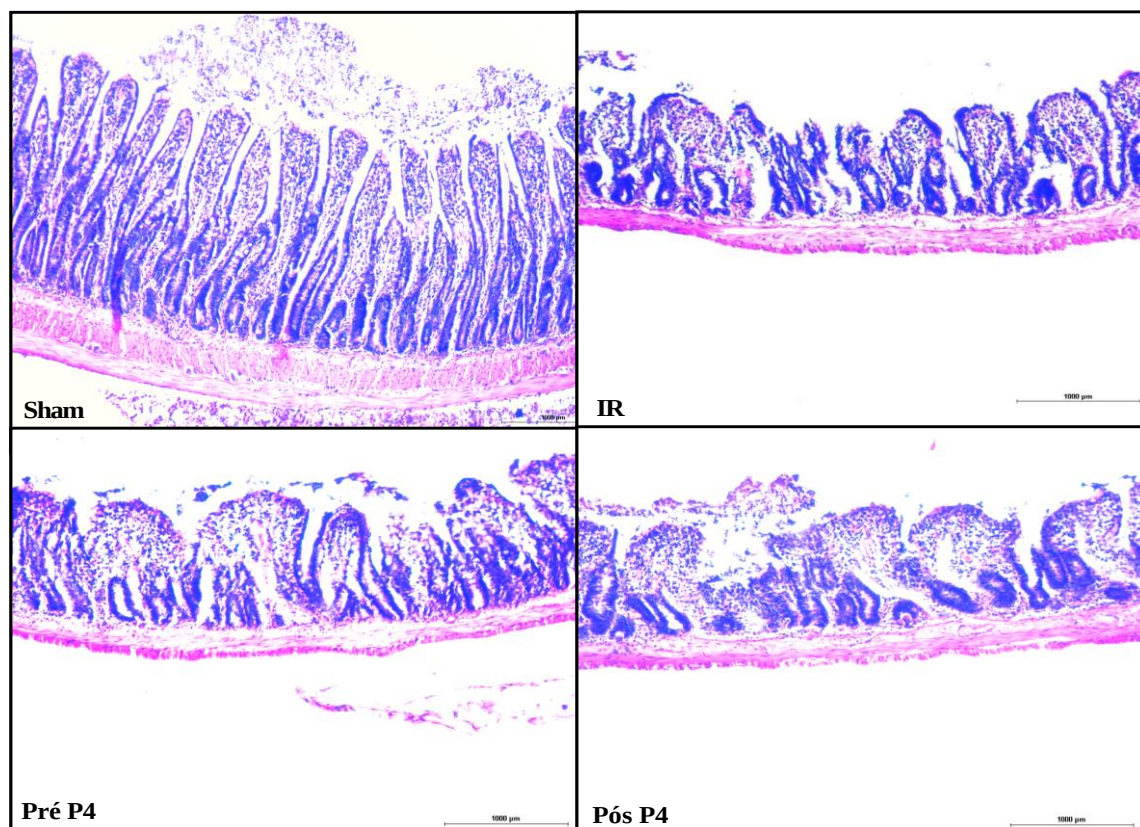


Figura 19: Fotomicrografias representativas de intestino dos grupos: Sham, animais submetidos apenas aos procedimentos cirúrgicos; Isquemia e Reperusão (IR), animais submetidos aos procedimentos cirúrgicos seguidos por isquemia e reperusão; Pré P4, animais tratados com progesterona (P4, 2mg/kg) antes da indução da isquemia; Pós P4, animais tratados com progesterona (P4, 2mg/kg) no momento da desoclusão aórtica. Aumento final de 100x.

5.16 Análise de moléculas envolvidas na morte celular por apoptose

Analizamos as proteínas Bcl-2 e Caspase-3 e observamos um aumento significativo na expressão de Caspase-3 nos animais do grupo IR quando comparados ao grupo Sham. Nos animais do grupo Pré P4, houve uma redução de Caspase-3 comparado ao grupo IR (Figura 20). No entanto, no grupo Pós P4, essa diminuição não foi observada. Ao analisar a Bcl-2, não encontramos diferenças em sua expressão, em nenhum dos nossos grupos experimentais.

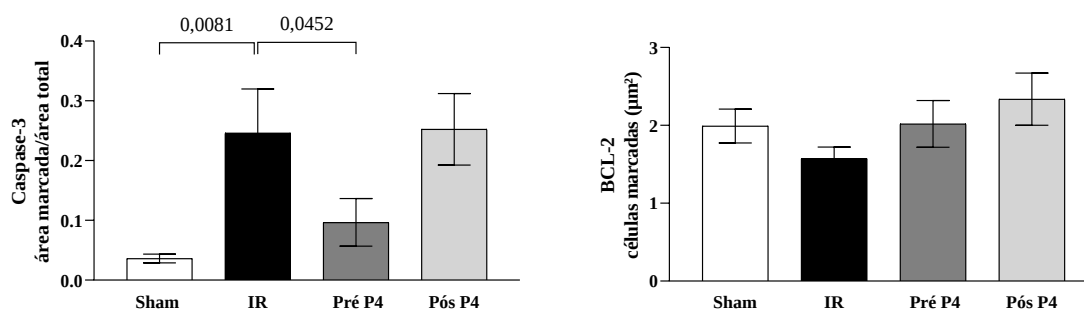


Figura 20: Expressão protéica de Bcl-2 e Caspase-3 nos grupos: Sham, animais submetidos apenas aos procedimentos cirúrgicos; Isquemia e Reperusão (IR), animais submetidos aos procedimentos cirúrgicos seguidos por isquemia e reperusão; Pré P4, animais tratados com progesterona (P4, 2mg/kg) antes da indução da isquemia; Pós P4, animais tratados com progesterona (P4, 2mg/kg) no momento da desocclusão aórtica. Os valores representam a média±EPM de 5 animais por grupo, 1 corte por animal, 10 imagens analisadas. P Kruskal-Wallis Caspase-3 0,004 e Bcl-2 0,325.

5.17 Expressão de nNOS e receptor P2X7 nos neurônios do plexo mioentérico

A análise da expressão de nNOS (Figura 21), nos neurônios do plexo mioentérico, avaliada pela densidade (A) e pelo perfil celular (B), não mostrou diferenças significativas entre os grupos.

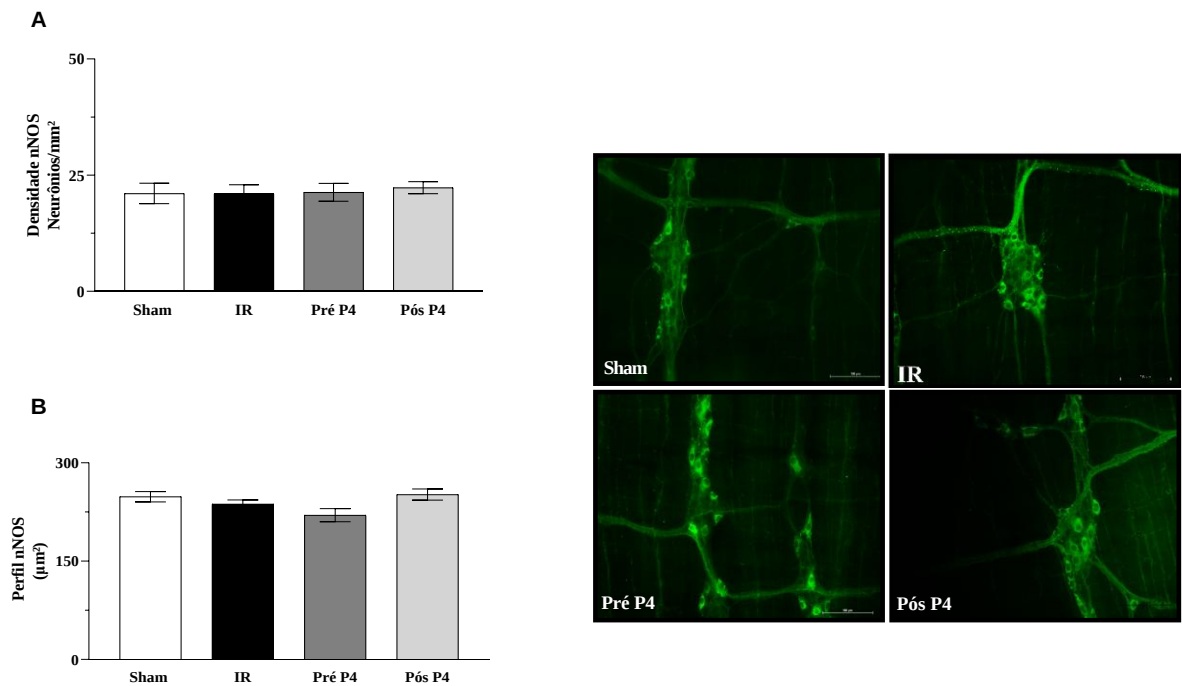


Figura 21: Imunofluorescência para a expressão proteica de óxido nítrico síntase neuronal (nNOS), densidade (A), perfil celular (B) e fotomicrografias representativas (400x) das reações realizadas nas células neuronais do plexo miontérico, nos grupos: Sham, animais submetidos apenas aos procedimentos cirúrgicos; Isquemia e Reperfusão (IR), animais submetidos aos procedimentos cirúrgicos seguidos por isquemia e reperfusão; Pré P4, animais tratados com progesterona (P4, 2mg/kg) antes da indução da isquemia; Pós P4, animais tratados com progesterona (P4, 2mg/kg) no momento da desoclusão aórtica. Os valores representam a média±EPM de 5 animais por grupo, 1 corte por animal, 30 imagens analisadas. P^{ANOVA} densidade 0,960 e perfil 0,042.

A análise da expressão de P2X7 nos neurônios mioentéricos do tecido intestinal não revelou diferenças entre os grupos estudados (Figura 22).

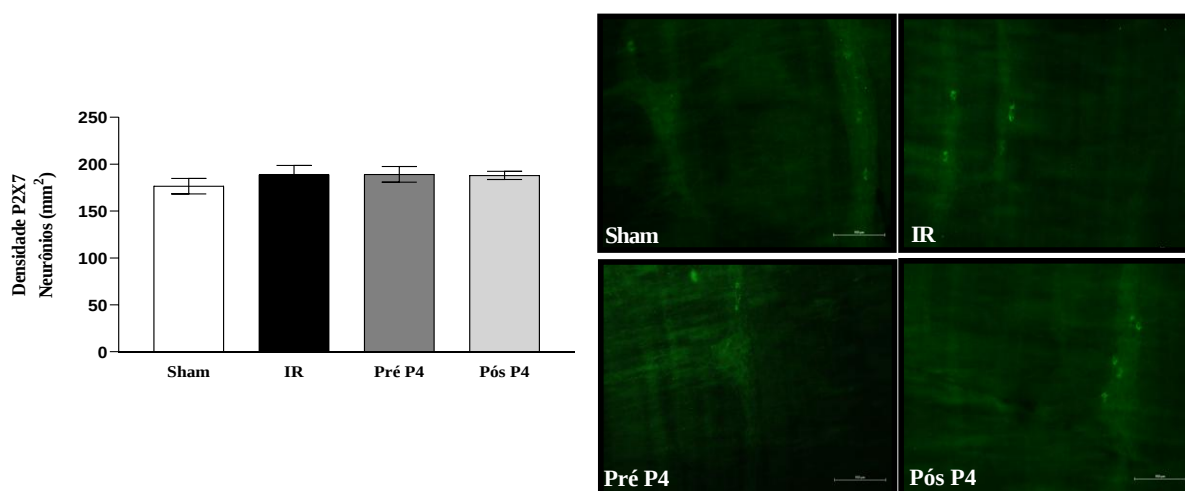


Figura 22: Imunofluorescência para a expressão proteica do receptor P2X7 nas células neuronais do plexo miontérico, análise da densidade nos grupos: Sham, animais submetidos apenas aos procedimentos cirúrgicos; Isquemia e Reperusão (IR), animais submetidos aos procedimentos cirúrgicos seguidos por isquemia e reperusão; Pré P4, animais tratados com progesterona (P4, 2mg/kg) antes da indução da isquemia; Pós P4, animais tratados com progesterona (P4, 2mg/kg) no momento da desocclusão aórtica. Os valores representam a média±EPM de 5 animais por grupo, 1 corte por animal, 30 imagens analisadas. $P_{\text{Kruskal-Wallis}} 0,866$.

6 DISCUSSÃO

Este estudo oferece uma nova perspectiva sobre o uso terapêutico de hormônios na evolução do quadro de I/R aórtica em um modelo experimental. Obtivemos resultados positivos nos grupos que receberam o tratamento com progesterona (P4) como a melhora do trânsito gastrointestinal e a prevenção do aumento da permeabilidade da barreira intestinal (mucosa), impactando na formação do edema. O tratamento também foi capaz de reduzir o infiltrado leucocitário no intestino, modulando a liberação de mediadores inflamatórios sistêmicos. É bem estabelecido que a circulação gastrointestinal é comprometida pela I/R aórtica, desencadeando importantes alterações metabólicas que resultam em lesão tecidual, com a liberação de mediadores inflamatórios e aumento da expressão de moléculas de adesão endotelial (Rocha de Souza et al., 2018). Em relação à microcirculação, o tratamento com progesterona foi capaz de manter a perfusão nos microvasos mesentéricos, diferentemente dos animais não tratados que passaram pela I/R e apesar de uma alteração pouco expressiva das moléculas de adesão, houve redução na quantidade de leucócitos aderidos e migrados. Embora a análise histológica tenha indicado danos na mucosa intestinal e ausência de efeitos significativos com os tratamentos propostos, foi observada uma redução nos marcadores apoptóticos sob ação da progesterona. Deste modo, os achados indicam que a administração de progesterona tanto anteriormente

quanto após a oclusão aórtica, exercem efeitos positivos para atenuar o desenvolvimento da lesão.

Em nosso trabalho, administramos a progesterona tanto em um contexto preventivo quanto terapêutico (antes e após a isquemia, respectivamente), em grupos distintos. De modo geral, ambos os tratamentos demonstraram a capacidade de atenuar os efeitos prejudiciais provocados pelo processo de I/R em diferentes análises. A determinação de 2 horas como período de reperfusão reproduz trabalhos anteriores do grupo com este modelo. (Rocha de Sousa et al., 2018; Sobral et al., 2022). Os resultados obtidos revelaram queda da pressão arterial sistêmica devido à oclusão aórtica em todos os animais que passaram pela lesão de I/R, o que confirma a eficácia do modelo experimental utilizado. Em relação à dosagem sérica de progesterona, nos grupos que receberam o tratamento observamos o aumento na concentração em relação aos demais grupos, confirmando a efetividade da administração.

Diversos autores relatam aumento de corticosterona após a lesão de isquemia e reperfusão, porém, acreditamos que o estresse causado pela gavagem, com os animais acordados, somado ao estresse cirúrgico possam ser fatores determinantes para não conseguirmos identificar diferenças em nossos grupos experimentais. Adicionalmente foram avaliados os números totais de leucócitos circulantes, acompanhados de uma análise diferencial, encontrando-se aumento significativo no número total de leucócitos circulantes após a manipulação cirúrgica (Final – Sham) em comparação com o grupo IR, principalmente atribuído ao aumento de granulócitos. Nossos dados podem indicar influência do estresse cirúrgico associado à ventilação mecânica, favorecendo a mobilização leucocitária para o compartimento vascular, com o predomínio de granulócitos. Observamos também redução nos leucócitos totais e monócitos no tempo final em relação ao basal, em todos os grupos submetidos à I/R. Além disso, todos os grupos expostos à IR apresentaram diminuição no número de plaquetas ao longo do experimento, como já descrito por Sobral et al. (2022).

É sabido que a ação anti-inflamatória e imunomoduladora da progesterona está associada com a redução da síntese e liberação de citocinas pró inflamatórias bem como a inibição da ativação e migração de células imunes (Pettus et al., 2005; Raghupathy & Szekeres-Bartho; 2022). Por conseguinte, avaliamos a expressão de mediadores inflamatórios que desempenham um papel fundamental na resposta inflamatória durante a lesão de I/R, sendo mediadoras na comunicação celular e modulação da inflamação. Durante o processo de reperfusão, a privação de oxigênio e nutrientes geradas durante a isquemia, causa danos teciduais que desencadeiam a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-6, que são rapidamente produzidas por células endoteliais, macrófagos e outras células imunes

(Oruckaptan et al., 2009; Zhang et al., 2010; Flessas et al., 2011). Estudo prévio de nosso grupo mostrou que neste modelo de I/R as concentrações séricas de mediadores inflamatórios, como IL-1 β , IL-6 e IL-10 encontram-se elevadas (Sobral et al., 2022).

Em nossos resultados, observamos que a I/R elevou as concentrações de TNF- α IL-6 e IL-10, e também que a redução observada de CINC-1 nos animais do grupo Pós P4 pode ser importante para reduzir o número de leucócitos no tecido intestinal e na circulação mesentérica, uma vez que as quimiocinas ativam os leucócitos para desencadear a resposta imune por meio da mobilização celular. Experimentos com células humanas demonstraram que a redução dos níveis de progesterona levou a um aumento da expressão de IL-8 (análoga a CINC-1) (Zhao et al., 2013). Ademais, estudos apontam que a progesterona possui efeitos benéficos em quadros de sepse, promovendo a redução de citocinas inflamatórias, como IL-6 e TNF- α , e restaurando as atividades das enzimas antioxidantes em diferentes tecidos. Ademais, a progesterona apresenta propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, atenuando a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) bem como reduzindo a apoptose celular no tecido intestinal (Aksoy et al., 2014). Em modelos experimentais, o tratamento com progesterona resultou em níveis significativamente mais baixos de marcadores inflamatórios e oxidativos, como malondialdeído (MDA), óxido nítrico (NO), além de preservar de forma significativa a integridade da mucosa intestinal (Karatepe et al., 2012).

Adicionalmente, o processo de I/R levou a diminuição do trânsito gastrointestinal e resultados semelhantes foram vistos por Ricardo da Silva et al. (2021) e Umer et al. (2020) utilizando um modelo de I/R intestinal direta. Nossos resultados mostram que o tratamento com progesterona após a isquemia foi capaz de reverter a redução da motilidade gerada pela I/R. Este efeito pode estar associado às propriedades anti-inflamatórias da progesterona no músculo liso intestinal, que auxiliam na restauração da motilidade normal. A modulação das contrações do músculo liso pelo óxido nítrico (NO), mediada por neurônios não-adrenérgicos e não colinérgicos, é essencial. Portanto, alterações no nível basal de NO ou na sua geração induzida pela I/R podem impactar significativamente a motilidade intestinal (Li et al., 2022).

Estudos apontam que a progesterona exerce um papel inibitório nas células musculares lisas intestinais, em parte por elevar a síntese de óxido nítrico, o que induz o relaxamento do músculo liso, contribuindo para um efeito inibitório na motilidade gastrointestinal. Esse efeito ocorre pela inibição de vias de sinalização que levam à contração, como a Rho quinase (Alqudah et al., 2022), ou pelo aumento de NO, promovendo a produção de cGMP a partir do trifosfato de guanossina (Al-Shboul et al., 2018). Por outro lado, um estudo realizado por Liu et al. (2002) demonstrou que ratos machos tratados com baixas doses de progesterona (até 3

mg/kg) apresentaram melhora na motilidade intestinal. Esses resultados sugerem que o efeito da progesterona pode variar conforme a dose e o contexto experimental.

Além disso, a progesterona pode modular a resposta ao estresse oxidativo e à inflamação, fatores cruciais na disfunção intestinal pós-isquemia. Por meio de suas propriedades anti-inflamatórias, a progesterona desempenha efeitos neuroprotetores em neurônios do sistema nervoso central, periférico e entérico, sendo esses últimos essenciais para a regulação da motilidade intestinal (Stein et al., 2008; Stegemann et al., 2023).

Consideramos em nosso modelo que o processo de I/R aórtica resultou em aumento da permeabilidade da barreira intestinal nos animais do grupo IR quando comparados ao Sham, evidenciada por danos estruturais e possivelmente disfunção de junções epiteliais. A literatura mostra que um evento crucial na cascata fisiopatológica da I/R intestinal é a ruptura da barreira intestinal, decorrente da privação de oxigênio e nutrientes ao tecido. Essa condição resulta em danos teciduais, acompanhados pela geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), ativação de vias de morte celular e desencadeamento de uma resposta inflamatória subsequente à reperfusão do tecido (Grootjans et al., 2010; Shimada et al., 2024). No entanto, o tratamento com progesterona antes do processo de I/R demonstrou um efeito protetor, preservando a integridade da barreira intestinal. Esse efeito pode ser relacionado à capacidade da progesterona de reduzir a inflamação e o estresse oxidativo, reforçando as junções entre as células epiteliais e impedindo a translocação de endotoxinas e microrganismos para a circulação sistêmica (Zhou et al., 2019; van der Giessen et al., 2019). Um estudo conduzido por Zhou et al. (2019) demonstrou que a progesterona foi capaz de reduzir a permeabilidade intestinal, promovendo o aumento da expressão de ocludina, uma proteína integrante das junções oclusivas. Além disso, outros estudos evidenciam o papel benéfico da progesterona na preservação das barreiras intestinal e hematoencefálica, utilizando diferentes modelos experimentais, como na doença inflamatória intestinal e no trauma encefálico. (Si et al., 2014; van der Giessen et al., 2019;). Foi descrito também que o estrogênio e a progesterona aliviam o estresse do retículo endoplasmático, diminuem a produção de citocinas pró-inflamatórias, estimulam a cicatrização de feridas e aumentam a função de barreira das células epiteliais em modelos de doença inflamatória intestinal (van der Giessen et al., 2019).

Outro aspecto avaliado neste estudo, foi a alteração da permeabilidade microvascular, em que vimos a diminuição nos animais do grupo tratado após a lesão de isquemia em comparação ao grupo IR. A lesão de I/R resulta em aumento da permeabilidade vascular, conforme observado em modelos de choque hemorrágico e trauma (*in vivo e in vitro*) (Bernardo-Castro et al., 2023). Kimizuka et al., (2004) mostraram que durante a reperfusão de

enxerto intestinal, há geração de espécies reativas de oxigênio, que são amplamente responsáveis pela fisiopatologia do dano celular direto associado à lesão de I/R, causando danos e morte das células endoteliais. Esse processo resulta na disfunção da microcirculação e na ativação de potentes cascatas inflamatórias, como liberação de citocinas, expressão de moléculas de adesão e ativação de fatores de ativação plaquetária. No contexto do trauma encefálico, embora os mecanismos pelos quais a progesterona reduz o edema não estejam completamente elucidados, sabe-se que a progesterona pode reduzir os níveis de aquaporina 4, uma proteína de canal de água da membrana, e modular o edema cerebral, além de inibir a captação ativa de íons via Na/K-ATPase, o que também pode ser relevante para a regulação da permeabilidade microvascular (Wei & Xiao, 2013).

O processo de isquemia leva à restrição do fluxo sanguíneo e a diminuição da perfusão dos vasos mesentéricos. Em trabalho anterior, com modelo de isquemia e reperfusão observamos a redução significativa do fluxo sanguíneo intestinal no grupo IR em comparação ao grupo Sham (Rocha de Sousa et al., 2018), mesmo resultado encontrado em nosso estudo. Outros dados da literatura corroboram este quadro (Kimizuka, 2004) que consistente no comprometimento microvascular típico dessas condições (Guan et al., 2008; Hörer et al., 2014). A redução no fluxo pode ser explicada pelo aumento da resistência vascular, inflamação e formação de microtrombos que frequentemente acompanham a reperfusão. Embora nossos tratamentos com progesterona não tenham influenciado no fluxo sanguíneo mesentérico, trabalhos mostram a progesterona como sendo um hormônio vasoativo modulando canais de cálcio e recuperando o fluxo sanguíneo após isquemia, que poderia ser um dos mecanismos associados a este quadro. (Barbagallo et al. 2001).

Ao analisarmos a perfusão na microcirculação mesentérica, observamos que a administração de progesterona contribuiu para uma melhor perfusão nos animais que receberam tratamento prévio a isquemia quando comparados com os animais do grupo IR, sugerindo um papel na modulação da microcirculação após o evento isquêmico. Esse efeito pode ser atribuído à capacidade da progesterona de reduzir o estresse oxidativo e a inflamação local, modulando a síntese de NO (Omar et al., 1995; Smith et al., 2009; Aller et al., 2014), aumentando a quantidade de vasos sanguíneos perfundidos e promovendo a recuperação da função vascular. Assim, a progesterona pode representar uma estratégia terapêutica para minimizar danos vasculares após a I/R que provavelmente contribuem também com alterações no trânsito intestinal observadas neste estudo.

Neste cenário, o aumento da expressão proteica de eNOS e endotelina-1 nos animais do grupo que receberam o tratamento com progesterona após a isquemia sugere uma modulação

favorável do equilíbrio vasomotor. A endotelina é reconhecida como um potente vasoconstritor, desempenhando um papel crucial na regulação do tônus vascular durante a resposta inflamatória, especialmente no cenário do processo de I/R, o qual pode levar a lesão endotelial e estresse oxidativo (Serracino-Inglott et al., 2001). O NO atua como uma molécula de sinalização celular; modula o tônus muscular sendo um potente vasodilatador, regula a secreção de insulina e modula o tônus das vias aéreas e o peristaltismo intestinal (Andrabi et al., 2023; Bu et al., 2022). No âmbito da I/R, é observado que a ET e o NO exercem controle mútuo por meio de mecanismos de *feedback* autócrino, o que impacta a expressão tanto de endotelina quanto das sintases de NO: eNOS e iNOS (Ozel et al., 2001). Diversos estudos apontam que o processo de I/R pode aumentar a síntese de compostos bioativos, incluindo a endotelina, o que se reflete no aumento dos níveis plasmáticos dessa molécula (Ayada et al., 2005). Nossos resultados demonstraram uma diminuição da marcação de ET em vasos do mesentério nos animais do grupo IR em relação ao grupo Pós P4, sugerindo que, em vez de se acumular localmente nas células endoteliais, ela pode estar sendo liberada na corrente sanguínea. Outro ponto relevante está relacionado à interação entre os esteróides femininos e a ET como demonstrado em modelos celulares, evidências indicam que a progesterona, pode inibir a liberação de ET (Morey et al., 1998; Sebzda et al., 2018), o que coincide com nossos achados em que vimos o aumento de ET nos animais tratados do grupo Pós P4 em relação ao grupo I/R. Além disso, Kiprono et al. (2013) demonstraram que a progesterona pode reduzir a secreção de ET por células endoteliais em resposta à isquemia placentária, sinalizando também que essa molécula poderia se acumular no endotélio, uma observação que igualmente corrobora nossos dados. Tendo em vista que a progesterona poderia inibir a liberação de endotelina, se mantendo esta, acumulada no vasos, esses dados destacam a complexa interação da progesterona com a função endotelial em situações de I/R. Ainda no contexto cardiovascular, a progesterona é conhecida por seus efeitos benéficos, como a indução da liberação de óxido nítrico pelo endotélio vascular, promovendo vasodilatação (Pang et al., 2015). Em nosso estudo encontramos o aumento de eNOS nos animais do grupo Pós P4 em relação ao grupo IR. Complementarmente dados da literatura mostraram que a progesterona aumenta a expressão de eNOS, sugerindo que essa ação ocorre via receptor de progesterona PR-A (receptor nuclear) e mPR- α (receptor de membrana) (Pang et al., 2015; You Y et al., 2020). Esses achados reforçam a importância da progesterona na modulação das respostas vasculares no quadro de I/R. Levando em consideração que, neste estudo, foram encontradas diferenças entre os grupos apenas nas análises proteicas e não na expressão gênica de eNOS, ET-1 e iNOS, propõe-se que os efeitos do tratamento com progesterona derivem de ações rápidas de natureza não genômica.

De fato, as vias de sinalização não genômicas desencadeadas pela ativação dos receptores hormonais presentes na membrana plasmática podem ser responsáveis pelos efeitos imediatos da progesterona sobre a microcirculação mesentérica (Barbagallo et al. 2001; Nilsen & Brinton, 2002).

O cenário sistêmico da lesão por I/R envolve interações complexas entre os sistemas imune e vascular. Em nossas análises utilizamos a técnica de microscopia intravital que nos permitiu observar em tempo real as interações dos leucócitos com o endotélio de vasos mesentéricos. Nossos dados mostram não haver diferenças em relação a quantidade de leucócitos em rolamento (células que interagem com o endotélio e rolam sobre o leito vascular) em nenhum dos nossos grupos estudados, no entanto, quando analisamos o número de leucócitos aderidos e leucócitos migrados, encontramos aumento nos animais do grupo IR e uma diminuição nos animais dos dois grupos que receberam tratamento com progesterona. Este achado aparentemente não está relacionado ao número de leucócitos circulantes, uma vez que todos os grupos apresentaram leucocitose ao final do experimento, principalmente devido à neutrofilia. Resultados conformes foram descritos por Rocha de Sousa et al., (2018), sobre o aumento dos leucócitos migrados após I/R aórtica e, em modelo de I/R mesentérica, também foi observado um aumento significativo no número de neutrófilos firmemente aderidos ao endotélio (Szabó et al., 2006).

Diversos estudos mostraram que a lesão de I/R ocorre principalmente devido às interações de células polimorfonucleares (PMN) com as células endoteliais em tecidos reperfundidos (Massberg et al., 199; Kumar et al., 2009; Szabó et al., 2006). Além disso existe uma ampla evidência na literatura para a regulação da função imunológica pela progesterona por meio de seu efeito em células musculares lisas, estromais e perivasculares (Gotkin et al., 2006; Hardy et al., 2006; Luk et al., 2010) e, como descrito em alguns estudos, a progesterona pode atuar como um agente anti-inflamatório, reduzindo a infiltração de leucócitos em vários tecidos, incluindo músculo esquelético, útero e cérebro (St Pierre Schneider et al. 2012; Tibbetts et al., 1999).

A mieloperoxidase (MPO), é uma enzima liberada por neutrófilos ativados capaz de produzir espécies reativas de oxigênio. Representa o componente mais abundante dos grânulos azurófilos presentes nos neutrófilos e é amplamente utilizada como um marcador histopatológico para a identificação dessas células. (Nauseef, 2014; Breckwoldt et al., 2008). Estudos que utilizaram modelos de I/R mostraram que o extravasamento consequente de neutrófilos amplifica ainda mais as reações pró-inflamatórias e as lesões teciduais identificadas por MPO. (Kimizuka et al., 2004 Margaritis et al., 2011). Da mesma forma a iNOS é fortemente

induzida em macrófagos ativados, nos quais criam uma produção exacerbada de NO representando um evento importante na cascata inflamatória aguda, levando a danos colaterais amplos ao tecido saudável pela geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio. (Chen et al, 2024). Em nosso estudo notamos que o processo de I/R provocou o aumento na porcentagem de células positivas para iNOS no mesentério dos animais do grupo IR quando comparado ao grupo Sham, da mesma forma vimos o aumento tanto da atividade quanto da expressão de MPO no íleo dos animais do grupo IR, indicando que houve recrutamento ou ativação de neutrófilos em decorrência da isquemia e reperfusão. Além disso, observamos efeito positivo da progesterona prevenindo o aumento de atividade de MPO, bem como a diminuição de células marcadas nos animais dos dois grupos tratados. Fundamentando os nossos dados, diversos modelos experimentais de doenças intestinais, pulmonares e neurológicas apontam para a função anti-inflamatória dos hormônios sexuais femininos como estrógeno e progesterona em que há uma propensão à diminuição da quantidade de marcadores inflamatórios como iNOS e MPO. (Dhote et al., 2022; Keshavarzi et al. 2018; Breithaupt-Faloppa et al., 2014).

Naturalmente o processo em várias etapas do recrutamento de neutrófilos para o local da lesão, requer a expressão de moléculas de adesão como, integrinas, selectinas e também da superfamília das imunoglobulinas (Rao et al., 2007). Desta forma, em nosso estudo avaliamos as moléculas de adesão e não encontramos diferenças na expressão de VCAM-1 em nenhum dos nossos grupos experimentais, por outro lado vimos o aumento de ICAM-1 nos animais do grupo IR mas sem diferenças nos animais tratados com progesterona. Adicionalmente, observamos a diminuição de P-selectina nos animais do grupo Pós P4 quando comparado ao grupo IR e de PECAM-1 nos animais do grupo Pós P4 quando comparados ao IR.

A P-selectina, expressa em células endoteliais e plaquetas, desempenha um papel crucial na facilitação da adesão de leucócitos às células endoteliais durante processos de isquemia e reperfusão, iniciando assim, a resposta inflamatória necessária para o recrutamento celular (Jones et al., 2015). Além da P-selectina, as glicoproteínas expressas em leucócitos e células endoteliais também são fundamentais para o recrutamento neutrofílico. Dentre essas moléculas de adesão, destaca-se a ICAM-1, uma glicoproteína de superfície celular com expressão basal baixa em células imunológicas, endoteliais e epiteliais, cuja expressão é aumentada em resposta a estímulos inflamatórios. Ela é responsável por regular o rolamento dos leucócitos e as interações adesivas com a parede vascular, orientando a transmigração dos leucócitos através da camada endotelial, promovendo uma amplificação da resposta inicial mediada pela P-selectina (Hubbard & Rothlein R., 2020; Bui et al., 2020). De igual forma a

PECAM-1 expressa em plaquetas, monócitos, linfócitos e células endoteliais (Lertkiatmongkol et al., 2016), também participa do processo de diapedese de leucócitos no âmbito do processo inflamatório (Liu et al., 2012). Não identificamos na literatura, trabalhos fora do contexto reprodutivo feminino, com foco em imunidade inata e inflamação sistêmica que abordem o papel da progesterona. Porém, estudos *in vitro* da expressão de moléculas de adesão endotelial, mostram que o tratamento isolado com progesterona, não é capaz de impedir o aumento da expressão dessas moléculas por estímulo inflamatório (Piercy et al., 2002).

Neste cenário, estudos anteriores demonstram que as repercussões histopatológicas na mucosa intestinal, resultantes do clampeamento aórtico supracelíaco em ratos, são graves e focadas principalmente nas vilosidades (Erling et al. 2010; Rocha de Sousa et al., 2018). É sabido também que em modelos de I/R ocorrem lesões na mucosa intestinal como a degeneração nuclear e a vacuolização das células epiteliais, bem como necrose e apoptose. (Shimada et al., 2024; Li et al., 2022). Em nossa análise histológica do intestino observamos a presença de lesões significativas após a I/R aórtica independentemente do tratamento administrado, como diminuição na altura das vilosidades, na espessura total da mucosa e na razão entre altura das vilosidades e profundidade das criptas. Esses achados sugerem que, embora a progesterona tenha demonstrado efeitos protetores em outros parâmetros, como a motilidade e a permeabilidade da barreira intestinal, ela não foi capaz de prevenir os danos histológicos observados. Isso pode indicar que a lesão estrutural do tecido intestinal depende de mecanismos adicionais que não são modulados pela progesterona ou que requerem abordagens terapêuticas complementares.

Adicionalmente aos efeitos da inflamação causada pelo processo de I/R, analisamos as moléculas relacionadas a apoptose: caspase-3, uma enzima proteolítica essencial no processo de apoptose, sendo considerada uma caspase efetora. Ela é ativada por cascatas de sinalização apoptótica que atua clivando proteínas estruturais e regulatórias (Elmore 2007), e Bcl-2 uma proteína antiapoptótica e um regulador central da apoptose, atuando principalmente na mitocôndria para inibir a morte celular programada e preservar a integridade celular (Adams, 2003.) Encontramos o aumento da molécula proapoptótica caspase-3 nos animais do grupo IR quando comparados ao grupo Sham, contudo o tratamento com progesterona administrado previamente à isquemia foi capaz de diminuir esta expressão. Não observamos diferenças na expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 em nenhum de nossos grupos experimentais. O processo de I/R intestinal resulta em danos significativos aos tecidos, caracterizados por um influxo acentuado de neutrófilos nas pontas das vilosidades, o que contribui para o agravamento da resposta inflamatória. Além disso, há um aumento considerável na apoptose de células que

desempenham um papel fundamental na manutenção da integridade da barreira intestinal e no controle da microbiota (Alice Hajic et al., 2024). Em modelos de I/R intestinal, foi observado que a taxa de apoptose das células epiteliais é aumentada, acompanhada por elevações nos níveis da caspase-3 e da proteína proapoptótica Bax, indicando uma ativação robusta das vias de morte celular (Li et al., 2022; Abozaid et al., 2023). Esse desequilíbrio entre fatores pró-apoptóticos e antiapoptóticos contribui para a exacerbação do dano epitelial, favorecendo a disfunção da barreira intestinal, o que facilita a translocação bacteriana e amplifica a resposta inflamatória sistêmica.

Estudos demonstram que os hormônios sexuais femininos desempenham múltiplos papéis na regulação fisiológica, incluindo a modulação da transcrição gênica (McDonnell & Norris, 2002) e da sinalização intracelular (Filardo et al., 2002). Além disso, possuem uma potente ação antioxidante (Prokai et al., 2005) e são capazes de inibir as vias apoptóticas (Dubal et al., 1999). Nesse contexto, a progesterona tem demonstrado eficácia na inibição da apoptose induzida por IL-1 β em culturas celulares (Liu et al., 2018), e de forma mais ampla, seus efeitos antiapoptóticos e antioxidantes contribuem para uma ação protetora em modelos de lesão por I/R ovariana (Başer G.B. et al., 2018).

Em modelos de lesão traumática cerebral, a progesterona mostrou capacidade de proteger os neurônios corticais da apoptose (Yabin et al., 2015), além de reduzir a expressão de marcadores de apoptose e o déficit neurológico em lesões de isquemia focal e reperfusão cerebral (Lin et al., 2015; Djebaili *et al.* 2004; Espinosa-García et al., 2014). Esses achados reforçam o potencial terapêutico da progesterona, particularmente no contexto de lesões que envolvem processos de apoptose e estresse oxidativo. Portanto, destacam o papel importante das vias de apoptose na fisiopatologia da lesão por I/R e sugerem que a modulação desses mecanismos, por meio do controle da expressão de proteínas como Bax, caspase-3 e Bcl-2, pode ser uma estratégia relevante para limitar o dano tecidual e preservar a função da barreira intestinal.

Observando os resultados obtidos do trânsito gastrointestinal, fluxo e perfusão dos vasos sanguíneos, sobretudo pela vasta literatura que delinea o papel protetor da progesterona no sistema nervoso após lesões de I/R e doenças inflamatórias (Singh et al., 2024; Kawadkar et al., 2024), consideramos expandir nossas análises aos neurônios do sistema nervoso entérico (SNE). Trata-se de uma rede intrínseca de gânglios neuronais no tubo intestinal com cerca de 100 milhões de neurônios localizados no plexo mioentérico e no plexo submucoso. Este sistema controla a motilidade, o fluxo sanguíneo, absorção de nutrientes, secreção, o sistema imunológico e processos inflamatórios no intestino. (Sharkey & Mawe, 2023; Salazar et al.,

2023). Neste cenário é importante ressaltar a ação dos receptores P2X7 no processo de I/R que são amplamente expressos por neurônios entéricos, envolvidos na ativação de vias inflamatórias e na morte celular, especialmente através da liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β . A progesterona pode modular a resposta desses receptores, atenuando a inflamação e a apoptose ao reduzir sua ativação. (Di Virgilio et al, 2017). Além disso, a I/R afeta morfológica e funcionalmente o intestino e seus efeitos podem ser revertidos pelo tratamento com bloqueador de P2x7 sugerindo o receptor como um alvo terapêutico. (Palombit et al., 2019).

Nossa análise imunoistoquímica dos neurônios entéricos não revelou diferenças significativas na expressão de nNOS (óxido nítrico sintase neuronal) e receptores P2X7 após o tratamento com progesterona. Esses resultados sugerem que, embora a progesterona tenha efeitos benéficos em outros aspectos da recuperação pós-isquêmica, como a motilidade intestinal e a perfusão mesentérica, em nosso modelo ela não altera diretamente a expressão dos receptores e a densidades dos neurônios especificamente, provavelmente pelo tempo de isquemia e de reperfusão utilizados. Isso pode indicar que nos tempos propostos o efeito protetor da progesterona ocorre predominantemente por meio de outros mecanismos, como a modulação da inflamação e da integridade da barreira intestinal.

Desta maneira é importante ressaltar que tomados em conjunto, os resultados apresentados destacam o potencial terapêutico da progesterona no contexto de lesões associadas a inflamação intestinal, alterações da função intestinal e vasculares relacionadas ao mesentérico, sugerindo seu papel na manutenção da integridade tecidual e na mitigação de danos inflamatórios e funcionais.

7 CONCLUSÃO

- A administração de progesterona no modelo de isquemia e reperfusão aórtica mostrou benefícios significativos na melhora do trânsito gastrointestinal e na preservação da permeabilidade da barreira intestinal;
- A progesterona demonstrou efeitos positivos no aumento da perfusão microcirculatória mesentérica;
- O tratamento com progesterona modulou a inflamação, reduzindo a interação leucócito-endotélio e a liberação de mediadores inflamatórios;
- A progesterona não mostrou impacto significativo nas alterações histológicas da mucosa intestinal, entretanto, foi capaz de reduzir os marcadores apoptóticos.

- Em nosso modelo, não foram identificadas alterações nos parâmetros analisados nos neurônios do plexo mioentérico;
- A variação dos efeitos da progesterona conforme o momento da administração ressalta a necessidade de estudos futuros para otimizar dose, tempo de uso e protocolos terapêuticos em lesões intestinais por isquemia e reperfusão.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abozaid ER, Abdel-Kareem RH, Habib MA. A novel beneficial role of humanin on intestinal apoptosis and dysmotility in a rat model of ischemia reperfusion injury. *Pflugers Arch*. 2023 May 5;475(5):655–66.

Adams JM. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev*. 2003 Oct 15;17(20):2481–95.

Aksoy A, Toker A, Celik M, Aksoy M, Halici Z, Aksoy H. The effect of progesterone on systemic inflammation and oxidative stress in the rat model of sepsis. *Indian J Pharmacol*. 2014;46(6):622.

Al Shboul O, Mustafa A, Omar A, Al Dwairi A, Alqudah M, Nazzal M, et al. Effect of progesterone on nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate signaling and contraction in gastric smooth muscle cells. *Biomed Rep*. 2018 Oct 18;

Alicehajic A, Duivenvoorden AAM, Lenaerts K. Unveiling the molecular complexity of intestinal ischemia–reperfusion injury through omics technologies. *Proteomics*. 2024 Jun 13;24(12–13).

Aller R, Moya JL, Ávila S, Villa J, Moreira V, B'arcena R, et al. Implications of estradiol and progesterone in pulmonary vasodilatation in cirrhotic patients. *J Endocrinol Invest*. 2002 Jan 11;25(1):4–10.

Alqudah M, Al-Shboul O, Al-Dwairi A, Al-U'Dat DG, Alqudah A. Progesterone Inhibitory Role on Gastrointestinal Motility. *Physiol Res*. 2022 Apr 30;(2):193–8.

Andrabi SM, Sharma NS, Karan A, Shahriar SMS, Cordon B, Ma B, et al. Nitric Oxide: Physiological Functions, Delivery, and Biomedical Applications. *Advanced Science*. 2023 Oct 26;10(30).

Ayada C, Toru Ü, Genç O, Akcılar R, Şahin S. Balanced oxidative status by nesfatin-1 in intestinal ischemia-reperfusion. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(3):3318–24.

Bala M, Catena F, Kashuk J, De Simone B, Gomes CA, Weber D, et al. Acute mesenteric ischemia: updated guidelines of the World Society of Emergency Surgery. *World J Emerg Surg*. 2022 Oct 19;17(1):54.

Barajas-López C, Huizinga JD, Collins SM, Gerzanich V, Espinosa-Luna R, Peres AL. P2x-purinoceptors of myenteric neurones from the guinea-pig ileum and their unusual pharmacological properties. *Br J Pharmacol*. 1996 Dec;119(8):1541–8.

- Barbagallo M, Dominguez LJ, Licata G, Shan J, Bing L, Karpinski E, et al. Vascular Effects of Progesterone. *Hypertension*. 2001 Jan;37(1):142–7.
- Bernardo-Castro S, Sousa JA, Martins E, Donato H, Nunes C, d’Almeida OC, et al. The evolution of blood-brain barrier permeability changes after stroke and its implications on clinical outcome: A systematic review and meta-analysis. *Int J Stroke*. 2023 Aug;18(7):783–94.
- Blikslager AT. Life in the Gut Without Oxygen: Adaptive Mechanisms and Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology*. 2008 Jan;134(1):346–8.
- Booth JWR, Tam FWK, Unwin RJ. P2 purinoceptors: Renal pathophysiology and therapeutic potential. *Clin Nephrol*. 2012 Aug 1;78(08):154–63.
- Breckwoldt MO, Chen JW, Stangenberg L, Aikawa E, Rodriguez E, Qiu S, et al. Tracking the inflammatory response in stroke in vivo by sensing the enzyme myeloperoxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008 Nov 25;105(47):18584–9.
- Breithaupt-Faloppa AC, Thais Fantozzi E, Romero DC, Rodrigues A da S, de Sousa PTR, Lino dos Santos Franco A, et al. Acute Effects of Estradiol on Lung Inflammation Due to Intestinal Ischemic Insult in Male Rats. *Shock*. 2014 Mar;41(3):208–13.
- Bu S, Nguyen HC, Nikfarjam S, Michels DCR, Rasheed B, Maheshkumar S, et al. Endothelial cell-specific loss of eNOS differentially affects endothelial function. *PLoS One*. 2022 Sep 23;17(9):e0274487.
- Bui TM, Wiesolek HL, Sumagin R. ICAM-1: A master regulator of cellular responses in inflammation, injury resolution, and tumorigenesis. *J Leukoc Biol*. 2020 Sep 1;108(3):787–99.
- Cerqueira NF, Hussni CA, Yoshida WB. Pathophysiology of mesenteric ischemia/reperfusion: a review. *Acta Cir Bras*. 2005 Aug;20(4):336–43.
- Chen G, Shi JX, Qi M, Wang HX, Hang CH. Effects of Progesterone on Intestinal Inflammatory Response, Mucosa Structure Alterations, and Apoptosis Following Traumatic Brain Injury in Male Rats. *Journal of Surgical Research*. 2008 Jun;147(1):92–8.
- Chen R, Zhang H, Tang B, Luo Y, Yang Y, Zhong X, et al. Macrophages in cardiovascular diseases: molecular mechanisms and therapeutic targets. *Signal Transduct Target Ther*. 2024 May 31;9(1):130.
- Chen Y, Tang Y, Tong X, Wu J, Li Y, Dong S. [Protective effects of P2X7 receptor inhibition in cerebral ischemia/reperfusion injury in rats]. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2018 Nov 28;43(11):1169–76.
- Clair DG, Beach JM. Strategies for managing aortoiliac occlusions: access, treatment and outcomes. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2015 May 4;13(5):551–63.
- Collard CD, Gelman S. Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Prevention of Ischemia-Reperfusion Injury. *Anesthesiology*. 2001 Jun 1;94(6):1133–8.
- Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer*. 2002 Sep 1;2(9):647–56.
- Danese S. Extraintestinal manifestations in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2005;11(46):7227.

- Deitch EA, Ananthakrishnan P, Cohen DB, Xu DZ, Feketeova E, Hauser CJ. Neutrophil activation is modulated by sex hormones after trauma-hemorrhagic shock and burn injuries. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2006 Sep;291(3):H1456–65.
- Dhote V V., Balaraman R. Gender specific effect of progesterone on myocardial ischemia/reperfusion injury in rats. *Life Sci*. 2007 Jun;81(3):188–97.
- Di Virgilio F, Dal Ben D, Sarti AC, Giuliani AL, Falzoni S. The P2X7 Receptor in Infection and Inflammation. *Immunity*. 2017 Jul;47(1):15–31.
- Djebaili M, Hoffman SW, Stein DG. Allopregnanolone and progesterone decrease cell death and cognitive deficits after a contusion of the rat pre-frontal cortex. *Neuroscience*. 2004 Jan;123(2):349–59.
- Doucet D, Badami C, Palange D, Bonitz RP, Lu Q, Xu DZ, et al. Estrogen Receptor Hormone Agonists Limit Trauma Hemorrhage Shock-Induced Gut and Lung Injury in Rats. *PLoS One*. 2010 Feb 25;5(2):e9421.
- Duan L, Hu G huang, Li Y jin, Zhang C liang, Jiang M. P2X7 receptor is involved in lung injuries induced by ischemia-reperfusion in pulmonary arterial hypertension rats. *Mol Immunol*. 2018 Sep;101:409–18.
- Dubal DB, Shughrue PJ, Wilson ME, Merchenthaler I, Wise PM. Estradiol Modulates bcl-2 in Cerebral Ischemia: A Potential Role for Estrogen Receptors. *The Journal of Neuroscience*. 1999 Aug 1;19(15):6385–93.
- Durakbasa ÇU, Dagli TE, Mouni H, Haklar G, Bilsel AS, Yuksel M, et al. Nitric oxide and endothelin relationship in intestinal ischemia/reperfusion injury. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1998 Dec;59(6):379–83.
- Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol*. 2007 Jun 1;35(4):495–516.
- Eltzschig HK, Collard CD. Vascular ischaemia and reperfusion injury. *Br Med Bull*. 2004 Jan 1;70(1):71–86.
- Erling N, Nakagawa NK, Costa Cruz JWM, Zanoni FL, Baptista-Silva JCC, Sannomiya P, et al. Microcirculatory effects of local and remote ischemic preconditioning in supraceliac aortic clamping. *J Vasc Surg*. 2010 Nov;52(5):1321–9.
- Espinosa-García C, Aguilar-Hernández A, Cervantes M, Morali G. Effects of progesterone on neurite growth inhibitors in the hippocampus following global cerebral ischemia. *Brain Res*. 2014 Jan;1545:23–34.
- Farsky SP, Sannomiya P, Garcia-Leme J. Secreted glucocorticoids regulate leukocyte-endothelial interactions in inflammation. A direct vital microscopic study. *J Leukoc Biol*. 1995 Mar 1;57(3):379–86.
- Filardo EJ, Quinn JA, Frackelton AR, Bland KI. Estrogen Action Via the G Protein-Coupled Receptor, GPR30: Stimulation of Adenylyl Cyclase and cAMP-Mediated Attenuation of the Epidermal Growth Factor Receptor-to-MAPK Signaling Axis. *Molecular Endocrinology*. 2002 Jan 1;16(1):70–84.

Filpa V, Carpanese E, Marchet S, Pirrone C, Conti A, Rainero A, et al. Nitric oxide regulates homeoprotein OTX1 and OTX2 expression in the rat myenteric plexus after intestinal ischemia-reperfusion injury. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2017 Apr 1;312(4):G374–89.

Flessas II, Papalois AE, Toutouzas K, Zagouri F, Zografos GC. Effects of Lazaroids on Intestinal Ischemia and Reperfusion Injury in Experimental Models. *Journal of Surgical Research*. 2011 Apr;166(2):265–74.

Furness JB. Types of neurons in the enteric nervous system. *J Auton Nerv Syst*. 2000 Jul;81(1–3):87–96.

Galligan JJ, LePard KJ, Schneider DA, Zhou X. Multiple mechanisms of fast excitatory synaptic transmission in the enteric nervous system. *J Auton Nerv Syst*. 2000 Jul;81(1–3):97–103.

Gatto M, Mota GAF, Pagan LU, Gomes MJ, Okoshi MP. Pré-Condicionamento na Lesão por Isquemia-Reperfusão. *Arq Bras Cardiol*. 2021 Nov 22;117(6):1145–6.

Goldblum SE, Wu KM, Jay M. Lung myeloperoxidase as a measure of pulmonary leukostasis in rabbits. *J Appl Physiol*. 1985 Dec 1;59(6):1978–85.

Gotkin JL, Celver J, McNutt P, Shields AD, Howard BC, Paonessa DJ, et al. Progesterone reduces lipopolysaccharide induced interleukin-6 secretion in fetoplacental chorionic arteries, fractionated cord blood, and maternal mononuclear cells. *Am J Obstet Gynecol*. 2006 Oct;195(4):1015–9.

Granger DN, Korthuis RJ. Physiologic Mechanisms of Postischemic Tissue Injury. *Annu Rev Physiol*. 1995 Oct;57(1):311–32.

Grisham MB, Jourdain D, Wink DA. I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 1999 Feb 1;276(2):G315–21.

Grootjans J, Lenaerts K, Derikx JPM, Matthijsen RA, de Bruijne AP, van Bijnen AA, et al. Human Intestinal Ischemia-Reperfusion-Induced Inflammation Characterized. *Am J Pathol*. 2010 May;176(5):2283–91.

Grotz MRW, Deitch EA, Ding J, Xu D, Huang Q, Regel G. Intestinal Cytokine Response After Gut Ischemia. *Ann Surg*. 1999 Apr;229(4):478–86.

Guan Y, Worrell RT, Pritts TA, Montrose MH. Intestinal ischemia-reperfusion injury: reversible and irreversible damage imaged in vivo. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2009 Jul;297(1):G187–96.

Güleç Başer B, İslimye Taşkın M, Adalı E, Öztürk E, Hısmıoğulları AA, Yay A. Does progesterone have protective effects on ovarian ischemia-reperfusion injury? *J Turk Ger Gynecol Assoc*. 2018 Jun 4;19(2):87–93.

Hardev Ramandeep Singh Girn, Ahilathirunayagam S, Mavor AID, Homer-Vanniasinkam S. Reperfusion Syndrome: Cellular Mechanisms of Microvascular Dysfunction and Potential Therapeutic Strategies. *Vasc Endovascular Surg*. 2007 Aug 1;41(4):277–93.

- Hardy DB, Janowski BA, Corey DR, Mendelson CR. Progesterone receptor plays a major antiinflammatory role in human myometrial cells by antagonism of nuclear factor-kappaB activation of cyclooxygenase 2 expression. *Mol Endocrinol*. 2006 Nov;20(11):2724–33.
- Hide I, Tanaka M, Inoue A, Nakajima K, Kohsaka S, Inoue K, et al. Extracellular ATP Triggers Tumor Necrosis Factor- α Release from Rat Microglia. *J Neurochem*. 2000 Sep 4;75(3):965–72.
- Homma H, Hoy E, Xu DZ, Lu Q, Feinman R, Deitch EA. The female intestine is more resistant than the male intestine to gut injury and inflammation when subjected to conditions associated with shock states. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2005 Mar;288(3):G466–72.
- Hörner TM, Skoog P, Nilsson KF, Oikonomakis I, Larzon T, Norgren L, et al. Intraperitoneal Metabolic Consequences of Supraceliac Aortic Balloon Occlusion in an Experimental Animal Study Using Microdialysis. *Ann Vasc Surg*. 2014 Jul;28(5):1286–95.
- Hubbard AK, Rothlein R. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. *Free Radic Biol Med*. 2000 May;28(9):1379–86.
- Hikhlis M, Atherton NS. Vascular Reperfusion Injury. 2023 Aug 14. In: StatPearls [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024.
- Jarras H, Bourque M, Poirier A, Morissette M, Coulombe K, Di Paolo T, et al. Neuroprotection and immunomodulation of progesterone in the gut of a mouse model of Parkinson's disease. *J Neuroendocrinol*. 2020 Jan 10;32(1).
- Jones RT, Toledo-Pereyra LH, Quesnelle KM. Selectins in Liver Ischemia and Reperfusion Injury. *Journal of Investigative Surgery*. 2015 Sep 3;28(5):292–300.
- Karatepe O, Altıok M, Battal M, Kamali G, Kemik A, Aydin T, et al. The effect of progesterone in the prevention of the chemically induced experimental colitis in rats. *Acta Cir Bras*. 2012 Jan;27(1):23–9.
- Katseni K, Chalkias A, Kotsis T, Dafnios N, Arapoglou V, Kaparos G, et al. The Effect of Perioperative Ischemia and Reperfusion on Multiorgan Dysfunction following Abdominal Aortic Aneurysm Repair. *Biomed Res Int*. 2015;2015:1–11.
- Kawadkar M, Mandloi AS, Singh N, Mukharjee R, Dhote V V. Retraction Note: Combination therapy for cerebral ischemia: do progesterone and nescapine provide better neuroprotection than either alone in the treatment? *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2024 Mar 6;397(3):1917–1917.
- Keshavarzi Z, Afshari AR, Mohammadzadeh N, Mohebbi M, Mohebbi M, Mollazadeh H. Traumatic Brain Injury and the Gastrointestinal Tract: The Role of Female Sexual Hormones. *J Endocrinol Metab*. 2017;7(6):163–71.
- Kimizuka K, Nakao A, Nalesnik MA, Demetris AJ, Uchiyama T, Ruppert K, et al. Exogenous IL-6 inhibits acute inflammatory responses and prevents ischemia/reperfusion injury after intestinal transplantation. *Am J Transplant*. 2004 Apr;4(4):482–94.

- Kiprono L V, Wallace K, Moseley J, Martin J, Lamarca B. Progesterone blunts vascular endothelial cell secretion of endothelin-1 in response to placental ischemia. *Am J Obstet Gynecol*. 2013 Jul;209(1):44.e1-6.
- Kumar S, Allen DA, Kieswich JE, Patel NSA, Harwood S, Mazzon E, et al. Dexamethasone Ameliorates Renal Ischemia-Reperfusion Injury. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2009 Nov;20(11):2412–25.
- Lertkiatmongkol P, Liao D, Mei H, Hu Y, Newman PJ. Endothelial functions of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31). *Curr Opin Hematol*. 2016 May;23(3):253–9.
- Li XJ, He RF, Li S, Li XJ, Li DL. [Effects of progesterone on learning and memory and P2X7 receptor expression in the hippocampus after global cerebral ischemia/ reperfusion injury in rats]. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi*. 2012 Sep;28(5):472–5.
- Li Y, Zhang P, Zhang J, Bao W, Li J, Wei Y, et al. Role of Autophagy Inducers and Inhibitors in Intestinal Barrier Injury Induced by Intestinal Ischemia–Reperfusion (I/R). *J Immunol Res*. 2022 Jul 30;2022:1–10.
- Lin C, He H, Li Z, Liu Y, Chao H, Ji J, et al. Efficacy of progesterone for moderate to severe traumatic brain injury: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Sci Rep*. 2015 Aug 25;5(1):13442.
- Liu L, Zhang Y, Wang Y, Peng W, Zhang N, Ye Y. Progesterone inhibited endoplasmic reticulum stress associated apoptosis induced by interleukin-1 β via the GRP78/PERK/CHOP pathway in BeWo cells. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*. 2018 Mar 14;44(3):463–73.
- Luk J, Seval Y, Ulukus M, Ulukus EC, Arici A, Kayisli UA. Regulation of Monocyte Chemotactic Protein-1 Expression in Human Endometrial Endothelial Cells by Sex Steroids: A Potential Mechanism for Leukocyte Recruitment in Endometriosis. *Reproductive Sciences*. 2010 Mar 30;17(3):278–87.
- Mallick IH, Yang W, Winslet MC, Seifalian AM. REVIEW: Ischemia–Reperfusion Injury of the Intestine and Protective Strategies Against Injury. *Dig Dis Sci*. 2004 Sep;49(9):1359–77.
- Margaritis E V, Yanni AE, Agrogiannis G, Liarakos N, Pantopoulou A, Vlachos I, et al. Effects of oral administration of l-arginine, l-NAME and allopurinol on intestinal ischemia/reperfusion injury in rats. *Life Sci*. 2011 Jun;88(23–24):1070–6.
- Massberg S, Enders G, Leiderer R, Eisenmenger S, Vestweber D, Krombach F, et al. Platelet-endothelial cell interactions during ischemia/reperfusion: the role of P-selectin. *Blood*. 1998 Jul 15;92(2):507–15.
- McDonnell DP, Norris JD. Connections and Regulation of the Human Estrogen Receptor. *Science* (1979). 2002 May 31;296(5573):1642–4.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. DATASUS. Tabnet. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2023; Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/niuf.def>
- MOREY KA, RAZANDI M, PEDRAM A, HU RM, PRINS AB, LEVIN RE. Oestrogen and progesterone inhibit the stimulated production of endothelin-1. *Biochemical Journal*. 1998 Mar 15;330(3):1097–105.

Morrissy S, Xu B, Aguilar D, Zhang J, Chen QM. Inhibition of apoptosis by progesterone in cardiomyocytes. *Aging Cell*. 2010 Oct 16;9(5):799–809.

Nakagawa NK, Nogueira RA, Correia CJ, Shiwa SR, Costa Cruz JWM, Poli de Figueiredo LF, et al. LEUKOCYTE-ENDOTHELIUM INTERACTIONS AFTER HEMORRHAGIC SHOCK/REPERFUSION AND CECAL LIGATION/PUNCTURE. *Shock*. 2006 Aug;26(2):180–6.

Nalini S, Mathan MM, Balasubramanian KA. Oxygen free radical induced damage during intestinal ischemia/reperfusion in normal and xanthine oxidase deficient rats. *Mol Cell Biochem*. 1993;124(1):59–66.

Nauseef WM. Myeloperoxidase in human neutrophil host defence. *Cell Microbiol*. 2014 Aug;16(8):1146–55.

Netala VR, Teertam SK, Li H, Zhang Z. A Comprehensive Review of Cardiovascular Disease Management: Cardiac Biomarkers, Imaging Modalities, Pharmacotherapy, Surgical Interventions, and Herbal Remedies. *Cells*. 2024 Sep 1;13(17):1471.

Nilsen J, Brinton RD. Impact of Progestins on Estrogen-Induced Neuroprotection: Synergy by Progesterone and 19-Norprogesterone and Antagonism by Medroxyprogesterone Acetate. *Endocrinology*. 2002 Jan;143(1):205–12.

Omar HA, Ramirez R, Gibson M. Properties of a progesterone-induced relaxation in human placental arteries and veins. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995 Feb;80(2):370–3.

Özel ŞK, Yüksel M, Haklar G, Durakbaşı ÇU, Daglı TE, Aktan AÖ. Nitric oxide and endothelin relationship in intestinal ischemia/reperfusion injury (II). Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA). 2001 Apr;64(4–5):253–7.

Palombit K, Mendes CE, Tavares-de-Lima W, Barreto-Chaves ML, Castelucci P. Blockage of the P2X7 Receptor Attenuates Harmful Changes Produced by Ischemia and Reperfusion in the Myenteric Plexus. *Dig Dis Sci*. 2019 Jul 7;64(7):1815–29.

Pang Y, Dong J, Thomas P. Progesterone increases nitric oxide synthesis in human vascular endothelial cells through activation of membrane progesterone receptor- α . *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2015 May 15;308(10):E899–911.

Pettus EH, Wright DW, Stein DG, Hoffman SW. Progesterone treatment inhibits the inflammatory agents that accompany traumatic brain injury. *Brain Res*. 2005 Jul;1049(1):112–9.

Portugal-Cohen M, Kohen R. Exposure of human keratinocytes to ischemia, hyperglycemia and their combination induces oxidative stress via the enzymes inducible nitric oxide synthase and xanthine oxidase. *J Dermatol Sci*. 2009 Aug;55(2):82–90.

Proctor KG. Gender differences in trauma theory vs. practice: Comments on “Mechanism of estrogen-mediated intestinal protection following trauma-hemorrhage: p38 MAPK-dependent upregulation of HO-1” by Hsu JT et al. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2008 Jun;294(6):R1822–4.

Prokai L, Prokai-Tatrai K, Perjési P, Simpkins JW. Mechanistic insights into the direct antioxidant effects of estrogens. *Drug Dev Res*. 2005 Oct 17;66(2):118–25.

- Qin Y, Chen Z, Han X, Wu H, Yu Y, Wu J, et al. Progesterone attenuates A β 25–35 -induced neuronal toxicity via JNK inactivation and progesterone receptor membrane component 1-dependent inhibition of mitochondrial apoptotic pathway. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2015 Nov;154:302–11.
- Raghupathy R, Szekeres-Bartho J. Progesterone: A Unique Hormone with Immunomodulatory Roles in Pregnancy. *Int J Mol Sci*. 2022 Jan 25;23(3):1333.
- Rao RM, Yang L, Garcia-Cardena G, Luscinskas FW. Endothelial-Dependent Mechanisms of Leukocyte Recruitment to the Vascular Wall. *Circ Res*. 2007 Aug 3;101(3):234–47.
- Ricardo-da-Silva FY, Fantozzi ET, Rodrigues-Garbin S, Domingos HV, Oliveira-Filho RM, Vargaftig BB, et al. Estradiol prevented intestinal ischemia and reperfusion-induced changes in intestinal permeability and motility in male rats. *Clinics*. 2021;76:e2683.
- Rivera LR, Thacker M, Castelucci P, Bron R, Furness JB. The reactions of specific neuron types to intestinal ischemia in the guinea pig enteric nervous system. *Acta Neuropathol*. 2009 Aug 23;118(2):261–70.
- Rocha de Sousa PT, Breithaupt-Faloppa AC, de Jesus Correia C, Simão RR, Ferreira SG, Fiorelli AI, et al. 17 β -Estradiol prevents mesenteric injury induced by occlusion of the proximal descending aorta in male rats. *J Vasc Surg*. 2018 Feb;67(2):597–606.
- Ruwart MJ, Klepper MS, Rush BD. Adrenergic and cholinergic contributions to decreased gastric emptying, small intestinal transit, and colonic transit in the postoperative ileus rat. *Journal of Surgical Research*. 1980 Aug;29(2):126–34.
- Salazar V, Bolaños P, del Castillo JR. Enteric Nervous System: Identification of a Novel Neuronal Sensory Network in the Duodenal Epithelium. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2023 Nov 4;71(11):601–30.
- Sebzda KN, Kuczmarski A V., Pohlig RT, Lennon SL, Edwards DG, Wenner MM. Ovarian hormones modulate endothelin-1 receptor responses in young women. *Microcirculation*. 2018 Oct 25;25(7).
- Serracino-Inglott F, Habib NA, Mathie RT. Hepatic ischemia-reperfusion injury. *The American Journal of Surgery*. 2001 Feb;181(2):160–6.
- Sharkey KA, Mawe GM. The enteric nervous system. *Physiol Rev*. 2023 Apr 1;103(2):1487–564.
- Shimada M, Koyama Y, Kobayashi Y, Matsumoto Y, Kobayashi H, Shimada S. Si-based agent alleviated small bowel ischemia-reperfusion injury through antioxidant effects. *Sci Rep*. 2024 Feb 20;14(1):4141.
- SI D, LI J, LIU J, WANG X, WEI Z, TIAN Q, et al. Progesterone protects blood-brain barrier function and improves neurological outcome following traumatic brain injury in rats. *Exp Ther Med*. 2014 Sep;8(3):1010–4.
- Singh M, Krishnamoorthy VR, Kim S, Khurana S, LaPorte HM. Brain-derived neurotrophic factor and related mechanisms that mediate and influence progesterone-induced neuroprotection. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2024 Feb 26;15.

- 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 Nov;36(5):631–44.
- Smith J, Lindsay M, Rahimian R, Anderson L. The influence of estrogen and progesterone on parasympathetic vasodilatation in the rat submandibular gland. *Autonomic Neuroscience*. 2009 Mar;146(1–2):87–94.
- Sobral MLP, Dias RR, Correia C de J, Coutinho e Silva R dos S, da Anunciação LF, Breithaupt-Faloppa AC, et al. Protective effects of 17 β -oestradiol on coagulation and systemic inflammation after total occlusion of the descending aorta in male rats. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*. 2022 Feb 18;61(3):666–74.
- Spear ET, Mawe GM. Enteric neuroplasticity and dysmotility in inflammatory disease: key players and possible therapeutic targets. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2019 Dec 1;317(6):G853–61.
- St. Pierre Schneider B, Vigil SA, Moonie S. Body weight and leukocyte infiltration after an acute exercise-related muscle injury in ovariectomized mice treated with estrogen and progesterone. *Gen Comp Endocrinol*. 2012 Apr;176(2):144–50.
- Stegemann LN, Neufeld PM, Hecking I, Vorgerd M, Matschke V, Stahlke S, et al. Progesterone: A Neuroprotective Steroid of the Intestine. *Cells*. 2023 Apr 21;12(8):1206.
- Stein DG, Wright DW, Kellermann AL. Does progesterone have neuroprotective properties? *Ann Emerg Med*. 2008 Feb;51(2):164–72.
- Szabó A, Vollmar B, Boros M, Menger MD. Gender differences in ischemia-reperfusion-induced microcirculatory and epithelial dysfunctions in the small intestine. *Life Sci*. 2006 May;78(26):3058–65.
- Thacker M, Rivera LR, Cho HJ, Furness JB. The relationship between glial distortion and neuronal changes following intestinal ischemia and reperfusion. *Neurogastroenterology & Motility*. 2011 Nov;23(11):e500–9.
- Tibbetts TA, Conneely OM, O'Malley BW. Progesterone via Its Receptor Antagonizes the Pro-Inflammatory Activity of Estrogen in the Mouse Uterus¹. *Biol Reprod*. 1999 May 1;60(5):1158–65.
- van der Giessen J, van der Woude CJ, Peppelenbosch MP, Fuhler GM. A Direct Effect of Sex Hormones on Epithelial Barrier Function in Inflammatory Bowel Disease Models. *Cells*. 2019 Mar 19;8(3):261.
- Vandenberk N, Unluer EE, Gokmen N, Yurekli I, Okmen E, Yilmaz O, et al. Neuroprotective effects of progesterone in spinal cord ischemia in rabbits. *Am J Emerg Med*. 2013 Mar;31(3):581–4.
- Wei J, Xiao G min. The neuroprotective effects of progesterone on traumatic brain injury: current status and future prospects. *Acta Pharmacol Sin*. 2013 Dec 18;34(12):1485–90.
- Wei W, Ryu JK, Choi HB, McLarnon JG. Expression and function of the P2X7 receptor in rat C6 glioma cells. *Cancer Lett*. 2008 Feb;260(1–2):79–87.

Wu L, Xiong X, Wu X, Ye Y, Jian Z, Zhi Z, et al. Targeting Oxidative Stress and Inflammation to Prevent Ischemia-Reperfusion Injury. *Front Mol Neurosci*. 2020 Mar 5;13.

You Y, Tan W, Guo Y, Luo M, Shang F fei, Xia Y, et al. Progesterone promotes endothelial nitric oxide synthase expression through enhancing nuclear progesterone receptor-SP-1 formation. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2020 Aug 1;319(2):H341–8.

Zhang M, Liu Q, Meng H, Duan H, Liu X, Wu J, et al. Ischemia-reperfusion injury: molecular mechanisms and therapeutic targets. *Signal Transduct Target Ther*. 2024 Jan 8;9(1):12.

Zhao Y, Koga K, Osuga Y, Izumi G, Takamura M, Harada M, et al. Cyclic Stretch Augments Production of Neutrophil Chemokines and Matrix Metalloproteinases-1 (<scp>MMP</scp> - 1) from Human Decidual Cells, and the Production was Reduced by Progesterone. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2013 May 19;69(5):454–62.

Zhou Z, Bian C, Luo Z, Guille C, Ogunrinde E, Wu J, et al. Progesterone decreases gut permeability through upregulating occludin expression in primary human gut tissues and Caco-2 cells. *Sci Rep*. 2019 Jun 10;9(1):8367.

9 ANEXOS



Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Avenida Dr. Arnaldo, 455
Pacaembu – São Paulo – SP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que a proposta intitulada “**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO TRATAMENTO COM PROGESTERONA NAS ALTERAÇÕES MESENTÉRICAS E INTESTINAIS EM MODELO EXPERIMENTAL DE ISQUEMIA E REPERFUSÃO POR OCLUSÃO AÓRTICA EM RATOS MACHOS**” registrada com o nº **1425/2020**, sob a responsabilidade de **Luiz Felipe Pinho Moreira e Cristiano de Jesus Correia**, apresentada pela Comissão Científica do InCor - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em 18/03/2020.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 03-02-2020 Término: 08-04-2022
Espécie/linhagem/raça	Rato Wistar
Nº de animais	90
Peso/Idade	7 semanas
Sexo	machos
Origem	Biotério FMUSP

A CEUA FMUSP solicita que ao final da pesquisa seja enviado Relatório com todas as atividades.

CEUA-FMUSP, 18 de Março de 2020

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



Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina
FICHA DO ALUNO

5156 - 8977446/2 - Brunella Valbão Flora Agostinho

Email: brunellavalbao@usp.br
Data de Nascimento: 11/06/1991
Cédula de Identidade: RG - 63.478.895-4 - SP
Local de Nascimento: Estado de Minas Gerais
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Bacharel em Biomedicina - Universidade Cidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2014
Mestrado: Mestra em Ciências - Área: Ciências Morfofuncionais - Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2016

Curso: Doutorado
Programa: Medicina (Cirurgia Torácica e Cardiovascular)
Modalidade: Acadêmica
Área: Cirurgia Torácica e Cardiovascular
Data de Matrícula: 27/02/2020
Início da Contagem de Prazo: 27/02/2020
Data Limite para o Depósito: 16/02/2026
Orientador: Prof(a). Dr(a). Luiz Felipe Pinho Moreira - 27/02/2020 até o presente. Email: luiz.moreira@incor.usp.br
Co-orientador: Prof(a). Dr(a). Cristiano de Jesus Correia - 13/08/2020 até o presente. Email: cristiano.correia@hc.fm.usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 27/02/2020
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 23/04/2024
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 27/02/2020



Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina
FICHA DO ALUNO

5156 - 8977446/2 - Brunella Valbão Flora Agostinho

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação	Pres.
MCP5847-3/1	Modelos de Pesquisa Básica e Translacional em Transplante de Órgãos e Cirurgia Cardiorácica (1)	09/12/2019	15/12/2019	30	2	100	A	N	Concluída	S
FMM5003-1/1	Princípios de Análise de Dados e de Bioestatística	02/03/2020	15/03/2020	60	4	90	A	N	Concluída	S
MCP5806-4/3	Análise Crítica da Metodologia e da Elaboração do Trabalho Científico	14/06/2021	11/07/2021	60	4	100	B	N	Concluída	N

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese (Totais/Presenciais)	Totais/Presenciais
Disciplinas:	4	8 / 5	10 / 10*
Estágios:			
Total:	4	8 / 5	10 / 10*

Créditos Atribuídos à Tese: 176

*Créditos obtidos anteriormente a 01/01/2024 serão computados como presenciais de acordo com a Resolução CoPGr 8546, de 01/12/2023

Observações:

1) Disciplina(s) cursada(s) isoladamente e aceita(s) pelo(a) orientador(a) do(a) candidato(a)

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

A manuscript number has been assigned to your Shock: Injury, Inflammation, and Sepsis: Laboratory and Clinical Approaches submission

Assunto: A manuscript number has been assigned to your Shock: Injury, Inflammation, and Sepsis: Laboratory and Clinical Approaches submission

De: Shock <em@editorialmanager.com>

Data: 10/12/2024, 13:43

Para: Cristiano de Jesus Correia <cristiano.correia@hc.fm.usp.br>

TODAYS_DATE%

Dear Dr Correia,

Your submission entitled "PROGESTERONE TREATMENT POSITIVE EFFECTS IN THE FUNCTION AND INFLAMMATION OF INTESTINE COMPROMISED BY AORTIC OCCLUSION" has been assigned the following manuscript number: SHOCK-D-24-00717.

You may check on the progress of your paper at any time by logging on to Editorial Manager as an author.

<https://www.editorialmanager.com/shock/>

Your username is: sanc1er98

<https://www.editorialmanager.com/shock/1.asp?i=497294&l=AE3MRLTR>

Thank you for submitting your work to Shock: Injury, Inflammation, and Sepsis: Laboratory and Clinical Approaches.

Kind Regards,

Daniel Remick, M.D.

Editor-in-Chief, SHOCK

Shock: Injury, Inflammation, and Sepsis: Laboratory and Clinical Approaches

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Use the following URL: <https://www.editorialmanager.com/shock/login.asp?a=r>). Please contact the publication office if you have any questions.