

MARCELO NUNES DE SOUSA

**Avaliação dos efeitos do estradiol na lesão pulmonar causada
pela oclusão da aorta descendente proximal em ratos machos**

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

Programa de Cirurgia Torácica e Cardiovascular
Orientadora: Dra. Ana Cristina Breithaupt Faloppa

SÃO PAULO

2023

MARCELO NUNES DE SOUSA

**Avaliação dos efeitos do estradiol na lesão pulmonar causada
pela oclusão da aorta descendente proximal em ratos machos**

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

Programa de Cirurgia Torácica e Cardiovascular
Orientadora: Dra. Ana Cristina Breithaupt Faloppa

SÃO PAULO

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Sousa, Marcelo Nunes de
Avaliação dos efeitos do estradiol na lesão
pulmonar causada pela oclusão da aorta descendente
proximal em ratos machos / Marcelo Nunes de Sousa. -
- São Paulo, 2023.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Cirurgia Torácica e Cardiovascular.
Orientadora: Ana Cristina Breithaupt Faloppa.

Descritores: 1.Lesão pulmonar 2.Isquemia e
reperusão 3.Estradiol

USP/FM/DBD-245/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

Aos meus Pais, Lourival de Sousa e Maria do Carmo de Sousa, (*in memoriam*), por todo o esforço para tornar a mim e aos meus irmãos pessoas de bem. Carregarei comigo suas lições por toda a vida.

Aos meus filhos: Matheus, Luana, Marcelo Filho e Lorenzo. Pois eles são a luz da minha vida, meu combustível diário e o real motivo de eu buscar sempre novos desafios (Inclusive esse belo ciclo que aqui se encerra).

A minha esposa Ediane, fiel companheira, amiga e apoiadora em todos meus projetos. Meu verdadeiro porto seguro.

A toda minha querida família.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Dra. Ana Cristina Breithaupt Faloppa, pelo apoio incondicional, pela enorme paciência para ensinar e pela forma alegre e eficiente ao transmitir todo o conhecimento. Terei por ela gratidão por toda a vida .

Ao Dr. Cristiano de Jesus Correia, pelo apoio impecável na condução dos experimentos, por estar tão presente em cada fase da pesquisa e por tornar a distância de minha família mais amena com sua descontraída e genuína amizade. Obrigado meu AMIGO.

Ao Prof. Dr. Luiz Felipe Pinho Moreira, pela confiança em mim depositada, e por toda orientação e valiosas contribuições neste trabalho.

A todos meus colegas do Lim 11; Brunela Valbão, Fernanda Yamamoto, Lucas Ferreira, Marina Vidal, Mayara Ramos, Pedro Zonta, Raphael Coutinho, Roberto Armstrong e Sérgio Sales, pois em algum momento cada um contribuiu com alguma parcela para este estudo.

Aos membros da banca de qualificação , Profa. Dra. Carolina Demarchi Munhoz, Dr Leonardo Pessoa Cavalcante e Dr Rogério Pazetti, pelo aceite e por todas valiosas observações.

Aos meus sócios e amigos, membros cirurgiões em Manaus, Anderson Terrazas, Dorian Cardoso , Fausto Pina, George Butel, Luis Alberto Saraiva e Mariano Terrazas, por suprir minha ausência das cirurgias sempre que me desloquei para as obrigações do doutorado.

À FAPESP, pelo auxílio financeiro na realização deste projeto.

“Pouco conhecimento faz com que as pessoas se sintam orgulhosas. Muito conhecimento, que se sintam humildes. É assim que as espigas sem grãos erguem desdenhosamente a cabeça para o céu, enquanto as cheias as baixam para a terra, sua mãe.”

(Leonardo da Vinci)

Essa tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento dessa publicação:

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

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

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

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Abstract

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	OBJETIVOS	9
2.1	OBJETIVO GERAL	9
2.2	Objetivos específicos	9
3	MÉTODOS.....	10
3.1	Delineamento Experimental.....	10
3.2	Animais	11
3.3	Anestesia	11
3.4	Indução do processo de isquemia e reperfusão	12
3.5	Protocolo de tratamento	13
3.6	Determinação das concentrações séricas hormonais de estradiol, corticosterona e testosterona.....	13
3.7	Quantificação de gases respiratórios	14
3.8	Determinação número total e diferencial de leucócitos circulantes	14
3.9	Contagem dos leucócitos totais do lavado broncoalveolar (LBA).....	15
3.10	Avaliação da microcirculação pulmonar por microscopia intravital e análise do fluxo sanguíneo.....	15
3.11	Agregação Plaquetária	16
3.12	Determinação da presença de neutrófilos pela atividade da MPO.....	16
3.13	Cultura de tecido isolado (explante).....	17
3.14	Determinação das concentrações de mediadores inflamatórios.....	17
3.15	Análise histopatológica.....	18
3.16	Real time PCR para expressão gênica	19

3.17	Imunohistoquímica para pesquisa das sintases do óxido nítrico (iNOS e eNOS) e da endotelina no tecido pulmonar.....	20
3.18	Imunohistoquímica para pesquisa das moléculas de adesão.....	21
3.19	Imunohistoquímica para pesquisa dos receptores de estradiol (ER- α , ER- β e GPER) no tecido pulmonar	22
3.20	Análise estatística	22
4	RESULTADOS	24
4.1	Parâmetros hemodinâmicos	24
4.2	Perfil de gases expirados.....	25
4.3	Concentrações hormonais no soro.....	26
4.4	Número de leucócitos circulantes e na medula óssea.....	28
4.5	Mediadores Inflamatórios no Soro	29
4.6	Agregação plaquetária e no número de plaquetas circulantes	30
4.7	Número de leucócitos recuperados das vias aéreas (LBA).....	32
4.8	Análise histológica	33
4.9	Mediadores inflamatórios no meio de cultura pulmonar (Explante).....	34
4.10	Microscopia intravital por epi-iluminação.....	35
4.11	Permeabilidade vascular pulmonar.....	36
4.12	Avaliação do fluxo sanguíneo pulmonar	37
4.13	Presença e atividade de mieloperoxidase (MPO) no tecido pulmonar	38
4.14	Expressão gênica de mediadores inflamatórios	39
4.15	Expressões gênica e proteica das sintases do óxido nítrico e da endotelina ...	40
4.16	Expressões gênica e proteica das moléculas de adesão endotelial	42
4.17	Expressão dos receptores de estradiol	43
4.18	Expressão gênica e proteica da metaloproteinase-9 (MMP-9)	44
5	DISCUSSÃO	46
6	CONCLUSÃO.....	54
7	REFERÊNCIAS.....	55
8	ANEXOS	65

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	- adenosina difosfato
AE	- Azul de Evans
BCL-2	- B-cell lymphoma protein-2
BSA	- albumina sérica bovina
CD11/CD18	- glicoproteínas expressas nos leucocitos
CINC-1	- quimiocina para neutrófilo induzida por citocina-1
DAC	- doença arterial coronariana
DAMPs	- Padrões Moleculares Associados a Danos
DCV	- doença cardiovascular
DNA	- ácido desoxirribonucleico
E2 – 17 β	- estradiol
EDTA	- ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	- ensaio de imunoabsorção enzimática
eNOS	- óxido nítrico sintase endotelial
ER	- receptor de estradiol
ET	- endotelina
FiO ₂	- fração inspirada de oxigênio
GP _{ER}	- receptor do estrogênio acoplado à proteína G
HTAB	- brometo de hexadecil-tri-metil-amônio
ICAM-1	- molécula de adesão intercelular-1
IFN- γ	- interferon- γ
Ig	- imunoglobulina
IL	- interleucina
iNOS	- óxido nítrico sintase induzida
I/R	- isquemia e reperfusão
LBA	- lavado bronco-alveolar
MMP-9	- metaloproteinase -9
MPO	- mieloperoxidase
nNOS	- óxido nítrico sintase neuronal
NO	- óxido nítrico

NOS	-	óxido nítrico sintase
Nox	-	metabólitos do óxido nítrico (nitritos e nitratos)
OCT	-	composto de temperatura de corte ideal
PAM	-	pressão arterial média
PARs	-	receptores ativados por protease
PBS	-	tampão fosfato salina
PRP	-	plasma rico em plaquetas
RNA	-	ácido ribonucleico
ROS	-	espécie reativa de oxigênio
SDRA	-	síndrome do desconforto respiratório agudo
TBST	-	TRIS salina tamponada
TNF- α	-	Fator de necrose tumoral- α
TRIS	-	Tris (Hidroximetil) Aminometano
VCAM-1	-	molécula de adesão de célula vascular-1
VEGF	-	fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Registro da pressão arterial distal e proximal de ratos submetidos à lesão de isquemia e reperfusão (I/R, n=6); ratos falso-operados (Sham, n=6); ratos tratados com 17 β -estradiol (E2) 30 min antes da indução da lesão de isquemia e reperfusão (E2 Pré, n=6) e de ratos tratados com 17 β -estradiol 1 h após o início da reperfusão (E2 Pós, n=6). A seta preta indica o momento da oclusão da aorta e a seta branca o início da reperfusão. Os valores representam a média $\pm$ EPM. *P<0,05 em relação ao grupo Sham .. 25
- Figura 2:** Análises de O₂ expirado e CO₂ expirado, em ratos submetidos a isquemia e reperfusão, tratamento com estradiol e grupo controle. Os dados foram representados por média $\pm$ erro padrão * p < 0,05 em comparação com o grupo IR 26
- Figura 3:** Concentração sérica de estradiol, testosterona e corticosterona nos animais submetidos à lesão de isquemia e reperfusão (I/R, n=6); ratos falso-operados (Sham, n=5); ratos tratados com 17 β -estradiol (E2) antes da indução da lesão de isquemia e reperfusão (E2 Pré, n=6) e de ratos tratados com 17 β -estradiol 1 h após o início da reperfusão (E2 Pós, n=6). Os dados representam a média $\pm$ EPM. **P** (Kruskal-Wallis): Estradiol = 0,0013; Corticosterona = 0,825; Testosterona: 0,0057 27
- Figura 4:** Número total de leucócitos presentes na medula óssea após a lesão de isquemia e reperfusão (I/R, n=6); ratos falso-operados (Sham, n=6); ratos tratados com 17 β -estradiol (E2) 30 min antes da indução da lesão de isquemia e reperfusão (E2 Pré, n=6) e de ratos tratados com 17 β -estradiol 1 h após o início da reperfusão (E2 Pós, n=6). Os dados representam média $\pm$ EPM (n=6). **P** (ANOVA): Medula = 0,1001 29
- Figura 5:** Quantificação de mediadores inflamatórios (pg/mL) no soro de ratos submetidos à lesão de isquemia e reperfusão (I/R, n=6); ratos falso-operados (Sham, n=6); ratos tratados com 17 β -estradiol (E2) 30 min antes da indução da lesão de isquemia e reperfusão (E2 Pré, n=6) e de ratos tratados com 17 β -estradiol 1 h após o início da reperfusão (E2 Pós, n=6). **P** (ANOVA): CINC-1= 0,025; TNF= 0,3020; VEGF=0,2433; IL-1=0,0237; IL-10=0,0296; NOx=0,2161 30
- Figura 6:** Número de plaquetas circulantes, porcentagem de agregação plaquetária e número de plaquetas no plasma rico em plaquetas (PRP) de ratos submetidos à lesão de isquemia e reperfusão (I/R, n=6); ratos falso-operados (Sham, n=6); ratos tratados com 17 β -estradiol (E2) 30 min antes da indução da lesão de isquemia e reperfusão (E2 Pré, n=6) e de ratos

tratados com 17 β -estradiol 1 h após o início da reperfusão (E2 Pós, n=6). Os dados representam a média $\pm$ EPM. **P** ^(ANOVA): Plaquetas circulantes=0,586; Agregação= 0,0721; Plaquetas= 0,4113..... 31

Figura 7: Número total de leucócitos presentes no lavado broncoalveolar (LBA) após a lesão de isquemia e reperfusão (I/R, n=6); ratos falso-operados (Sham, n=6); ratos tratados com 17 β -estradiol (E2) 30 min antes da indução da lesão de isquemia e reperfusão (E2 Pré, n=6) e de ratos tratados com 17 β -estradiol 1 h após o início da reperfusão (E2 Pós, n=6). Os dados representam média $\pm$ EPM (n=6). **P** ^(ANOVA): LBA = 0,0644..... 32

Figura 8: Análise histológica dos pulmões de animais submetidos à lesão de isquemia e reperfusão (I/R, n=6); ratos falso-operados (Sham, n=6); ratos tratados com 17 β -estradiol (E2) 30 min antes da indução da lesão de isquemia e reperfusão (E2 Pré, n=6) e de ratos tratados com 17 β -estradiol 1 h após o início da reperfusão (E2 Pós, n=6). Fotomicrografias representativas de cada grupo. Os dados representam a média $\pm$ EPM. Foram analisados 1 corte por animal (n=6), 10 áreas por corte. **P** ^(ANOVA): Edema = 0,745; Polimorfonucleares $P < 0,0001$; Hemorragia = 0,280..... 33

Figura 9: Quantificação de mediadores inflamatórios (pg/ml/mg) no meio de cultura de pulmão (explante, 24 h) de ratos submetidos à lesão de isquemia e reperfusão (I/R, n=6); ratos falso-operados (Sham, n=6); ratos tratados com 17 β -estradiol (E2) 30 min antes da indução da lesão de isquemia e reperfusão (E2 Pré, n=6) e de ratos tratados com 17 β -estradiol 1 h após o início da reperfusão (E2 Pós, n=6). Os dados representam a média $\pm$ EPM. **P** ^(ANOVA): CINC-1=0,8918; TNF=0,286; VEGF=0,419; IL-1 β =0,0432; IL-10=0,3944; NOx=0,3073..... 34

Figura 10: Avaliação do infiltrado no tecido pulmonar por microscopia intravital por epi-iluminação. Grupos de ratos submetidos à lesão de isquemia e reperfusão (I/R, n=8); ratos falso-operados (Sham, n=8); ratos tratados com 17 β -estradiol (E2) 30 min antes da indução da lesão de isquemia e reperfusão (E2 Pré, n=8) e de ratos tratados com 17 β -estradiol 1 h após o início da reperfusão (E2 Pós, n=8). Os dados representam a média $\pm$ EPM. **P** ^(ANOVA): Infiltrado= 0,0078..... 35

Figura 11: Extravasamento do corante azul de Evans no pulmão de animais submetidos à lesão de isquemia e reperfusão (I/R, n=6); ratos falso-operados (Sham, n=6); ratos tratados com 17 β -estradiol (E2) 30 min antes da indução da lesão de isquemia e reperfusão (E2 Pré, n=6) e de ratos tratados com 17 β -estradiol 1 h após o início da reperfusão (E2 Pós, n=6). O corante foi injetado imediatamente após a desinsuflação do balão intra-aórtico. **P** ^(ANOVA): AE = 0,1475 36

Figura 12: Avaliação do fluxo sanguíneo pulmonar ao término das 4 h de reperfusão por sensor Laser Doppler (AD Instruments, EUA) em pulmões de ratos submetidos à lesão de isquemia e reperfusão (I/R, n=5); ratos falso-operados (Sham, n=5); ratos tratados com 17 β -estradiol (E2) 30 min antes da indução da lesão de isquemia e reperfusão (E2 Pré, n=5) e de ratos tratados com 17 β -estradiol 1 h após o início da reperfusão (E2 Pós, n=5). Os dados são apresentados em média $\pm$ EPM de 5 animais por grupo, 5 medidas por animal. **P**^(ANOVA): Fluxo = 0,7385 37

Figura 13: Expressão e atividade de mieloperoxidase (MPO) no tecido pulmonar de ratos submetidos à lesão de isquemia e reperfusão (I/R, n=8); ratos falso-operados (Sham, n=8); ratos tratados com 17 β -estradiol (E2) 30 min antes da indução da lesão de isquemia e reperfusão (E2 Pré, n=8) e de ratos tratados com 17 β -estradiol 1 h após o início da reperfusão (E2 Pós, n=8). Os dados representam a média $\pm$ EPM. **P**^(ANOVA):Imuno= 0,0039: Atividade: 0,0255 38

Figura 14: Expressão gênica de TNF- α , IL-6, IL-1 β e IL-10 no tecido pulmonar de ratos submetidos à lesão de isquemia e reperfusão (I/R, n=6); ratos falso-operados (Sham, n=6); ratos tratados com 17 β -estradiol (E2) 30 min antes da indução da lesão de isquemia e reperfusão (E2 Pré, n=8) e de ratos tratados com 17 β -estradiol 1 h após o início da reperfusão (E2 Pós, n=8). Os dados são apresentados em mediana e 95% de intervalo de confiança de 6-8 animais e são relativos a valores obtidos em animais não manipulados. **P**^(Kruskal-Wallis): TNF- α = 0,1018; IL-6= 0,9391; IL-1 β = 0,0608; IL-10= 0,7290 39

Figura 15: Expressão gênica de eNOS, iNOS e ET no tecido pulmonar de ratos submetidos à lesão de isquemia e reperfusão (I/R, n=6); ratos falso-operados (Sham, n=6); ratos tratados com 17 β -estradiol (E2) 30 min antes da indução da lesão de isquemia e reperfusão (E2 Pré, n=8) e de ratos tratados com 17 β -estradiol 1 h após o início da reperfusão (E2 Pós, n=8). Os dados são apresentados em mediana e 95% de intervalo de confiança de 6-8 animais e são relativos a valores obtidos em animais não manipulados. **P**^(Kruskal-Wallis): iNOS= 0,0357; eNOS= 0,0973; ET= 0,2372.. 41

Figura 16: Expressão proteica de iNOS, ET e eNOS no tecido pulmonar de ratos submetidos à lesão de isquemia e reperfusão (I/R, n=5); ratos falso-operados (Sham, n=5); ratos tratados com 17 β -estradiol (E2) 30 min antes da indução da lesão de isquemia e reperfusão (E2 Pré, n=5) e de ratos tratados com 17 β -estradiol 1 h após o início da reperfusão (E2 Pós, n=5). Os dados são apresentados em média $\pm$ EPM de 5 animais por grupo, 2 cortes por animal e 5 imagens analisadas por corte. As fotomicrografias são representativas do resultado da análise de eNOS. **P**^(ANOVA): iNOS= 0,9848; ET=0,2873 41

Figura 17: Expressão gênica de ICAM-1 e VCAM no tecido pulmonar de ratos submetidos à lesão de isquemia e reperfusão (I/R, n=8); ratos falso-operados (Sham, n=8); ratos tratados com 17 β -estradiol (E2) 30 min antes da indução da lesão de isquemia e reperfusão (E2 Pré, n=8) e de ratos tratados com 17 β -estradiol 1 h após o início da reperfusão (E2 Pós, n=8). Os dados são apresentados em mediana e 95% de intervalo de confiança de 6-8 animais e são relativos a valores obtidos em animais não manipulados. **P** ^(Kruskal-Wallis): ICAM= 0,0961: VCAM= 0,6137 42

Figura 18: Expressão proteica de ICAM-1 e VCAM no tecido pulmonar de ratos submetidos à lesão de isquemia e reperfusão (I/R, n=8); ratos falso-operados (Sham, n=8); ratos tratados com 17 β -estradiol (E2) 30 min antes da indução da lesão de isquemia e reperfusão (E2 Pré, n=8) e de ratos tratados com 17 β -estradiol 1 h após o início da reperfusão (E2 Pós, n=8). Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM de 5 animais por grupo, 2 cortes por animal e 5 imagens por corte. **P** ^(ANOVA): ICAM = 0,0389: VCAM = 0,0031 43

Figura 19: Expressão proteica de dos receptores de estradiol ER- α , ER- β e GPER no tecido pulmonar de ratos submetidos à lesão de isquemia e reperfusão (I/R, n=5); ratos falso-operados (Sham, n=5); ratos tratados com 17 β -estradiol (E2) 30 min antes da indução da lesão de isquemia e reperfusão (E2 Pré, n=5) e de ratos tratados com 17 β -estradiol 1 h após o início da reperfusão (E2 Pós, n=5). Os dados são apresentados em média $\pm$ EPM de 5 animais por grupo, 2 cortes por animal e 5 imagens analisadas por corte. **P** ^(ANOVA): ER- α = 0,3009: ER- β = 0,1938: GPER = 0,5154 44

Figura 20: Expressão gênica de MMP-9 no tecido pulmonar de ratos submetidos à lesão de isquemia e reperfusão (I/R, n=6); ratos falso-operados (Sham, n=6); ratos tratados com 17 β -estradiol (E2) 30 min antes da indução da lesão de isquemia e reperfusão (E2 Pré, n=7) e de ratos tratados com 17 β -estradiol 1 h após o início da reperfusão (E2 Pós, n=8). Os dados são apresentados em mediana e 95% de intervalo de confiança de 6-8 animais e são relativos a valores obtidos em animais não manipulados. **P** ^(Kruskal-Wallis): MMP-9 = 0,5491 45

Figura 21: Expressão proteica de MMP-9 no tecido pulmonar de ratos submetidos à lesão de isquemia e reperfusão (I/R, n=5); ratos falso-operados (Sham, n=5); ratos tratados com 17 β -estradiol (E2) 30 min antes da indução da lesão de isquemia e reperfusão (E2 Pré, n=5) e de ratos tratados com 17 β -estradiol 1 h após o início da reperfusão (E2 Pós, n=5). Os dados são apresentados em média $\pm$ EPM de 5 animais. **P** ^(ANOVA): 0,0229..... 45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Primers utilizados para a análise de RT-PCR 19

Tabela 2: Contagem total e diferencial de leucócitos circulantes. Dados
apresentados como média $\pm$ EPM 28

RESUMO

Sousa MN. *Avaliação dos efeitos do estradiol na lesão pulmonar causada pela oclusão da aorta descendente proximal em ratos machos*[tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

Introdução: Eventos de isquemia e reperfusão resultantes de procedimentos cirúrgicos cardiovasculares, que envolvem a obstrução aórtica por pinçamento, podem levar a uma série de complicações cardíacas, neurológicas, pulmonares, viscerais e periféricas. Os danos podem acometer órgãos mais distantes ao pinçamento aórtico, com o processo isquêmico afetando um órgão/região e suas manifestações clínicas refletindo em outros órgãos, como os pulmões. O quadro de inflamação pulmonar aguda é caracterizado por aumento da permeabilidade microvascular, infiltrado leucocitário e liberação de mediadores inflamatórios. Na avaliação de alternativas terapêuticas para o tratamento da lesão gerada por isquemia e reperfusão, o 17 β -estradiol mostra resultados promissores, reduzindo a lesão mesentérica, normalizando a resposta plaquetária e diminuindo mortalidade. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a ação do 17 β -estradiol como modulador da resposta vascular e imune nos eventos sistêmicos e pulmonares por meio do modelo experimental de obstrução aórtica seguida de reperfusão em ratos. **Métodos:** Ratos Wistar machos foram randomizados e alocados em quatro grupos: (Sham) falsamente operados (n = 6); (I/R) animais submetidos à oclusão da aorta por 20 minutos, seguidos por período de reperfusão de 4 horas (n = 6); (E2 Pré) animais tratados com 17 β -estradiol (280 μ g/kg, iv) 30 minutos antes do processo de isquemia (n = 6); (E2 Pós) animais tratados com 17 β -estradiol (280 μ g/kg, iv) 60 minutos depois do processo de isquemia, dentro do período de reperfusão (n = 6). Foi realizada a avaliação histológica do tecido pulmonar. A concentração sérica e local de mediadores inflamatórios foi quantificada por ensaio imunoenzimático. A expressão proteica de moléculas de adesão endotelial, das sintases do óxido nítrico, da mieloperoxidase e da metaloproteinase-9 foi avaliada por imunohistoquímica. A expressão gênica destas moléculas foi quantificada por *real time* PCR. **Resultados:** O grupo I/R mostrou aumento do infiltrado leucocitário tanto no parênquima pulmonar (P<0,0001), quanto nas vias aéreas (P=0,06440), comparado aos grupos de tratados. A análise de MPO do tecido pulmonar mostrou elevação no grupo I/R, tanto na presença (P = 0,0039), quanto na atividade de neutrófilos (P=0,0255) e foi reduzida pelos tratamentos. Na análise de mediadores inflamatórios, nos grupos tratados houve redução da CINC-1(P= 0,025) no soro, redução da expressão gênica pulmonar e da concentração de IL-1 β no explante, comparados ao grupo I/R. A avaliação das plaquetas mostrou redução da resposta de agregação no grupo E2 Pós comparado ao grupo I/R (P=0,0721). Os grupos tratados apresentaram aumento na expressão proteica de eNOS (P=0,0316) e redução na expressão de MMP-9 (P=0,0229), frente ao grupo I/R. Houve ainda elevação na expressão gênica (P=0,0961) e proteica (P= 0,0389) da molécula de adesão ICAM-1 no grupo I/R, comparado aos grupos de tratados. **Conclusão:** O tratamento com estradiol foi capaz de modular os componentes da resposta inflamatória, reduzindo a expressão de MPO e MMP-9 e aumentando a expressão de eNOS, além de reduzir a agregação plaquetária, reduzir as concentrações de IL-1 β e a mobilização de granulócitos. Nossos dados apontam que o 17 β -estradiol pode ser uma abordagem complementar para lidar com o processo inflamatório sistêmico e a deterioração pulmonar após a isquemia e reperfusão.

Palavras-chave: Lesão pulmonar, Isquemia e reperfusão, Estradiol.

ABSTRACT

Sousa MN. Evaluation of the effects of estradiol on lung injury caused by occlusion of the proximal descending aorta in male rats[thesis]. São Paulo: Faculty of Medicine, University of São Paulo; 2023.

Introduction: Ischemia and reperfusion events resulting from cardiovascular procedures involving aortic preservation by cross-clamping can lead to a series of cardiac, neurological, pulmonary, visceral and peripheral complications. Damage can affect organs that are more distant from the aortic clamping, with the ischemic process affecting an organ/region and its clinical manifestations reflecting in other organs, such as the lungs. Acute pulmonary inflammation is characterized by increased microvascular permeability, leukocyte infiltration and release of inflammatory mediators. In the evaluation of therapeutic alternatives for the treatment of the injury caused by ischemia and reperfusion, 17 β -estradiol shows promising results, thwarting the mesenteric injury, normalizing the platelet response and mortality. Therefore, the objective of this study was to evaluate the action of 17 β -estradiol as a modulator of the vascular and immune response in systemic and pulmonary events through the experimental model of aortic protection followed by reperfusion in rats. **Methods:** Male Wistar rats were randomized and allocated into four groups: sham-operated (Sham) (n = 6); (I/R) animals submitted to aortic occlusion for 20 minutes, followed by a 4-hour reperfusion period (n = 6); (E2 Pre) animals treated with 17 β -estradiol (280 μ g/kg, iv) 30 minutes before the ischemia process (n = 6); (E2 Post) animals treated with 17 β -estradiol (280 μ g/kg, iv) 60 minutes after the ischemia process, within the reperfusion period (n = 6). A histological evaluation of the lung tissue was performed. Serum and local concentration of inflammatory mediators were quantified by immunoenzymatic assay. The expression of endothelial adhesion proteins, nitric oxide synthases, myeloperoxidase and metalloproteinase-9 was evaluated by immunohistochemistry. These gene expressions were quantified by real-time PCR. **Results:** The I/R group showed an increase in leukocyte infiltrate both in the lung parenchyma (P<0.0001) and in the airways (P=0.06440), compared to the treated groups. Lung tissue MPO analysis increased in the I/R group both in the presence (P = 0.0039) and activity of neutrophils (P = 0.0255) and was reduced by treatments. In the analysis of inflammatory mediators, in the treated groups there was a reduction in CINC-1 (P= 0.025) in the serum, a reduction in pulmonary gene expression and in the concentration of IL-1 β in the explant, compared to the I/R group. Platelet evaluation showed reduced aggregation response in the E2 Pos group compared to the I/R group (P=0.0721). The treated groups presented an increase in the protein expression of eNOS (P=0.0316) and a reduction in the expression of MMP-9 (P=0.0229), compared to the I/R group. There was also elevation of gene (P=0.0961) and protein (P=0.0389) expression of the adhesion molecule ICAM-1 in the I/R group, compared to the treated groups. **Conclusion:** Estradiol treatment was able to modulate the components of the inflammatory response, reducing the expression of MPO and MMP-9 and increasing the expression of eNOS, in addition reduced platelet aggregation and decreased IL-1 β concentrations and granulocyte mobilization. Our data indicate that 17 β -estradiol may be a complementary approach to deal with the systemic inflammatory process and pulmonary deterioration after ischemia and reperfusion.

Keywords: Lung injury, Ischemia and reperfusion, Estradiol.

1 INTRODUÇÃO

Dentre as diversas complicações cirúrgicas existentes, a lesão pulmonar remota certamente ocupa um lugar de destaque. Apesar da incidência variar de acordo com o tipo de procedimento cirúrgico, o fato de estar associada à síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), produz um cenário que vai ditar a morbidade e mortalidade em diversos procedimentos, tanto a curto como a longo prazo. Este evento de lesão pulmonar tem como característica a ocorrência após a realização de cirurgias fora do sítio pulmonar, causando lesão a distância. Em um estudo retrospectivo sobre a incidência e mortalidade da SDRA em pacientes após cirurgia cardíaca, Kogan et al. (2014), demonstraram que mesmo com uma incidência baixa (0,61%), a taxa de mortalidade é significativamente alta, com 40,5% neste tipo de cirurgia. No entanto, outros relataram que a incidência de SDRA após a cirurgia é tão alta quanto 20% e a taxa de mortalidade é de até 80%. (Stephens et al; 2013). Em uma metanálise recente, Serpa et al. (2014), relacionaram a lesão pulmonar remota pós-operatória e a incidência de mortalidade e morbidade após cirurgias abdominais ou torácicas. Entre 3.365 pacientes, a incidência geral de lesão pulmonar pós-operatória foi de aproximadamente 4% independentemente do tipo de cirurgia; no entanto, a lesão pulmonar pós-operatória após cirurgia torácica foi associada a maior morbidade do paciente. Considera-se que, os mecanismos patológicos que cercam este tipo de lesão são complexos, envolvendo citocinas e DAMPs (Padrões Moleculares Associados a Danos), liberados por órgãos lesados ou locais cirúrgicos. Como resultado, a função normal do sistema respiratório fica comprometida, contribuindo para o desenvolvimento de lesão pulmonar. (Chen et al. ;2019)

Eventos de isquemia e reperfusão (I/R) resultantes de procedimentos cirúrgicos cardiovasculares, que envolvem a obstrução aórtica por pinçamento, podem levar a uma série de complicações cardíacas, neurológicas, pulmonares, viscerais e periféricas (Wu et al., 1999; Erbel et al., 2014). A isquemia visceral aguda e a lesão subsequente, que se seguem às abordagens cirúrgicas da aorta, estão associadas a altas taxas de morbimortalidade. Os danos podem acometer órgãos mais distantes ao pinçamento aórtico, com o processo isquêmico afetando um órgão/região e suas manifestações clínicas refletindo em outros órgãos. Por exemplo, o quadro de isquemia intestinal seguido de reperfusão está associado à inflamação pulmonar aguda caracterizada por aumento da permeabilidade microvascular, evidência histológica de lesão celular endotelial alveolar, níveis reduzidos de ATP do tecido pulmonar e sequestro pulmonar de neutrófilos (Schmeling et al. 1989; Gelman, 1995). A isquemia é uma condição clínica na qual ocorre a diminuição ou privação do fluxo sanguíneo em um determinado área/órgão. A obstrução pode ser aguda ou crônica e de origem patológica ou cirúrgica. A hipóxia tecidual causada pela isquemia leva à redução de nutrientes e ao dano celular. Essa condição desencadeia uma série de complicações, a partir da ativação da resposta imune inata, da geração de estresse oxidativo, culminando em lesão tecidual significativa (Laubach e Sharma, 2016).

O restabelecimento do fluxo sanguíneo é necessário a fim de evitar danos irreversíveis, porém, paradoxalmente, a reperfusão do tecido isquêmico pode amplificar as lesões teciduais que, associadas às complicações sistêmicas, colocam em risco a vida do paciente (Laubach e Sharma, 2016; Ribeiro e Yoshida, 2005). Admite-se que a reperfusão contribua para a ativação celular (Waxman, 1996), tendo em vista que todos os produtos tóxicos e mediadores da inflamação que foram acumulados durante o período isquêmico, serão então disseminados de forma sistêmica (Parkes e Granger 1986).

Em estudos experimentais, Breithaupt-Faloppa et al (2009, 2013, 2014) mostraram que o processo de I/R intestinal causa inflamação pulmonar aguda, caracterizada pela migração leucocitária, aumento da permeabilidade microvascular pulmonar e edema pulmonar não cardiogênico, quadro que se assemelha à síndrome de desconforto respiratório agudo (SDRA). Estudos apontam que a lesão pulmonar aguda é uma das principais consequências sistêmicas da reperfusão tecidual (Welling, 1996; Hudson e Steinberg, 1999; van Soeren et al, 2000). A SDRA é sua forma mais grave, caracterizada por intensa inflamação pulmonar onde há hipoxemia grave (Bernard et al., 1999). Quando na gasometria a relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ alcança um valor igual ou inferior a 200 mmHg, temos então estabelecido o diagnóstico de SDRA. Em verdade, subentende-se que os mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento da SDRA estão limitados à lesão do epitélio alveolar e do endotélio capilar (Randhawa e Bellington, 2007).

Vale lembrar que durante a I/R intestinal há o desenvolvimento da inflamação sistêmica na qual se observa o acúmulo, de citocinas pró-inflamatórias tais como o $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1-}\beta$, IL-6 , IL-8 e o $\text{INF-}\gamma$. De maneira geral, os efeitos dessas citocinas estão intimamente relacionados com o aumento da expressão de moléculas de adesão, recrutamento e ativação de células inflamatórias (neutrófilos, eosinófilos), lesão microvascular e endotelial e aumento do extravasamento plasmático. Sumariamente, as alterações citadas anteriormente são em parte responsáveis pela disfunção do funcionamento de diversos órgãos (Malangoni et al., 1990). Em relação ao pulmão, a ativação de neutrófilos e macrófagos alveolares desempenha papel importante na fase precoce e tardia da lesão pulmonar por I/R (Zhao et al. 2006). Apesar do recrutamento de neutrófilos para locais de lesão tecidual ser evento crítico para a defesa do hospedeiro contra estímulos lesivos e para a reparação de tecidos (Doherty e Janusz, 1994), os

neutrófilos promovem danos teciduais pulmonares, através de liberação de proteases e de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Grisham et al., 1986)

A considerar os eventos vasculares observados na resposta inflamatória, é razoável supor mecanismos subjacentes coordenados pela ativação das células endoteliais. A manutenção da homeostase e do fluxo depende do equilíbrio na liberação de substâncias vasoativas pelo endotélio. Muitos estudos já apontam que as células endoteliais, além de atuar como barreira física protetora da vasculatura (Galley e Webster, 2004), possuem ainda relevante papel metabólico (Hack e Zeerleder, 2001). Na verdade, estas células produzem mediadores vasoativos, como o óxido nítrico (NO) e a endotelina e os efeitos destes sobre o tônus da musculatura lisa vascular e na permeabilidade microvascular já são muito bem comprovados. O NO é um radical livre gasoso altamente reativo e prontamente difusível, o qual é sintetizado por 3 subtipos distintos da enzima NO sintase (NOS), cada um com padrões de expressão únicos e propriedades funcionais: NOS neuronal (nNOS, NOS1), NOS induzível (iNOS, NOS2) e NOS endotelial (eNOS, NOS3) (Gresele, 2019; Förstermann et al., 2012). Nos neurônios, o NO produzido pelas funções de sinalização nNOS para modular a transmissão sináptica a longo prazo, leva ao envolvimento crítico na aprendizagem, memória e neurogênese. (Zhou et al, 2009). Somado a isto, dados sugerem que a nNOS poderia desempenhar importante papel na manutenção do tônus vascular pelos efeitos dos neurônios finais que expressam nNOS que inervam o músculo liso na microvasculatura. (Melikian et al, 2009). Em contraste, a iNOS é fortemente induzida em macrófagos ativados, nos quais cria uma explosão de NO representando o evento sentinela na cascata inflamatória aguda, levando a danos colaterais significativos ao tecido saudável pela geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio. (Lind et al, 2017). A eNOS é a NOS nativa das células endoteliais vasculares e sua função é fundamental para a manutenção da

homeostase vascular apropriada. A sinalização do NO leva diretamente à dilatação dos vasos sanguíneos, estimulando a guanililciclase solúvel, levando a um aumento do monofosfato cíclico de guanosina e subsequente relaxamento do músculo liso vascular. (Ignarro, 1986; Rapoport 1983; Förstermann et al, 1986). Todavia, o NO tem vários outros papéis distintos na fisiologia vascular. Age por exemplo, exercendo efeitos antiplaquetários pela inibição da agregação plaquetária e adesão; além disso, o NO derivado da eNOS das plaquetas provavelmente tem efeitos inibitórios autócrinos e parácrinos em um trombo em desenvolvimento para limitar a formação de coágulos patológicos (Gresele et al, 2019). O NO diminui a expressão da proteína quimioatrativa de macrófagos-1, tal diminuição cursa com a limitação ao tráfego de leucócitos para o endotélio. (Zeicher et al, 1995). O NO age ainda modificando a capacidade funcional das proteínas CD11/CD18 nos leucócitos, alterando desta forma sua capacidade de aderência à parede endotelial. (Kubes et al, 1991).

A disfunção endotelial é caracterizada pela diminuição dos níveis de NO e aumento da permeabilidade vascular. O recrutamento celular pulmonar e as lesões vasculares intestinais são dependentes das modificações (aumento/redução) na atividade das NO sintases (constitutiva e induzida) durante o período de I/R intestinal (Ward et al., 2000). Em casos mais graves, a lesão pulmonar promove uma despolarização das membranas das células endoteliais que induz a produção exacerbada de espécies reativas de oxigênio e NO, os quais promovem a degradação das barreiras endoteliais e epiteliais. O resultado é a disfunção das células endoteliais, manifestada pela hipertensão pulmonar e aumento da permeabilidade vascular, levando a edema e comprometimento da hematose. Em última instância, a lesão oxidativa e ativação de caminhos de sinalização impulsionam a inflamação e morte celular (Chatterjee et al. 2014).

Evidências clínicas e experimentais indicam que a resposta imunológica, bem como a suscetibilidade do organismo a infecções e lesões, difere entre os sexos. Esse dimorfismo sexual pode estar associado a diversos fatores, como inativação do cromossomo X, diferenças anatômicas, a presença/concentração de hormônios sexuais e o contexto social (Fish 2008). Dados revelam que as repercussões do trauma em fêmeas são menos intensas do que em machos e que machos sob tratamento com estradiol evoluem, também, com danos de menor intensidade (Deitch, 2001). De forma adicional, trabalhos ainda comprovam que as fêmeas evoluem com melhores parâmetros hemodinâmicos após o choque hemorrágico quando comparadas aos machos. (Deitch et al., 2008a; Deitch et al 2008b).

Sabe-se que o estrógeno possui um papel protetor da função endotelial (Ma et al., 2001), ativando a geração de NO via sintase de NO endotelial (eNOS) (Novella et al. 2012). Ainda, estudos do nosso grupo utilizando modelo de oclusão aórtica, indicam que o tratamento prévio com estradiol exerce efeito benéfico no curso da isquemia mesentérica e da lesão intestinal, prevenindo a mortalidade (Rocha de Sousa et al., 2018). Adicionalmente, em modelo de I/R intestinal, resultados indicam que os hormônios sexuais femininos, notadamente o estradiol, exercem efeito protetor no desencadeamento das lesões pulmonares e intestinais causadas pela inflamação sistêmica após trauma isquêmico (Breithaupt-Faloppa et al., 2013; Breithaupt-Faloppa et al., 2014; Ricardo-da-Silva et al., 2017). Além disso, estudos clínicos e experimentais mostram o efeito protetor do estradiol sobre o sistema imune, a inflamação pulmonar e a liberação de diversos mediadores inflamatórios (MacNeil et al ,2011; Doucet et al ,2010; Papenfuss et al ,2011). Estudos anteriores do nosso grupo apontaram para alterações na coagulação de animais submetidos a I/R aórtica. Ratos submetidos ao modelo de I/R aórtica e mantidos por 2 h em reperusão apresentam aumento da agregação plaquetária em relação ao grupo

Sham e o tratamento prévio com estradiol é capaz de normalizar a resposta plaquetária (Sobral et al. 2022).

Os efeitos do estradiol são resultantes de sua ligação a receptores, como os receptores clássicos (ER) que são classificados em α e β . Estes subtipos estão distribuídos de forma diferente no organismo, havendo no pulmão a prevalência de ER- β (Faulds et al., 2012; Kuiper et al., 1997). Também foram identificados receptores acoplados a proteína G (GPER-1), localizados na membrana plasmática e sua ativação é importante para a geração de respostas biológicas rápidas (Prossnitz et al., 2008; Revankar et al., 2005; Thomas et al., 2005; Björnström, Sjöberg, 2005).

Ainda sob o escopo hormonal, é importante ressaltar o papel antagônico dos andrógenos em relação aos hormônios femininos em situações tais quais trauma, hemorragia e sepse nos diversos sistemas. Em um estudo clínico prospectivo, Offner et al. (1999), identificaram o sexo masculino como um fator de risco independente para o desenvolvimento de infecção grave em pacientes cirúrgicos. Já em um outro estudo prospectivo sobre sepse, foi demonstrado o aumento de sobrevida do sexo feminino quando comparado a pacientes do sexo masculino, sendo a taxa de sobrevivência feminina de 74%, comparada a 31% dos homens (Schröder et al., 1998). Corroborando com os achados anteriores, um trabalho experimental demonstrou que a castração de ratos machos duas semanas antes do evento trauma/hemorragia preveniu a depressão da função miocárdica (Remmers et al., 1998). Este efeito de amortecimento da defesa do hospedeiro pelos andrógenos já é bem conhecido e explica os vieses do sexo relacionados a imunocompetência, autoimunidade e incidência de câncer (Gubbels et al., 2018). Os efeitos androgênicos incluem a apoptose de células T e B e a indução de células T reguladoras e células supressoras de CD8⁺ (Gubbels et al., 2018; Bouman et al., 2005). Além disso, em monócitos/macrófagos, os andrógenos reduzem a sinalização pró-

inflamatória (TLR4, TNF α , IL-1 β e IL-6) (Rettew et al., 2008), mas aumentam a produção de citocinas anti-inflamatórias (IL-10) (D'agostino et al., 1999).

Considerando que não existem agentes terapêuticos utilizados clinicamente para prevenir especificamente a lesão por I/R causada por procedimentos cirúrgicos de alta complexidade, particularmente aqueles que envolvem o pinçamento aórtico e que as estratégias de tratamento são limitadas aos cuidados de suporte, este estudo visou compreender melhor os mecanismos de lesão da microcirculação pulmonar causados pela obstrução aórtica, a fim de identificar alvos terapêuticos. Ainda, avaliou-se o papel do estradiol como modulador da resposta vascular e imune, influenciando os eventos desencadeados pela isquemia e sua capacidade como alternativa terapêutica para mitigar os efeitos deletérios da I/R.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar os efeitos do tratamento com estradiol sobre a lesão pulmonar decorrente do processo de isquemia e reperfusão (I/R), por oclusão da aorta descendente proximal via cateter intravascular em ratos machos.

2.2 Objetivos específicos

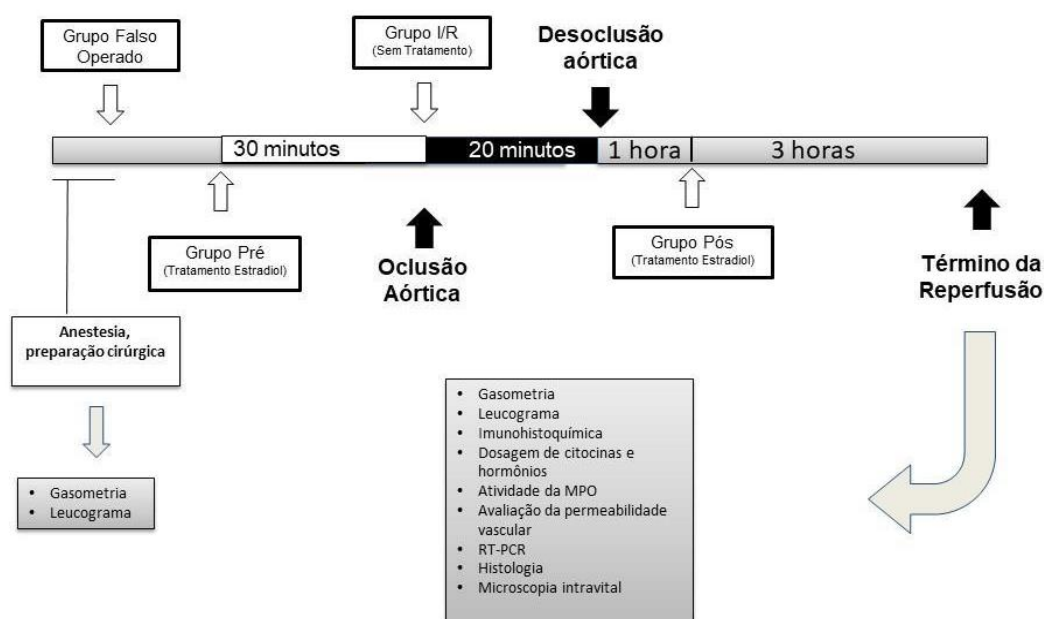
- Avaliar inflamação pulmonar;
- Determinar as concentrações sistêmicas e locais de mediadores inflamatórios;
- Avaliar a microcirculação pulmonar por microscopia intravital;
- Avaliar a expressão proteica de moléculas de adesão endotelial e das sintases de óxido nítrico e da endotelina no tecido pulmonar;
- Avaliar a expressão gênica das sintases de óxido nítrico e da endotelina no tecido pulmonar

3 MÉTODOS

3.1 Delineamento Experimental

Grupos de estudo foram dispostos em:

- **Grupo falso-operado (Sham)** – Animais manipulados cirurgicamente, no entanto não submetidos ao processo isquêmico;
- **Grupo isquemia/reperfusão (I/R)** – Animais que foram submetidos à lesão de isquemia e reperfusão por oclusão aórtica;
- **Grupo estradiol pré-isquemia (E2 Pré)** – Animais que receberam o tratamento com estradiol (280 µg/Kg, iv) 30 minutos antes da isquemia aórtica;
- **Grupo estradiol pós-isquemia (E2 Pós)** – Animais que receberam o tratamento com estradiol (280 µg/Kg, iv) uma hora após o início da reperfusão.



3.2 Animais

O presente projeto de estudo foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Coordenadoria de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Protocolo 1035/2018). Os experimentos foram realizados no Laboratório de Investigação Médica (LIM)-11 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). Foram utilizados 80 ratos Wistar machos divididos em duas etapas, considerando também a taxa de mortalidade de 25% associada ao modelo experimental: 32 animais foram utilizados para a coleta de tecidos para as avaliações histológicas, imunohistoquímicas e dosagens e 32 animais foram utilizados para a avaliação da microcirculação pulmonar pela técnica de microscopia intravital por epi-iluminação. Os animais foram provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, com aproximadamente 60 dias. Os animais foram mantidos a 23 ± 2 °C, período de claro e escuro de 12 h, sem restrições à ingestão de água e ração.

3.3 Anestesia

A anestesia foi realizada através da mistura de isoflurano associado ao oxigênio em uma câmara fechada. Posteriormente, os ratos foram intubados (jelco 16G), conectados a um ventilador para roedores e mantidos a FiO_2 de 60%, volume corrente de

10 ml/kg e frequência de 70 ciclos/minuto. O esquema anestésico proposto foi sustentado com isoflurano a 2%.

Os animais foram alocados em uma plataforma cirúrgica aquecida (37°C). Realizamos a dissecação e cateterizamos a artéria caudal do animal com um cateter tipo PE 10 para monitorização da pressão arterial distal. A monitorização da pressão arterial proximal foi feita indiretamente através da dissecação e cateterização da artéria carótida comum esquerda com um cateter de politetrafluoretileno tipo PE 50.

3.4 Indução do processo de isquemia e reperfusão

A indução da isquemia foi realizada por meio oclusão da aorta com um cateter de Fogarty® 2F (Edwards Lifesciences LLC – Irvine, CA, EUA). Para tanto, pela artéria carótida comum esquerda (mesma incisão realizada para a monitorização da pressão arterial proximal) houve a progressão do cateter, por cerca de 10 a 12 mm, na direção caudal, até a aorta descendente proximal. Com a insuflação parcial do balão (0,04 ml de solução fisiológica a 0,9%) seguiu-se uma discreta tração em sentido cranial até o posicionamento correto do balão no óstio da artéria carótida comum esquerda. Nessa mesma posição ocorre também, a oclusão do óstio da artéria subclávia esquerda – importante via de circulação colateral. Então, 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 foi mantida ocluída por um total de 20 minutos sem correção adicional da pressão arterial proximal. A eficiência da oclusão da aorta foi confirmada por meio da imediata e sustentada perda de qualquer detecção de pressão arterial distal (próximo de zero).

Foram realizadas, ainda, medidas de pressão seriadas no período de oclusão aórtica (isquemia) e durante a reperfusão (desinsuflação/retirada do cateter). A artéria carótida e a artéria caudal foram conectadas ao transdutor de pressão (P23XL, Viggo-Spectramed Inc., EUA), ligado a um sistema de multicanal de aquisição de dados biológicos (Acqknowledge – Biopac Systems, Inc., EUA). Os parâmetros hemodinâmicos foram obtidos continuamente.

Após o tempo de isquemia, o cateter foi desinsuflado e os animais foram mantidos por 4 horas em reperfusão, período no qual os animais receberam reposição volêmica de solução fisiológica a 0,9% no volume de 10ml/kg/h com intuito de manter a estabilidade hemodinâmica frente ao insulto isquêmico.

3.5 Protocolo de tratamento

Grupos de animais receberam tratamento com 280 µg/Kg de 17β-estradiol (Sigma-Aldrich, EUA) via endovenosa 30 minutos antes do início da isquemia (E2 Pré) ou uma hora após o início da reperfusão (E2 Pós). Os animais do grupo I/R receberam solução de ciclodextrina (veículo do 17β-estradiol) por via endovenosa em volume equivalente 30 minutos antes da indução da isquemia.

3.6 Determinação das concentrações séricas hormonais de estradiol, corticosterona e testosterona

Após o término da reperfusão, foram coletadas alíquotas de sangue para quantificação de estradiol, testosterona e corticosterona. A amostra foi retirada da aorta

em sua porção abdominal e as concentrações circulantes dos hormônios foram mensuradas no soro utilizando kits de Elisa (Cayman Chemicals, EUA). Substancialmente foi executado o protocolo proposto pelo fabricante.

3.7 Quantificação de gases respiratórios

Uma vez que os animais foram mantidos sob ventilação mecânica controlada, a análise de função respiratória incluiu apenas a quantificação de gases respiratórios, obtida através de dispositivo adequado a pequenos animais (MLT1L Respiratory Flow Head, AD Instruments, EUA) acoplado ao sistema de avaliação dos gases respiratórios (ML206 Gas Analyser, AD Instruments, EUA). As informações acerca dos volumes expirados de O₂ e CO₂ foram obtidas e analisadas a partir de software específico (LabChart, AD Instruments, EUA).

3.8 Determinação número total e diferencial de leucócitos circulantes

Alíquotas de sangue (20µl) foram obtidas da cauda dos animais antes do início do processo isquêmico e logo após o término da reperfusão de 4 h. Utilizamos uma pipeta automática para coletar a amostra, que foi homogeneizada em diluente do próprio equipamento e submetida à contagem automática total e diferencial em analisador hematológico automático (BC-2800vet, Mindray, China).

3.9 Contagem dos leucócitos totais do lavado broncoalveolar (LBA)

O lavado broncoalveolar foi realizado de acordo com de Lima et al. (1992). A lavagem do espaço alveolar foi realizada com seringa contendo 5 ml de meio de cultura (DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Sigma-Aldrich®, EUA), acoplada ao jelco 16G utilizado para intubação, injetando-se lentamente o DMEM três vezes. O LBA obtido foi centrifugado por 10 minutos a 201 x *g* na temperatura de 15 °C. O botão celular foi ressuspensionado em 1ml de PBS. A contagem total de células foi realizada em contador hematológico automático (BC-2800vet, Mindray, China).

3.10 Avaliação da microcirculação pulmonar por microscopia intravital e análise do fluxo sanguíneo.

A análise da microcirculação pulmonar foi realizada por técnica de microscopia intravital por epi-iluminação. Após o processo de reperfusão, os ratos foram colocados em decúbito lateral esquerdo e uma incisão cutânea e muscular foi realizada para exteriorização do lado direito da caixa torácica. Para visualização do pulmão direito foi posicionado um afastador no 5º espaço intercostal. Uma membrana transparente de polivinilideno foi colocada sobre o tecido pulmonar exposto. Os leucócitos foram corados *in vivo* através da administração endovenosa de Rodamina 6G (0,2 mg/kg). A avaliação de leucócitos migrados foi realizada em uma área total de 200.000 μm^2 em 05 campos diferentes por animal. Para análise do fluxo sanguíneo na microcirculação pulmonar (*in situ* e *in vivo*), foi utilizado um sensor (MSP 300 XP Laser doppler surface Probe) de 25 mm de extensão e 0,48 mm de diâmetro acoplado a fluxômetro a laser (IN191 Laser Doppler Flowmetry, AD Instruments, Colorado Springs, CO, EUA). Foram analisadas

05 áreas diferentes do lobo pulmonar direito. O laser de retorno captado é proporcional ao fluxo de células sanguíneas através da microvasculatura. Os valores são registrados como porcentagem de retorno do sinal.

3.11 Agregação Plaquetária

Para o teste de agregação plaquetária, amostras de sangue foram coletadas em tubo com citrato de sódio 3,2% e centrifugadas por 10 minutos em 201 x *g* para obtenção de plasma rico em plaquetas (PRP) que foi utilizado para o ensaio em agregômetro (EasyAgreg). Como agonista foi utilizado o ADP na concentração de 10µM. A análise consiste no registro de alterações na transmissão da luz, pois, ao adicionar o agente agonista, tem-se um decréscimo da mesma devido à mudança na forma das plaquetas, que passam de discóides a esféricas, seguido de um aumento gradual na transmissão de luz, devido à agregação das plaquetas, o que torna o meio mais claro. Este teste é válido para mostrar o defeito da hemostasia primária.

3.12 Determinação da presença de neutrófilos pela atividade da MPO

A avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) pulmonar foi baseada na metodologia descrita em Goldblum et al. (1985). Após o término do período de 4h de reperfusão, os animais foram submetidos à eutanásia por exsanguinação. A cavidade torácica foi aberta e o leito vascular pulmonar perfundido com 20 ml de PBS por meio de uma cânula inserida na artéria pulmonar. O pulmão foi extraído e imediatamente congelado. Os tecidos foram pesados e homogeneizados em 3 ml/g em tampão fosfato

pH 6,0 contendo 0,5% de brometo de hexadecil-tri-metil-amônio (HTAB) e 5 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (gentleMACS™ Dissociator, MiltenyiBiotec, Alemanha). As amostras foram centrifugadas a 453 x *g* durante 15 min a 4 °C, e o sobrenadante obtido foi então utilizado para determinar a atividade de MPO. O ensaio da atividade de MPO foi conduzido adicionando a placas de 96 poços: 185 µl de tampão fosfato pH 6,0, 50 µl de H₂O₂ (0,0005%), 50 µl de orto-dianisidina (1,75 mg/ml) e 20 µl das amostras. Decorrido o tempo de 10 min, a reação foi interrompida pela adição de 50 µl de azida sódica (1,3%). A leitura foi feita em espectrofotômetro (Spectramax™ Microplate Reader, Molecular Devices, EUA) em comprimento de onda de 450 nm.

3.13 Cultura de tecido isolado (explante)

A cultura de tecidos foi realizada de acordo com Proust et al. (2003). Decorrido o tempo de reperfusão (4 h), fragmentos de tecido pulmonar foram incubados em placas de 24 poços e mantidos em atmosfera úmida com 95% de O₂ e 5% de CO₂, a 37 ° C em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma-Aldrich, EUA), contendo 0,5% de Penicilina/Estreptomicina (10.000 U.I./10 mg por ml). Os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -80 ° C até a análise e os fragmentos de pulmão desidratados e pesados.

3.14 Determinação das concentrações de mediadores inflamatórios

Foi realizada a quantificação de IL-1β, IL-6, IL-10, CINC-1, TNF-α e VEGF em amostras de soro e meio de cultura do explante pulmonar utilizando-se de kits de ELISA

(R&D Systems, EUA). Os ensaios foram conduzidos seguindo as especificações do fabricante.

A concentração de nitratos e nitritos (NO_x^-) no soro e no explante pulmonar foi determinada por meio de uma reação com reagente de Griess, após a incubação das amostras com nitrato redutase (0,15 U/ml). A densidade ótica (540nm) foi obtida em espectrofotômetro e os níveis de nitratos e nitritos expressos em nM/ml, foram obtidos a partir de curva padrão de NO_2^- .

3.15 Análise histopatológica

Fragmentos do pulmão foram fixados em solução de formaldeído (10%). Os tecidos foram processados, emblocados em parafina, cortados e corados (hematoxilina/eosina) para análise histopatológica em microscópio óptico. Análises morfométricas convencionais foram realizadas em um corte por animal ($n = 5$ por grupo). Os parâmetros investigados foram: infiltrado leucocitário, edema intersticial e hemorragia, analisados por dois observadores. Os cortes foram digitalizados e dez áreas por imagem foram extraídas e exportadas em formato compatível com o software NIS Elements (Nikon, Japão). Um retículo com 110 intersecções (área total $247500 \mu\text{m}^2$) foi utilizado para a avaliação da hemorragia e do edema e foi considerada apenas a área de tecido (o espaço aéreo foi subtraído da área total). Para a avaliação do número de polimorfonucleares foram utilizadas 10 áreas de $66000 \mu\text{m}^2$ por corte e o espaço aéreo também foi desconsiderado, sendo os dados expressos como células/área de tecido.

3.16 Real time PCR para expressão gênica

Os genes foram quantificados quanto à sua expressão através de PCR em tempo real, em aparelho Step One Plus® (Applied Biosystem, EUA). A extração de RNA dos tecidos (pulmão) foi realizada com a utilização de kit comercial (Mirvana®, Ambion), seguindo o protocolo do fabricante. O cDNA foi transcrito (High capacity Reverse transcriptase kit, Applied Biosystem, EUA) e a reação de PCR em tempo real realizada. Os primers utilizados foram Taqman (Applied Biosystem, USA): GAPDH (Rn01775763_g1), β -actin (Rn00667869_m1*), iNOS (Rn00561646_m1*), eNOS (Rn02132634_s1*), endothelin 1 (Rn00561129_m1*), ICAM-1 (Rn00564227_m1*), VCAM-1 (Rn00563627_m1*) e MMP-9 (Rn00579162_m1*). As condições de ciclagem foram: 2 min a 50°C, 10 minutos a 95°C seguido de 40 ciclos de 15 segundos 95°C e 1 min a 60°C.

Os primers Syber Green® utilizados estão listados na tabela abaixo:

Tabela 1. Primers utilizados para a análise de RT-PCR

Real-time PCR SYBR® Green		
β -actin	RN b-act fw	5'-GGAAATCGTGCGTGACATTAAA-3'
	RN b-act rv	5'-GCGGCAGGGCCATCTC-3'
TNF- α	RN TNFa fw	5'-AGGCTGTCTGCTACATCACTGAA-3'
	RN TNFa rv	5'-TGACCCGTAGGGCGATTACA-3'
IL-1 β	RN IL-1B fw	5'-CAGCAATGGTCGGGACATAGTT-3'
	RN IL-1B rv	5'-GCATTAGGAATAGTGCAGCCATCT-3'
IL-10	RN IL-10 fw	5'-GCAACAGCTCAGCGCATCT-3'
	RN IL-10 rv	5'-ACAAACTGGTCACAGCTTTCGA-3'
IL-6	RN IL-6 fw	5'-CAACTTCCAATGCTCTCCTAATG-3'
	RN IL-6 rv	5'-TTCAAGTGCTTTCAAGAGTTGGAT-3'
Caspase-3	RN CASP-3 fw	5'-GCATGCCAGAAGATAACAGTGG-3'
	RN CASP-3 rv	5'-AGTTTCAGCATGGCGCAAA-3'
BCL-2	RN BCL-2 fw	5'-CTGGGATGCCTTTGTGGAA-3'
	RN BCL-2 rv	5'-TCAGAGACAGCCAGGAGAAATCA-3'

3.17 Imunohistoquímica para pesquisa das sintases do óxido nítrico (iNOS e eNOS) e da endotelina no tecido pulmonar

A cavidade torácica foi aberta e o leito vascular pulmonar perfundido com 20 ml de PBS por meio de uma cânula inserida na artéria pulmonar. O pulmão esquerdo foi extraído, insuflado com solução de OCT (optimal cutting temperature), imerso em hexano e congelado em nitrogênio líquido. Cortes seriados de 10 µm foram colocados sobre lâminas silanizadas (Starfrost®, Knitellglass, Alemanha) e as amostras fixadas em acetona (10 min). As lâminas foram lavadas com solução tampão TRIS salina-tween (TBS-T), seguido de bloqueio de sítios inespecíficos com tampão de bloqueio (3% BSA em TBS-T) e bloqueio da peroxidase endógena (solução de H₂O₂ 2%). Para imunodeteção das enzimas utilizou-se anticorpos primários IgG de coelho anti-iNOS ou anti-eNOS de rato (Abcam, Cambridge, EUA) diluídos 1:100 em solução de TBS-T contendo 3% de BSA. Para a imunodeteção de endotelina utilizou-se o anticorpo primário IgG de camundongo (Abcam, Cambridge, EUA) diluído 1:200 em solução de TBS-T contendo 3% de BSA. A incubação foi realizada a 4°C por 12 horas. Após lavagens sucessivas com TBS-T, os cortes foram incubados por 2 h a 37°C com anticorpos secundários anti-coelho ou anti-camundongo conjugados a HRP (Boster, EUA) diluídos 1:100 em TBST-BSA. Após novas lavagens, as amostras foram incubadas com solução de substrato AEC (3-amino-9-ethylcarbazole, Vector Laboratories, Burlingame, EUA) por 5 a 15 min e contra coradas com hematoxilina. A marcação no tecido pulmonar 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 analisadas com auxílio do software NIS-Elements-BR (Nikon). Como controle negativo foram utilizadas imagens de cortes incubadas na ausência do anticorpo primário.

3.18 Imunohistoquímica para pesquisa das moléculas de adesão ICAM-1, VCAM, MPO e MMP-9 no tecido pulmonar

Cortes seriados de 10 µm foram colocados sobre lâminas silanizadas (Starfrost®, Knittelglass, Alemanha) e as amostras fixadas em acetona. As lâminas foram lavadas com solução tampão TRIS salina-tween (TBS-T), seguido de bloqueio de sítios inespecíficos com tampão de bloqueio (3% BSA em TBS-T) e bloqueio da peroxidase endógena (solução de H₂O₂ 2%). Para a imunodeteção, os anticorpos primários IgGs de camundongo anti-ICAM-1 (Boster, EUA), anti-VCAM (Abcam, EUA), anti-MPO (Novus Biologicals, EUA) e MMP-9 (Boster, EUA) de rato foram diluídos (1:100) em solução de 3% BSA em TBS-T e os cortes foram incubados por 12 h em geladeira. As lâminas foram lavadas com TBS-T e incubadas com solução 1:400 de anticorpo secundário anti-camundongo associado a HRP (Boster, EUA) por 1 h a 37°C. Como substrato para coloração foi utilizado AEC (3-amino-9-ethylcarbazole, Vector Laboratories, EUA). A marcação no tecido pulmonar foi identificada e a análise foi realizada através de sistema de aquisição de imagens com câmera digital DS-Ri1 (Nikon, Japão), acoplada a microscópio (Nikon) e analisadas com auxílio do software NIS-Elements-BR (Nikon). Como controle negativo foram utilizadas imagens de cortes incubadas na ausência do anticorpo primário.

3.19 Imunohistoquímica para pesquisa dos receptores de estradiol (ER- α , ER- β e GPER) no tecido pulmonar

Cortes seriados de 10 μ m foram colocados sobre lâminas silanizadas (Starfrost®, Knittelglass, Alemanha) e as amostras fixadas em acetona. As lâminas foram lavadas com solução tampão TRIS salina-tween (TBS-T), seguido de bloqueio de sítios inespecíficos com tampão de bloqueio (3% BSA em TBS-T) e bloqueio da peroxidase endógena (solução de H₂O₂ 2%). Para a imunodeteção, os anticorpos primários IgGs de coelho anti-ER- α (Novus Biologicals, EUA), anti-ER- β (Novus Biologicals, EUA) e anti-GPER (Novus Biologicals, EUA) de rato foram diluídos (1:100) em solução de 3% BSA em TBS-T e os cortes foram incubados por 12 h em geladeira. As lâminas foram lavadas com TBS-T e os cortes foram incubados por 12 h em geladeira. As lâminas foram lavadas com TBS-T e incubadas com solução 1:400 de anticorpo secundário anti-coelho associado a HRP (Boster, EUA) por 1 h a 37°C. Como substrato para coloração foi utilizado AEC (3-amino-9-ethylcarbazole, Vector Laboratories, EUA). A marcação no tecido pulmonar foi identificada e a análise foi realizada através de sistema de aquisição de imagens com câmera digital DS-Ri1 (Nikon, Japão), acoplada a microscópio (Nikon) e analisadas com auxílio do software NIS-Elements-BR (Nikon). Como controle negativo foram utilizadas imagens de cortes incubadas na ausência do anticorpo primário.

3.20 Análise estatística

As análises estatísticas foram conduzidas utilizando GraphPad Prism Software v.9 (GraphPad, EUA). Os resultados foram expressos como médias $\pm$ erro padrão da

média (EPM) ou mediana e intervalo de confiança 95% (todos os dados de expressão gênica). Os dados foram submetidos a teste de normalidade e submetidos à análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey para múltiplas comparações ou Kruskal-Wallis seguido por teste de Dunn e corrigidos pelo teste de dois estágios de Benjamini, Krieger and Yekutieli.

4 RESULTADOS

4.1 Parâmetros hemodinâmicos

Para produzir o evento isquêmico, ocluímos a aorta descendente por um período de 20 minutos sem correção adicional da pressão arterial proximal. Esta oclusão foi seguida de forma sustentada por uma imediata diminuição da pressão arterial distal do animal (em torno de 10 mmHg), demonstrando assim a eficácia da oclusão aórtica. Como podemos observar na Figura 1, as pressões arteriais, distal e proximal, foram registradas antes do início do procedimento de isquemia, durante a oclusão da aorta (isquemia) e durante a reperfusão (desinsuflação/retirada do cateter de Fogarty). Um comportamento bastante similar foi observado na comparação dos animais submetidos à lesão isquêmica, tratados ou não com o 17β -estradiol, antes da isquemia aórtica ou após a lesão isquêmica, isto é, durante a reperfusão. Não ocorreram variações significativas de pressões arteriais, distal e proximal, nos controles Sham ao longo do tempo.

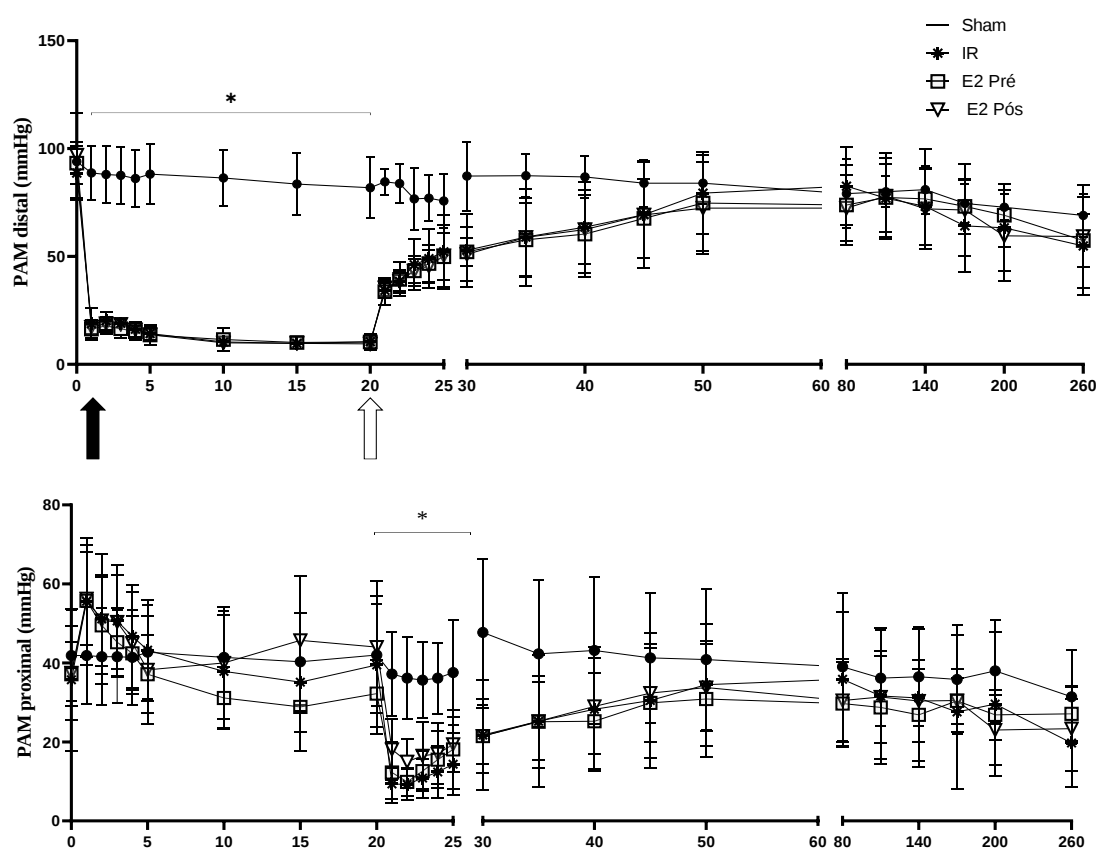


Figura 1: Registro da pressão arterial distal e proximal de ratos submetidos à lesão de isquemia e reperfusão (I/R, n=6); ratos falso-operados (Sham, n=6); ratos tratados com 17 β -estradiol (E2) 30 min antes da indução da lesão de isquemia e reperfusão (E2 Pré, n=6) e de ratos tratados com 17 β -estradiol 1 h após o início da reperfusão (E2 Pós, n=6). A seta preta indica o momento da oclusão da aorta e a seta branca o início da reperfusão. Os valores representam a média $\pm$ EPM. * $P < 0,05$ em relação ao grupo Sham

4.2 Perfil de gases expirados

Conforme ilustrado na figura 2, há um relativo aumento da liberação de O₂ e uma diminuição da expiração de CO₂ durante a isquemia nos grupos submetidos à isquemia em relação ao Sham. Após o restabelecimento da perfusão, a exalação dos gases foi normalizada. O tratamento com estradiol não interferiu no padrão de trocas gasosas.

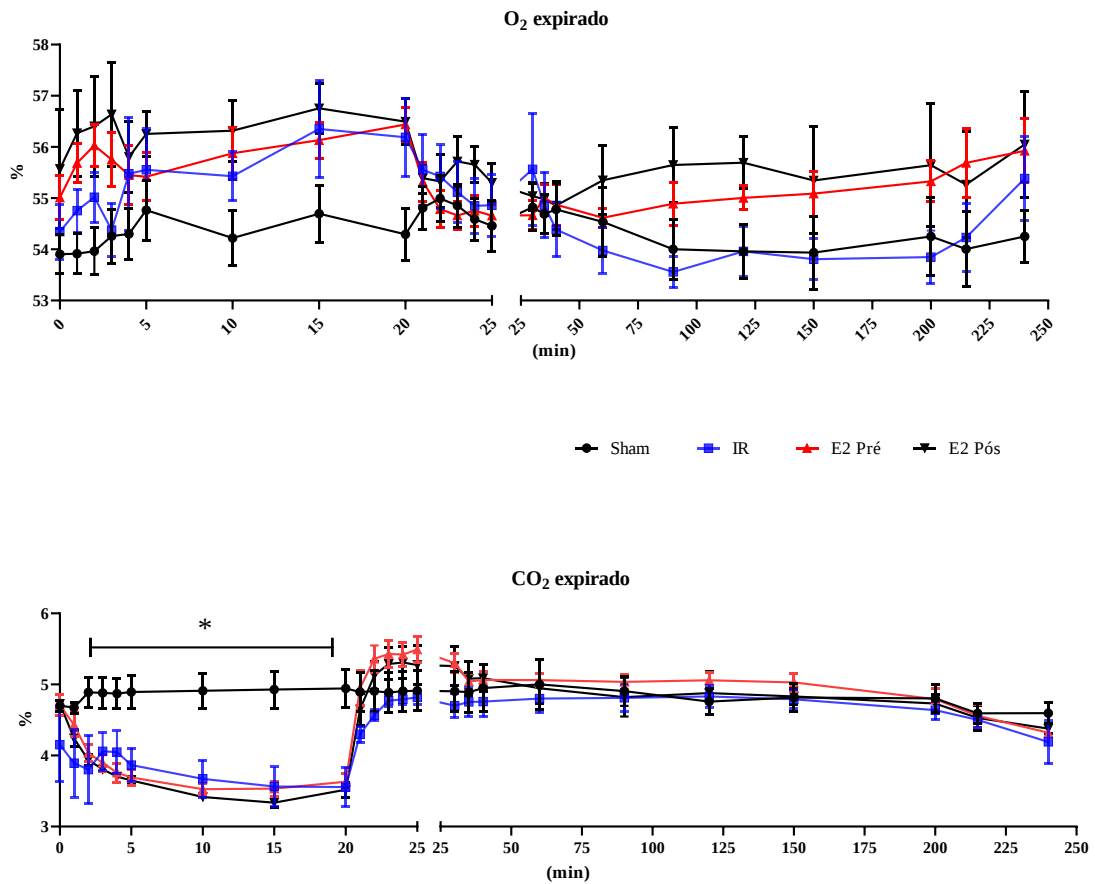


Figura 2: Análises de O₂ expirado e CO₂ expirado, em ratos submetidos a isquemia e reperfusão, tratamento com estradiol e grupo controle. Os dados foram representados por média $\pm$ erro padrão * $p < 0,05$ em comparação com o grupo IR

4.3 Concentrações hormonais no soro

Para a confirmação do tratamento, foi analisada a concentração de estradiol (E2) ao término de 4h de reperfusão, como mostrado na figura 3. Os animais machos controles/Sham e animais submetidos a I/R apresentam baixa concentração de E2. Os animais dos grupos tratados apresentaram aumento significativo na concentração sérica de estradiol.

Uma vez que os animais estudados são do sexo masculino, foi avaliada também a concentração sérica de testosterona. O andrógeno foi encontrado em maior concentração nos animais submetidos à I/R e o tratamento com estradiol foi capaz de reduzir sua concentração.

Paralelamente a estradiol e testosterona, foi quantificada a concentração sérica de corticosterona. Como todos os grupos foram submetidos ao estresse cirúrgico e a ventilação mecânica, apesar de variações, não evidenciamos diferenças significativas entre eles. (Figura 3).

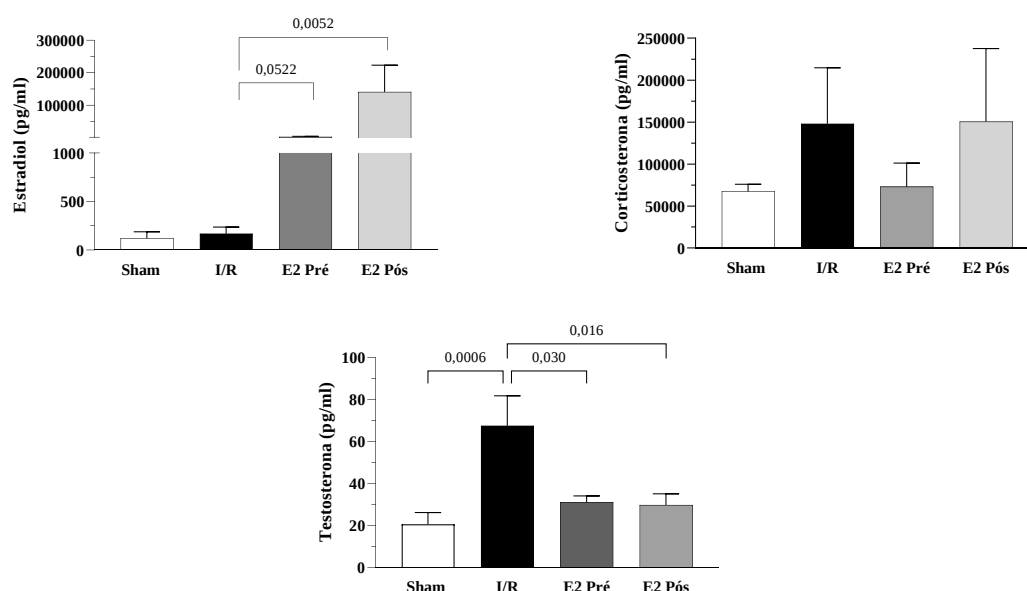


Figura 3: Concentração sérica de estradiol, testosterona e corticosterona nos animais submetidos à lesão de isquemia e reperfusão (I/R, n=6); ratos falso-operados (Sham, n=5); ratos tratados com 17 β -estradiol (E2) antes da indução da lesão de isquemia e reperfusão (E2 Pré, n=6) e de ratos tratados com 17 β -estradiol 1 h após o início da reperfusão (E2 Pós, n=6). Os dados representam a média $\pm$ EPM. **P** (Kruskal-Wallis): Estradiol = 0,0013; Corticosterona = 0,825; Testosterona: 0,0057

4.4 Número de leucócitos circulantes e na medula óssea

Foram analisados os números totais de leucócitos circulantes e, paralelamente, foi realizada a análise diferencial. Os resultados são observados na tabela 2. Houve aumento significativo no número total de granulócitos circulantes após a manipulação (Final), no grupo I/R em relação ao Sham. O tratamento não alterou o número de maneira significativa, ficando em um patamar intermediário. No presente estudo, além da análise no compartimento sanguíneo apresentado anteriormente, o componente celular da inflamação foi investigado também na medula óssea. Os protocolos de tratamentos com estradiol foram capazes de prevenir parcialmente a mobilização de granulócitos para o sangue, porém não alteraram o número de células presentes na medula óssea (Figura 4).

Tabela 2: Contagem total e diferencial de leucócitos circulantes. Dados apresentados como média $\pm$ EPM

WBC (cells/mm ³)				
	Total	Linfócitos	Granulócitos	Monócitos
Sham				
Inicial	14760 $\pm$ 1690	9800 $\pm$ 929	3771 $\pm$ 863	729 $\pm$ 164
Final	12543 $\pm$ 2373	8500 $\pm$ 2389	3457 $\pm$ 837	586 $\pm$ 155
I/R				
Inicial	13600 $\pm$ 1860	8850 $\pm$ 957	3438 $\pm$ 620	650 $\pm$ 139
Final	18938 $\pm$ 3345	10538 $\pm$ 1771	8650 $\pm$ 2256*	1150 $\pm$ 306
E2				
Inicial	13775 $\pm$ 1625	8688 $\pm$ 769	4425 $\pm$ 875	763 $\pm$ 157
Final	20900 $\pm$ 3510	13775 $\pm$ 3165	6175 $\pm$ 1615	950 $\pm$ 238

* $P < 0,05$ relacionados aos respectivos valores iniciais

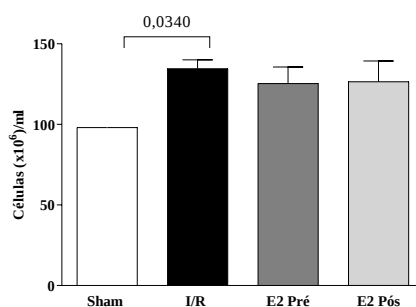


Figura 4: Número total de leucócitos presentes na medula óssea após a lesão de isquemia e reperfusão (I/R, n=6); ratos falso-operados (Sham, n=6); ratos tratados com 17 β -estradiol (E2) 30 min antes da indução da lesão de isquemia e reperfusão (E2 Pré, n=6) e de ratos tratados com 17 β -estradiol 1 h após o início da reperfusão (E2 Pós, n=6). Os dados representam média $\pm$ EPM (n=6). $P^{(ANOVA)}$: Medula = 0,1001

4.5 Mediadores Inflamatórios no Soro

Com o intuito de investigar a circulação sistêmica de mediadores inflamatórios, foram coletadas e analisadas amostras de soro (Figura 5). Como pode ser observado, houve aumento no grupo I/R da concentração de CINC-1 e redução no grupo tratado durante a reperfusão (E2 Pós). Há uma tendência de elevação que pode ser observada nos demais mediadores quantificados, não havendo diferenças significativas entre os grupos tratados e o grupo isquêmico.

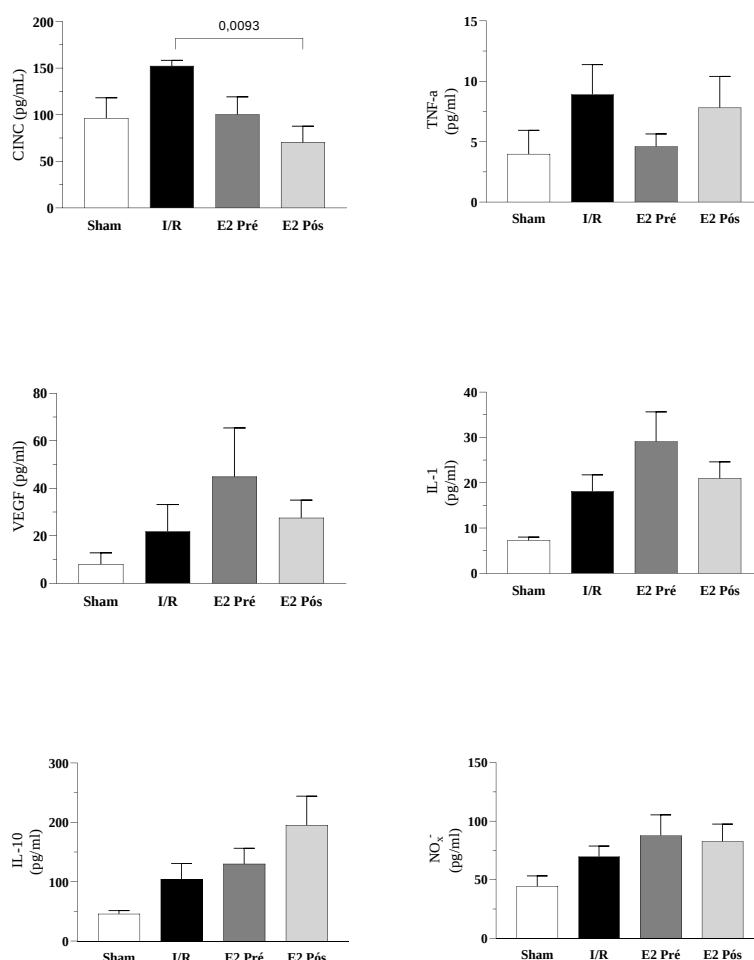


Figura 5: Quantificação de mediadores inflamatórios (pg/mL) no soro de ratos submetidos à lesão de isquemia e reperusão (I/R, n=6); ratos falso-operados (Sham, n=6); ratos tratados com 17 β -estradiol (E2) 30 min antes da indução da lesão de isquemia e reperusão (E2 Pré, n=6) e de ratos tratados com 17 β -estradiol 1 h após o início da reperusão (E2 Pós, n=6). $P^{(ANOVA)}$: CINC-1= 0,025; TNF= 0,3020; VEGF=0,2433; IL-1=0,0237; IL-10=0,0296; NOx=0,2161

4.6 Agregação plaquetária e no número de plaquetas circulantes

Devido a já conhecida interrelação e integração entre os sistemas de coagulação e inflamação, analisamos dados da agregação plaquetária dos animais. Os dados apresentados demonstraram que houve redução da resposta agregante das plaquetas,

representada pelo grupo E2 Pós, quando comparado ao grupo I/R e que o estradiol parece ter um efeito agudo antiagregante. Nossos dados são apresentados na Figura 6. Foi observada também redução no número de plaquetas circulantes em todos os grupos e redução significativa do número de plaquetas no plasma rico em plaquetas dos animais do grupo I/R. O grupo E2 Pós apresenta valores semelhantes ao grupo controle, indicando ação do tratamento no número de plaquetas.

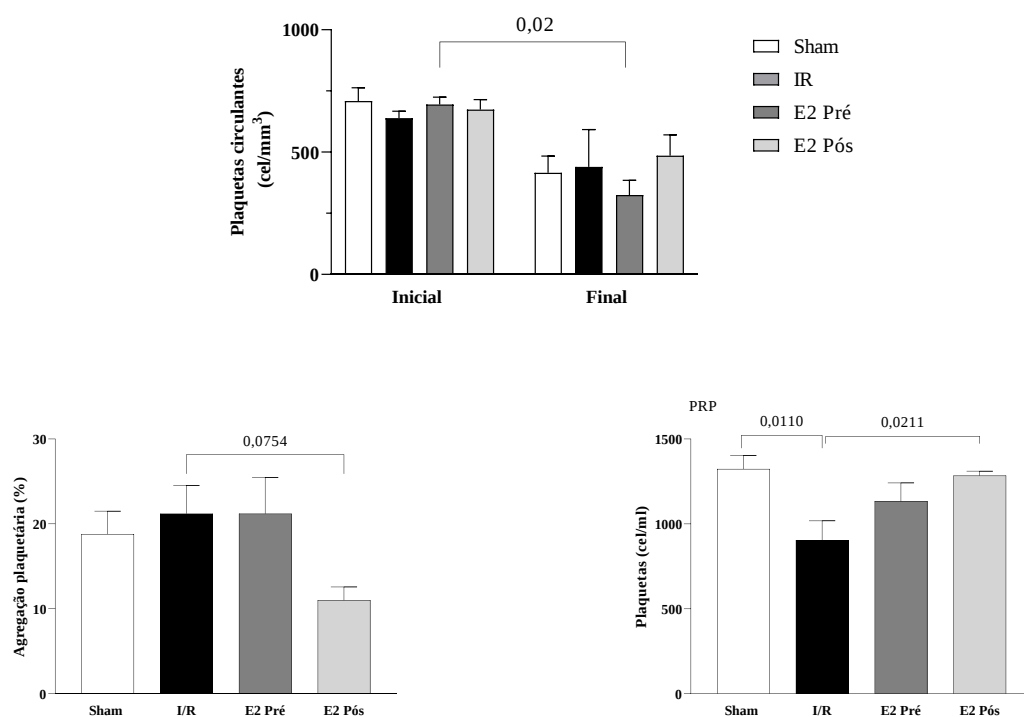


Figura 6: Número de plaquetas circulantes, porcentagem de agregação plaquetária e número de plaquetas no plasma rico em plaquetas (PRP) de ratos submetidos à lesão de isquemia e reperfusão (I/R, n=6); ratos falso-operados (Sham, n=6); ratos tratados com 17 β -estradiol (E2) 30 min antes da indução da lesão de isquemia e reperfusão (E2 Pré, n=6) e de ratos tratados com 17 β -estradiol 1 h após o início da reperfusão (E2 Pós, n=6). Os dados representam a média $\pm$ EPM. *P* (ANOVA): Plaquetas circulantes=0,586; Agregação= 0,0721; Plaquetas= 0,4113.

4.7 Número de leucócitos recuperados das vias aéreas (LBA)

Além da análise sistêmica dos leucócitos circulantes, realizamos também a investigação da migração leucocitária para as vias aéreas. Os tratamentos foram capazes de reduzir a celularidade do lavado broncoalveolar (Figura 7).

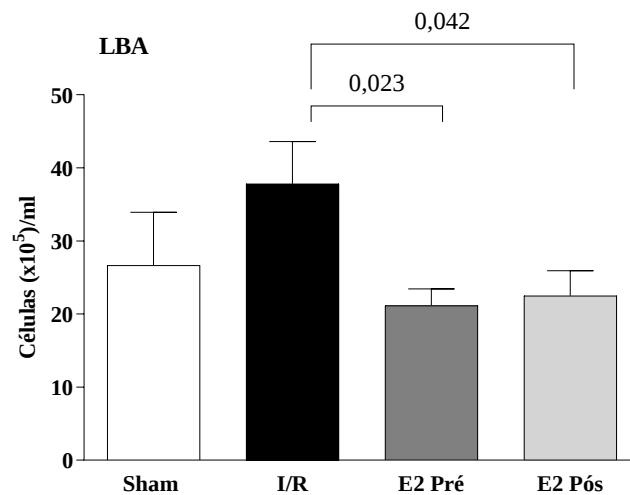


Figura 7: Número total de leucócitos presentes no lavado broncoalveolar (LBA) após a lesão de isquemia e reperfusão (I/R, n=6); ratos falso-operados (Sham, n=6); ratos tratados com 17 β -estradiol (E2) 30 min antes da indução da lesão de isquemia e reperfusão (E2 Pré, n=6) e de ratos tratados com 17 β -estradiol 1 h após o início da reperfusão (E2 Pós, n=6). Os dados representam média $\pm$ EPM (n=6). *P* (ANOVA): LBA = 0,0644

4.8 Análise histológica

Para avaliação do infiltrado celular no parênquima pulmonar, realizamos o preparo e a análise histológica do tecido pulmonar. Os resultados são apresentados e ilustrados na Figura 8. O tratamento com estradiol durante a reperfusão foi capaz de reduzir a presença de granulócitos no parênquima pulmonar, porém o tratamento no grupo E2 Pré não alterou o número de granulócitos no tecido.

Não foram observados efeitos protetores do tratamento com estradiol na hemorragia e no edema intersticial, que não foram componentes significativos das alterações geradas pela I/R aórtica.

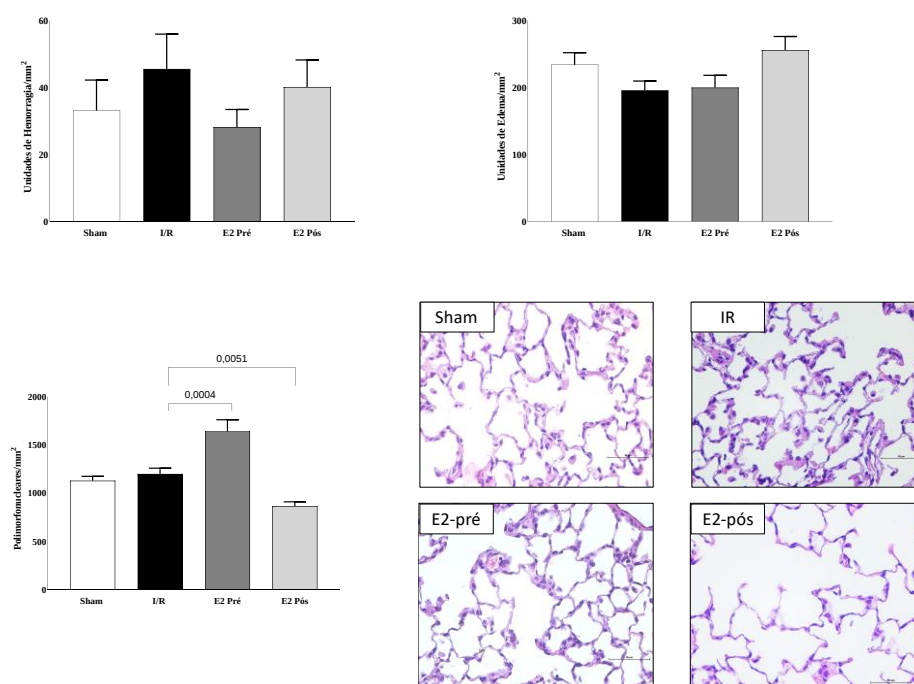


Figura 8: Análise histológica dos pulmões de animais submetidos à lesão de isquemia e reperfusão (I/R, n=6); ratos falso-operados (Sham, n=6); ratos tratados com 17 β -estradiol (E2) 30 min antes da indução da lesão de isquemia e reperfusão (E2 Pré, n=6 e de ratos tratados com 17 β -estradiol 1 h após o início da reperfusão (E2 Pós, n=6). Fotomicrografias representativas de cada grupo. Os dados representam a média $\pm$ EPM. Foram analisados 1 corte por animal (n=6), 10 áreas por corte. $P^{(ANOVA)}$: Edema = 0,745; Polimorfonucleares $P < 0,0001$; Hemorragia = 0,280

4.9 Mediadores inflamatórios no meio de cultura pulmonar (Explante)

Os mediadores inflamatórios também foram quantificados no meio de cultura de pulmão (explante) e os dados são apresentados na Figura 9. A avaliação da liberação pulmonar de mediadores inflamatórios mostrou um aumento na concentração de IL-1 β e o tratamento foi capaz de reduzir sua concentração. As demais citocinas analisadas não apresentaram diferenças significativas entre os grupos isquêmicos tratados ou não.

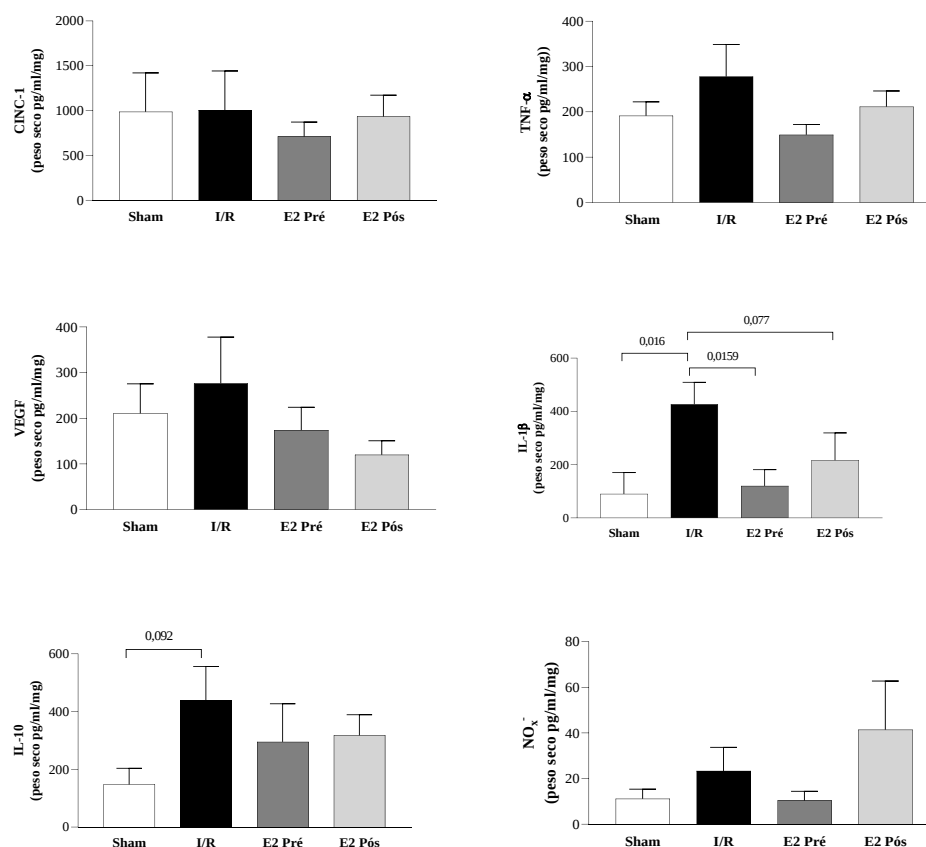


Figura 9: Quantificação de mediadores inflamatórios (pg/ml/mg) no meio de cultura de pulmão (explante, 24 h) de ratos submetidos à lesão de isquemia e reperfusão (I/R, n=6); ratos falso-operados (Sham, n=6); ratos tratados com 17 β -estradiol (E2) 30 min antes da indução da lesão de isquemia e reperfusão (E2 Pré, n=6) e de ratos tratados com 17 β -estradiol 1 h após o início da reperfusão (E2 Pós, n=6). Os dados representam a média $\pm$ EPM. P (ANOVA): CINC-1=0,8918; TNF=0,286; VEGF=0,419; IL-1 β =0,0432; IL-10=0,3944; NOx=0,3073

4.10 Microscopia intravital por epi-iluminação

Com intuito de refinar a avaliação da mobilização celular para os pulmões, foi realizada a análise da presença de leucócitos pela técnica de microscopia intravital por epi-iluminação. Os resultados são apresentados na Figura 10. Foi observado maior presença de leucócitos nos pulmões de animais do grupo E2 Pré, semelhante ao que foi observado na análise histológica.

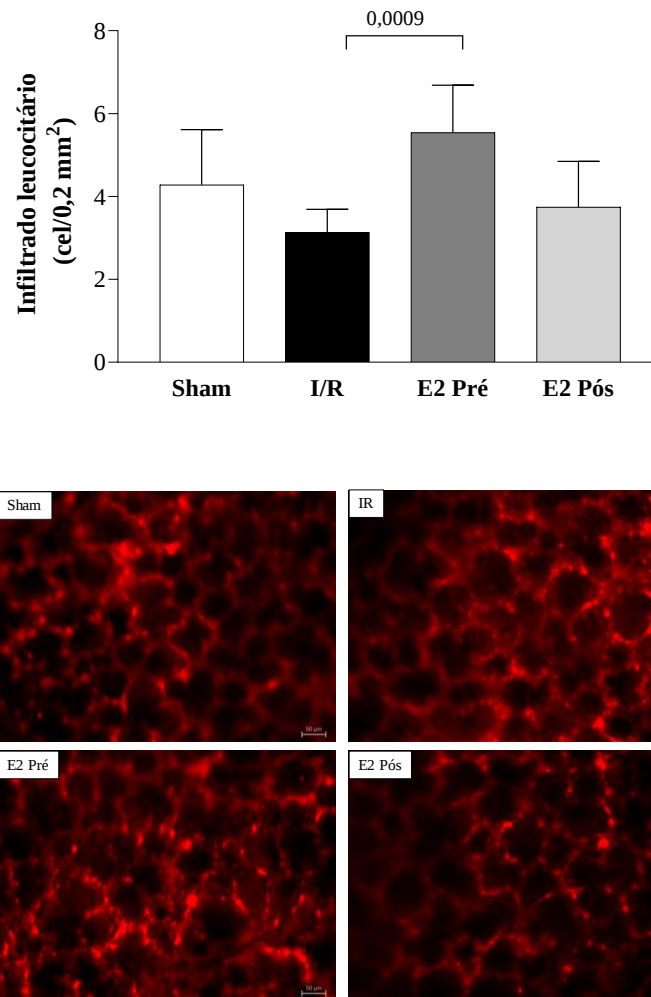


Figura 10: Avaliação do infiltrado no tecido pulmonar por microscopia intravital por epi-iluminação. Grupos de ratos submetidos à lesão de isquemia e reperfusão (I/R, n=8); ratos falso-operados (Sham, n=8); ratos tratados com 17 β -estradiol (E2) 30 min antes da indução da lesão de isquemia e reperfusão (E2 Pré, n=8) e de ratos tratados com 17 β -estradiol 1 h após o início da reperfusão (E2 Pós, n=8). Os dados representam a média $\pm$ EPM. **P**^(ANOVA): Infiltrado= 0,0078

4.11 Permeabilidade vascular pulmonar

Para análise do edema pulmonar, avaliamos a permeabilidade vascular através da técnica do extravasamento do corante AE. Os dados estão expostos na figura 11. O gráfico indica um maior extravasamento do corante azul de Evans no pulmão dos animais pertencentes ao grupo I/R e redução deste nos grupos tratados com estradiol.

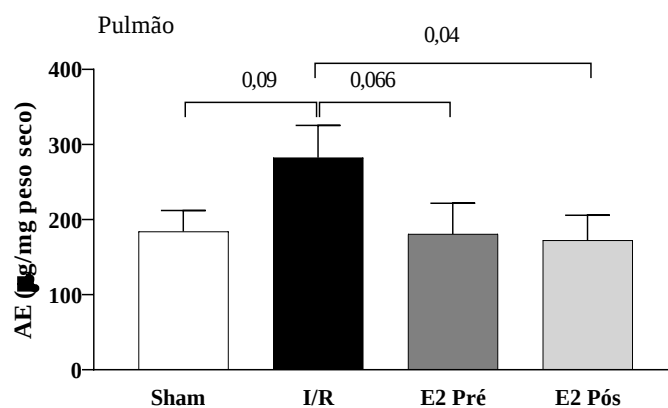


Figura 11: Extravasamento do corante azul de Evans no pulmão de animais submetidos à lesão de isquemia e reperfusão (I/R, n=6); ratos falso-operados (Sham, n=6); ratos tratados com 17β -estradiol (E2) 30 min antes da indução da lesão de isquemia e reperfusão (E2 Pré, n=6) e de ratos tratados com 17β -estradiol 1 h após o início da reperfusão (E2 Pós, n=6). O corante foi injetado imediatamente após a desinsuflação do balão intra-aórtico. $P^{(ANOVA)}$: AE = 0,1475

4.12 Avaliação do fluxo sanguíneo pulmonar

Para ampliarmos as análises previstas, foi realizada a avaliação do fluxo sanguíneo pulmonar em 5 diferentes áreas de pulmão ao término das 4 h de reperfusão. Os resultados são apresentados na Figura 12. Não encontramos diferenças significativas entre os grupos.

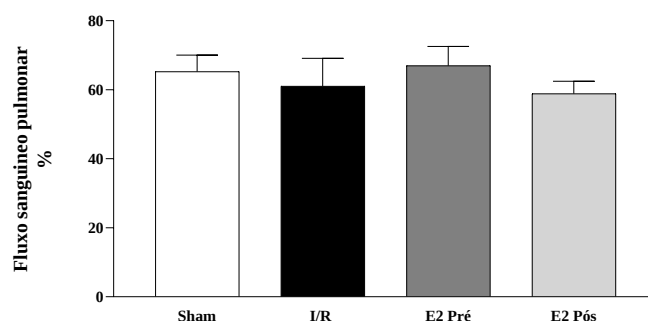


Figura 12: Avaliação do fluxo sanguíneo pulmonar ao término das 4 h de reperfusão por sensor Laser Doppler (AD Instruments, EUA) em pulmões de ratos submetidos à lesão de isquemia e reperfusão (I/R, n=5); ratos falso-operados (Sham, n=5); ratos tratados com 17 β -estradiol (E2) 30 min antes da indução da lesão de isquemia e reperfusão (E2 Pré, n=5) e de ratos tratados com 17 β -estradiol 1 h após o início da reperfusão (E2 Pós, n=5). Os dados são apresentados em média $\pm$ EPM de 5 animais por grupo, 5 medidas por animal. $P^{(ANOVA)}$: *Fluxo* = 0,7385

4.13 Presença e atividade de mieloperoxidase (MPO) no tecido pulmonar

Com o objetivo de analisar de maneira mais específica a presença/ativação de neutrófilos no tecido pulmonar, realizamos a análise da expressão de mieloperoxidase, além disso realizamos ensaios de atividade da enzima. Os resultados são apresentados na Figura 13. Foi observado aumento tanto na presença de neutrófilos nos pulmões dos animais I/R, quanto sua atividade. Observamos redução significativa no número de neutrófilos nos pulmões dos ratos do grupo E2 Pós e uma tendência de redução na sua atividade. O tratamento com estradiol prévio (E2 Pré) não foi capaz de reduzir os parâmetros.

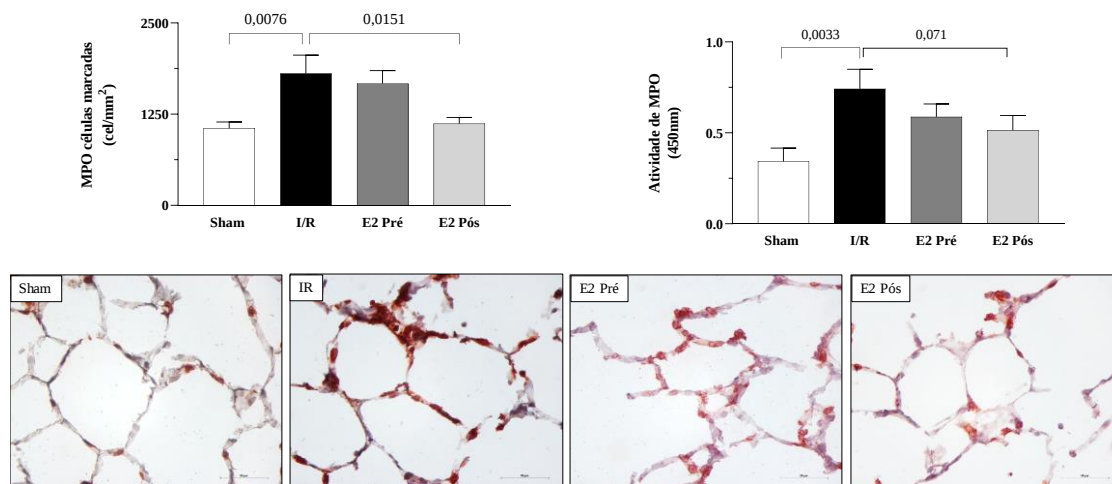


Figura 13: Expressão e atividade de mieloperoxidase (MPO) no tecido pulmonar de ratos submetidos à lesão de isquemia e reperfusão (I/R, n=8); ratos falso-operados (Sham, n=8); ratos tratados com 17 β -estradiol (E2) 30 min antes da indução da lesão de isquemia e reperfusão (E2 Pré, n=8) e de ratos tratados com 17 β -estradiol 1 h após o início da reperfusão (E2 Pós, n=8). Os dados representam a média $\pm$ EPM. *P* (ANOVA):Imuno= 0,0039; Atividade: 0,0255

4.14 Expressão gênica de mediadores inflamatórios

Os resultados acerca da liberação local de mediadores inflamatórios mostraram que houve aumento de IL-1 β e o tratamento foi capaz de reduzir sua concentração (Figura 9). Ampliamos a avaliação quantificando a expressão gênica de mediadores inflamatórios no tecido pulmonar. Os resultados são apresentados na Figura 14. Os dados apontam para maior expressão gênica de IL-1 β no pulmão dos animais do grupo I/R em relação ao grupo Sham, havendo um efeito do tratamento com estradiol, principalmente no tratamento pós. Paralelamente, observamos aumento da expressão gênica do TNF- α no grupo I/R, apesar desse fator ser um marcador de fase aguda, indicando, portanto, a manutenção de um perfil pró-inflamatório nos animais submetidos a oclusão aórtica mesmo depois de 4 h.

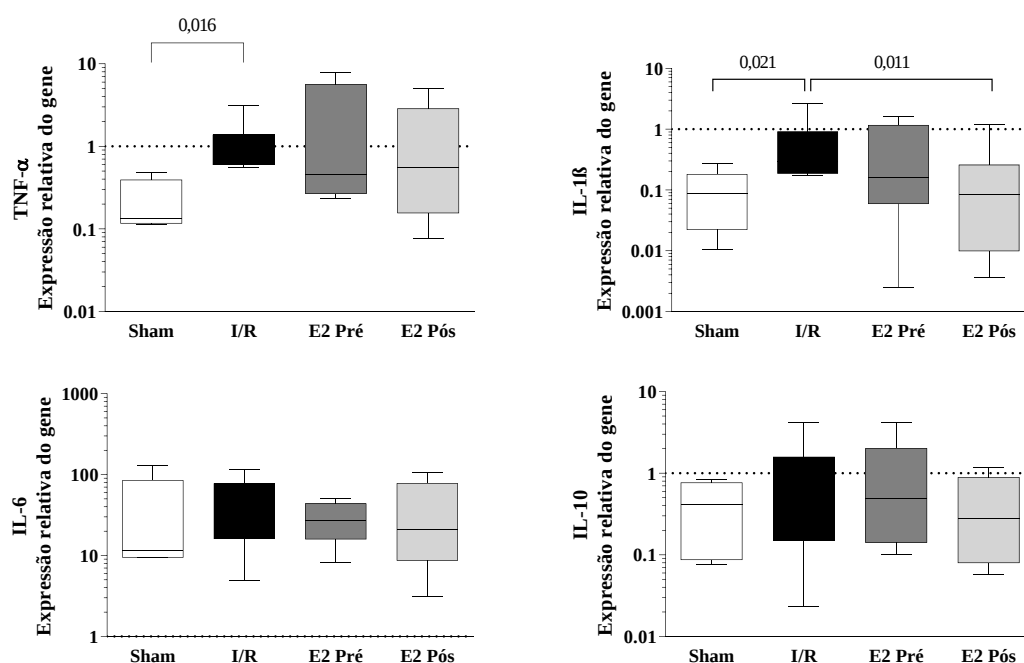


Figura 14: Expressão gênica de TNF- α , IL-6, IL-1 β e IL-10 no tecido pulmonar de ratos submetidos à lesão de isquemia e reperfusão (I/R, n=6); ratos falso-operados (Sham, n=6); ratos tratados com 17 β -estradiol (E2) 30 min antes da indução da lesão de isquemia e reperfusão (E2 Pré, n=8) e de ratos tratados com 17 β -estradiol 1 h após o início da reperfusão (E2 Pós, n=8). Os dados são apresentados em mediana e 95% de intervalo de confiança de 6-8 animais e são relativos a valores obtidos em animais não manipulados. **P** (Kruskal-Wallis): TNF- α = 0,1018; IL-6= 0,9391; IL-1 β = 0,0608; IL-10= 0,7290

4.15 Expressões gênica e proteica das sintases do óxido nítrico e da endotelina

Em seguida, apresentamos a avaliação da expressão gênica e proteica das sintases de óxido nítrico (eNOS e iNOS) e da endotelina (ET) no tecido pulmonar. Estas enzimas estão ligadas ao processo inflamatório pulmonar e a manutenção do fluxo sanguíneo e da integridade da microcirculação pulmonar. Os dados são apresentados na Figura 15. Os resultados mostraram que há uma *upregulation* da expressão de iNOS em todos os grupos em relação aos valores de referência obtidos com animais não manipulados. Em relação a eNOS, não observamos alterações significativas, mas em relação a endotelina, de maneira similar à iNOS, também observamos *upregulation* em todos os grupos estudados em relação a referência.

Paralelamente a expressão gênica, avaliamos a expressão proteica dessas enzimas (iNOS e eNOS) e da endotelina (ET) por imunohistoquímica. Os dados são apresentados na Figura 16. Não foram observadas diferenças nas expressões proteicas de iNOS e ET, entretanto observamos tendência de redução na expressão de eNOS nos vasos pulmonares de ratos submetidos ao modelo de isquemia e reperfusão aórtica e houve aumento da expressão dessa enzima nos vasos pulmonares dos animais do dois grupos tratados.

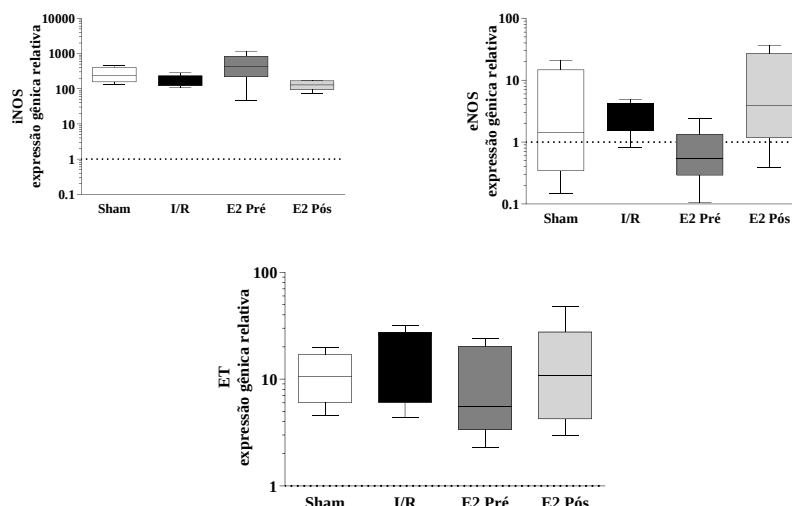


Figura 15: Expressão gênica de eNOS, iNOS e ET no tecido pulmonar de ratos submetidos à lesão de isquemia e reperfusão (I/R, n=6); ratos falso-operados (Sham, n=6); ratos tratados com 17 β -estradiol (E2) 30 min antes da indução da lesão de isquemia e reperfusão (E2 Pré, n=8) e de ratos tratados com 17 β -estradiol 1 h após o início da reperfusão (E2 Pós, n=8). Os dados são apresentados em mediana e 95% de intervalo de confiança de 6-8 animais e são relativos a valores obtidos em animais não manipulados. **P** (Kruskal-Wallis): iNOS= 0,0357; eNOS= 0,0973; ET= 0,2372

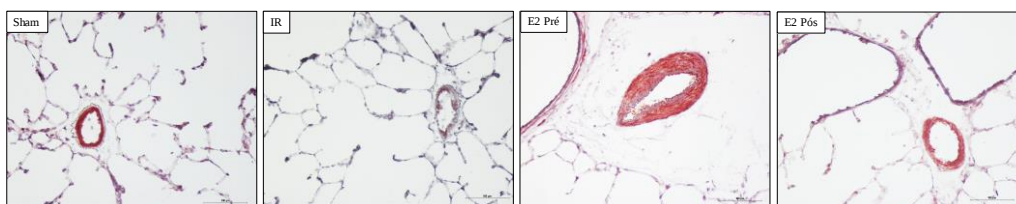
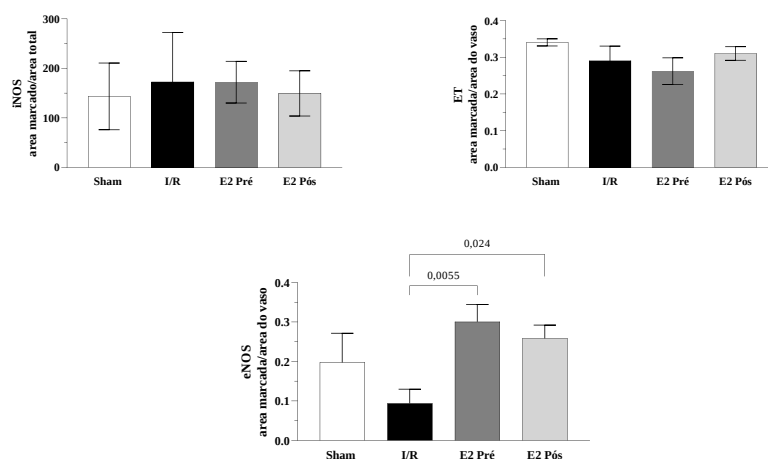


Figura 16: Expressão proteica de iNOS, ET e eNOS no tecido pulmonar de ratos submetidos à lesão de isquemia e reperfusão (I/R, n=5); ratos falso-operados (Sham, n=5); ratos tratados com 17 β -estradiol (E2) 30 min antes da indução da lesão de isquemia e reperfusão (E2 Pré, n=5) e de ratos tratados com 17 β -estradiol 1 h após o início da reperfusão (E2 Pós, n=5). Os dados são apresentados em média $\pm$ EPM de 5 animais por grupo, 2 cortes por animal e 5 imagens analisadas por corte. As fotomicrografias são representativas do resultado da análise de eNOS. **P** (ANOVA): iNOS= 0,9848; ET=0,2873

4.16 Expressões gênica e proteica das moléculas de adesão endotelial

Com o objetivo de entender os mecanismos modulados pelo tratamento com estradiol para a redução da mobilização celular, investigamos a expressão gênica e proteica pulmonar das moléculas de adesão endotelial ICAM-1 e VCAM. Os resultados são apresentados nas Figuras 17 e 18. Em relação à expressão gênica, há uma tendência de aumento da expressão do gene da ICAM-1 no pulmão do grupo I/R e há redução significativa no grupo tratado com estradiol 30 min antes da isquemia (E2 Pré) (Figura 17). Em relação à expressão proteica de ICAM-1 observamos que há aumento no grupo I/R em relação ao Sham e uma tendência de redução nos grupos tratados (Figura 18).

A expressão de VCAM também aumentou após a I/R, porém não observamos efeitos dos tratamentos (Figura 18)

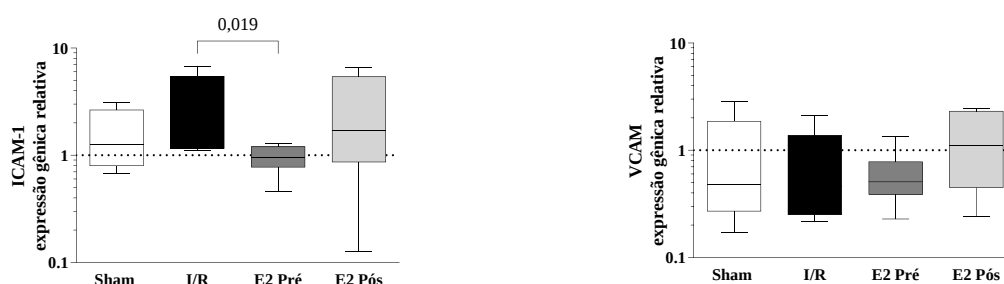


Figura 17: Expressão gênica de ICAM-1 e VCAM no tecido pulmonar de ratos submetidos à lesão de isquemia e reperfusão (I/R, n=8); ratos falso-operados (Sham, n=8); ratos tratados com 17 β -estradiol (E2) 30 min antes da indução da lesão de isquemia e reperfusão (E2 Pré, n=8) e de ratos tratados com 17 β -estradiol 1 h após o início da reperfusão (E2 Pós, n=8). Os dados são apresentados em mediana e 95% de intervalo de confiança de 6-8 animais e são relativos a valores obtidos em animais não manipulados. *p* (Kruskal-Wallis): ICAM= 0,0961: VCAM= 0,6137

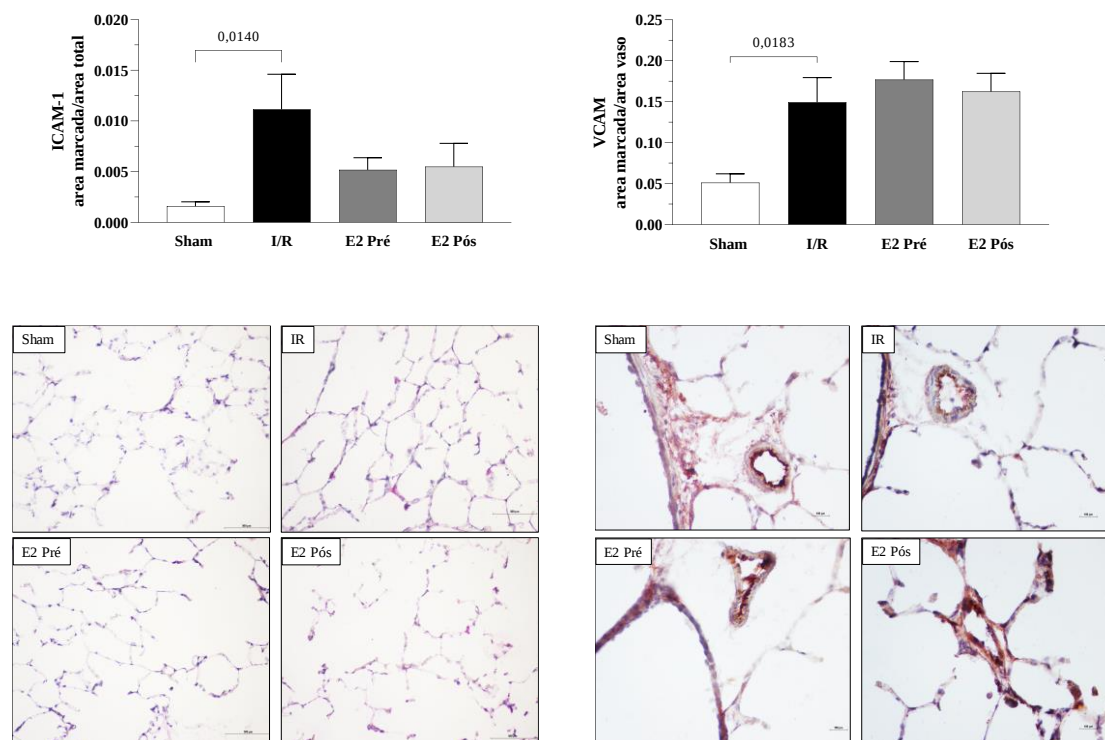


Figura 18: Expressão proteica de ICAM-1 e VCAM no tecido pulmonar de ratos submetidos à lesão de isquemia e reperfusão (I/R, n=8); ratos falso-operados (Sham, n=8); ratos tratados com 17β -estradiol (E2) 30 min antes da indução da lesão de isquemia e reperfusão (E2 Pré, n=8) e de ratos tratados com 17β -estradiol 1 h após o início da reperfusão (E2 Pós, n=8). Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM de 5 animais por grupo, 2 cortes por animal e 5 imagens por corte. **P** (ANOVA): ICAM = 0,0389; VCAM = 0,0031

4.17 Expressão dos receptores de estradiol

O tratamento com estradiol depende de sua interação com seus receptores específicos, logo foi quantificada a expressão destes receptores (ER- α , ER- β e GPER) para observar se haveria alteração de sua presença a partir da administração de doses suprafisiológicas do hormônio. Não encontramos diferenças significativas na expressão dos receptores de estradiol no tecido pulmonar nos grupos estudados, tratados ou não (Figura 19). Estes dados indicam que em ratos machos, não houve

influência da I/R na expressão dos receptores de estradiol e mesmo após o tratamento os níveis se mantem estáveis.

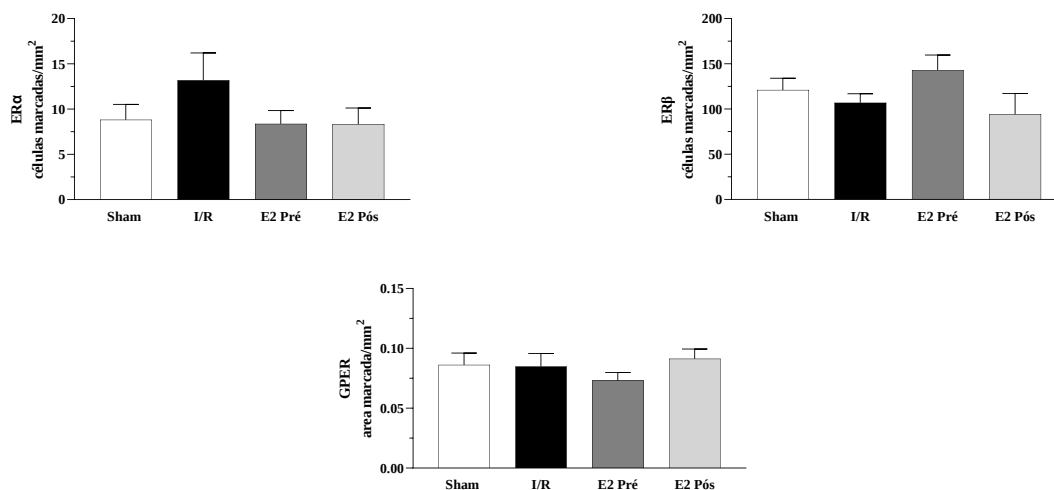


Figura 19: Expressão proteica de dos receptores de estradiol ER- α , ER- β e GPER no tecido pulmonar de ratos submetidos à lesão de isquemia e reperfusão (I/R, n=5); ratos falso-operados (Sham, n=5); ratos tratados com 17 β -estradiol (E2) 30 min antes da indução da lesão de isquemia e reperfusão (E2 Pré, n=5) e de ratos tratados com 17 β -estradiol 1 h após o início da reperfusão (E2 Pós, n=5). Os dados são apresentados em média $\pm$ EPM de 5 animais por grupo, 2 cortes por animal e 5 imagens analisadas por corte. $P^{(ANOVA)}$: ER- α = 0,3009: ER- β = 0,1938: GPER = 0,5154

4.18 Expressão gênica e proteica da metaloproteinase-9 (MMP-9)

Visando ampliar a compreensão dos mecanismos que compõem o processo de inflamação pulmonar nesse modelo, avaliamos a expressão gênica e proteica da MMP-9. Os dados indicaram que há *upregulation* na expressão gênica pulmonar de MMP-9 em todos os grupos em relação a referência (ratos não manipulados) (Figura 20) e que há aumento da expressão proteica nos ratos do grupo I/R (Figura 21). Os dois grupos tratados apresentaram redução da expressão proteica de MMP-9 nos pulmões, indicando possível ação do estradiol na regulação dessa enzima.

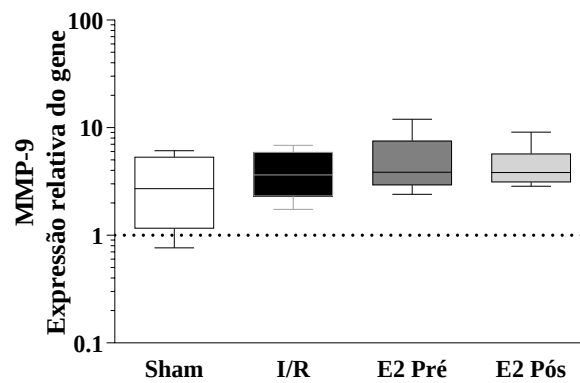


Figura 20: Expressão gênica de MMP-9 no tecido pulmonar de ratos submetidos à lesão de isquemia e reperfusão (I/R, n=6); ratos falso-operados (Sham, n=6); ratos tratados com 17 β -estradiol (E2) 30 min antes da indução da lesão de isquemia e reperfusão (E2 Pré, n=7) e de ratos tratados com 17 β -estradiol 1 h após o início da reperfusão (E2 Pós, n=8). Os dados são apresentados em mediana e 95% de intervalo de confiança de 6-8 animais e são relativos a valores obtidos em animais não manipulados. **P** (Kruskal-Wallis): MMP-9 = 0,5491

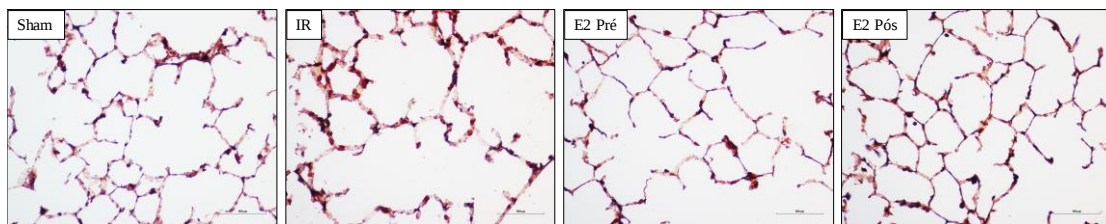
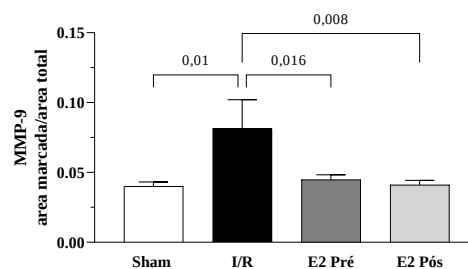


Figura 21: Expressão proteica de MMP-9 no tecido pulmonar de ratos submetidos à lesão de isquemia e reperfusão (I/R, n=5); ratos falso-operados (Sham, n=5); ratos tratados com 17 β -estradiol (E2) 30 min antes da indução da lesão de isquemia e reperfusão (E2 Pré, n=5) e de ratos tratados com 17 β -estradiol 1 h após o início da reperfusão (E2 Pós, n=5). Os dados são apresentados em média $\pm$ EPM de 5 animais. **P** (ANOVA): 0,0229

5 DISCUSSÃO

Dados da Organização mundial de saúde demonstram que as doenças cardiovasculares (DCVs), são a causa mais frequente de morte em todo o mundo e que aproximadamente 17,9 milhões de pessoas morreram de DCV em 2019, representando 32% de todas as mortes globalmente. (World Health Organization, 2021). O termo DCV abrange uma série de condições, das quais a doença arterial coronariana (DAC) e o acidente vascular cerebral são as mais comuns, com prevalência global de 154 e 80 milhões de pessoas, respectivamente, e juntas respondem por 85% das mortes por DCV. (GBD, 2016). Apesar do grande número de estudos investigando os efeitos da privação do suprimento sanguíneo tecidual e suas consequências funcionais, as doenças cardiovasculares iniciadas por isquemia tecidual local ou sistêmica mantêm-se ainda como uma das maiores causas de morte nos Estados Unidos e na Europa (Carden, 2000). Vários estudos (Breithaupt-Faloppa et al, 2009; Girn et al, 2007; Turnage et al, 1994), entretanto, evidenciaram que a reperfusão após um período de isquemia pode colocar os órgãos isquêmicos em risco de necrose celular adicional e limitar a recuperação da função, trazendo assim um conceito de letalidade para a restauração do fluxo sanguíneo característico da síndrome de isquemia e reperfusão (I/R). Estudos mostraram que a síndrome de isquemia e reperfusão é de natureza predominantemente inflamatória e é caracterizada pelo acúmulo de neutrófilos pulmonares e aumento do vazamento microvascular (Carden et al, 2000; Eltzschig et al, 2005; Yang et al, 2007). Essa disfunção microvascular induzida por I/R é atualmente um problema sério encontrado durante uma

variedade de procedimentos médicos e cirúrgicos, afinal, não existe um agente terapêutico específico para lesão de I/R.

No estudo atual, abordamos os efeitos anti-inflamatórios do estradiol na lesão de isquemia e reperfusão pulmonar causada por um modelo de oclusão aórtica. Neste modelo o pulmão não é afetado diretamente pela isquemia, as repercussões pulmonares são decorrentes da disseminação sistêmica de produtos tóxicos durante a reperfusão. Nossos resultados apontam para a ativação de uma resposta inflamatória pulmonar, caracterizada principalmente por infiltração leucocitária com aumento da atividade de MPO, maior adesão de moléculas endoteliais e expressão de MMP-9, liberação pulmonar local da citocina IL-1 β e diminuição da expressão de eNOS.

Visto por uma perspectiva de profilaxia, o estradiol já foi utilizado em alguns estudos do nosso grupo previamente ao insulto isquêmico; esses estudos conseguiram demonstrar resultados positivos, conseguindo reduzir a lesão de isquemia/reperfusão nos pulmões, normalizando a resposta plaquetária e mantendo a integridade intestinal após lesão de isquemia e reperfusão induzida por oclusão aórtica, inclusive evitando eventos fatais no grupo tratado com estradiol (Anunciação et al., 2022; Rocha de Sousa et al., 2018; Sobral et al., 2021). É importante ressaltar que são poucos os trabalhos que utilizam o estradiol em uma perspectiva terapêutica (após o insulto isquêmico). Em um trabalho recente, Ricardo-da-Silva et al (2021), utilizando modelo de oclusão da artéria mesentérica superior e tratando os animais com dose única de estradiol trinta minutos após a indução isquêmica, conseguiram demonstrar que o tratamento com estradiol melhorou a motilidade, reduziu a permeabilidade intestinal e aumentou a expressão de eNOS e ET, apontando assim para resultados favoráveis com o tratamento pós-isquêmico. Em um outro trabalho experimental, Terrell et al (2007), utilizando um modelo de I/R miocárdica global seguida por infusão pós-isquêmica de 17 β -estradiol,

demonstraram que uma infusão na concentração de 1 nM ou 10 nM diminui a disfunção miocárdica em ratos machos após lesão I/R. Em nosso estudo, utilizamos o hormônio estradiol tanto em uma perspectiva profilática como na terapêutica, (pré e pós isquemia), em grupos separados. De forma global, os dois tratamentos foram capazes nas diversas análises, de amenizar os efeitos deletérios causados pelo processo de I/R. Em destaque, o grupo E2 pós foi capaz de diminuir a mobilização leucocitária, assim como a expressão da enzima mieloperoxidase, mostrando redução na presença de neutrófilos. Foi ainda efetivo na diminuição da agregação plaquetária e manutenção do número de plaquetas, além de reduzir de forma significativa a quimiocina CINC-1 sérica.

A mobilização e ativação de células polimorfonucleares desempenham um papel fundamental no desenvolvimento da lesão de I/R. A isquemia visceral prolongada como consequência do pinçamento aórtico não só resulta em ativação de neutrófilos e expressão de moléculas de adesão, mas também resulta em aumento da mortalidade por falência múltipla de órgãos (Foulds et al, 1998). Os leucócitos expostos ao tecido isquêmico podem reentrar na circulação sistêmica em um estado ativado após a reperfusão. Esses neutrófilos ativados foram implicados como mediadores de lesão de órgão remoto induzida por I/R (Carden et al., 1993; Carden et al., 1998; Xiao et al., 1997). No estudo atual, investigamos a mobilização de leucócitos nos compartimentos sanguíneo, pulmonar e das vias aéreas. A análise sanguínea mostrou aumento de granulócitos no grupo I/R em relação ao Sham e o tratamento reduziu o influxo de células. O tratamento com estradiol pós isquemia, conseguiu reduzir a presença de granulócitos no parênquima pulmonar e reduzir o influxo de leucócitos para as vias aéreas. Nesse contexto, com o intuito de compreender a migração celular para o tecido pulmonar, a avaliação da expressão da proteína ICAM-1 aponta para efeito do estradiol modulando sua expressão. ICAM-1 é uma glicoproteína de superfície celular expressa em um baixo nível basal em

células imunes, endoteliais e epiteliais, mas é regulada positivamente em resposta à estimulação inflamatória. (Hubbard AK et al., 2000). Estudos anteriores apontam para relação entre o estradiol e a regulação da expressão da proteína ICAM-1. Breithaupt-Faloppa et al (2014), demonstraram, em um modelo de I/R por oclusão da artéria mesentérica, que o tratamento com estradiol conseguiu reduzir a expressão de ICAM-1, quando comparado aos grupos isquêmicos. Em um trabalho que relacionou os efeitos da morte cerebral com a inflamação pulmonar, Ricardo-da-Silva et al (2021), observaram que a expressão gênica de ICAM-1 foi significativamente aumentada pela morte cerebral quando comparada com o grupo sham, o tratamento com E2 diminuiu a expressão gênica de ICAM nos grupos tratados. Em nosso estudo notamos a elevação da expressão da ICAM-1 no grupo I/R, quando comparado ao Sham, e uma redução no grupo tratado com estradiol. Esses dados são relevantes na medida em que sabemos que as moléculas de adesão são reguladores críticos da função celular, integridade tecidual e homeostase. Essas moléculas não apenas medeiam as interações célula a célula, mas através da associação com o citoesqueleto celular e outras proteínas desencadeiam eventos de sinalização intracelular em resposta a sinais específicos e locais (Harjunpaa et al, 2019; Cavallaro et al ,2011).

A mieloperoxidase (MPO), uma enzima secretada por neutrófilos ativados, pode gerar espécies reativas de oxigênio para causar dano tecidual. É o componente mais abundante de grânulos azurofílicos em neutrófilos e tem sido frequentemente usado como marcador histopatológico para neutrófilos (Rausch et al., 1978; Breckwoldt et al., 2008). O processo de I/R levou a um aumento tanto na presença de neutrófilos nos pulmões de animais I/R quanto na sua atividade. O E2 foi capaz de reduzir significativamente o número de neutrófilos nos pulmões e houve uma tendência à redução da atividade de MPO em ambos os grupos tratados. Haegens et al (2009), em um trabalho experimental

com camundongos, sugerem que a MPO desempenha papel chave no desenvolvimento da neutrofilia pulmonar e contribui indiretamente para a produção de quimiocinas e citocinas que modulam processos inflamatórios.

Embora frequentemente avaliados em separado, a coagulação e a inflamação são sistemas biológicos altamente integrados e delicadamente equilibrados, com extenso cruzamento de fatores, o que otimiza a resposta do organismo a lesões e invasão por patógenos. Com o surgimento da vida multicelular, surgiu uma maior necessidade de proteção contra a invasão de patógenos e, portanto, a rápida evolução do sistema imunológico. O sistema de coagulação desenvolveu-se a partir de um sistema imunológico inato precoce, com serina proteases sanguíneas divergindo de proteases semelhantes ao complemento (Delvaeye and Conway, 2009). A coagulação age imediatamente, com a via intrínseca ou extrínseca ativando uma cascata de protease que leva à rápida ativação da trombina, deposição de fibrina e ativação plaquetária, levando à hemostasia. A imunidade inata é mais lenta e normalmente requer a detecção de padrões moleculares associados a patógenos para ativar citocinas apicais, como a interleucina-1 (IL-1), para direcionar a inflamação e subsequente imunidade adaptativa (Dinarello, 2009). A inflamação induz o fator tecidual para promover a coagulação, enquanto a trombina induz a inflamação por meio da clivagem dos receptores ativados por protease (PARs) (Delvaeye and Conway, 2009). Essa cinética mais lenta pode permitir que os micróbios proliferem dentro, por exemplo, de uma ferida. Sobral et al (2021), em um estudo anterior do nosso grupo, apontaram alterações na coagulação de animais submetidos à I/R aórtica. Ratos submetidos ao modelo de I/R aórtico e mantidos por 2 horas em reperfusão apresentaram agregação plaquetária aumentada quando comparados ao grupo Sham e o tratamento prévio com estradiol foi capaz de normalizar a resposta plaquetária. Em nosso estudo atual, os dados obtidos com animais submetidos ao mesmo

modelo, mas mantidos por 4 h em reperfusão, mostraram que houve, ao longo do tempo, normalização da resposta agregante das plaquetas (efeito este representado pelo comportamento do grupo E2 pré) e, que o estradiol parece ter um efeito agudo antiagregante, como podemos observar nos animais do grupo E2 pós. Foram vistas também redução no número de plaquetas circulantes em todos os grupos e redução significativa do número de plaquetas no plasma rico em plaquetas dos animais do grupo I/R. O grupo E2 pós apresenta valores semelhantes ao grupo controle, indicando ação do tratamento no número de plaquetas.

Um aspecto importante dos efeitos do estradiol é sua capacidade de mediar a geração de NO (Townsend et al., 2011). Tem sido sugerido que o recrutamento de neutrófilos e o aumento da permeabilidade microvascular observada após I/R intestinal podem ser mediados pelo NO (Ward et al., 2000; Breithaupt-Faloppa et al., 2013). O óxido nítrico produzido pela eNOS, a isoforma constitutivamente expressa principalmente nas células endoteliais, contribui para a regulação do tônus vascular, distribuição do fluxo sanguíneo nos órgãos, inibição da agregação plaquetária, leucocitária, preservação da permeabilidade endotelial e atenuação da infiltração leucocitária (Moncada et al., 1991). Sabe-se que os estrogênios exercem importantes efeitos vasoativos pela ativação da sintase do óxido nítrico endotelial (eNOS), bem como a modulação de substâncias vasoativas liberadas das células endoteliais ou o efeito direto de vasodilatação através do relaxamento das células do músculo liso (Chambliss et al., 1992; Novella et al., 2012). Breithaupt-Faloppa et al (2013), demonstraram que E2 é capaz de reduzir o processo inflamatório pulmonar após I/R intestinal e exerce esses efeitos modulando a expressão da proteína eNOS nos pulmões. Em nosso estudo, observamos redução na expressão da eNOS nos vasos pulmonares de ratos submetidos ao modelo de isquemia e reperfusão aórtica e houve aumento da expressão desta enzima

nos vasos pulmonares dos animais dos grupos tratados. Podemos sugerir que a liberação local de NO pela eNOS poderia favorecer a manutenção da integridade vascular e, portanto, que o tratamento com estradiol favorece a microcirculação pulmonar e sua homeostase. O endotélio microvascular pulmonar é um órgão metabolicamente ativo essencial para manter a homeostase pulmonar (Orfanos et al., 2004). Além disso, as células endoteliais ativadas podem sintetizar várias citocinas e quimiocinas e promover a inflamação das vias aéreas, possivelmente aumentando a gravidade da lesão pulmonar.

A IL-1 β é uma citocina pró-inflamatória que atua ativando as células e a síntese de outras citocinas e quimiocinas, além de induzir a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais, facilitando, assim o recrutamento de células inflamatórias (Dinarello, 2000). Paralelamente, esta citocina é importante para ativar e recrutar neutrófilos para o tecido lesionado (El Eter et al., 2007). Outros estudos mostram que os níveis séricos de IL-1 β estão elevados em ratos submetidos a I/R intestinal (Cavriani et al., 2007; Guzmán et al., 2013; Hato et al., 2001; Narita et al., 2004), e que a neutralização da IL-1 β circulante reduz hiperreatividade brônquica induzida pela I/R intestinal (Coelho et al., 2007). A IL-1 β pode afetar a permeabilidade endotelial e levar a um aumento na exsudação de proteínas secretadas da circulação para os tecidos das vias aéreas (Sedgwick et al., 2002). Nossos dados evidenciaram aumento da permeabilidade vascular pulmonar induzida pela I/R e os tratamentos reduziram esse efeito. É importante ressaltar a ação do estradiol na redução dos níveis de IL-1 β em modelos de inflamação experimental (Cuzzocrea et al., 2001; Esposito et al., 2005; Speyer et al., 2005).

O processo inflamatório pulmonar é resultado da convergência e da interação de inúmeros elementos, parte dos quais analisamos neste estudo. Dentre os elementos que modulam o processo estão as metaloproteinases, que são enzimas que envolvidas na adesão e migração de neutrófilos, modulando a matriz extracelular e removendo barreiras

como a membrana basal (Chakraborty et al., 2012). A MMP-9 está localizada nos grânulos terciários dos neutrófilos (Kjeldsen et al., 1992). O estradiol teria a capacidade de interferir na secreção de MMP-9 em neutrófilos, modulando assim sua ação (Fedorova et al., 2018). Em nosso estudo, a avaliação da expressão proteica de MMP-9 foi aumentada no grupo isquêmico, com redução nos grupos tratados, apontando assim para um possível papel modulador do estradiol.

6 CONCLUSÃO

Finalmente, apesar de vários adjuntos cirúrgicos e intervenções farmacológicas, a ausência de um método realmente eficaz para prevenir/tratar lesão de I/R, continua sendo um desafio para os cirurgiões. De fato, os resultados aqui obtidos demonstraram que o tratamento com estradiol, conseguiu modular os componentes da resposta inflamatória, reduzindo a expressão de MPO, IL-1 β , MMP-9 e aumentando a expressão vascular pulmonar de eNOS, assim como restaurando a agregação plaquetária. Sendo assim, este estudo pode ser considerado mais um passo para o uso do E2 para prevenir/reduzir a resposta inflamatória após pinçamento da aorta torácica descendente.

Quando analisados em sua totalidade nossos dados apontam que o 17 β -estradiol pode ser uma abordagem complementar para lidar com o processo sistêmico e a deterioração pulmonar.

7 REFERÊNCIAS

1. da Anunciação LF, Sousa MN, Vidal-Dos-Santos M, Armstrong-Jr R, Moreira LFP, Correia CJ, Breithaupt-Faloppa AC. Modulatory effects of 17 β -estradiol on acute lung inflammation after total occlusion of the descending aorta in male rats. *Int Immunopharmacol*. 2022 Dec;113(Pt A):109311. doi: 10.1016/j.intimp.2022.109311. Epub 2022 Oct 14. PMID: 36252489.
2. Bernard, S. et al. Aerobic and strength training in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, Québec, CA, v. 159, n. 3, p. 896-901, Mar. 1999.
3. Björnström L, Sjöberg M. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol Endocrinol*. 2005 Apr;19(4):833-42. doi: 10.1210/me.2004-0486. Epub 2005 Feb 3. PMID: 15695368.
4. Bouman A, Heineman MJ, Faas MM. Sex hormones and the immune response in humans. *Hum Reprod Update*. 2005;11(4):411-423. doi:10.1093/humupd/dmi008
5. Breckwoldt MO, Chen JW, Stangenberg L, Aikawa E, Rodriguez E, Qiu S, Moskowitz MA, Weissleder R. Tracking the inflammatory response in stroke in vivo by sensing the enzyme myeloperoxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Nov 25;105(47):18584-9. doi: 10.1073/pna
6. Breithaupt-Faloppa AC, Vitoretti LB, Coelho FR, dos Santos Franco AL, Domingos HV, Sudo-Hayashi LS, Oliveira-Filho RM, Tavares de Lima W. Nitric oxide mediates lung vascular permeability and lymph-borne IL-6 after an intestinal ischemic insult. *Shock*. 2009 Jul;32(1):55-61. doi: 10.1097/SHK.0b013e31818bb7a1. PMID: 18838940.
7. Breithaupt-Faloppa, A. C. et al. Protective effect of estradiol on acute lung inflammation induced by an intestinal ischemic insult is dependent on nitric oxide. *Shock*, São Paulo, v. 40, n. 3, p. 203-209, Sept. 2013.
8. Breithaupt-Faloppa, A. C. et al. Acute effects of estradiol on lung inflammation due to intestinal ischemic insult in male rats. *Shock*, São Paulo, v. 41, n. 3, p. 208-213, Mar. 2014.
9. Carden DL, Young JA, Granger DN. Pulmonary microvascular injury after intestinal ischemia-reperfusion: role of P-selectin. *J Appl Physiol* (1985). 1993 Dec;75(6):2529-34. doi: 10.1152/jappl.1993.75.6.2529. PMID: 7510279.

10. Carden D, Xiao F, Moak C, Willis BH, Robinson-Jackson S, Alexander S. Neutrophil elastase promotes lung microvascular injury and proteolysis of endothelial cadherins. *Am J Physiol.* 1998;275(2):H385-H392. doi:10.1152/ajpheart.1998.275.2.H385
11. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol.* 2000 Feb;190(3):255-66. doi: 10.1002/(SICI)1096-9896(200002)190:3<255::AID-PATH526>3.0.CO;2-6. PMID: 10685060.
12. Cavallaro U., and Dejana E. (2011) Adhesion molecule signalling: not always a sticky business. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 189–197 10.1038/nrm3068
13. Cavriani G, Domingos HV, Oliveira-Filho RM, Sudo-Hayashi LS, Vargaftig BB, de Lima WT. Lymphatic thoracic duct ligation modulates the serum levels of IL-1beta and IL-10 after intestinal ischemia/reperfusion in rats with the involvement of tumor necrosis factor alpha and nitric oxide. *Shock.* 2007 Feb;27(2):209-13. doi: 10.1097/01.shk.0000238068.84826.52. PMID: 17224798.
14. Chambliss KL, Gibson KM. Succinic semialdehyde dehydrogenase from mammalian brain: subunit analysis using polyclonal antiserum. *Int J Biochem.* 1992 Sep;24(9):1493-9. doi: 10.1016/0020-711x(92)90077-e. PMID: 1426531.
15. Chakraborty, S. et al. The multifaceted roles of neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) in inflammation and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, Ohama, NE, v. 1826, n. 1, p. 129-169, Mar. 2012.
16. Chatterjee, S. et al. Shear stress-related mechanosignaling with lung ischemia: lessons from basic research can inform lung transplantation. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, Philadelphia, PA, v. 307, n. 9, p. 0668-680, Sept. 2014.
17. Chen L, Zhao H, Alam A, Mi E, Eguchi S, Yao S, Ma D. Postoperative remote lung injury and its impact on surgical outcome. *BMC Anesthesiol.* 2019 Mar 4;19(1):30. doi: 10.1186/s12871-019-0698-6. PMID: 30832647; PMCID: PMC6399848.
18. Coelho FR, Cavriani G, Soares AL, Teixeira SA, Almeida PC, Sudo-Hayashi LS, Muscará MN, Oliveira-Filho RM, Vargaftig BB, Tavares-de-Lima W. Lymphatic-borne IL-1beta and the inducible isoform of nitric oxide synthase trigger the bronchial hyporesponsiveness after intestinal ischemia/reperfusion in rats. *Shock.* 2007 Dec;28(6):694-9. doi: 10.1097/shk.0b013e318053621d. PMID: 17607157.
19. Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, Salvemini D. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol Rev.* 2001 Mar;53(1):135-59. PMID: 11171943.
20. D'agostino P, Milano S, Barbera C, Di Bella G, La Rosa M, Ferlazzo V, et al. Os hormônios sexuais modulam os mediadores inflamatórios produzidos pelos macrófagos. *Ann N Y Acad Sci.* (1999) 876:426–9. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1999.tb07667.x

21. Deitch, E. A. et al. A time course study of the protective effect of mesenteric lymph duct ligation on hemorrhagic shock-induced pulmonary injury and the toxic effects of lymph from shocked rats on endothelial cell monolayer permeability. *Surgery*, Newark, NJ, v. 129, n. 1, p. 39-47, jan. 2001.
22. Deitch, E. A. et al. Organ blood flow and the central hemodynamic response are better preserved in female, as opposed to the male rats, after trauma-hemorrhagic shock. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, Newark, NJ, v. 65, n. 3, p. 566-572, Sept. 2008.
23. Deitch, E. A. et al. Resistance of the female, as opposed to the male, intestine to I/R-mediated injury is associated with increased resistance to gut-induced distant organ injury. *Shock*, Newark, NJ, v. 29, n. 1, p. 78-83, Jan. 2008.
24. Delvaeye M, Conway EM. Coagulation and innate immune responses: can we view them separately? *Blood*. 2009 Sep 17;114(12):2367-74. doi: 10.1182/blood-2009-05-199208. Epub 2009 Jul 7. PMID: 19584396.
25. Dinarello CA. The role of the interleukin-1-receptor antagonist in blocking inflammation mediated by interleukin-1. *N Engl J Med*. 2000 Sep 7;343(10):732-4. doi: 10.1056/NEJM200009073431011. PMID: 10974140.
26. Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:519-50. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132612. PMID: 19302047
27. Doucet D, Badami C, Palange D, Bonitz RP, Lu Q, Xu D-Z, Kannan KB, Colorado I, Feinman R, Deitch EA: Estrogen receptor hormone agonists limit trauma hemorrhage shock-induced gut and lung injury in rats. *PLoS ONE* 2010, 5:e9421.
28. El Eter E, Al Tuwaijiri A, Hagar H, Arafa M. In vivo and in vitro antioxidant activity of ghrelin: Attenuation of gastric ischemic injury in the rat. *J Gastroenterol Hepatol*. 2007 Nov;22(11):1791-9. doi: 10.1111/j.1440-1746.2006.04696.x. PMID: 17914952.
29. Eltzschig HK, Abdulla P, Hoffman E, Hamilton KE, Daniels D, Schönfeld C, Löffler M, Reyes G, Duzenko M, Karhausen J, Robinson A, Westerman KA, Coe IR, Colgan SP. HIF-1-dependent repression of equilibrative nucleoside transporter (ENT) in hypoxia. *J Exp Med*. 2005 Dec 5;202(11):1493-505. doi: 10.1084/jem.20050177. PMID: 16330813; PMCID: PMC2213326.
30. Erbel, R. et al. 2014 ESC Guidelines on the diagnosis and treatment of aortic diseases: document covering acute and chronic aortic diseases of the thoracic and abdominal aorta of the adult The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Aortic Diseases of the European Society of Cardiology (ESC). *European heart journal*, Hessen, GER, v. 35, n. 41, p. 2873-2926, Nov. 2014.
31. Esposito E, Iacono A, Raso GM, Pacilio M, Coppola A, Di Carlo R, Meli R. Raloxifene, a selective estrogen receptor modulator, reduces carrageenan-induced acute inflammation in normal and ovariectomized rats. *Endocrinology*. 2005 Aug; 146(8):3301-8. doi: 10.1210/en.2005-0375. Epub 2005 Apr 28. PMID: 15860553.

32. Faulds MH, Zhao C, Dahlman-Wright K, Gustafsson JÅ. The diversity of sex steroid action: regulation of metabolism by estrogen signaling. *J Endocrinol*. 2012 Jan;212(1):3-12. doi: 10.1530/JOE-11-0044. Epub 2011 Apr 21. PMID: 21511884.
33. Fedorova, N. V. et al. Neutrophils release metalloproteinases during adhesion in the presence of insulin, but cathepsin G in the presence of glucagon. *Mediators of inflammation*, Moscow, v. 2018, p. 1-9, Feb. 2018.
34. Fish, E. N. The X-files in immunity: sex-based differences predispose immune responses. *Nature Reviews Immunology*, Toronto, CA. v. 8, n. 9, p. 737-744, Sept. 2008.
35. Foulds S, Mireskandari M, Kalu P, Jackson W, Cheshire NJ, Mansfield AO, Schachter M. Visceral ischemia and neutrophil activation in sepsis and organ dysfunction. *J Surg Res*. 1998 Mar;75(2):170-6. doi: 10.1006/jsre.1998.5276. PMID: 9655091.
36. Förstermann U, Mülsch A, Böhme E, et al. Stimulation of soluble guanylate cyclase by an acetylcholine-induced endothelium-derived factor from rabbit and canine arteries. *Circ Res* 1986;58(4):531–8. [PubMed] [Google Scholar]
37. Förstermann U, Sessa WC. Óxido nítrico sintases: regulação e função. *Eur Coração J* 2012; 33(7):829–37. [Artigo livre do PMC] [PubMed] [Google Acadêmico]
38. Galley, H. F.; Webster, N. R. Physiology of the endothelium. *British journal of anaesthesia*, Scotland, UK. v. 93, n. 1, p. 105-113, Apr. 2004.
39. GBD 2016 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet*. 2017 Sep 16;390(10100):1211-1259. doi: 10.1016/S0140-6736(17)32154-2. Erratum in: *Lancet*. 2017 Oct 28;390(10106):e38. PMID: 28919117; PMCID: PMC5605509.
40. Gelman, S. The pathophysiology of aortic cross-clamping and unclamping. *The Journal of the American Society of Anesthesiologists*, Boston, MA, v. 82, n. 4, p. 1026-1057, Apr. 1995.
41. Girn HR, Orsi NM, Homer-Vanniasinkam S. An overview of cytokine interactions in atherosclerosis and implications for peripheral arterial disease. *Vasc Med*. 2007 Nov;12(4):299-309. doi: 10.1177/1358863X07083387. PMID: 18048466.
42. Goldblum, S. E. et al. Lung myeloperoxidase as a measure of pulmonary leukostasis in rabbits. *Journal of applied physiology*, v. 59, n. 6, p. 1978-1985, Dec. 1985.
43. Granger, D. et al. Ischemia-reperfusion injury: role of oxygen derived free radicals. *Acta Physiol Scand Suppl*, v. 548, p. 47-63, 1986.

44. Gresele P, Momi S, Guglielmini G. Nitric oxide-enhancing or -releasing agents as antithrombotic drugs. *Biochem Pharmacol* 2019;166(June):300–12. [PubMed] [Google Scholar]
45. Grisham, M. B. et al. Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischemia. *American Journal of Physiology-gastrointestinal and Liver Physiology*, Alabama, v. 251, n. 4, p. 567-574, May. 1986.
46. Gubbels Bupp MR, Jorgensen TN. *Imunol frontal*. (2018) 9:794. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00794
47. Guzmán-de la Garza FJ, Ibarra-Hernández JM, Cordero-Pérez P, Villegas-Quintero P, Villarreal-Ovalle CI, Torres-González L, Oliva-Sosa NE, Alarcón-Galván G, Fernández-Garza NE, Muñoz-Espinosa LE, Cámara-Lemarroy CR, Carrillo-Arriaga JG. Temporal relationship of serum markers and tissue damage during acute intestinal ischemia/reperfusion. *Clinics (Sao Paulo)*. 2013 Jul;68(7):1034-8.
48. Hack, C. E.; Zeerleder, S. The endothelium in sepsis: source of and a target for inflammation. *Critical care medicine*, Bern, SZ, v. 29, n. 7, p. S21-S27, July. 2001.
49. Haegens A, Heeringa P, van Suylen RJ, Steele C, Aratani Y, O'Donoghue RJ, et al. Myeloperoxidase deficiency attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung inflammation and subsequent cytokine and chemokine production. *J Immunol*. 2009;182:7990–6.
50. Harjunpää H., Lloret Asens M., Guenther C., and Fagerholm S. C. (2019) Cell adhesion molecules and their roles and regulation in the immune and tumor microenvironment. *Front. Immunol*. 10, 1078 10.3389/fimmu.2019.01078
51. Hato S, Urakami A, Yamano T, et al. Attenuation of liver and lung injury after hepatic ischemia and reperfusion by a cytokine-suppressive agent, FR167653. *Eur Surg Res*. 2001;33(3):202-209. doi:10.1159/000049707
52. Hubbard AK, Rothlein R. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. *Free Radical Biol Med*. 2000; 28: 1379- 1386.
53. Hudson, L. D.; Steinberg, K. P. Epidemiology of acute lung injury and ARDS. *Chest*, Seattle, WA, v. 116, p. 74S-82S, July. 1999.
54. Ignarro LJ, Harbison RG, Wood KS, et al. Activation of purified soluble guanylate cyclase by endothelium-derived relaxing factor from intrapulmonary artery and vein: stimulation by acetylcholine, bradykinin and arachidonic acid. *J Pharmacol Exp Ther* 1986;237(3):893–900. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2872327>. [PubMed] [Google Scholar]
55. Janusz, M. J.; Doherty, N. S. Degradation of cartilage matrix proteoglycan by human neutrophils involves both elastase and cathepsin G. *The Journal of immunology*, v. 146, n. 11, p. 3922-3928, June. 1991.

-
56. Kjeldsen, L. et al. Subcellular localization and release of human neutrophil gelatinase, confirming the existence of separate gelatinase-containing granules. *Biochemical Journal*, Copenhagen, DK, v. 287, n. 2, p. 603-610, Mar. 1992.
 57. Kogan A, Preisman S, Levin S, Raanani E, Sternik L. Adult respiratory distress syndrome following cardiac surgery. *J Card Surg*. 2014;29(1):41-46. doi:10.1111/jocs.12264
 58. Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88(11):4651–5. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
 59. Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Häggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*. 1997 Mar;138(3):863-70. doi: 10.1210/endo.138.3.4979. PMID: 9048584.
 60. Laubach, V. E.; Sharma, A. K. Mechanisms of lung ischemia-reperfusion injury. *Current opinion in organ transplantation*, Charlottesville, VA, v. 21, n. 3, p. 246, June. 2016.
 61. de Lima WT, Sirois P, Jancar S. Immune-complex alveolitis in the rat: evidence for platelet activating factor and leukotrienes as mediators of the vascular lesions. *Eur J Pharmacol*. 1992;213(1):63-70. doi:10.1016/0014-2999(92)90233-t
 62. Lind M, Hayes A, Caprnda M, et al. Inducible nitric oxide synthase: good or bad? *Biomed Pharmacother* 2017;93:370–5. [PubMed] [Google Scholar]
 63. Ma W, Tan J, Matsumoto H, Robert B, Abrahamson DR, Das SK, Dey SK. Adult tissue angiogenesis: evidence for negative regulation by estrogen in the uterus. *Mol Endocrinol*. 2001 Nov;15(11):1983-92. doi: 10.1210/mend.15.11.0734. PMID: 11682628.
 64. MacNeil LG, Baker SK, Stevic I, Tarnopolsky MA: 17b-Estradiol attenuates exercise-induced neutrophil infiltration in men. *Am J Physiol Regulat Integr Compar Physiol* 2011, 300:R1443-R1451.
 65. Malangoni, M. A. et al. Interferon Gamma and Tumor Necrosis Factor Alpha: Use in Gram-negative Infection After Shock. *Archives of Surgery*, Louisville, KY, v. 125, n. 4, p. 444-446, Apr. 1990.
 66. Melikian N, Seddon MD, Casadei B, et al. Neuronal nitric oxide synthase and human vascular regulation. *Trends Cardiovasc Med* 2009;19(8):256–62. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
 67. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*. 1991 Jun;43(2):109-42. PMID: 1852778.

-
68. Narita K, Kuwabara Y, Fujii Y. Lung injury after intestinal ischemia-reperfusion may be avoided by the reduced absorption of locally produced cytokines. *Surg Today*. 2004;34(11):937-942. doi:10.1007/s00595-004-2847-9
69. Novella, S. et al. Vascular aging in women: is estrogen the fountain of Youth? *Frontiers in physiology*, Spain, v. 3, p. 165, May. 2012.
70. Offner PJ, Moore EE, Biffl WL. Male gender is a risk factor for major infections after surgery. *Arch Surg*. 1999;134:935–8, discussion 938-40. doi: 10.1001/archsurg.134.9.935.
71. Orfanos S.E., Mavrommati I., Korovesi I., Roussos C. Pulmonary endothelium in acute lung injury: from basic science to the critically ill. *Intensive Care Med*. 2004;30:1702–1714
72. Papenfuss TL, Powell ND, McClain MA, Bedarf A, Singh A, Gienapp IE, Shawler T, Whitacre CC: Estriol generatestolerogenic dendritic cells in vivo that protect against autoimmunity. *J Immunol* 2011, 186:3346-3355.
73. Prossnitz ER, Sklar LA, Oprea TI, Arterburn JB. GPR30: a novel therapeutic target in estrogen-related disease. *Trends Pharmacol Sci*. 2008 Mar;29(3):116-23. doi: 10.1016/j.tips.2008.01.001. Epub 2008 Feb 11. PMID: 18262661.
74. Proust, B. et al. Persistence of bronchopulmonary hyper-reactivity and eosinophilic lung inflammation after anti-IL-5 or-IL-13 treatment in allergic BALB/c and IL-4R α knockout mice. *Clinical & Experimental Allergy*, Verneuil-em-halatte, France, v. 33, n. 1, p. 119-131, Jan. 2003.
75. Randhawa, R.; Bellingan, G. Acute lung injury. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*, v. 8, n. 11, p. 477-480, Nov. 2007.
76. Rapoport RM, Draznin MB, Murad F. Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. *Nature* 1983;306(5939):174–6. [PubMed] [Google Scholar]
77. Rausch PG, Pryzwansky KB, Spitznagel JK. Immunocytochemical identification of azurophilic and specific granule markers in the giant granules of Chediak-Higashi neutrophils. *N Engl J Med*. 1978;298(13):693-698. doi:10.1056/NEJM197803302981301
78. Remmers DE, Cioffi WG, Bland KI, Wang P, Angele MK, Chaudry IH. Testosterone: the crucial hormone responsible for depressing myocardial function in males after trauma-hemorrhage. *Ann Surg*. 1998;227:790–9. doi: 10.1097/00000658-199806000-00002.
79. Rettew JA, Huet-Hudson YM, Marriott I. Testosterone reduces macrophage expression in the mouse of toll-like receptor 4, a trigger for inflammation and innate immunity. *Biol Reprod*. 2008;78(3):432-437. doi:10.1095/biolreprod.107.063545

80. Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science*. 2005 Mar 11;307(5715):1625-30. doi: 10.1126/science.1106943. Epub 2005 Feb 10. PMID: 15705806.
81. Ribeiro, M. E.; Yoshida, W. B. Lesões intestinais decorrentes de isquemia e reperfusão: fisiopatologia e modelos experimentais. *Jornal Vascular Brasileiro*, Botucatu, SP, v. 4, n. 2, p. 183-194, Mar. 2005.
82. Ricardo-da-Silva, F. Y. et al. Estradiol modulates local gut injury induced by intestinal ischemia-reperfusion in male rats. *Shock: Injury, Inflammation, and Sepsis: Laboratory and Clinical Approaches*, São Paulo, v. 48, n. 4, p. 477-483, Oct. 2017.
83. Ricardo-da-Silva FY, Armstrong R Jr, Vidal-Dos-Santos M, Correia CJ, Coutinho E Silva RDS, da Anunciação LF, Moreira LFP, Leuvenink HGD, Breithaupt-Faloppa AC. 17 β -Estradiol Treatment Protects Lungs Against Brain Death Effects in Female Rat Donor. Transplantation. 2021 Apr 1;105(4):775-784. doi: 10.1097/TP.0000000000003467. PMID: 33031230.
84. Rocha de Sousa, P. T. et al. 17 β -Estradiol prevents mesenteric injury induced by occlusion of the proximal descending aorta in male rats. *Journal of vascular surgery*, São Paulo, v. 67, n. 2, p. 597-606, feb. 2018.
85. Schmeling, D. J. et al. Evidence for neutrophil-related acute lung injury after intestinal ischemia-reperfusion. *Surgery*, Michigan, v. 106, n. 2, p. 195-202, Aug. 1989.
86. Sedgwick JB, Menon I, Gern JE, Busse WW. Effects of inflammatory cytokines on the permeability of human lung microvascular endothelial cell monolayers and differential eosinophil transmigration. *J Allergy Clin Immunol*. 2002 Nov;110(5):752-6. doi: 10.1067/mai.2002.128581. PMID: 12417884.
87. Serpa NA, Hemmes SN, Barbas CS, Beiderlinden M, Fernandez-Bustamante A, Futier E, et al. Incidence of mortality and morbidity related to postoperative lung injury in patients who have undergone abdominal or thoracic surgery: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Respir Med*. 2014;2(12):1007–1015
88. Schröder J, Kahlke V, Staubach KH, Zabel P, Stüber F. Gender differences in human sepsis. *Arch Surg*. 1998;133:1200–5. doi: 10.1001/archsurg.133.11.1200.
89. Sobral, M. L. 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*. Sept. 2021.
90. Speyer CL, Rancilio NJ, McClintock SD, Crawford JD, Gao H, Sarma JV, Ward PA. Regulatory effects of estrogen on acute lung inflammation in mice. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2005 Apr;288(4):C881-90. doi: 10.1152/ajpcell.00467.2004. PMID: 15761213.

91. Stephens RS, Shah AS, Whitman GJ. Lesão pulmonar e síndrome do desconforto respiratório agudo após cirurgia cardíaca. *Ann Thorac Surg*. 2013; 95(3):1122–1129.
92. Terrell, AM, Crisostomo PR, Markel TA, Wang M, Abarbanell AM, Herrmann JL, Meldrum DR. Postischemic infusion of 17-beta-estradiol protects myocardial function and viability. *J Surg Res*. 2008 May 15;146(2):218-24. doi: 10.1016/j.jss.2007.05.021. Epub 2007 Jul 20.
93. Thomas P, Pang Y, Filardo EJ, Dong J. Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology*. 2005 Feb;146(2):624-32. doi: 10.1210/en.2004-1064. Epub 2004 Nov 11. PMID: 15539556.
94. Townsend EA, Meuchel LW, Thompson MA, Pabelick CM, Prakash YS. Estrogen increases nitric-oxide production in human bronchial epithelium. *J Pharmacol Exp Ther*. 2011 Dec;339(3):815-24. doi: 10.1124/jpet.111.184416. Epub 2011 Sep 22. PMID: 21940647; PMCID: PMC3226369.
95. Turnage RH, Guice KS, Oldham KT 1994. Endotoxemia and remote organ injury following intestinal reperfusion. *J Surg Res* 56: 571-578
96. Van Soeren, M. H. et al. Pathophysiology and implications for treatment of acute respiratory distress syndrome. *AACN Advanced Critical Care*, v. 11, n. 2, p. 179-97, May. 2000.
97. Ward, D. T. et al. Sustained nitric oxide production via L-arginine administration ameliorates effects of intestinal ischemia–reperfusion. *Journal of Surgical Research*, Bethesda, MD, v. 89, n. 1, p. 13-19, Mar. 2000.
98. Waxman, K. Shock: ischemia, reperfusion, and inflammation. *New horiz*, v. 4, n. 2, p. 153-160, May. 1996.
99. Welling, K. L. Acute respiratory distress syndrome. Pathogenesis and therapy of acute pulmonary failure. *Ugeskrift for laeger*, v. 158, n. 25, p. 3593-3600, Jun. 1996.
100. World Health Organization(2021),(<[http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))>) Accessed on 24 May, 2023.
101. Wu X, Siegemund M, Seeberger M, Studer W. Systemic and mesenteric hemodynamics, metabolism, and intestinal tonometry in a rat model of supraceliac aortic cross-clamping and declamping. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 1999;13(6):707-714. doi:10.1016/s1053-0770(99)90125-8
102. Yang L, Park J, Graveley BR. Splicing from the outside in. *Mol Cell*. 2007 Sep 21;27(6):861-2. doi: 10.1016/j.molcel.2007.09.003. PMID: 17889658; PMCID: PMC2376043.
103. Xiao F, Eppihimer MJ, Young JA, Nguyen K, Carden DL. Lung neutrophil retention and injury following intestinal ischemia–reperfusion. *Microcirculation* 1997; 4:359-367.

-
104. Zeiher AM, Fisslthaler B, Schray-Utz B, et al. Nitric oxide modulates the expression of monocyte chemoattractant protein 1 in cultured human endothelial cells. *Circ Res* 1995;76(6):980–6. [PubMed] [Google Scholar]
 105. Zhao, M. et al. Alveolar macrophage activation is a key initiation signal for acute lung ischemia-reperfusion injury. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, charlottesville, VA v. 291, n. 5, p. 1018-1026, July. 2006.
 106. Zhou L, Zhu D-Y. Óxido nítrico sintase neuronal: estrutura, localização subcelular, regulação e implicações clínicas. *Óxido Nítrico* 2009; 20(4):223–30. [PubMed] [Google Acadêmico]

8 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 ESTRADIOL NA LESÃO PULMONAR CAUSADA PELA OCLUSÃO DA AORTA DESCENDENTE PROXIMAL EM RATOS MACHOS**”, registrada com o nº **1035/2018**, sob a responsabilidade de **Ana Cristina Breithaupt Faloppa** 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 reunião de 18.07.18

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 30-04-2018 Término: 30-04-2020
Espécie/linhagem/raça	Rato wistar
Nº de animais	90
Peso/Idade	8 semanas
Sexo	macho
Origem	Biotério ICB

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

CEUA-FMUSP, 18 de Julho de 2018

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

Trabalho publicado

International Immunopharmacology 113 (2022) 109311



Contents lists available at ScienceDirect

International Immunopharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/intimp



Modulatory effects of 17 β -estradiol on acute lung inflammation after total occlusion of the descending aorta in male rats

Lucas Ferreira da Anunciação^{a,1}, Marcelo Nunes de Sousa^{a,1}, Marina Vidal-dos-Santos^a, Roberto Armstrong-Jr.^a, Luiz Felipe Pinho Moreira^a, Cristiano Jesus Correia^a, Ana Cristina Breithaupt-Faloppa^{a,*}

^a Laboratório de Cirurgia Cardiovascular e Fisiopatologia da Circulação (LIM-11), Instituto do Coração (InCor), Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Ischemia and Reperfusion
17 β -estradiol
Lung inflammation
iNOS

ABSTRACT

As a consequence of systemic inflammation caused by ischemia and reperfusion (I/R) due to aortic occlusion, the lungs can exhibit increased microvascular permeability, local release of pro-inflammatory mediators, and leukocyte infiltration. Lung tissue infiltration by activated neutrophils is followed by acute respiratory distress syndrome, which is linked to acute pulmonary microvascular damage, high mortality rates, and organ dysfunction. Previous studies have demonstrated that female sex hormones modulate the inflammatory response and that prophylactic treatment with 17 β -estradiol (E2) can prevent fatalities and preserve mesenteric perfusion and intestinal integrity after ischemia/reperfusion induced by aortic occlusion. In this study, we focused on the protective effects of estradiol after aortic ischemia/reperfusion by evaluating lung injury and endothelial alterations. Upon anesthesia and mechanical ventilation, male rats were subjected to aortic occlusion for 20 min, followed by 2 h of reperfusion. In parallel, one group of rats received a single injection of estradiol (280 μ g/kg, i. v.) 30 min before ischemia. We observed increased serum concentrations of IL-1 β , IL-6 and IL-10 in the I/R rats and E2 was able to reduce them. E2 effects after 2 h of reperfusion resulted mainly in decreasing of edema, iNOS expression and preventing leukocyte infiltration. Overall, our data indicate that estradiol might be a supplementary approach to deal with systemic processes and lung deterioration.

1. Introduction

Acute ischemia is a life-threatening condition that can lead to morbidity and mortality. The damaging process results in widespread inflammation and multi-organ dysfunction, once the necessary restoration of blood flow (reperfusion) disseminates the inflammatory cytokines and toxic products generated, aggravating the problem caused by ischemia [1,2]. Aortic clamping is a surgical maneuver that can result in acute inflammatory activation due to broad ischemia induction, which is associated with systemic inflammatory response syndrome and organ dysfunction [3,4]. As a result of inflammatory mediators release and an increase in hydrostatic microvascular pressure, pulmonary microvascular permeability is higher, resulting in pulmonary edema [5]. Acute lung inflammation is characterized by increased microvascular

permeability, the local release of proinflammatory mediators, and leukocyte infiltration. Lung tissue infiltration by activated neutrophils is followed by acute respiratory distress syndrome, which is linked to acute pulmonary microvascular damage and high mortality rates [6]. After ischemia/reperfusion, the inflammatory lung response persists for a long period and is characterized by the release of proinflammatory mediators and danger signals [7].

Previous studies have demonstrated that female sex hormones modulate the inflammatory response, showing that females have a better inflammatory response, which is more effective than that in males [8,9]. In addition to cardiovascular effects, 17 β -estradiol (E2) has immunomodulatory properties that reduce septic and ischemia/reperfusion (I/R) injury [10,11]. In the context of the lungs, 17 β -estradiol attenuates tissue damage caused by various forms of acute lung injury.

* Corresponding author at: Laboratório de Cirurgia Cardiovascular e Fisiopatologia da Circulação (LIM/11) - HC-FMUSP, Universidade de São Paulo, Av. Dr. Arnaldo, 455 2º andar - sala 2146 - 01246-903, São Paulo, Brazil.

E-mail addresses: cristiano.correia@hc.fm.usp.br (C.J. Correia), ana.breithaupt@hc.fm.usp.br (A.C. Breithaupt-Faloppa).

¹ LFA and MNS contributed equally to this manuscript.

<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2022.109311>

Received 1 July 2022; Received in revised form 13 September 2022; Accepted 30 September 2022

Available online 14 October 2022

1567-5769/© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.

Besides, the prophylactic treatment with 17 β -estradiol can prevent fatalities and preserve mesenteric perfusion and intestinal integrity after ischemia/reperfusion induced by aortic occlusion [12]. Therefore, the present study has focused on the protective effects of estradiol after aortic ischemia/reperfusion by evaluating lung injury and endothelial alterations.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Male Wistar rats (250–350 g; 8-week-old; $n = 24$) were obtained from our animal facility. The rats were maintained (12:12-h light-dark cycle, $21 \pm 2^\circ\text{C}$) with free access to food and water. The Animal Subject Committee of São Paulo University Medical School approved the experimental protocol (SDC 4444/16/110). All rats received humane care in compliance with the “Principles of Laboratory Animal Care” formulated by the National Society for Medical Research and the “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals,” as prepared by the Institute of Laboratory Animal Resources and published by the National Institute of Health (NIH Publication No. 86–23, revised 1996).

The animals were randomized into three groups: *sham* ($n = 8$), were subjected to surgery without inducing I/R injury; 2) *IR* ($n = 8$), were subjected to ischemia of the left descending aorta for 20 min with 120 min of reperfusion; 3) *E2* ($n = 8$), were treated with 17 β -estradiol (280 $\mu\text{g}/\text{kg}$, intravenous) 30 min prior to aortic occlusion and induced ischemia induction. Ischemia had been induced for 20 min, through the occlusion of the left descending aorta with 120 min of reperfusion.

2.2. Ischemia/reperfusion model

Anesthesia was induced with 5% isoflurane in a closed chamber. Rats were intubated and were kept on 2% isoflurane, while being mechanically ventilated with a volume control ventilator (Harvard Apparatus, Inc., Holliston, MA, USA) with a tidal volume of 10 ml/kg, a frequency of 70 breaths/min. A catheter for proximal arterial pressure was inserted into the left common carotid toward the skull, and a second catheter was inserted into the caudal ventral artery for distal arterial pressure measurement. Measurements were performed throughout the experimental period.

Aortic ischemia was established following the model used by Rocha de Sousa et al. (2018) [12]. Briefly, a Fogarty 2F catheter was inserted into the left common carotid, reaching the descending aorta in the left common artery ostium, which also allowed the occlusion of an important collateral circulation vessel, the subclavian left artery. When in position, the catheter was fully inflated (saline solution, $90 \pm 10 \mu\text{L}$), thus occluding the aorta. Ischemia was confirmed by observing the mean distal arterial pressure at $\sim 10 \text{ mmHg}$ and was maintained for 20 min, followed by 120 min of reperfusion. During reperfusion, the animals received 0.9% saline solution as a volume replacement at 20 ml/kg/h. Animals were euthanized by exsanguination via the abdominal aorta, and blood and lung tissue samples were collected. During the experimental period, animal gas exhalation (O_2 and CO_2) was quantified and recorded (Respiratory Gas Analysis, ADInstruments, USA).

2.3. White blood cells and platelet counts

Blood samples (20 μL) were collected, and white blood cells (WBCs) and platelet counts were obtained at baseline (initial; before surgery manipulation) and following the experiment (final: 120 min). The samples were analyzed using an automatic hematology analyzer (Mindray BCE 2800 Vet, Shenzhen, China).

2.4. Quantifying serum and lung tissue inflammatory mediators and serum estradiol

Blood samples were collected from abdominal aorta at the end of reperfusion period. Lung fragments were weighed and dissociated in PBS (gentleMACS Dissociator, Miltenyi Biotec, Germany). The serum and the lung tissue supernatants were stored at -80°C for analysis. An additional lung tissue sample was weighed and left in an oven to dry for 24 h, for posterior dry weight measurement.

Concentrations of interleukins (IL-1 β , IL-6, IL-10, and TNF- α) were quantified in serum aliquots and lung tissue homogenates supernatants using ELISA kits (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), in accordance with the manufacturer's instructions. The concentration values in serum were expressed as pg/ml, and in lung homogenates as total protein levels (pg/mg).

Serum E2 concentrations were quantified using an ELISA kit (Cayman Chemical Company, USA) following the manufacturer's protocols. The concentration values in serum were expressed as pg/ml.

2.5. Bronchoalveolar lavage and bone marrow cell counts

Animals were intubated during I/R. After euthanasia, bronchoalveolar lavage (BAL) fluid was obtained by flushing the lungs with DMEN (10 ml). After centrifugation ($200 \times g$ for 10 min at 15°C), the resulting cell pellet was resuspended in PBS (1 ml). The samples were analyzed by an automatic hematology analyzer (Mindray BCE 2800 Vet, Shenzhen, China).

Bone marrow cells were harvested by flushing the femur cavity with 10 ml of phosphate-buffered saline (PBS). After centrifugation at $500 \times g$ for 10 min, the cells were resuspended in a final volume of 1 ml PBS. Total cell counts were determined using the hematology analyzer.

2.6. Histopathological analyses

The lungs were collected, fixed in formalin, and embedded in paraffin. Samples were cut into 4-mm sections and stained with hematoxylin and eosin (H&E). The parameters investigated were leukocyte infiltration and edema. Two researchers, blinded for the study groups, performed the analyses using the NIS-Elements-BR (Nikon) software.

2.7. Expression of endothelial adhesion molecules, endothelial nitric oxide synthase, and endothelin-1

The left lung was immersed in hexane under liquid nitrogen and stored at -80°C . Serial sections of 8 μm were placed on organosilane-coated glass slides (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) and fixed in cold acetone for 10 min. To evaluate protein expression, immunohistochemical analyses were conducted. The slides were washed with TRIS-saline-tween buffer solution (TBS-T), followed by the blocking of nonspecific sites with an albumin-rich solution. For endothelial nitric oxide synthase (eNOS), inducible nitric oxide synthase (iNOS), and endothelin-1 (ET-1) immunodetection, primary rabbit antibodies (Abcam, Boston, MA, USA) were diluted 1:100 in TBS-T containing 1% BSA. After rinsing in TBS-T, the sections were incubated with secondary FITC- or TRITC-conjugated anti-rabbit antibodies (1:200; Abcam) for 2 h at 37°C . Negative control samples were incubated in the absence of primary antibodies. Images were acquired with a DS-Ri1 digital camera (Nikon, Tokyo, Japan) coupled with a fluorescence microscope (Nikon) and then analyzed using the NIS-Elements-BR (Nikon) software.

2.8. Gene expression

To evaluate gene expression, real-time PCR was performed using a Step One Plus device (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Lung tissue RNA was extracted using a commercial kit (Mirvana; Ambion, Waltham, MA, USA). cDNA was transcribed using a high-capacity

Table 1
Estradiol serum concentration.

(pg/mL)	sham	I/R	E2	P Anova
Estradiol	79.58 ± 26.61	128.1 ± 45.02	2188 ± 268.5*	<0.0001

Data expressed as mean ± SEM (n = 8). P < 0.0001 in relation to other groups.

reverse-transcriptase kit (Applied Biosystems, USA), and real-time PCR was performed. The cycling conditions were: 2 min at 50 °C, 10 min at 95 °C, 40 cycles of 15 s at 95 °C, and 1 min at 60 °C. The following TaqMan® primers were used: GAPDH (Rn01775763_g1*), β -actin (Rn00667869_m1*), eNOS (Rn02132634_s1*), endothelin 1 (Rn00561129_m1*), iNOS (Rn00561646_m1*), IL-1 β (SYBR®Green, RN IL-1B fw 5'-CAGCAATGGTCGGGACATAGTT-3' and RN IL-1B rv 5'-GCATTAGGAATAGTCAGCCATCT-3'), IL-10 (SYBR®Green, RN IL-10 fw 5'-GCAACAGCTCAGCGCATCT-3' and RN IL-10 rv 5'-ACAACTGGT-CACAGCTTTCGA-3'), IL-6 (SYBR®Green, RN IL-6 fw 5'-CCAATTC-CAATGCTCTCCTAATG-3' and RN IL-6 rv 5'-TTCAAGTCTTTCAAGAGTTGGAT-3'), and TNF- α (SYBR®Green, RN TNF- α fw 5'-AGGCTGTCGCTACATCACTGAA-3' and RN TNF- α rv 5'-TGACCCGTAGGCGGATTACA-3').

2.9. Statistical analysis

All data are presented as mean ± standard error of the mean (SEM) or as median and interquartile interval. Data were analyzed using analysis of variance (ANOVA), followed by the two-stage linear step-up procedure of Benjamini, Krieger, and Yekutieli. Non-normally distributed data were analyzed using the Kruskal–Wallis test, followed by a post-hoc Dunn multiple comparison test. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software v.9.1.

3. Results

Estradiol treatment (280 μ g/kg) increased E2 serum concentration measured following the experiments. Treated group had higher E2 concentration compared to other groups (Table 1).

3.1. Exhaled O₂ and CO₂ in rats submitted to ischemia and reperfusion

As illustrated in Fig. 1, there was a decrease in O₂ and CO₂ exhalation during ischemia in all groups compared to the sham group. The reduction in the exhaled volume of CO₂ was more pronounced and longer than that of O₂. After perfusion reestablishment, the exhalation of gases was normalized.

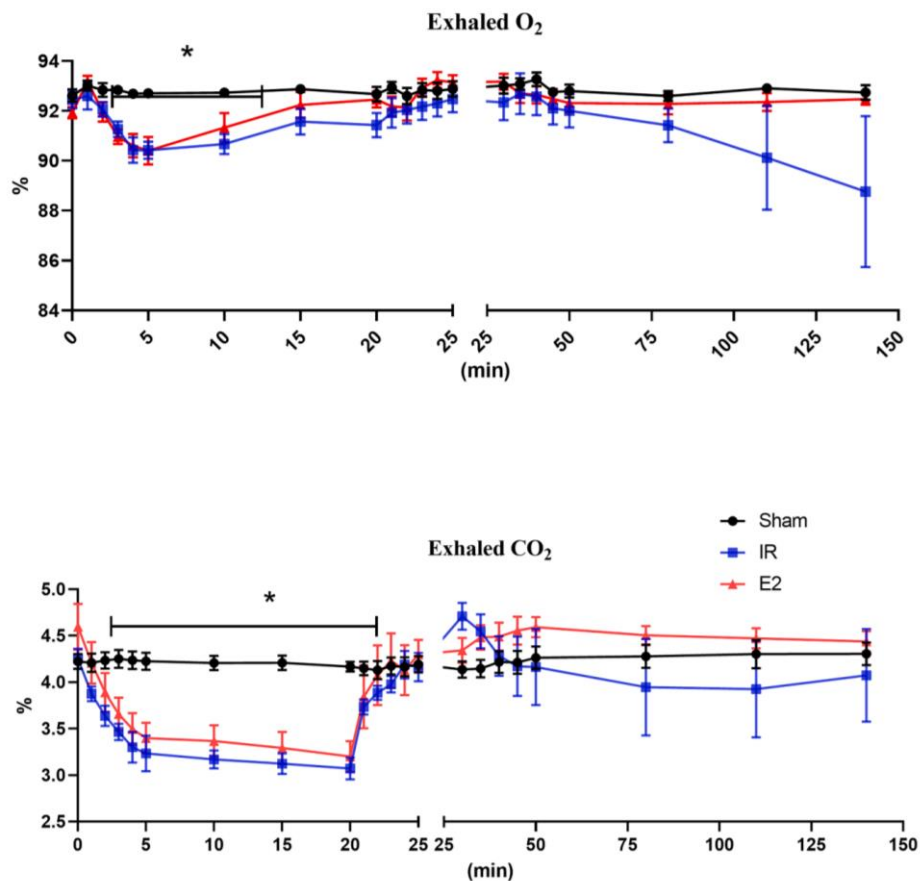


Fig. 1. Gas exhalation. Exhaled O₂ and CO₂ during the whole experimental period. Groups: sham (no I/R injury), IR (I/R injury), and E2 (I/R injury treated with 17 β -estradiol) (n = 8 per group). Data are presented as mean ± SEM. *p < 0.05.

Table 2

total and differential number of circulating leukocytes and platelet counts. The data was represented by mean $\pm$ standard error. * $p < 0.05$ in comparison with respective Basal numbers.

	Leukogram (cells/mm ³)				
	WBC	Lymphocytes	Granulocytes	Monocytes	Platelets
Sham					
Basal	14066.6 $\pm$ 1421	9200 $\pm$ 737	4222.2 $\pm$ 714.2	644.4 $\pm$ 97.34	966.3 $\pm$ 54.26
Final	31266.6 $\pm$ 4641*	14778 $\pm$ 2748	14388 $\pm$ 2688.5*	2100 $\pm$ 417*	915.3 $\pm$ 116.6
IR					
Basal	11760 $\pm$ 1004	8020 $\pm$ 636.4	3270 $\pm$ 435.3	470 $\pm$ 68.39	1044.6 $\pm$ 153.5
Final	25479 $\pm$ 3401.4*	10950 $\pm$ 1861	14640 $\pm$ 2964*	1590 $\pm$ 411.6*	1042.8 $\pm$ 164.3
E2					
Basal	12936.3 $\pm$ 1214	8754.5 $\pm$ 769	3654.5 $\pm$ 450.7	527.2 $\pm$ 75.18	1180.6 $\pm$ 151.2
Final	26020 $\pm$ 3019.3*	13860 $\pm$ 3297.0	10700 $\pm$ 2063.4*	1460 $\pm$ 159.3*	974.4 $\pm$ 182.5

3.2. White blood cell and platelet counts

The numbers of circulating leukocytes are presented in Table 2. All groups presented an increase in total WBC counts at the end of the experimental period, compared to the initial values. Differential analysis

indicated that this increase was mainly characterized by granulocytes and monocytes. No significant differences were observed between the groups. In relation to platelet numbers, all groups presented similar values over time and did not differ.

3.3. Broncho alveolar lavage cell quantification and bone marrow total counts

Fig. 2A shows that I/R led to an increased influx of leukocytes into the alveolar space, which was not observed in the estradiol-treated group. The protein levels in the BAL did not vary among the groups (data not shown). Regarding bone marrow cell content, the results did not indicate differences among the groups in the cellular content of the femoral cavity (Fig. 2B). In parallel to these analyses, the lung wet/dry ratio was calculated in the lung samples, and the results are shown in Fig. 2C. There was an increase in the wet/dry ratio in the I/R group, indicating edema formation in the lungs, and E2 treatment prevented this liquid accumulation.

3.4. Effects of aortic I/R on lung leukocyte infiltration and edema

Histopathological analysis of the lungs is shown in Fig. 3. There was an increase in the number of leukocytes in the lung parenchyma of animals subjected to I/R, -and estradiol treatment did prevent this increase. In addition, lung tissue from E2-treated rats showed a decrease in

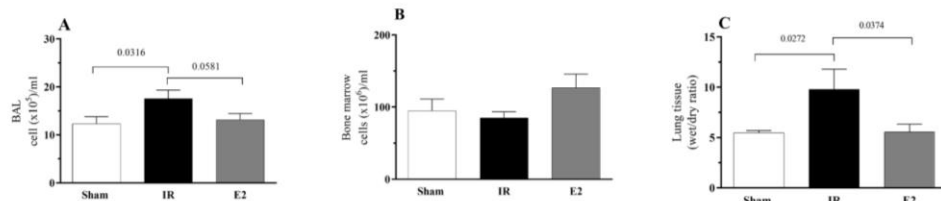


Fig. 2. Quantification of bronchoalveolar lavage (BAL) (A), bone marrow total cells (B) and Lung tissue wet/dry ratio (C). Cell suspensions were quantified by an automatic hematology analyzer. Groups: sham (no I/R injury), IR (I/R injury), and E2 (I/R injury treated with 17 β -estradiol) (n = 8 per group). Data are presented as mean $\pm$ SEM. P ANOVA BAL: 0.056; Bone Marrow: 0.155; Wet/Dry ratio: 0.047.

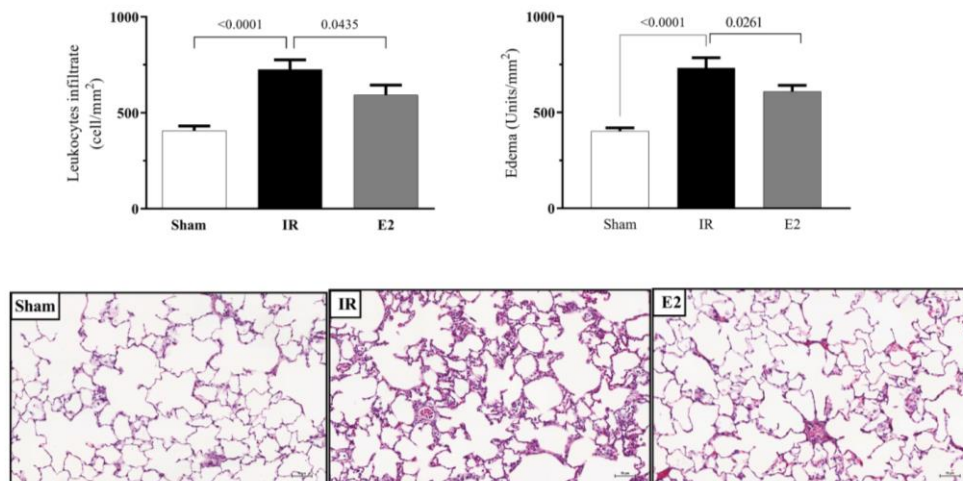


Fig. 3. Lung histopathology analysis of leukocyte infiltrate and edema. Photomicrographs of lung sections stained with standard hematoxylin and eosin staining. Groups: sham (no I/R injury), IR (I/R injury), and E2 (I/R injury treated with 17 β -estradiol). Data are expressed as mean $\pm$ SEM from 5 photos/sample, 2 sample/animal, and 5 animals/group animals. P ANOVA Leukocyte infiltrate: 0.0001; Edema: < 0.0001. Photomicrographs magnification 100x.

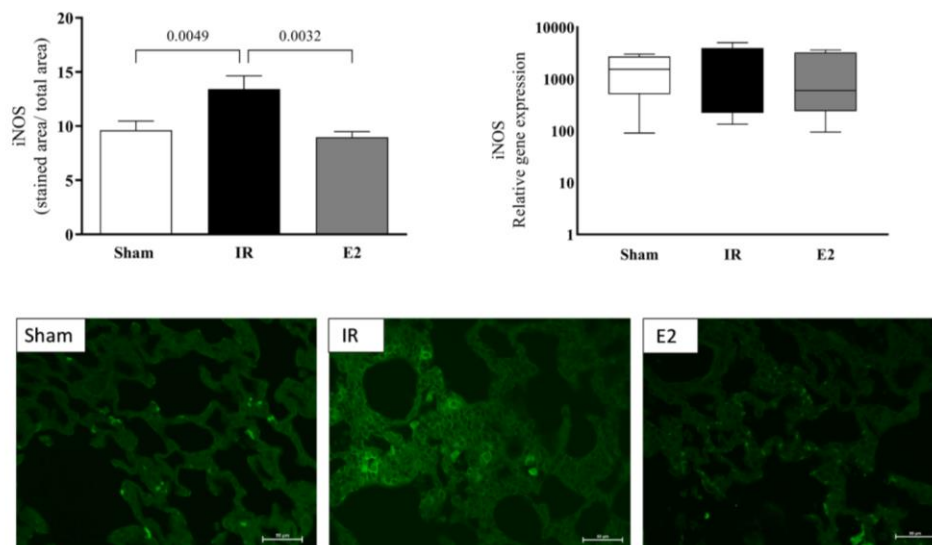


Fig. 4. Gene and protein expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS). Groups: sham (no I/R injury), IR (I/R injury), and E2 (I/R injury treated with 17 β -estradiol). Protein expression: Data are expressed as mean $\pm$ SEM from 5 photos/sample, 2 samples/animal, and 5 animals/group. P ANOVA = 0.0024. Gene expression: Data are expressed as the median and 95% percentile interval (n = 8 per group). P Kruskal-Wallis = 0.88. Photomicrographs magnification 200x.

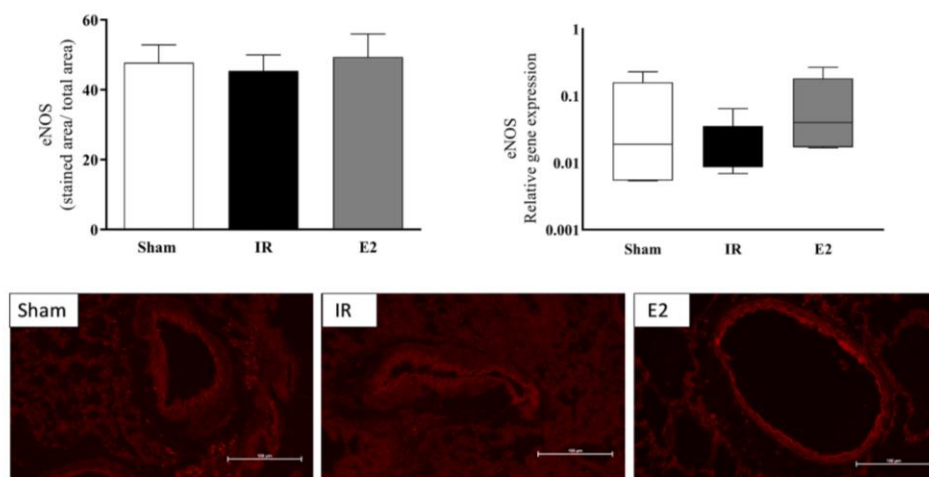


Fig. 5. Gene and protein expression of endothelial nitric oxide synthase. Groups: sham (no I/R injury), IR (I/R injury), and E2 (I/R injury treated with 17 β -estradiol). Protein expression: Data are expressed as mean $\pm$ SEM from 5 photos/sample, 2 samples/animal, and 5 animals/group. P ANOVA = 0.87. Gene expression: Data are expressed as the median and 95% percentile interval (n = 8 per group). P Kruskal-Wallis = 0.47. Photomicrographs magnification 400x.

the severity of edema elicited by I/R.

3.5. Analysis of nitric oxide enzymes and endothelin-1 in the lung tissue

To amplify the analysis of lung inflammatory status, lung expression of inducible nitric oxide synthase was evaluated by immunohistochemistry and gene expression. The results are shown in Fig. 4.

iNOS expression was augmented in the lungs of rats in the I/R group in comparison to the sham group; treatment with estradiol was able to avoid this. In relation to gene expression, all groups showed upregulated

iNOS expression, suggesting possible gene activation due to the surgical procedure and mechanical ventilation.

In relation to eNOS, neither protein levels nor gene expression differed between the groups (Fig. 5).

In contrast, ET-1 protein levels increased in the lungs of the I/R group, but no effect of estradiol was observed. ET-1 gene expression was unaltered by either the surgical procedure or treatment (Fig. 6).

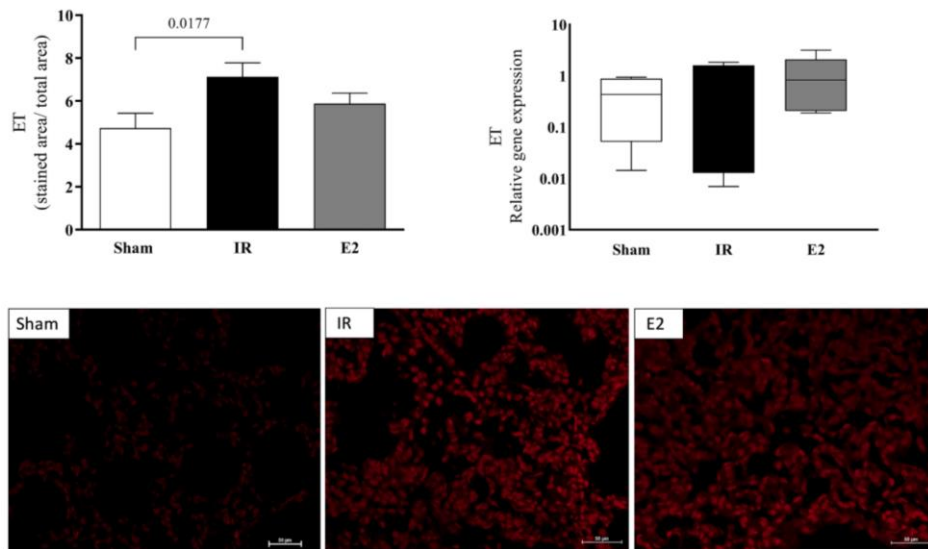


Fig. 6. Gene and protein expression of endothelin-1. Groups: sham (no I/R injury), IR (I/R injury), and E2 (I/R injury treated with 17 β -estradiol). Protein expression: Data are expressed as mean $\pm$ SEM from 5 photos/sample, 2 samples/animal, and 5 animals/group. P ANOVA = 0.054. Gene expression: Data are expressed as the median and 95% percentile interval (n = 8 per group). P Kruskal–Wallis = 0.30. Photomicrographs magnification 200x.

3.6. Quantification of inflammatory mediators in the serum, lung tissue, and their gene expression

As measured by ELISA in Fig. 7, there were higher serum concentrations of IL-1 β , IL-6, and IL-10 in the I/R group than in the sham group. Estradiol prevented this increase. To quantify the local generation of these interleukins, lung tissue homogenate supernatants were subjected to ELISA. IL-6 concentration was raised in the lungs of I/R rats with protective effects exerted by the treatment.

The inflammatory mediators gene expression analysis did only identified increased TNF- α gene expression in the I/R group, without effect of E2 treatment.

4. Discussion

The activation of systemic inflammation after aortic clamping is the main consequence of ischemia and reperfusion [12]. The ischemic period generates metabolic stress in areas affected by flow restriction, and during reperfusion, toxic metabolites are circulated throughout the whole system. Here, confirming the systemic inflammatory process caused by aortic clamping, we observed increased serum concentrations of IL-1 β , IL-6 and IL-10 in I/R rats. Previous studies using the aortic clamping model have evaluated the mesenteric and intestinal repercussions [12], medullary compromise [13], and alterations in coagulation and the liver [14]. However, it is important to highlight the systemic processes leading to priming and/or activation of nonimmune cell (such as epithelial/endothelial cells and immunocytes like neutrophils and macrophages), which cause lung inflammation/injury [15]. Acute lung injury (ALI) is a consequence of an ischemic insult and is notably observed shortly after reperfusion. The data presented in this study indicated that the experimental model of aortic I/R induced lung edema, leukocyte infiltration, and increased lung expression of iNOS and ET-1.

In the lungs, pulmonary micro-vessels and endothelial cells play an important role in enabling efficient gas exchange; to this end, permeability and vascular tone are maintained low. Of note, perfusion is

matched to ventilation by synthesis and release of several vasoactive compounds, including nitric oxide (NO) and ET-1 [16]. It is important to consider that the pulmonary circulation system is unique among the vascular beds in the human body, characterized by high flow, low resistance, and low pressure. Our results showed a transitory reduction of gas (CO₂ and O₂) exhalation during aortic ischemia, despite the fact that the animals were maintained under mechanical ventilation. This reduction during ischemia could be a result of blood flow redistribution in the upper vascular bed, including the lungs, which present a high capacity to recruit available vessels to accommodate an increase in flow [17]. During reperfusion, the gases normalized, and no additional effects were observed.

In this present project, the main objective was to investigate the modulatory effects of E2 on lung inflammation caused by aorta clamping. E2 effects after 2 h of reperfusion resulted mainly in the diminishing severity of edema and decreased iNOS expression, which prevents leukocyte infiltration. Acute lung injury and systemic inflammatory response following ischemic events are mediated by NO [18]. Using a model of intestinal ischemia and reperfusion, some authors suggested that the resultant disturbance in levels of constitutive nitric oxide synthase (cNOS) and iNOS activity could be one of the main causes of lung dysfunction [19]. Although NO is a potent smooth muscle relaxant and vasodilator, it can also act as an inflammatory mediator and toxin during reperfusion, since NO reacts with superoxide to produce peroxynitrite, a highly toxic oxidant [20]. Moreover, when iNOS expression increases, NO acts as a gas-free radical and aggravates cell injury and apoptosis [21]. In addition to increased iNOS expression, our data showed increased leukocyte infiltration in the BAL and lung parenchyma, indicating the establishment of lung inflammation. Activation of inducible NOS provides high levels of NO in an oxidative milieu, such as that generated by activated neutrophils adhering to the endothelium. High levels of NO would thus have a proinflammatory effect [18]. Our results from E2 treatment coincide with previous results showing that E2 acute treatment reduces iNOS activity and the consequent formation of free radical species in the lungs [22]. In addition, the combination of iNOS reduction, which protects ventilated mice against lung edema [23], and

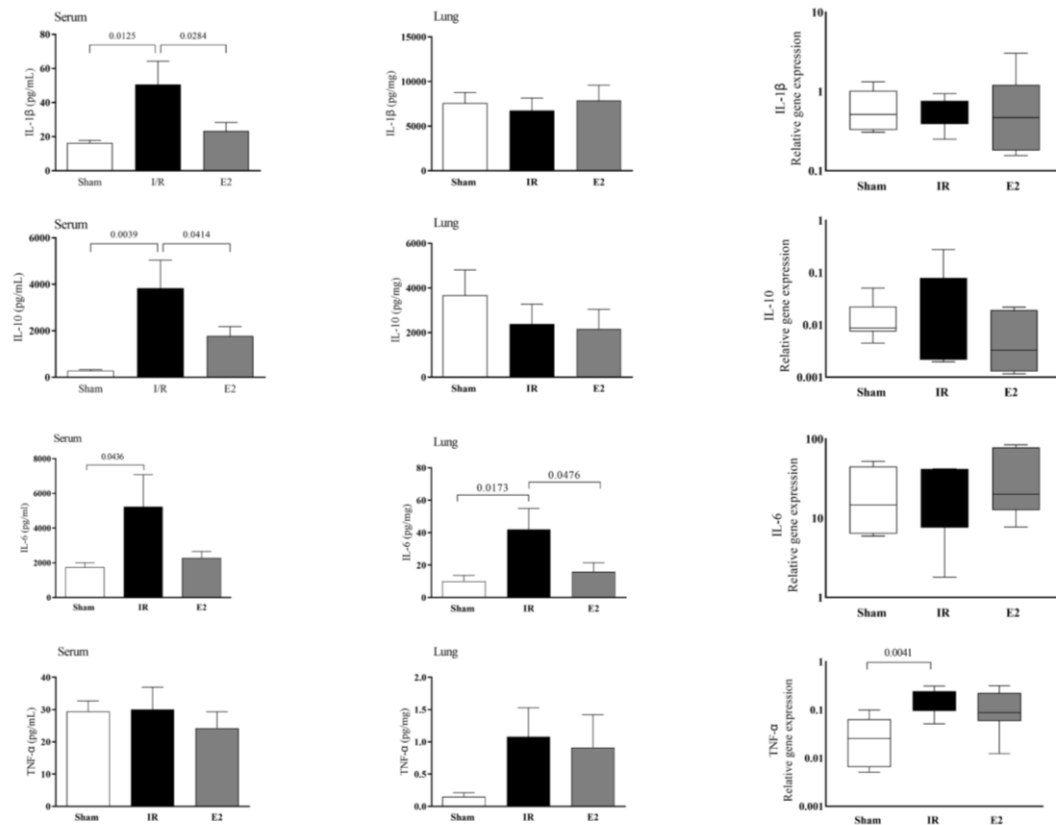


Fig. 7. IL-1 β , IL-6, IL-10, and TNF- α quantification. Interleukins concentration in serum samples (pg/mL) and tissue homogenates (pg/mg) and gene expression in the lungs. Groups: sham (no I/R injury), IR (I/R injury), and E2 (I/R injury treated with 17 β -estradiol) (n = 8 per group). IL-1 β : (Serum) P ANOVA = 0.03; (Lung) P ANOVA = 0.85; (Gene expression.) P Kruskal–Wallis: 0.96. IL-10: (Serum) P ANOVA = 0.013; (Lung) P ANOVA = 0.51; (Gene expression.) P Kruskal–Wallis: 0.093.

estradiol was able to prevent the increased expression of ET-1. It has been reported that estradiol can reduce ET-1 synthesis and influence its activity [24]. ET-1 is a vasoactive peptide that contributes to the development of inflammation by the aggregation of neutrophils and expression of adhesion molecules [25].

In parallel to oxidative stress, lung edema can result from alveolar epithelial damage, which results in increased tissue permeability and edema. Potential operative mechanisms of alveolar epithelial damage include cell death, loss of adequate cell junctions, changes in extracellular matrix (ECM) components, contact with epithelial cells, and changes in the communication between epithelial and immune cells [26]. An increase in pulmonary aortic pressure is also one of the causes of lung edema. Our I/R model confirmed the presence of edema by the wet/dry weight lung ratio and showed that estradiol treatment was able to prevent lung edema, contributing to reduced lung inflammatory status due to I/R. One important element influenced by estradiol in lung inflammatory response is the vascular endothelial growth factor (VEGF). VEGF overproduction leads to increased vascular permeability, which results in the leakage of plasma proteins, and inflammatory cells into the extravascular space, thereby contributing to edema [7]. In our study, VEGF was quantified in lung homogenates, but I/R concentration did not differ from sham group. Despite not being altered by I/R, estradiol reduced VEGF concentration in the lungs (Sham: 257.8 ± 60.14 ; I/R: 236.1 ± 66.26 ; E2: 80.36 ± 17.95 pg/mL/mg; p ANOVA = 0.06). This

reduction might be contributing to the reduction of the lung edema observed in the treated group.

Considering that I/R accounts for an imbalance between proinflammatory and anti-inflammatory mediators and neutrophil and endothelial cell activation, the prevention/reduction of lung leukocyte infiltration by estradiol can be considered a crucial factor for the maintenance of lung homeostasis. According to our results, aortic ischemia followed by reperfusion induces a higher influx of leukocytes into the lungs and airways. Pro- and anti-inflammatory signals that recruit and clear immune cells, respectively, are held in equilibrium by cross-talk between resident tissue and migratory cells during inflammation initiation [15]. When these processes advance through excessive sustained cell recruitment, unresolved inflammation can lead to lung damage. *In vivo* studies have shown that estrogen protects organ and tissue function by inhibiting neutrophil infiltration-mediated inflammation under pathological conditions, such as myocardial and intestinal ischemia reperfusion injury [10,27]. Moreover, E2 suppresses fMLP-induced neutrophil migration and superoxide production via the estrogen-receptor-mediated upregulation of MKP-2 expression and inhibition of ERK activation [28]. Considering the release of inflammatory mediators, E2 regulates immune function of the monocyte-macrophage system, especially the production of cytokines [29]. A previous study suggested that estradiol differentially regulates the systemic and lung release of cytokines induced by intestinal IR [7]. Our data confirm the

systemic influence of estradiol in the reduction of cytokine levels and identify its effects on the presence of IL-6 in the lungs. The analysis carried out 2 h after reperfusion showed the presence of this early-released cytokine in the lung tissue. Once the lung generation of cytokines persists for at least 24 h, we suggest that more time is necessary to investigate the release of late-released cytokines in our model.

Finally, despite various surgical adjuncts and pharmacological interventions, the absence of an effective method for the prevention and treatment of I/R injury remains a challenge for surgeons. Our study can be considered as a step towards using E2 to prevent local and remote inflammatory responses after descending thoracic aorta cross-clamping. Taken together, our data indicate that 17 β -estradiol might be a supplementary approach to address systemic processes and lung deterioration.

Author contributions

LFA and MNS designed and performed the study, analyzed the data, and wrote the manuscript. RAJR and MVS contributed to data collection and analysis. LFP contributed to data analysis and wrote the manuscript. CJC and ACBF designed the study, performed the study, analyzed the data, and wrote the manuscript.

Funding

This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo [FAPESP 2018/25759-3]. MVS is a scholarship holder of FAPESP 2020/11211-6 and FAPESP 2021/07455-0.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

Data will be made available on request.

References

- H.K. Eltzschig, C.D. Collard, Vascular ischaemia and reperfusion injury, *Br. Med. Bull.* 70 (2004) 71–86, <https://doi.org/10.1093/bmb/ldh025>, Erratum. In: *Br. Med. Bull.* 73–74 (2005) 139, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15494470>.
- S. Boateng, T. Sanborn, Acute myocardial infarction, *Dis. Mon.* 59 (2013) 83–96, <https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2012.12.004>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23410669>.
- M.J. Bown, M.L. Nicholson, P.R. Bell, R.D. Sayers, Cytokines and inflammatory pathways in the pathogenesis of multiple organ failure following abdominal aortic aneurysm repair, *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 22 (2001) 485–495, <https://doi.org/10.1053/ejvs.2001.1522>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11735196>.
- D.N. Moris, M.I. Kontos, E.I. Mantonakis, A.K. Athanasios, E.D. Spartalis, C.N. Bakoyiannis, G.P. Chrousos, S.E. Georgopoulos, Concept of the aortic aneurysm repair-related surgical stress: a review of the literature, *Int. J. Clin. Exp. Med.* 7 (2014) 2402–2412, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25356092>, PMC 4211742.
- J.L. Iglesias, J.L. LaNoüe, T.E. Rogers, L. Inman, R.H. Turnage, Physiologic basis of pulmonary edema during intestinal reperfusion, *J. Surg. Res.* 80 (1998) 156–163, <https://doi.org/10.1006/jsre.1998.5435>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9878307>.
- J. Villar, J. Blanco, R.M. Kacmarek, Acute respiratory distress syndrome definition: do we need a change? *Curr. Opin. Crit. Care.* 17 (2011) 13–17, <https://doi.org/10.1097/MCC.0b013e32834271fb>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21150586>.
- E.T. Fantozzi, A.C. Breithaupt-Faloppa, F.Y. Ricardo-da-Silva, S. Rodrigues-Garbin, D.C. Romero, A. da Silva Rodrigues, Y. Rizzo-Vasquez, W. Tavares-de-Lima, Estradiol mediates the long-lasting lung inflammation induced by intestinal ischemia and reperfusion, *J. Surg. Res.* 221 (2018) 1–7, <https://doi.org/10.1016/j.jss.2017.07.038>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29229114>.
- A. Bouman, M.J. Heineman, M.M. Faas, Sex hormones and the immune response in humans, *Hum. Reprod. Update.* 11 (2005) 411–423, <https://doi.org/10.1093/humupd/dmi008>, (Epub 2005 April 7), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15817524>.
- S.L. Klein, K.L. Flanagan, Sex differences in immune responses, *Nat. Rev. Immunol.* 16 (2016) 626–638, <https://doi.org/10.1038/nri.2016.90>.
- A.C. Breithaupt-Faloppa, E. Thais Fantozzi, D.C. Romero, A.D.S. Rodrigues, P.T. R. de Sousa, A. Lino dos Santos Franco, R.M. Oliveira-Filho, B. Boris Vargafitig, W. Tavares de Lima, Acute effects of estradiol on lung inflammation due to intestinal ischemic insult in male rats, *Shock.* 41 (3) (2014) 208–213.
- M.L. Zhang, H. Chen, Z. Yang, M.N. Zhang, X. Wang, K. Zhao, X. Li, N. Xiu, F. Tong, Y.X. Wang, 17 β -estradiol attenuates LPS-induced macrophage inflammation in vitro and sepsis-induced vascular inflammation in vivo by upregulating miR-29a-5p expression, *Mediators Inflamm.* 2021 (2021) 9921897, <https://doi.org/10.1155/2021/9921897>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34220338>, PMC 8211527.
- P.T. Rocha de Sousa, A.C. Breithaupt-Faloppa, C. de Jesus Correia, R.R. Simão, S.G. Ferreira, A.L. Fiorelli, L.F.P. Moreira, P. Sannomiya, 17 β -estradiol prevents mesenteric injury induced by occlusion of the proximal descending aorta in male rats, *J. Vasc. Surg.* 67 (2018) 597–606, <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2016.12.125>, (Epub 2017 April 4), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28385296>.
- L.P. Cavalcante, S.G. Ferreira, D.R. Pereira, S.R. Moraes, R. Simas, P. Sannomiya, A.C. Breithaupt-Faloppa, L.F.P. Moreira, Acute administration of oestradiol or progesterone in a spinal cord ischaemia-reperfusion model in rats, *Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg.* 26 (2018) 196–201, <https://doi.org/10.1093/icvts/ivx314>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29049608>.
- M.L.P. Sobral, R.R. Dias, C.D.J. Correia, R.D.S. Coutinho e Silva, L.F. da Anunciação, A.C. Breithaupt-Faloppa, L.F.P. Moreira, Protective effects of 17 β -estradiol on coagulation and systemic inflammation after total occlusion of the descending aorta in male rats, *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 61 (3) (2022) 666–674.
- M. Peri, J. Lomas-Neira, F. Venet, C.S. Chung, A. Ayala, Pathogenesis of indirect (secondary) acute lung injury, *Expert Rev. Respir. Med.* 5 (2011) 115–126, <https://doi.org/10.1586/ers.10.92>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21348592>, PMC 3108849.
- N.A. Maniatis, A. Kotanidou, J.D. Catravas, S.E. Orfanos, Endothelial pathomechanisms in acute lung injury, *Vasc. Pharmacol.* 49 (2008) 119–133, <https://doi.org/10.1016/j.vph.2008.06.009>, (Epub 2008 July 29), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18722553>, PMC 7110599.
- A. Huertas, C. Guignabert, J.A. Barberà, P. Bärtsch, J. Bhattacharya, S. Bhattacharya, M.R. Bonsignore, L. Dewachter, A.T. Dinh-Xuan, P. Dorfmueller, M. T. Gladwin, M. Humbert, T. Kotsimbos, T. Vassilakopoulos, O. Sanchez, L. Savale, U. Testa, M.R. Wilkins, Pulmonary vascular endothelium: the orchestra conductor in respiratory diseases: highlights from basic research to therapy, *Eur. Respir. J.* 51 (2018) 1700745, <https://doi.org/10.1183/13993003.00745-2017>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29545281>.
- G. Cavriani, R.M. Oliveira-Filho, A.G. Trezena, Z.L. da Silva, H.V. Domingos, M. J. de Arruda, S. Jancar, W. Tavares de Lima, Lung microvascular permeability and neutrophil recruitment are differently regulated by nitric oxide in a rat model of intestinal ischemia-reperfusion, *Eur. J. Pharmacol.* 494 (2004) 241–249, <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.04.048>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15212981>.
- S. Cuzzocrea, P.K. Chatterjee, E. Mazzon, L. Dugo, A. De Sarro, F.A. Van de Loo, A. P. Caputi, C. Thiemermann, Role of induced nitric oxide in the initiation of the inflammatory response after postischemic injury, *Shock.* 18 (2002) 169–176, <https://doi.org/10.1097/00024382-200208000-00014>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12166782>.
- E. Barocelli, V. Ballabeni, P. Ghizzardi, F. Cattaruzza, S. Bertoni, C.A. Lagrasta, M. Impicciatore, The selective inhibition of inducible nitric oxide synthase prevents intestinal ischemia-reperfusion injury in mice, *Nitric Oxide.* 14 (2006) 212–218, <https://doi.org/10.1016/j.niox.2005.11.006>, (Epub 2006 February 28), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16504557>.
- T. Zhu, Q. Yao, W. Wang, H. Yao, J. Chao, iNOS induces vascular endothelial cell migration and apoptosis via autophagy in ischemia/reperfusion injury, *Cell. Physiol. Biochem.* 38 (2016) 1575–1588, <https://doi.org/10.1159/000443098>, (Epub 2016 April 18), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27082814>.
- S. Cuzzocrea, S. Santagati, L. Sautebin, E. Mazzon, G. Calabrò, I. Serrano, A. P. Caputi, A. Maggi, 17 β -estradiol anti-inflammatory activity in carrageenan-induced pleurisy, *Endocrinology.* 141 (2000) 1455–1463, <https://doi.org/10.1210/endo.141.4.7404>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10746650>.
- X. Peng, R.E. Abdulnour, S. Sammani, S.F. Ma, E.J. Han, E.J. Hasan, R. Tuder, J. G. Garcia, P.M. Hassoun, Inducible nitric oxide synthase contributes to ventilator-induced lung injury, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 172 (2005) 470–479, <https://doi.org/10.1164/rccm.200411-1547OC>, (Epub 2005 June 3), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15937288>, PMC 2718528.
- R.K. Dubey, E.K. Jackson, P.J. Keller, B. Imthurn, M. Rosselli, Estradiol metabolites inhibit endothelin synthesis by an estrogen receptor-independent mechanism, *Hypertension.* 37 (2001) 640–644, <https://doi.org/10.1161/01.hyp.37.2.640>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11230349>.
- A. Kowalczyk, P. Kleniewska, M. Kolodziejczyk, B. Skibka, A. Goraca, The role of endothelin-1 and endothelin receptor antagonists in inflammatory response and sepsis, *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)* 63 (2015) 41–52, <https://doi.org/10.1007/s00005-014-0310-1>, (Epub 2014 October 7), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25288367>, PMC 4289534.
- R.L. Zemans, M.A. Matthay, Bench-to-bedside review: the role of the alveolar epithelium in the resolution of pulmonary edema in acute lung injury, *Crit. Care.* 8 (2004) 469–477, <https://doi.org/10.1186/cc2906>, (Epub 2004 June 30), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15566618>, PMC 1065044.
- E.A. Booth, B.R. Lucchesi, Estrogen-mediated protection in myocardial ischemia-reperfusion injury, *Cardiovasc. Toxicol.* 8 (2008) 101–113, <https://doi.org/10.1007/s12012-008-9000-0>.

L.F. da Anunciação et al.

International Immunopharmacology 113 (2022) 109311

- 10.1007/s12012-008-9022-2. (Epub 2008 August 6). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18683081>.
- [28] P. Zhang, Y. Fu, J. Ju, D. Wan, H. Su, Z. Wang, H. Rui, Q. Jin, Y. Le, R. Hou, Estradiol inhibits fMLP-induced neutrophil migration and superoxide production by upregulating MKP-2 and dephosphorylating ERK, *Int. Immunopharmacol.* 75 (2019), 105787, <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.105787>. (Epub 2019 August 8). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31401382>.
- [29] A.P. Miller, W. Feng, D. Xing, N.M. Weathington, J.E. Blalock, Y.F. Chen, S. Oparil, Estrogen modulates inflammatory mediator expression and neutrophil chemotaxis in injured arteries, *Circulation*. 110 (2004) 1664–1669, <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000142050.19488.C7>. (Epub 2004 September 7). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15353495>.

Manuscripto submetido

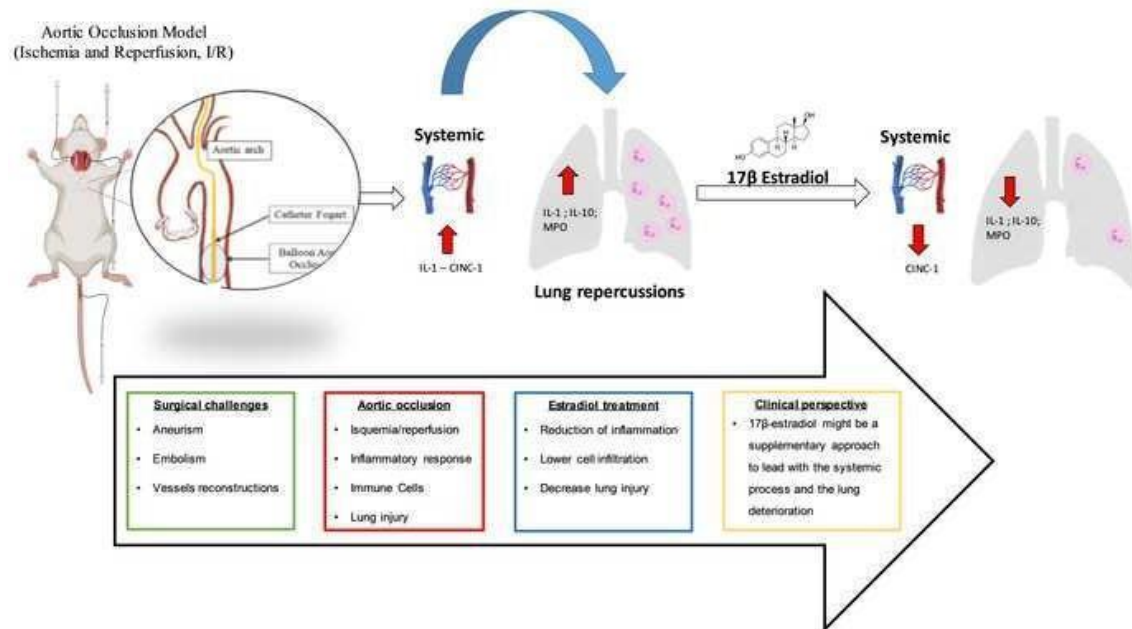
European Journal of Cardio-Thoracic Surgery
Evaluation of the therapeutic effects of estradiol on the
systemic inflammatory response and on lung injury caused by
the occlusion of the proximal descending aorta in male rats.

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	EJCTS-2023-100256R1
Full Title:	Evaluation of the therapeutic effects of estradiol on the systemic inflammatory response and on lung injury caused by the occlusion of the proximal descending aorta in male rats.
Article Type:	Original Article
Order of Authors:	Marcelo Nunes de Sousa
	Lucas Ferreira da Anunciação
	Pedro Luiz Zonta de Freitas
	Fernanda Yamamoto Ricardo-da-Silva
	Luiz Felipe Pinho Moreira
	Cristiano Jesus Correia
	Ana Cristina Breithaupt-Faloppa
Corresponding Author:	Cristiano Jesus Correia, PhD Laboratório Cirúrgico de Pesquisa Cardiovascular (LIM11), Instituto do Coração (INCOR), Hospital das Clínicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo Sao Paulo, Sao Paulo BRAZIL
Corresponding Author E-Mail:	cristiano.correia@hc.fm.usp.br
Section/Category:	Aorta and vascular surgery
Manuscript Classifications:	Lung - Inflammatory/infective disease; Basic research vascular; Cytokines; Ischemia/Reperfusion; Experimental - Vascular; Experimental models

Author Comments:	2.Banz Y, Rieben R, Zobrist C, Meier P, Shaw S, Lanz J, Carrel T, Berdat P. Addition of dextran sulfate to blood cardioplegia attenuates reperfusion injury in a porcine model of cardiopulmonary bypass. <i>Eur J Cardiothorac Surg</i>. 2008 Sep;34(3):653-60. 14.Sobral MLP, Dias RR, Correia CJ, Coutinho E Silva RDS, da Anunciação LF, Breithaupt-Faloppa AC, et al. Protective effects of 17β-oestradiol on coagulation and systemic inflammation after total occlusion of the descending aorta in male rats. <i>Eur J Cardiothorac Surg</i> 2022; 61(3):666-674. I/R- injury represents an important cause of postoperative morbidity with high mortality, and may lead to respiratory failure. From a prophylaxis perspective, estradiol was used prior to the ischemic insult with positive results, where E2 reduced ischemia/reperfusion injury, normalized platelet response and maintained intestinal integrity, including reduction of fatal events. In this current work, we sought a new approach, estradiol was used here as a treatment after the onset of ischemia, already one hour into the reperfusion period. In fact, our results showed that the E2 treatment performed late, already in the period of reperfusion, was able to modulate the inflammatory response, reducing MPO, IL-1β, MMP-9 and increasing lung vascular expression of eNOS. Taken together, our data indicate that 17β-estradiol might be a supplementary approach to lead with the systemic process and the lung deterioration.
Abstract:	OBJECTIVES: Ischemia and reperfusion-induced microvascular dysfunction is a serious problem encountered during a variety surgical procedures, leading to systemic inflammation and affecting remote organs, specially the lungs. 17β-estradiol reduces pulmonary repercussions from various acute lung injury forms. Here we focused on the 17β-estradiol therapeutic effects after aortic ischemia and reperfusion by evaluating lung inflammation.
Order of Authors (with Contributor Roles):	Marcelo Nunes de Sousa (Data curation; Formal analysis; Investigation; Writing – original draft)
	Lucas Ferreira da Anunciação (Data curation; Formal analysis; Investigation; Methodology; Writing – review & editing)
	Pedro Luiz Zonta de Freitas (Data curation; Formal analysis; Investigation; Methodology; Writing – review & editing)
	Fernanda Yamamoto Ricardo-da-Silva (Data curation; Formal analysis; Investigation; Methodology; Writing – review & editing)
	Luiz Felipe Pinho Moreira (Conceptualization; Formal analysis; Validation; Visualization; Writing – review & editing)
	Cristiano Jesus Correia (Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Investigation; Methodology; Writing – original draft; Writing – review & editing)
	Ana Cristina Breithaupt-Faloppa (Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Project administration; Resources; Supervision; Writing – original draft; Writing – review & editing)

Central image



1 ORIGINAL ARTICLE

2 Evaluation of the therapeutic effects of estradiol on the systemic inflammatory response and on lung

3 injury caused by the occlusion of the proximal descending aorta in male rats.

4 Estradiol decreases lung injury after aortic I/R

5 Marcelo Nunes de Sousa MD¹, Lucas Ferreira da Anunciação BS¹, Pedro Luiz Zonta de Freitas BS¹,

6 Fernanda Yamamoto Ricardo-da-Silva PhD¹, Luiz Felipe Pinho Moreira MD Ph.D¹, Cristiano Jesus Correia

7 Ph.D¹, Ana Cristina Breithaupt-Faloppa Ph.D¹.

8

9 ¹Laboratorio de Cirurgia Cardiovascular e Fisiopatologia da Circulação (LIM-11), Instituto do Coração

10 (INCOR), Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

11 Word Count: 2991

12

13 Corresponding author and post publication corresponding author: Cristiano de Jesus Correia, PhD,

14 Laboratório de Cirurgia Cardiovascular e Fisiopatologia da Circulação (LIM/11) - HC-FMUSP,

15 Universidade de São Paulo. Av. Dr. Arnaldo, 455 2º andar - sala 2146 - 01246-903 São Paulo, Brazil ,E-

16 mail: cristiano.correia@hc.fm.usp.br

17 ABSTRACT

18 OBJECTIVES: Ischemia and reperfusion-induced microvascular dysfunction is a
19 serious problem
20 encountered during a variety surgical procedures, leading to systemic
21 inflammation and affecting
22 remote organs, specially the lungs. 17β -estradiol reduces pulmonary repercussions
23 from various acute
24 lung injury forms. Here we focused on the 17β -estradiol therapeutic effects after
25 aortic ischemia and
26 reperfusion by evaluating lung inflammation.

23 METHODS: 24 Wistar rats were submitted to ischemia and reperfusion by
24 insufflation a 2F catheter in
25 thoracic aorta for 20min. Reperfusion took 4h and 17β -estradiol (280 $\mu\text{g/kg}$, i.v.)
26 was administered after
27 1h of reperfusion. Sham-operated rats were controls. Bronchoalveolar lavage was
28 performed and lung
29 samples were prepared for histopathological analysis, tissue culture (explant). IL-
30 1β , IL-10 and TNF- α
31 were quantified.

28 RESULTS: After ischemia and reperfusion, higher number of leukocytes in
29 bronchoalveolar lavage were
30 reduced by 17β -estradiol. The treatment also decreased leukocytes in lung tissue.
31 Ischemia and
32 reperfusion increased lung myeloperoxidase expression, with reduction by 17β -
estradiol. Serum CINC-1
and IL- 1β increased after ischemia and reperfusion and 17β -estradiol decreased
CINC-1. Ischemia and
reperfusion increased IL- 1β and IL-10 in lung explants, reduced by 17β -estradiol.

33 CONCLUSIONS: Our results showed that 17 β -estradiol treatment performed in
the period of reperfusion,
34 modulated the systemic response and the lung repercussions of ischemia and
reperfusion by thoracic
35 aortic occlusion. Thus, we can suggest that 17 β -estradiol might be a
supplementary approach leading
36 the lung deterioration after aortic clamping in surgical procedures.

37 **Keywords:** ischemia/reperfusion; rat. aortic occlusion; estradiol; lung injury;
leukocyte infiltration.

38

39 ABBREVIATIONS

40 ADP - Adenosine Diphosphate

41 BAL – Bronchoalveolar Lavage

42 BSA – Bovine Serum Albumine

43 CINC - Cytokine-induced neutrophil chemoattractant

44 DAP - Distal Arterial Pressure

45 DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium

46 E2 - 17 β -Estradiol

47 EDTA - Ethylenediaminetetraacetic Acid

48 ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

49 eNOS - Endothelial Nitric Oxide Synthase

50 ET - Endothelin

-
- 51 GAPDH - Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
- 52 HTAB - Hexadecyltrimethylammonium Bromide
- 53 I/R – Ischemia and Reperfusion
- 54 ICAM-1 - Intercellular Adhesion Molecule 1
- 55 IL – Interleukin
- 56 KW – Kruskal-Wallis
- 57 iNOS - Inducible Nitric Oxide Synthase
- 58 MMP - Metalloproteinase
- 59 MPO - Myeloperoxidase
- 60 PAP – Proximal Arterial Pressure
- 61 PBS – Phosphate Buffered Saline
- 62 PRP - Platelet-Rich Plasma
- 63 TBS-T – Tris Buffered Saline – Tween 20
- 64 TNF - Tumor necrosis factor
- 65 VCAM – Vascular Cell Adhesion Molecule
- 66 WBC – White Blood Cell
- 67

68 INTRODUCTION

69 Ischemia-reperfusion (I/R) due to aortic clamping activates inflammatory pathways
resulting in a
70 systemic inflammatory response syndrome and in injury to distant organs such as lungs
and kidneys ¹.
71 I/R- injury represents an important cause of postoperative morbidity with high mortality,
and may lead
72 to respiratory failure ². In the lungs, inflammatory mediators release and increase in
hydrostatic
73 microvascular pressure, elevate the pulmonary microvascular permeability, resulting in
pulmonary
74 edema ³. In parallel to increased microvascular permeability, there is leukocyte
infiltration and local
75 synthesis and action of proinflammatory mediators. Activated neutrophils infiltrate the
lung tissue and
76 contribute to the acute pulmonary microvascular injury associated to high mortality rates
⁴. This lung
77 inflammatory response generated by ischemia/reperfusion continues for a long period
after perfusion
78 reestablishment and maintain the release of proinflammatory mediators and danger
signals ⁵.
79 Some previous studies have demonstrated that female sex hormones modulate the
inflammatory
80 response, showing that they can affect non-specific immune responses by modulating
neutrophil
81 numbers and function and also the production of cytokines and chemokines by innate
immune cells ⁶. A
82 natural endogenous metabolite of 17- β estradiol has been shown to upregulate annexin
A1 expression
83 and attenuate IR-induced lung edema, neutrophil infiltration, inflammatory cytokine
production,
84 oxidative stress, lung cell apoptosis, tight junction protein disruption, MAPK activation,
and nuclear
85 translocation of NF- κ B in the lung tissue ⁷. A recent study of our group indicates
protective effects of

17 β - estradiol after aortic ischemia/reperfusion in the lungs when administered before ischemia induction⁸. Additionally, 17 β -estradiol is known for having immunomodulatory properties, reducing reperfusion injury⁹. Besides, the prophylactic treatment with 17 β -estradiol is able to avoid fatal occurrences and preserves mesenteric perfusion and intestinal integrity after ischemia/reperfusion induced by aortic occlusion¹⁰. Thus, the aim of this investigation is to evaluate the application of 17 β -estradiol during reperfusion after aortic clamping with specific focus on the lung injury and systemic inflammation.

93

94 MATERIALS AND METHODS

95 Ethical statement

96 Male Wistar rats (250-350 g; n = 24), were maintained with free access to food and water. The experimental protocol was approved by Sao Paulo University Medical School Animal Subject Committee and received number SDC 4696/18/047. All rats received humane care in compliance with the "Principles of Laboratory Animal Care" from the National Society for Medical Research and the 'Guide for the Care, and the "Use of Laboratory Animals" prepared by the Institute of Laboratory Animal Resources, published by the National Institute of Health (NIH Publication No. 86-23, revised 1996). The study focused on male rats due to their higher susceptibility to the model.

103 Study groups

104 The randomized study groups were as follows: (n=8): *Sham*- rats surgically manipulated without I/R

- 105 injury induction; 2) I/R (n=8): rats subjected to occlusion of the left descending aorta for 20 min followed
- 106 by 240 min of reperfusion; 3) E2(n=8): rats subjected to occlusion of the left descending aorta for 20 min
- 107 followed by 240 min of reperfusion and treated with 17 β -estradiol (280 μ g/kg, intravenous) 60 minutes
- 108 after starting the reperfusion period.

109 Ischemia/Reperfusion Model

- 110 The animals were anesthetized with 5 % isoflurane in a closed glass chamber. After intubation,
- 111 mechanical ventilation was defined at a tidal volume of 10 mL/kg, frequency of 70 breaths/min, and
- 112 oxygen fraction of 60 % (Harvard Apparatus, Inc., Holliston, MA, USA). All animals were monitored
- 113 throughout the whole experimental time with a catheter inserted cranially in the carotid artery for
- 114 proximal arterial pressure (PAP) and a second catheter was inserted in caudal ventral artery for distal
- 115 arterial pressure (DAP).
- 116 The I/R injury was induced following the model by Rocha de Sousa et al. (2018)¹⁰. Ischemia was
- 117 confirmed by observing DAP mean at approximately 10 mmHg and maintained for 20 min, followed by
- 118
- 119 240 min of reperfusion. During reperfusion, animals received a 0.9% saline solution as a volume
- 120 replacement at 10 mL/kg/h. At the end of the experimental period, under anesthesia, the animals were
- 121 euthanized by exsanguination via the abdominal aorta. Samples of blood and lung tissue were stored
- 122 for future analysis.

123 Determination of plasma concentration of estradiol and testosterone:

124 Blood samples were used to quantify the hormones with the use of Elisa kits (Cayman Chemicals, USA).

125 The protocol proposed by the manufacturer was executed.

126 White blood cell (WBC) and platelet counts

127 Blood samples (20 μ L) were withdrawn from the tip of the tail, and WBC and platelet numbers were

128 obtained at the beginning (Initial; before surgery manipulation) and at the end of experiment (Final; 240

129 min), using an automatic hematologic counter (Mindray BC 2800 Vet, Shenzhen, China).

130 Bronchoalveolar lavage

131 After euthanasia, the lungs were flushed with DMEM (10 mL). The obtained bronchoalveolar lavage

132 (BAL) media was centrifuged (200 x *g* for 10 min at 15 °C) and the resulting cell pellet was resuspended

133 in PBS (1 mL). The cell suspensions were analyzed by an automatic hematology analyzer (Mindray BC

134 2800 Vet, Shenzhen, China).

135 Histopathological analyses

136 Lung fragments were fixed in formalin, and paraffin embedded. Sections (4 μ m) were stained with

137 hematoxylin/eosin then digitalized. Tissue regions (n = 5 per group, two sections per animal, five areas

138 per section) were randomly analyzed by two researchers (blinded for the groups) for leukocyte infiltrate

139 and hemorrhage with NIS-Elements Software Basic Research (Nikon, Japan). The air space area was

140 disconsidered and the leukocyte number reported in cells/mm² of lung tissue.

141 Determination of myeloperoxidase activity

142 The pulmonary vascular bed was perfused with 20 ml of PBS through a cannula inserted
into the
143 pulmonary artery. Tissues were weighed and homogenized in 3 ml/g of phosphate buffer
pH 6.0
144 containing 0.5% hexadecyl-trimethyl-ammonium bromide (HTAB) and 5 mM
ethylenediamine
145 tetraacetic acid (EDTA) (gentleMACS™ Dissociator, Miltenyi Biotec, Germany).
Samples were
146 centrifuged at 453 x g for 15 min at 4°C, and the supernatant obtained was then used to
determine MPO
147 activity. The reading was performed in a spectrophotometer at a wavelength of 450 nm.

148 Isolated Tissue Culture (explant)

149 Tissue culture was performed according to Proust et al. (2003)¹¹. Lung fragments were
incubated for 24h
150 in a humid atmosphere of 95% O₂ and 5% CO₂, at 37°C in DMEM (Dulbecco's Modified
Eagle's Medium,
151 Sigma-Aldrich, USA). The supernatants were collected and stored at -80°C until analysis
and the
152 fragments were dehydrated and weighed.

153 Platelet Aggregation

154 For the platelet aggregation test, blood samples were collected in a tube with 3.2%
sodium citrate and
155 centrifuged for 10 minutes at 200 x g to obtain platelet-rich plasma (PRP), which was
used for the assay
156 in an aggregometer (EasyAgreg) using ADP at a concentration of 10 µM as an agonist.

157 Determination of serum and explant inflammatory mediators

158 Cytokine-induced neutrophil chemoattractant 1 (CINC-1), Interleukin (IL)-1β, IL-10 and
Tumor necrosis
159 factor-α (TNF-α), were quantified in serum aliquots using ELISA kits (R&D Systems,
USA), in accordance

160 to manufacturer's instructions. Explant samples were analyzed for IL-1 β , IL-10 and TNF- α presence (R&D
 161 Systems, USA).
 162 Endothelial adhesion molecules (ICAM-1 and VCAM), endothelial nitric oxide synthase (eNOS),
 163 *Inducible nitric oxide synthase (iNOS), endothelin-1 (ET), myeloperoxidase (MPO) and*
 164 metalloproteinase-9 (MMP-9) expression in the lungs
 165 The left lung was expanded with optimal cutting temperature media and snap frozen in nitrogen-hexane
 166 solution. Lung cryosections (10 μ m) were fixed in cold acetone for 10 min. Endogenous peroxidase
 167 blocking (H₂O₂, 2%) were conducted, followed by blocking of nonspecific sites with albumin rich solution.
 168 The sections were incubated at 4°C overnight with primary antibodies in TBS-T/BSA: MPO, ICAM-1,
 169 VCAM and MMP-9 immunodetection, primary antibodies (Boster, 1:100). For eNOS, iNOS and
 170 endothelin-1 immunodetection, primary antibodies (Abcam. 1:100). After secondary antibodies (HRP-
 171 conjugated) and peroxidase substrate incubation, analyses were performed using an image acquisition
 172 system with a DS-Ri1 digital camera (Nikon, Tokyo, Japan) and using NIS-Elements-BR (Nikon) software.

173 Gene expression

174 Lung RNA extraction (mirVana kit; Ambion, Carlsbad, CA, USA) and cDNA transcription (High Capacity
 175 Reverse transcriptase kit; Applied Biosystems) were evaluated by real-time PCR (Step One Plus; Applied
 176 Biosystems, CA, USA), applying primers: GAPDH (Rn01775763_g1*), β -actin (Rn00667869_m1*), eNOS
 179 (Rn02132634_s1*), endothelin 1 (Rn00561129_m1*), iNOS (Rn00561646_m1*), ICAM-1
 180 (Rn005642227_m1*), VCAM (Rn00563627_m1*), MMP-9 (Rn00579162_m1*) (Taqman[®], Applied

181 Biosystems) and IL-1 β (SYBR[®]Green, RN IL-1 β fw 5'-
CAGCAATGGTCGGGACATAGTT-3' and RN IL-1 β rv 5'-
182 GCATTAGGAATAGTGCAGCCATCT-3'), IL-10 (SYBR[®]Green, RN IL-10 fw 5'-
GCAACAGCTCAGCGCATCT-3'
183 and RN IL-10 rv 5'-ACAAACTGGTCACAGCTTTTCGA-3') and TNF- α (SYBR[®]Green,
RN TNF- α fw 5'-
184 AGGCTGTCGCTACATCACTGAA-3' and RN TNF- α rv 5'-
TGACCCGTAGGGCGATTACA-3') (SYBR[®]Green,
185 Invitrogen).

186 Statistical Analysis

187 All data are presented as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM) or as median and
interquartile
188 interval. Data were analyzed using Kruskal-Wallis test followed by a post-hoc Dunn test
adjusted for
189 multiple comparisons. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism
Software v.9
190 (GraphPad Software Inc, California).

191

192 RESULTS

193 Hormonal variations triggered by aortic I/R and estradiol treatment

194 Estradiol concentration was analyzed after 4h of reperfusion as shown in Figure 1A.
Sham and I/R groups
195 had a low concentration of E2. The E2 treated showed a significant increase in the serum
concentration
196 of estradiol, reaching supraphysiological therapeutic concentrations. Serum
concentration of
197 testosterone is shown in Figure 1B. Androgen was found in higher concentration in
animals submitted
198 to I/R and estradiol treatment was able to reduce it (Figure 1).
199 In parallel to sex hormones, corticosterone was quantified (Figure 1C), we did not find
significant
200 differences among the groups.

201 White blood cell counts

- 202 The number of circulating leukocytes is presented in Figure 2A. The differential analysis indicated that
- 203 there is an increase in final granulocytes number of I/R group in comparison to initial values (Figure 2B).
- 204 No significant differences were found among the groups.

205 Effects of the aortic occlusion model in the number of circulating platelets and platelet aggregation

- 206 I/R group decreased plasma platelet numbers compared to the Sham, and estradiol treatment increase
- 207 it (Figure 2C). Despite the reduction on platelets, no differences were found in aggregation after I/R
- 208 (Figure 2D). However, E2 exerted anti-aggregation effects.

209 Inflammatory cells infiltration to the lungs and airways after aortic IR

- 210 In order to evaluate the cellular infiltrate in the lung parenchyma, we performed the histological analysis
- 211 of the lungs. The estradiol treatment during reperfusion was able to reduce the presence of
- 212 polymorphonuclear cells (Figure 3A and C).
- 213 The cellular component of inflammation was also investigated in the lung airways by means of cell
- 214 recovery after bronchoalveolar lavage. Despite no significant differences between Sham and IR group, a
- 215 reduction in cellularity was observed in the treatment group (Figure 3B).

216 Myeloperoxidase (MPO) expression and activity in lung tissue

- 217 With the aim of analyzing the presence/activation of neutrophils more specifically in lung tissue, we
- 218 performed the analysis of myeloperoxidase expression, in addition to performing enzyme activity assay.
- 219 The results are shown in Figure 3. Both analysis indicated an increase in the presence of neutrophils in

220 the lungs of I/R animals (Figure 3D, E and F). E2 treatment was able to reduce the
number of neutrophils

221 and with a slight reduction in their activity.

222 **Inflammatory Mediators in Serum**

223 There was an increase in CINC-1 and IL-1 β concentration in the I/R group and a decrease
of CINC-1 in

224 the treated group after reperfusion period (Table 1). The anti-inflammatory cytokine IL-
10 increased in

225 the treated group (E2), in relation to I/R.

226 **Quantification of the Inflammatory Mediators in lung culture medium (explant) and analysis by RT-**

227 ***PCR of its gene expression***

228 There was an increase of cytokines IL-1 β and IL-10 after I/R in relation to the Sham
(Figure 4). Besides,

229 the data point to higher lung gene expression of IL-1 β in the IR group in relation to the
Sham, with an

230 effect of the treatment reducing the gene expression.

231 **Analysis of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) protein and gene expressions**

232 There was a reduction of eNOS in the pulmonary vessels of I/R group rats. E2 treatment
led to an

233 increase in the enzyme vascular expression (Figure 5). Regarding the gene expression of
eNOS, we did

234 not observe changes among the groups.

235 **Analysis of endothelial adhesion molecules (ICAM-1 and VCAM) protein and gene expressions**

236 There was an increase of protein expression of ICAM-1 and VCAM in the I/R group in
relation to Sham.

237 In relation to ICAM-1 gene expression, all groups were upregulated in relation to the
reference (non-

238 handled rats). VCAM gene expression did not alter significantly (Figure 6).

239 Analysis of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) protein and gene expressions

240 There was an increase in MMP-9 protein expression in the I/R group and an upregulation in the

241 pulmonary gene expression of MMP-9 in all groups in relation to the reference (non-handled rats)

242 (Figure 7). The treated group showed reduced MMP-9 protein expression in the lungs.

243

244 DISCUSSION

245 Despite the large number of studies investigating the effects of the tissue blood supply deprivation and

246 its functional consequences, cardiovascular diseases initiated by local or systemic tissue ischemia

247 continue to be the main cause of death in the United States and Europe ¹². Studies ¹³⁻¹⁴, however, have

248 made it evident that reperfusion after an ischemic event may place the affected organs at risk of further

249 cell necrosis and reduce function recovery, thus bringing a concept of lethality to the restoration of

250 blood flow characteristic of the ischemia and reperfusion (I/R) syndrome. Ischemia and reperfusion

251 syndrome has as characteristics accumulation of neutrophils in the lungs and increased microvascular

252 permeability ^{2,12}. This I/R-induced microvascular dysfunction is currently a serious problem encountered

253 during a variety of surgical procedures and there is no consensus on a specific therapeutic agent.

254 Gender is considered an important factor in the prognosis of patients with organic stress and female sex

255 hormones play a role in inflammation. Study from Fantozzi et al. (2018)⁵ suggests that estradiol

256 differentially regulates the systemic and lung release of cytokines induced by I/R, where, like in males,

257 the low levels of estradiol induced by the removal of the ovaries increases the generation/release of

258 inflammatory mediators. Here, we addressed the anti-inflammatory effects of estradiol on
pulmonary

259 injury caused by an aortic occlusion model in males. In this model, the lungs are not
directly affected by

260 ischemia, the repercussions are resultant of the systemic dissemination of toxic products
during

261 reperfusion. Our results point to the activation of a lung inflammatory response,
characterized mainly

262 by leukocyte infiltration with increased MPO activity, higher endothelial adhesion
molecules and MMP-

263 9 expression, local lung release of cytokines and decrease of eNOS expression.

264 From a prophylaxis perspective, estradiol was used prior to the ischemic insult with
positive results,

265 where E2 reduced ischemia/reperfusion injury, normalized platelet response and
maintained intestinal

266 integrity, including reduction of fatal events ^{9,10,15}.

267 In this current work, we sought a new approach, estradiol was used here as a treatment
after the onset

268 of ischemia, already one hour into the reperfusion period. In a recent work, Ricardo-da-
Silva et al

269 (2021)¹⁶, using a superior mesenteric artery occlusion model and treating the animals with
estradiol

270 thirty minutes after the ischemic injury, demonstrate that estradiol improved intestinal
motility,

271 reduced intestinal barrier leakage and enhanced eNOS and ET expression.

272 Prolonged visceral ischemia due to aortic cross-clamping not only causes neutrophil
activation and leads

273 to adhesion molecule expression, but it is also related to mortality from multiple organ
failure ¹⁷.

274 Activated leukocytes from the ischemic tissue may re-enter the circulation during
reperfusion. These

275 cells have been implicated as effectors of I/R-induced remote organ injury ¹⁸⁻²⁰. In males,
high

276 testosterone levels induce neutrophil recruitment ²¹. Here, the testosterone was found
elevated after

277 I/R. Blood analysis showed a significant increase in granulocytes in the I/R group
compared to Sham and

278 the treatment with estradiol was able to reduce testosterone and partially revert
granulocytes increase.

279 Estradiol reduced the presence of granulocytes in the lung parenchyma, and also in
bronchoalveolar

280 lavage recovered fluid. Regarding the mechanisms modulated by estradiol treatment to
reduce cell

281 mobilization, we focused on adhesion molecules. There was increased ICAM-1 protein
expression with

282 slight reduction by estradiol. Adhesion molecules act as receptors, mediating cell-to-cell
interactions,

283 and once associated with the cell cytoskeleton and proteins can initiate intracellular
signaling events

284 after specific and local cues ^{22,23}.

285 E2 reduced the number of neutrophils in the lungs and tended to reduce their activity.
Adding to, we

286 analysed MPO activity. MPO is an enzyme released by activated neutrophils that
catalyzes the formation

287 reactive oxygen species contributing to tissue damage and can be used as a
histopathological marker for

288 these cells ²⁴. An increase in both, the presence of neutrophils in the lungs of I/R animals
and their

289 activity was observed. Haegens et al (2009)²⁵ suggested that MPO can indirectly
influence the chemokine

290 and cytokine production during inflammatory processes, besides playing an important
role in the

291 development of lung neutrophilia. Here, we observed an increase in CINC-1
concentration, an important

292 chemokine, in the I/R group and a decrease in the treated group during reperfusion.

293 Activation of components of coagulation cascade and inflammation is often evaluated
separately,

294 although these systems are integrated and present extensive cross talk, affecting
inflammation and

295 thrombosis ²⁶. Sobral et al (2021)¹⁵ point to alterations in the coagulation of animals
submitted to aortic

296 I/R. Rats submitted to the aortic I/R model and maintained for 2h in reperfusion showed
increased

297 platelet aggregation compared to the Sham, and prophylactic treatment with estradiol was
able to

298 normalize the platelet response. Here, with 4h of reperfusion, a decrease in the
aggregation event in

299 the treated group was observed. There was also a significant reduction in the number of
platelets in the

300 platelet-rich plasma of the animals in the I/R group while the treated group-maintained
values similar

301 to the animals in the sham.

302 Nitric oxide reduces platelet and leukocyte aggregation, modulates endothelial
permeability, and

303 decreases leukocyte infiltration ²⁷. This enzyme is influenced by estrogens, that increase
its protein

304 expression and activity, enhancing NO production ²⁸. Breithaupt-Faloppa et al (2013)²⁹,
demonstrated

305 that E2 effects modulating eNOS protein expression in the lungs, lead to lung
inflammation reduction

306 after intestinal I/R. We observed reduction in the expression of eNOS in the pulmonary
vessels of rats

307 submitted to I/R and an increase in the expression of this enzyme in the vessels of the
treated group

308 (E2). We can suggest that the local release of NO by eNOS could favor the maintenance
of vascular

309 integrity and, therefore, that estradiol treatment would favor pulmonary microcirculation
and its

310 homeostasis.

311 Metalloproteinases are involved in neutrophil adhesion and migration, modulating the
extracellular

312 matrix and removing barriers such as the basement membrane ³⁰. Estradiol would have
the ability to

313 interfere with the secretion of MMP-9 in neutrophils, thus modulating its action ³¹. Here,
MMP-9 was

314 increased in the ischemic group, with a reduction in the treated group, pointing to a
modulating role of

315 estradiol.

316 This study has some limitations. Although this model focused on the
ischemia/reperfusion induced by
317 occlusion of the descending aorta as the main mechanism accounting for lung
inflammation, other
318 aspects such as the mechanical ventilation should be considered. Besides, lung function
was not
319 specifically addressed; despite that, our study confirmed the important therapeutic effects
of E2 in the
320 lungs after I/R in males.

321

322 **CONCLUSION**

323 Finally, despite various surgical adjuncts and pharmacological interventions, I/R injury
remains a
324 challenge to surgeons. In fact, our results showed that the E2 treatment performed late,
already in the
325 period of reperfusion, was able to modulate the inflammatory response, reducing MPO,
IL-1 β , MMP-9
326 and increasing lung vascular expression of eNOS. Taken together, our data indicate that
17 β -estradiol
327 might be a supplementary approach to lead with the systemic process and the lung
deterioration.

329 **DATA AVAILABILITY STATEMENT**

330 The data underlying this article will be shared on reasonable request to the corresponding
author.

331 **FUNDING STATEMENT**

332 This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
(FAPESP
333 2018/25759-3).

334 **AUTHORS CONTRIBUTION STATEMENT**

335 Study design: CJC, LFPM and ACBF; data collection and analysis: MNS, LFA, PLZF,
FYRS, CJC and ACBF;

336 writing the manuscript: MNS, CJC and ACBF; providing critical revisions to the
manuscript LFA, PLZF,
337 FYRS and LFPM; final approval of the submitted version: all authors; and agreement to
be accountable
338 for all factual aspects of the work: all authors.

339 **CONFLICT OF INTEREST STATEMENT**

340 None declared.
341

342 **LEGENDS TO THE FIGURES**

343 **Figure 1:** Serum concentrations of estradiol (A), testosterone (B) and corticosterone (C).
The rats were
344 subjected to aortic ischemia (20 min) and reperfusion (4 h). In the treated group, animals
were
345 submitted to IR and treated with 17 β -estradiol (E2) 1 h after the beginning of reperfusion.
Controls were
346 false operated animals (Sham). Data expressed as mean $\pm$ SEM from 8 animals.
KW(Kruskal-Wallis)

347 **Figure 2:** Total White blood cell counts (A), Granulocyte numbers in blood (B), number
of platelets in
348 platelet-rich plasma (C) and platelet aggregation (D). The rats were subjected to aortic
ischemia (20 min)
349 and reperfusion (4 h). In the treated group, animals were submitted to IR and treated with
17 β -estradiol
350 (E2) 1 h after the beginning of reperfusion. Controls were false operated animals (Sham).
Data expressed
351 as mean $\pm$ SEM from 8 animals. KW(Kruskal-Wallis)

352 **Figure 3:** Histological analysis of the lungs and bronchoalveolar lavage (BAL) cells
quantification:
353 Polymorphonuclear (A); BAL (B). Protein expression (D) and activity (E) of
myeloperoxidase (MPO) in
354 lung tissue. The rats were subjected to aortic ischemia (20 min) and reperfusion (4 h). In
the treated
355 group, animals were submitted to IR and treated with 17 β -estradiol (E2) 1 h after the
beginning of

356 reperfusion. Controls were false operated animals (Sham). Representative
357 photomicrographs of each
358 group: Histology (C), Immunohistochemistry (F). Data represent the mean $\pm$ SEM. 1
359 section per animal
360 (n=5), 10 areas per section were analyzed. BAL: 8 animals per group. KW(Kruskal-
361 Wallis)
362 **Figure 4:** Quantification of inflammatory mediators (pg/mL/mg dry weight), in rat lung
363 explant
364 samples(A,C,E), and their analysis by RT-PCR gene expression (B,D,F). The rats were
365 subjected to aortic
366 ischemia (20 min) and reperfusion (4 h). In the treated group, animals were submitted to
367 IR and treated
368 with 17 β -estradiol (E2) 1 h after the beginning of reperfusion. Controls were false
369 operated animals
370 (Sham). (A,C,E) Data expressed as mean $\pm$ SEM from 8 animals. (B, D, F) Data
371 expressed as median and
372 95% percentile interval from 8 animals. KW(Kruskal-Wallis)
373 **Figure 5:** Immunohistochemical analysis of eNOS protein expression (A) in lung tissue
374 and its analysis by
375 RT-PCR of gene expression (B). The rats were subjected to aortic ischemia (20 min) and
376 reperfusion (4
377 h). In the treated group, animals were submitted to IR and treated with 17 β -estradiol (E2)
378 1 h after the
379 beginning of reperfusion. Controls were false operated animals (Sham). (A) Data are
380 presented as a
381 mean $\pm$ SEM of 5 animals per group, 2 sections per animal and 5 images analyzed per
382 section. The
383 photomicrographs are representative for each group. (B) Data expressed as median and
384 95% percentile
385 interval from 8 animals. KW(Kruskal-Wallis)
386 **Figure 6:** Analysis of ICAM-1 (A) and VCAM (B) protein expression in lung tissue and
387 its analysis by RT-
388 PCR of gene expression. The rats were subjected to aortic ischemia (20 min) and
389 reperfusion (4 h). In the
390 treated group, animals were submitted to IR and treated with 17 β -estradiol (E2) 1 h after
391 the beginning
392 of reperfusion. Controls were false operated animals (Sham). Protein: Data are presented
393 as a mean $\pm$

- 376 SEM of 5 animals per group, 2 sections per animal and 5 images analyzed per section.
The
- 377 photomicrographs are representative for each group. Gene: Data expressed as median and
95%
- 378 percentile interval from 8 animals. KW(Kruskal-Wallis)
- 379 **Figure 7:** Immunohistochemical analysis of MMP-9 protein expression (A) in lung tissue
and its analysis
- 380 by RT-PCR of gene expression (B) The rats were subjected to aortic ischemia (20 min)
and reperfusion (4
- 381 h). In the treated group, animals were submitted to IR and treated with 17 β -estradiol (E2)
1 h after the
- 382 beginning of reperfusion. Controls were false operated animals (Sham). (A) Data are
presented as a
- 383 mean $\pm$ SEM of 5 animals per group, 2 sections per animal and 5 images analyzed per
section. The
- 384 photomicrographs are representative for each group. (B) Data expressed as median and
95% percentile
- 385 interval from 8 animals. KW(Kruskal-Wallis)
- 386
- 387 **Table 1:** Measurement of serum inflammatory parameters (pg/ml). Data presented as
mean $\pm$ SEM

				Serum inflammatory mediators (pg/ml)		
				Sham	I/R	E2
TNF- α CINC-1	IL-1 β	IL-10		3.98 $\pm$ 1.96	8.92 $\pm$ 2.46	7.82 $\pm$ 2.58
				7.27 $\pm$ 0.73*	18.4 $\pm$ 3.62	20.9 $\pm$ 3.63
				45.9 $\pm$ 5.59	104.1 $\pm$ 26.43	195.3 $\pm$ 48.86*
				96.4 $\pm$ 21.86*	152.3 $\pm$ 6.13	70.6 $\pm$ 17.54*

- 388 * P <0.05 in relation to IR

389

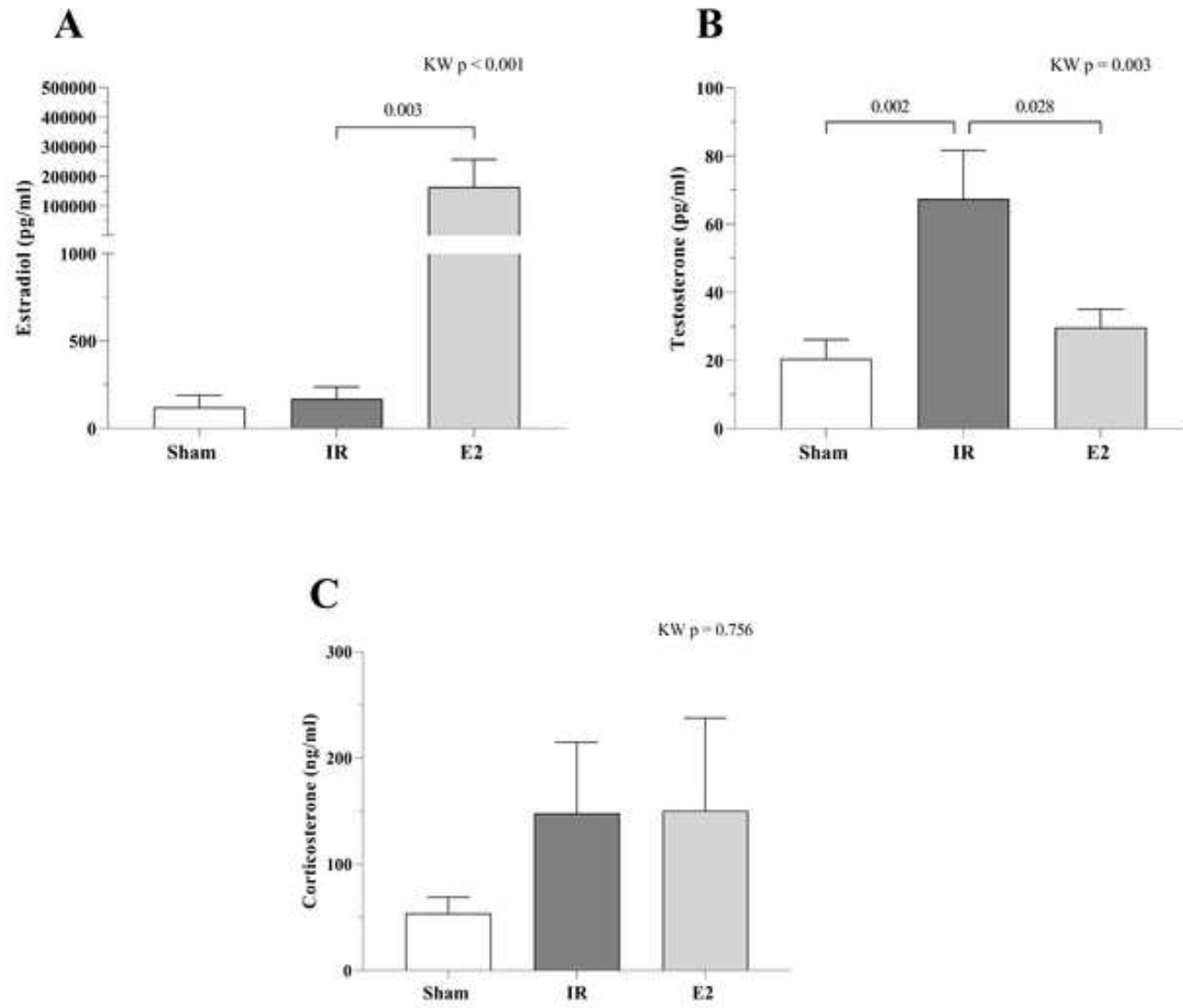
390 REFERENCES

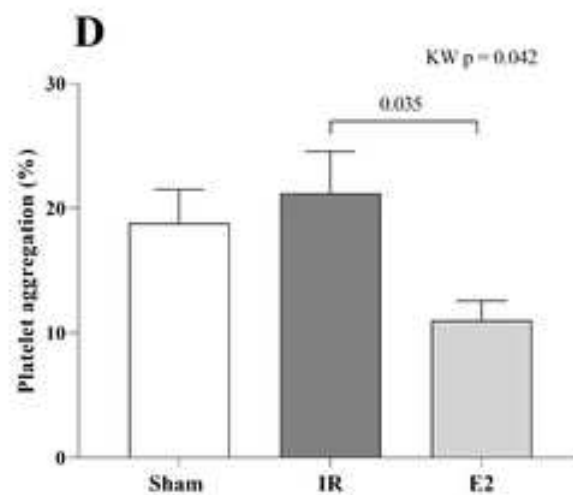
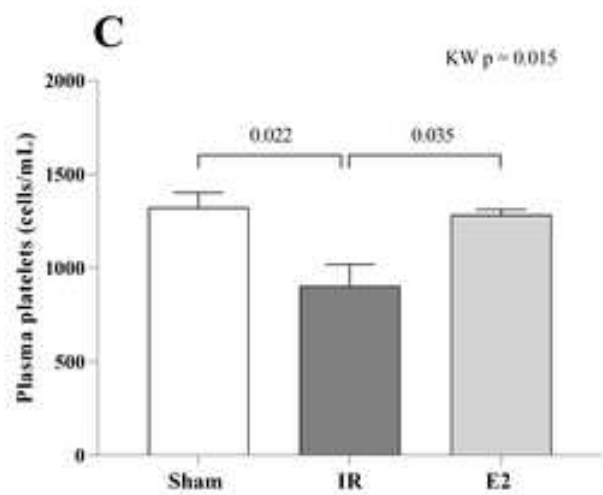
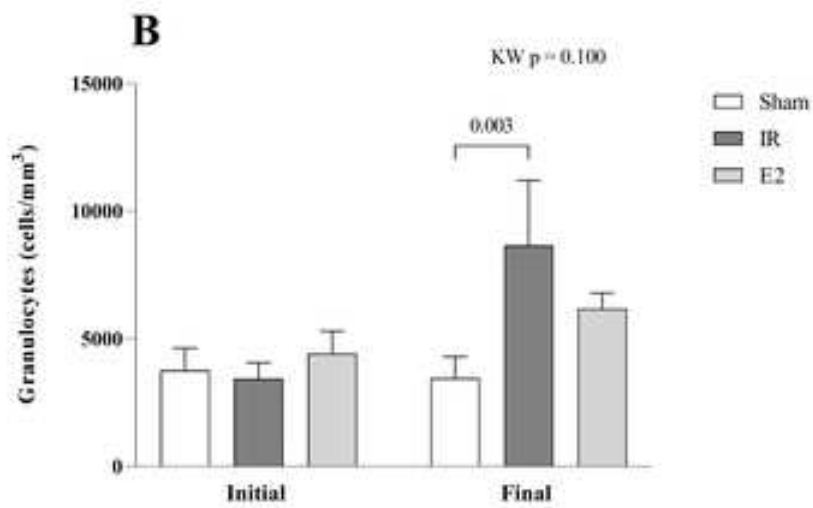
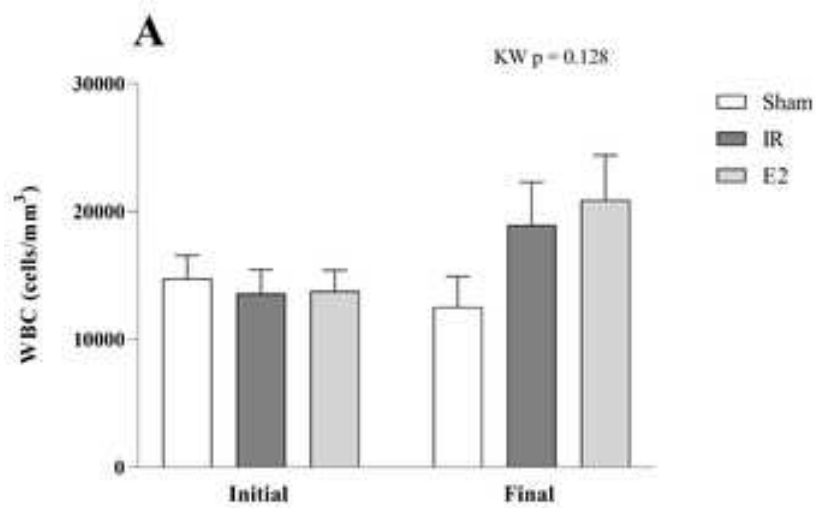
- 391 1. Bown MJ, Nicholson ML, Bell PR, Sayers RD. Cytokines and inflammatory pathways
in the
392 pathogenesis of multiple organ failure following abdominal aortic aneurysm repair. *Eur J*
Vasc
393 *Endovasc Surg* 2001; 22(6):485-95.
- 394 2. Banz Y, Rieben R, Zobrist C, Meier P, Shaw S, Lanz J, Carrel T, Berdat P. Addition of
dextran
395 sulfate to blood cardioplegia attenuates reperfusion injury in a porcine model of
396 cardiopulmonary bypass. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2008 Sep;34(3):653-60.
- 397 3. Iglesias JL, LaNoue JL, Rogers TE, Inman L, Turnage RH. Physiologic basis of
pulmonary edema during
398 intestinal reperfusion. *J Surg Res* 1998; 80(2):156-63.
- 399 4. Villar J, Blanco J, Kacmarek RM. Acute respiratory distress syndrome definition: do
we need a
400 change? *Curr Opin Crit Care* 2011; 17(1):13-7.
- 401 5. Fantozzi ET, Breithaupt-Faloppa AC, Ricardo-da-Silva FY, Rodrigues-Garbin S,
Romero DC, da Silva
402 Rodrigues A, et al. Estradiol mediates the long-lasting lung inflammation induced by
intestinal
403 ischemia and reperfusion. *J Surg Res* 2018; 221:1-7.
- 404 6. Klein SL, Flanagan KL. Sex differences in immune responses. *Nat Rev Immunol* 2016;
16(10):626-38.
- 405 7. Liao WI, Wu SY, Tsai SH, Pao HP, Huang KL, Chu SJ. 2-Methoxyestradiol Protects
Against
406 Lung Ischemia/Reperfusion Injury by Upregulating Annexin A1 Protein Expression. *Front*
407 *Immunol*. 2021; 12:596376.
- 408 8. da Anunciação LF, Sousa MN, Vidal-Dos-Santos M, Armstrong-Jr R, Moreira LFP,
Correia CJ,
409 Breithaupt-Faloppa AC. Modulatory effects of 17 β -estradiol on acute lung inflammation
after total
410 occlusion of the descending aorta in male rats. *Int Immunopharmacol*. 2022 Dec;113(Pt
A):109311.

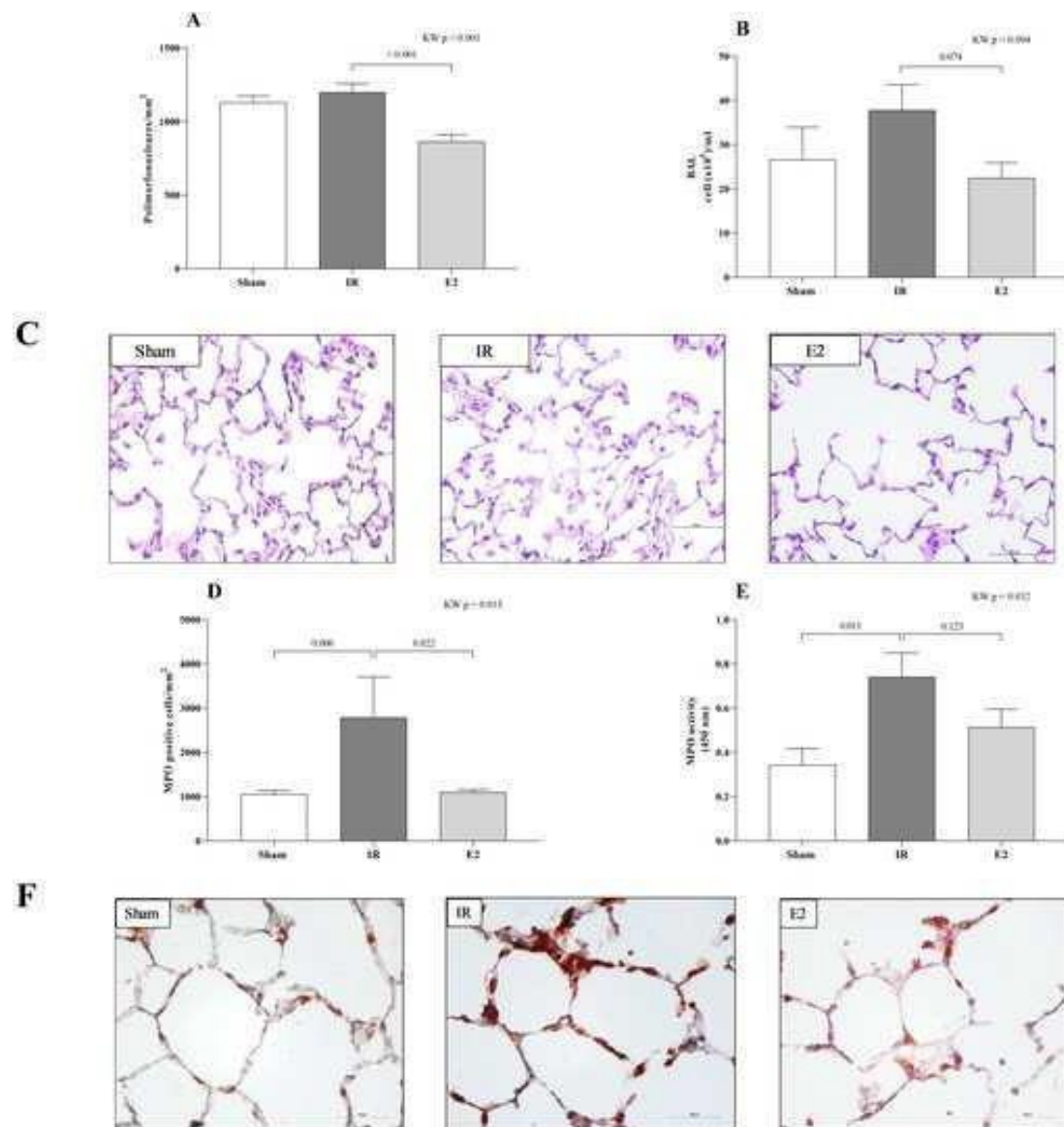
- 411 9. Breithaupt-Faloppa AC, Thais Fantozzi E, Romero DC, Rodrigues Ada S, de Sousa
PT, Lino Dos Santos
- 412 Franco A, et al. Acute effects of estradiol on lung inflammation due to intestinal ischemic
insult in
- 413 male rats. *Shock* 2014; 41(3):208-13.
- 414 10. Rocha de Sousa PT, Breithaupt-Faloppa AC, de Jesus Correia C, Simão RR, Ferreira
SG, Fiorelli AI, et
- 415 al. 17β -Estradiol prevents mesenteric injury induced by occlusion of the proximal
descending aorta
- 416 in male rats. *J Vasc Surg* 2018; 67(2):597-606.
- 417 11. Proust B, Nahori MA, Ruffie C, Lefort J, Vargaftig BB. Persistence of
bronchopulmonary hyper-
- 418 reactivity and eosinophilic lung inflammation after anti-IL-5 or -IL-13 treatment in
allergic BALB/c
- 419 and IL-4Ralpha knockout mice. *Clin Exp Allergy* 2003; 33(1):119-31.
- 420 12. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J. Pathol*
2000; 190: 255–66.
- 421 13. Breithaupt-Faloppa AC, Vitoretti LB, Coelho FR, dos Santos Franco AL, Domingos
HV, Sudo-Hayashi
- 422 LS, et al. Nitric oxide mediates lung vascular permeability and lymph-borne IL-6 after an
intestinal
- 423 ischemic insult. *Shock* 2009; 32(1):55-61.
- 424 14. Girn HR, Ahilathirunayagam S, Mavor AI, Homer-Vanniasinkam S. Reperfusion
syndrome: cellular
- 425 mechanisms of microvascular dysfunction and potential therapeutic strategies. *Vasc*
Endovascular
- 427 *Surg* 2007; 41(4):277-93.
- 428 15. Sobral MLP, Dias RR, Correia CJ, Coutinho E Silva RDS, da Anunciação LF,
Breithaupt-Faloppa AC, et
- 429 al. Protective effects of 17β -oestradiol on coagulation and systemic inflammation after
total
- 430 occlusion of the descending aorta in male rats. *Eur J Cardiothorac Surg* 2022; 61(3):666-674.
- 431 16. Ricardo-da-Silva FY, Fantozzi ET, Rodrigues-Garbin S, Domingos HV, Oliveira-
Filho RM, Vargaftig BB,

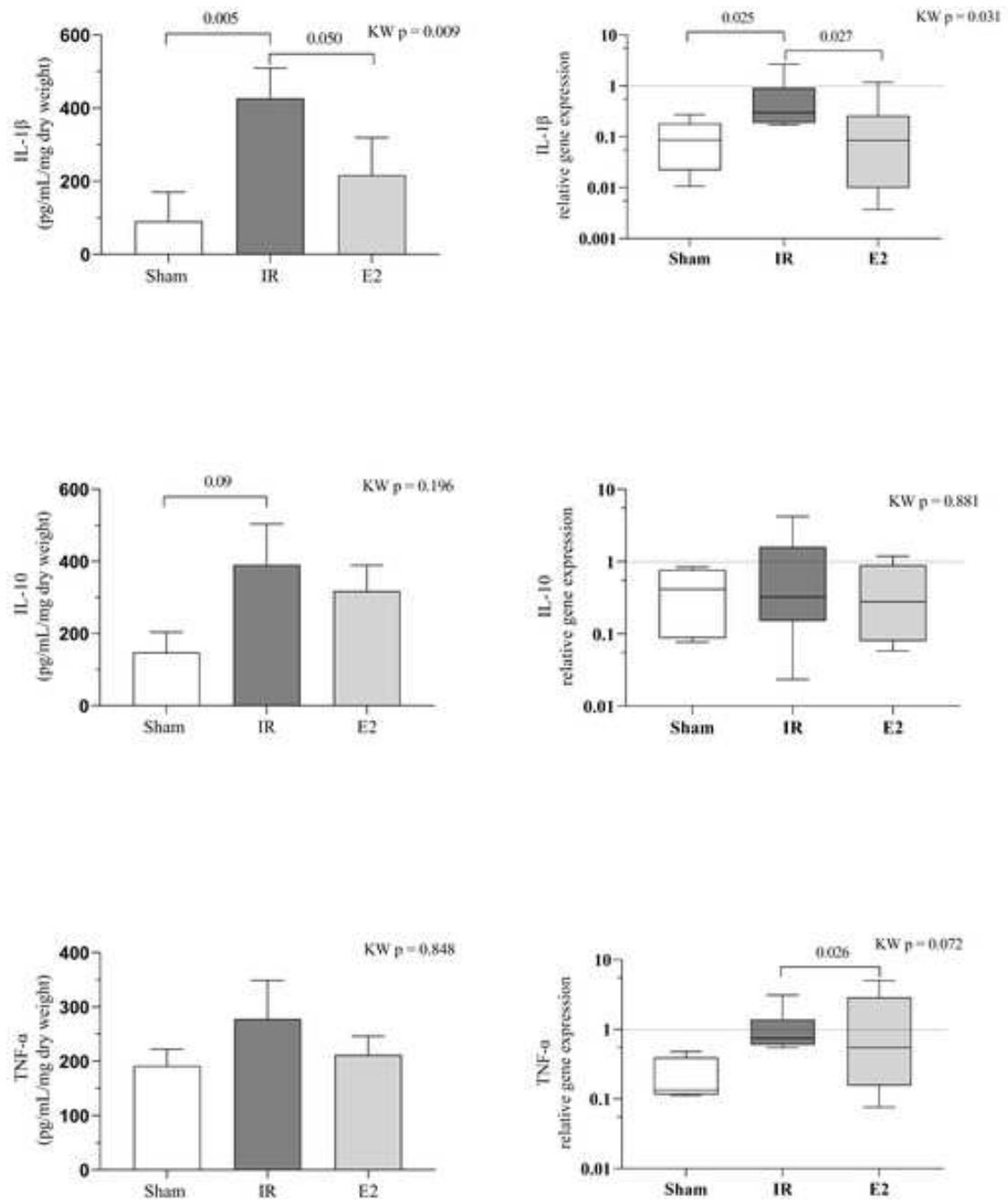
- 432 et al. Estradiol prevented intestinal ischemia and reperfusion-induced changes in
intestinal
- 433 permeability and motility in male rats. *Clinics (Sao Paulo)*. 2021; 76:e2683.
- 434 17. Foulds S, Mireskandari M, Kalu P, Jackson W, Cheshire NJ, Mansfield AO, et al.
Visceral ischemia and
- 435 neutrophil activation in sepsis and organ dysfunction. *J Surg Res* 1998; 75(2):170-6.
- 436 18. Carden DL, Young JA, Granger DN. Pulmonary microvascular injury after intestinal
ischemia–
- 437 reperfusion: role of P-selectin. *J Appl Physiol* 1993; 75: 2529–2534.
- 438 19. Carden DL, Xiao F, Moak C, Willis BH, Robinson-Jackson S, Alexander S.
Neutrophil elatase promotes
- 439 lung microvascular injury and proteolysis of endothelial cadherins. *Am J Physiol (Heart
Circ Physiol)*
- 440 1998; 275: H385–H392.
- 441 20. Xiao F, Eppihimer MJ, Young JA, Nguyen K, Carden DL. Lung neutrophil retention
and injury following
- 442 intestinal ischemia–reperfusion. *Microcirculation* 1997; 4: 359–367.
- 443 21. Scalerandi MV, Peinetti N, Leimgruber C, Cuello Rubio MM, Nicola JP, Menezes
GB, Maldonado CA,
- 444 Quintar AA. Inefficient N2-Like Neutrophils Are Promoted by Androgens During
Infection. *Front*
- 445 *Immunol*. 2018; 9:1980.
- 446 22. Harjunpää H, Lloret Asens M, Guenther C, Fagerholm SC. Cell Adhesion Molecules
and Their Roles
- 447 and Regulation in the Immune and Tumor Microenvironment. *Front Immunol* 2019;
10:1078.
- 448 23. Hubbard AK, Rothlein R. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and
cell signaling
- 449 cascades. *Free Radic Biol Med* 2000; 28(9):1379-86.
- 450 24. Breckwoldt MO, Chen JW, Stangenberg L, Aikawa E, Rodriguez E, Qiu S,
Moskowitz MA, et al.
- 451 Tracking the inflammatory response in stroke in vivo by sensing the enzyme
myeloperoxidase. *Proc*

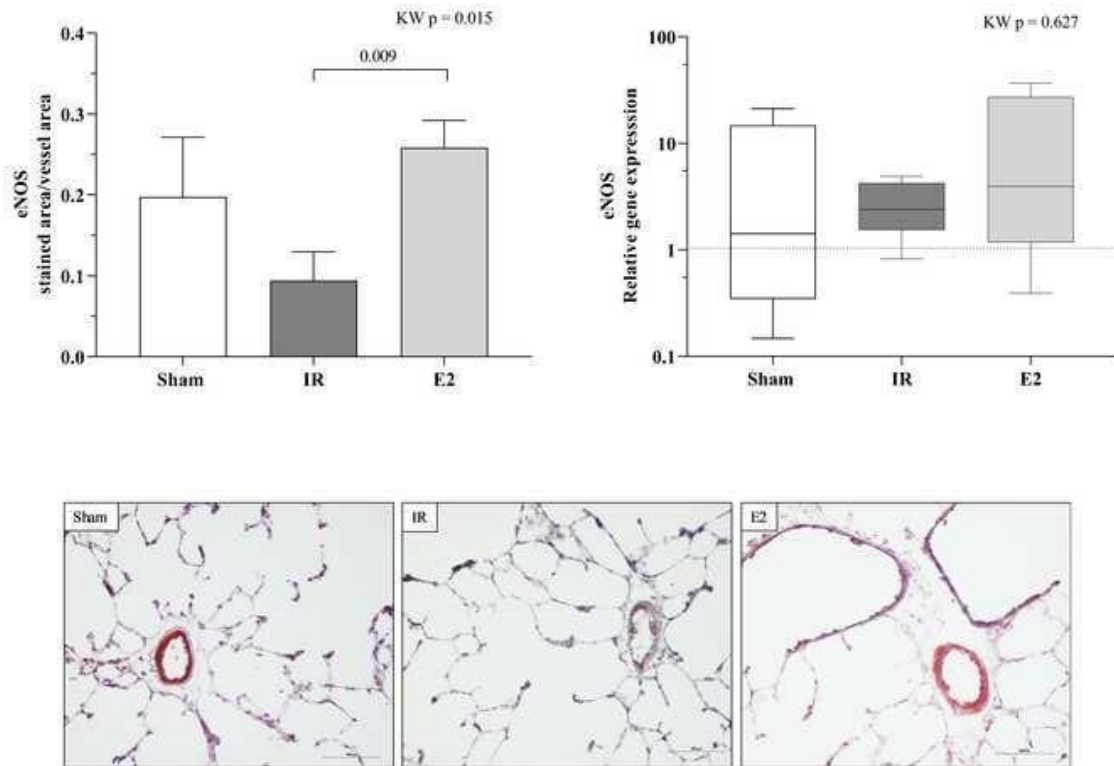
- 452 Natl Acad Sci U S A 2008; 105(47):18584-9.
- 453 25. Haegens A, Heeringa P, van Suylen RJ, Steele C, Aratani Y, O'Donoghue RJ, et al.
Myeloperoxidase
- 454 deficiency attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung inflammation and
subsequent cytokine
- 455 and chemokine production. J Immunol 2009; 182(12):7990-6.
- 456 26. Foley TR, Waldo SW, Armstrong EJ. Antithrombotic therapy in peripheral artery
disease. Vasc Med
- 457 2016; 21(2):156-69.
- 458 27. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA: Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and
pharmacology.
- 459 Pharmacol Rev 1991; 43 (2): 109–142.
- 460 28. Chambliss KL, Shaul PW: Estrogen modulation of endothelial nitric oxide synthase.
Endocr Rev 1992;
- 461 23 (5): 665–666.
- 462 29. Breithaupt-Faloppa AC, Fantozzi ET, de Assis Ramos MM, Vitoretti LB, Couto GK,
Lino-dos-Santos-
- 463 Franco A, et al. Protective effect of estradiol on acute lung inflammation induced by an
intestinal
- 464 ischemic insult is dependent on nitric oxide. Shock 2013; 40(3):203-9.
- 465 30. Chakraborty S, Stalin S, Das N, Choudhury ST, Ghosh S, Swarnakar S. The use of
nano-quercetin to
- 466 arrest mitochondrial damage and MMP-9 upregulation during prevention of gastric
inflammation
- 467 induced by ethanol in rat. Biomaterials 2012; 33(10):2991-3001.
- 468 31. Fedorova NV, Ksenofontov AL, Serebryakova MV, Stadnichuk VI, Gaponova TV,
Baratova LA, et al.
- 469 Neutrophils Release Metalloproteinases during Adhesion in the Presence of Insulin, but
Cathepsin
- 470 G in the Presence of Glucagon. Mediators Inflamm 2018; 2018:1574928.

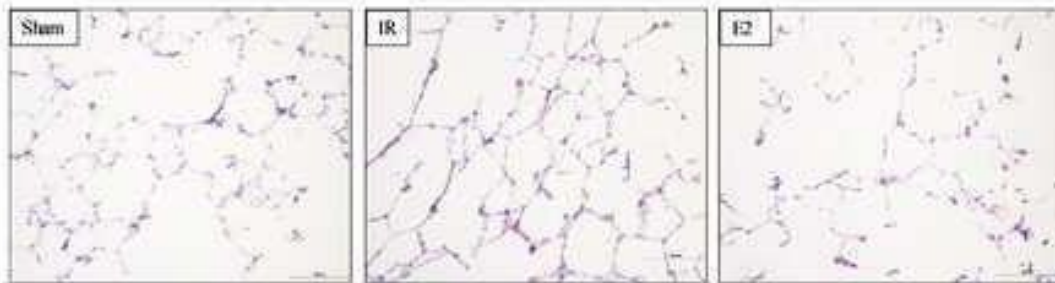
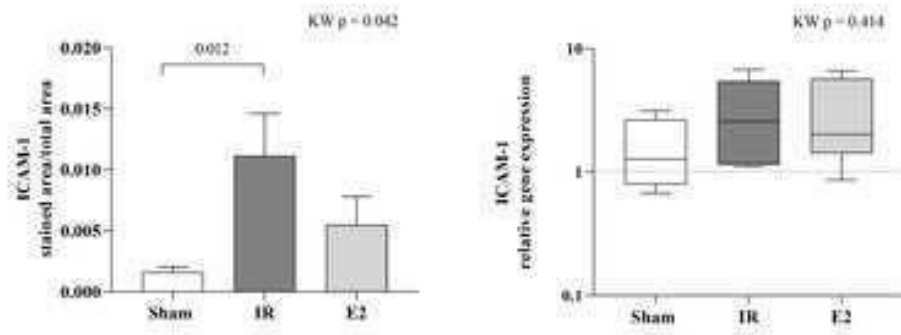
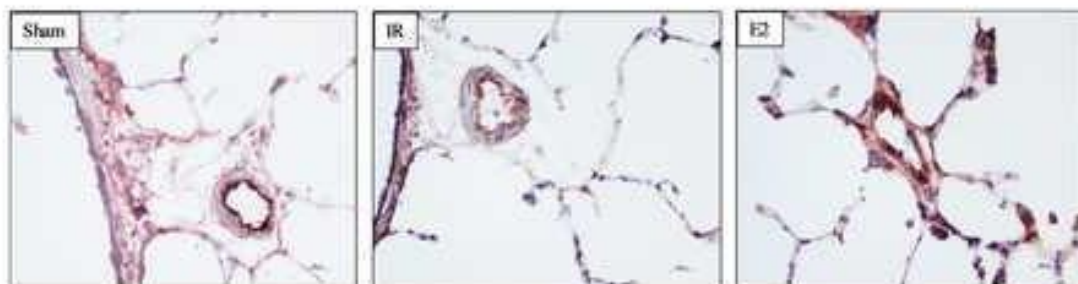
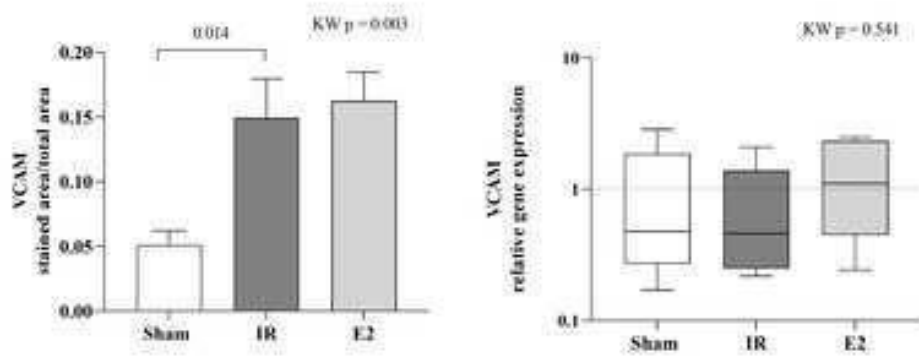


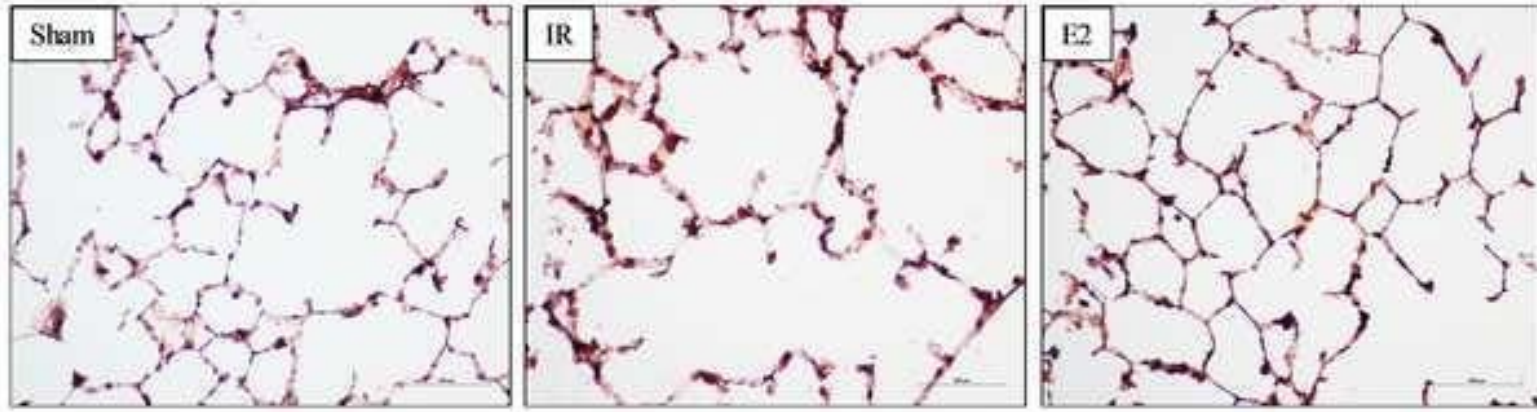
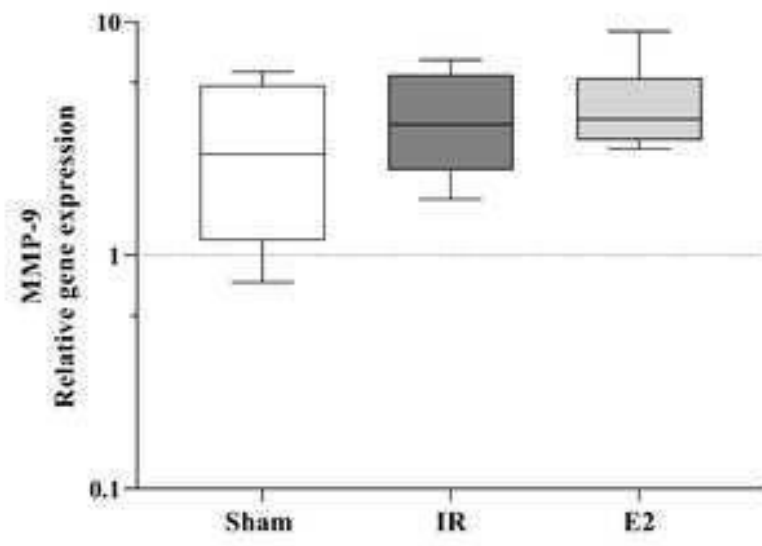
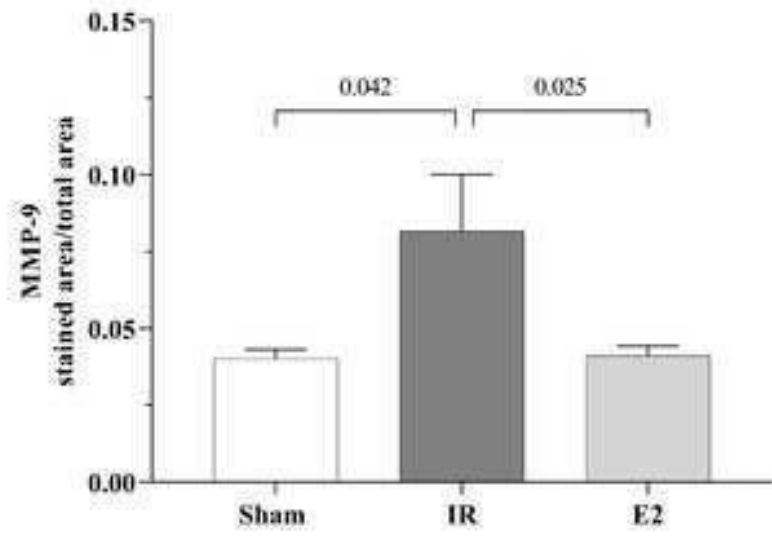


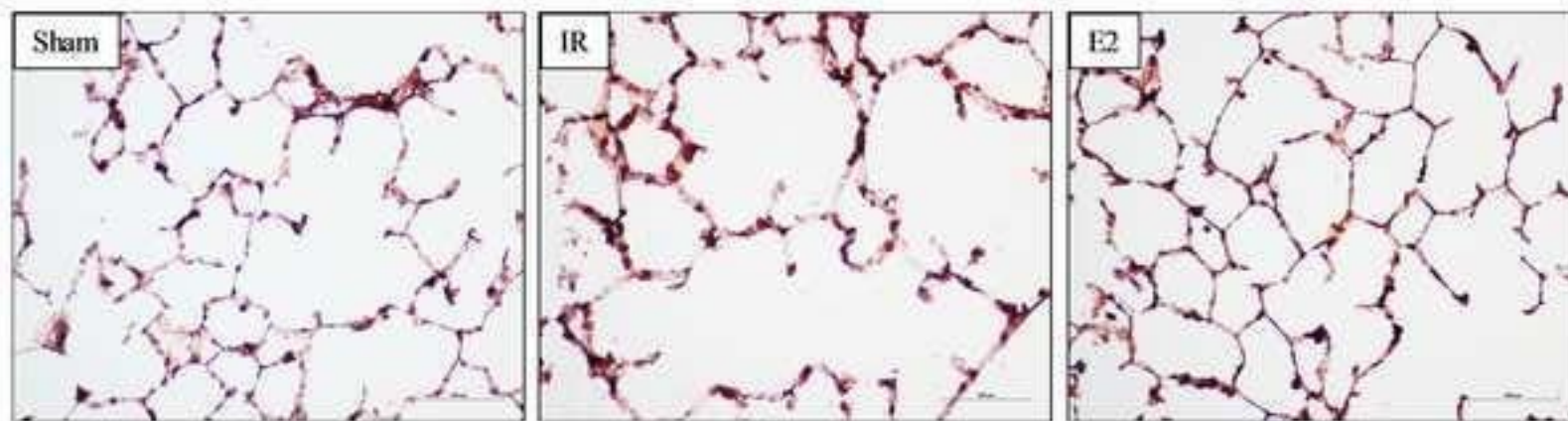
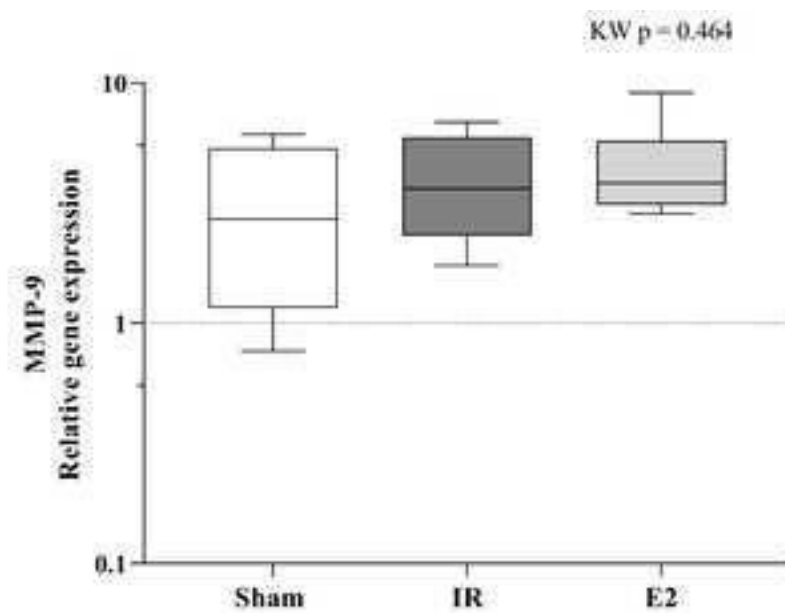
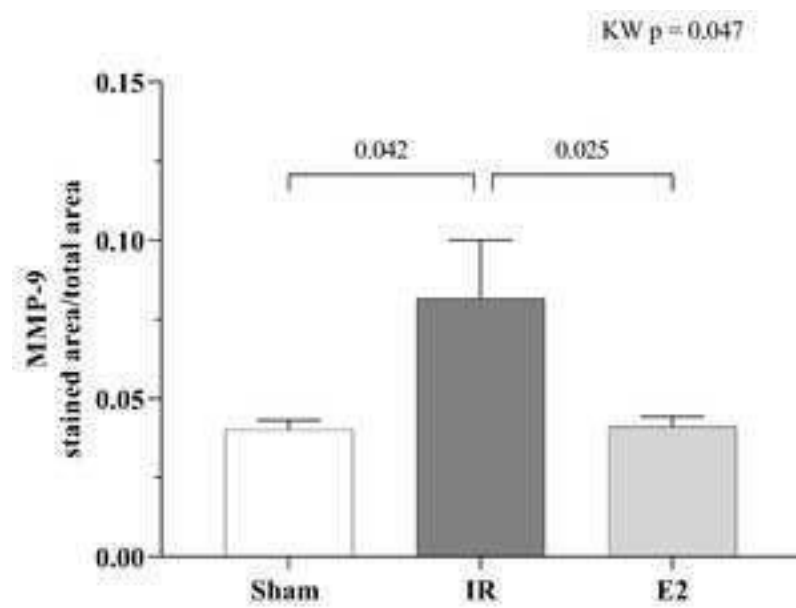


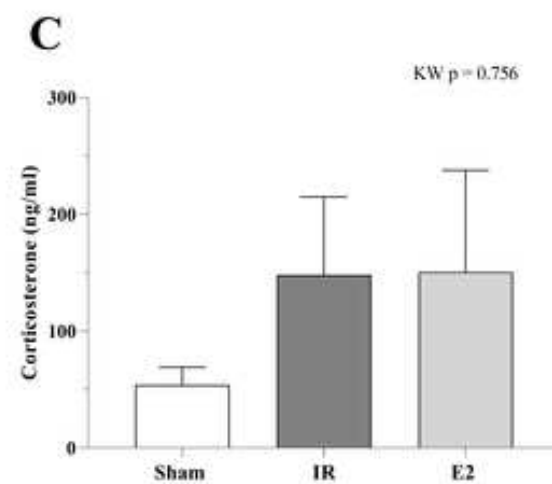
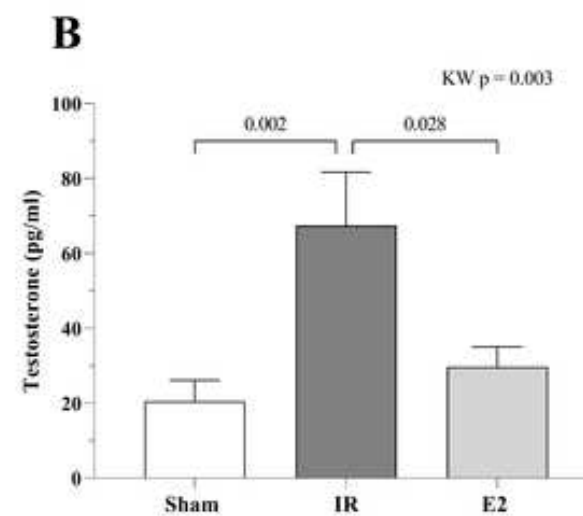
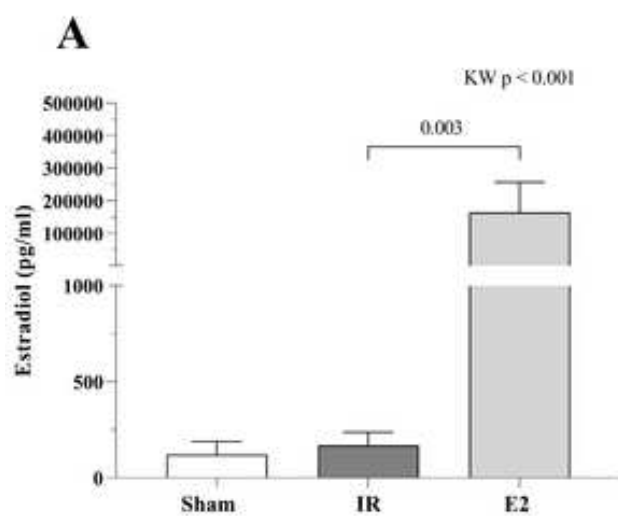


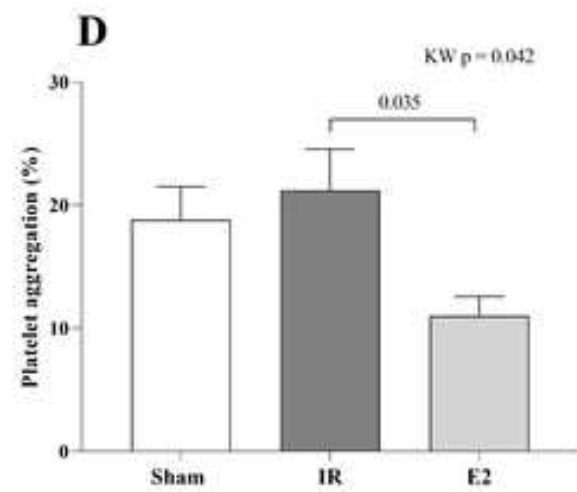
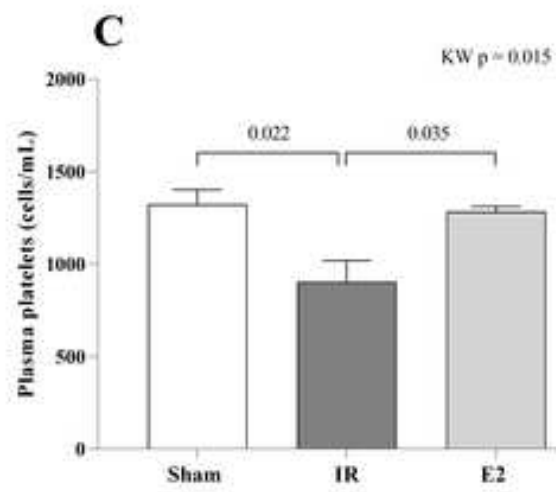
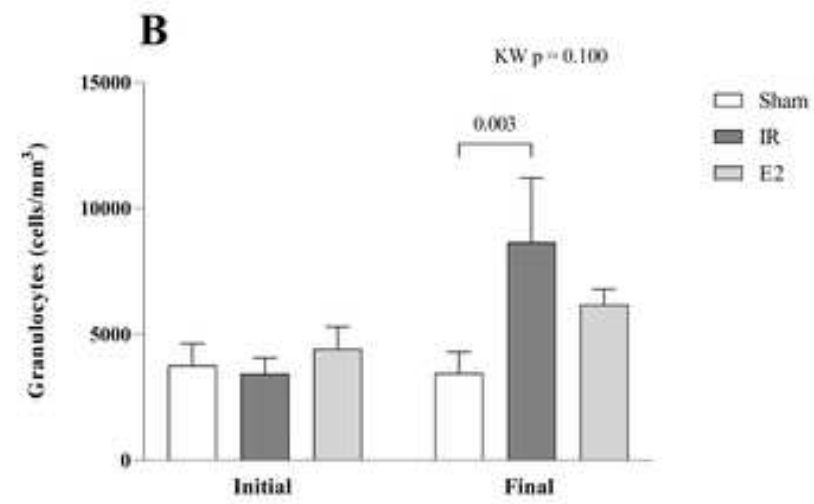
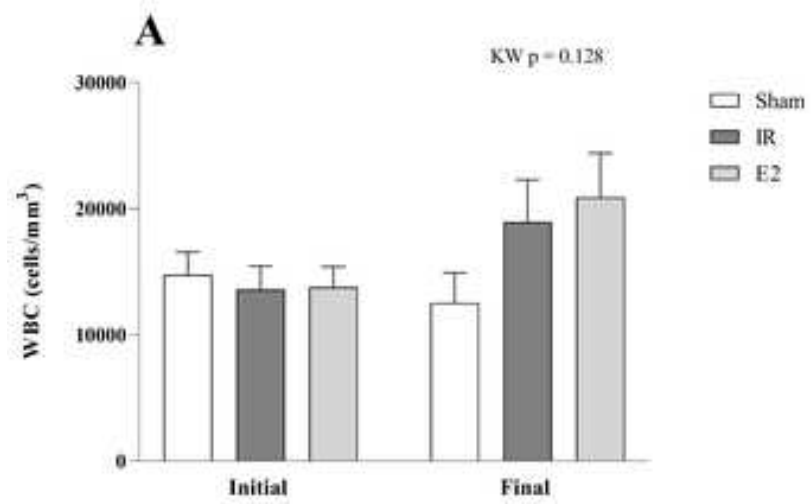


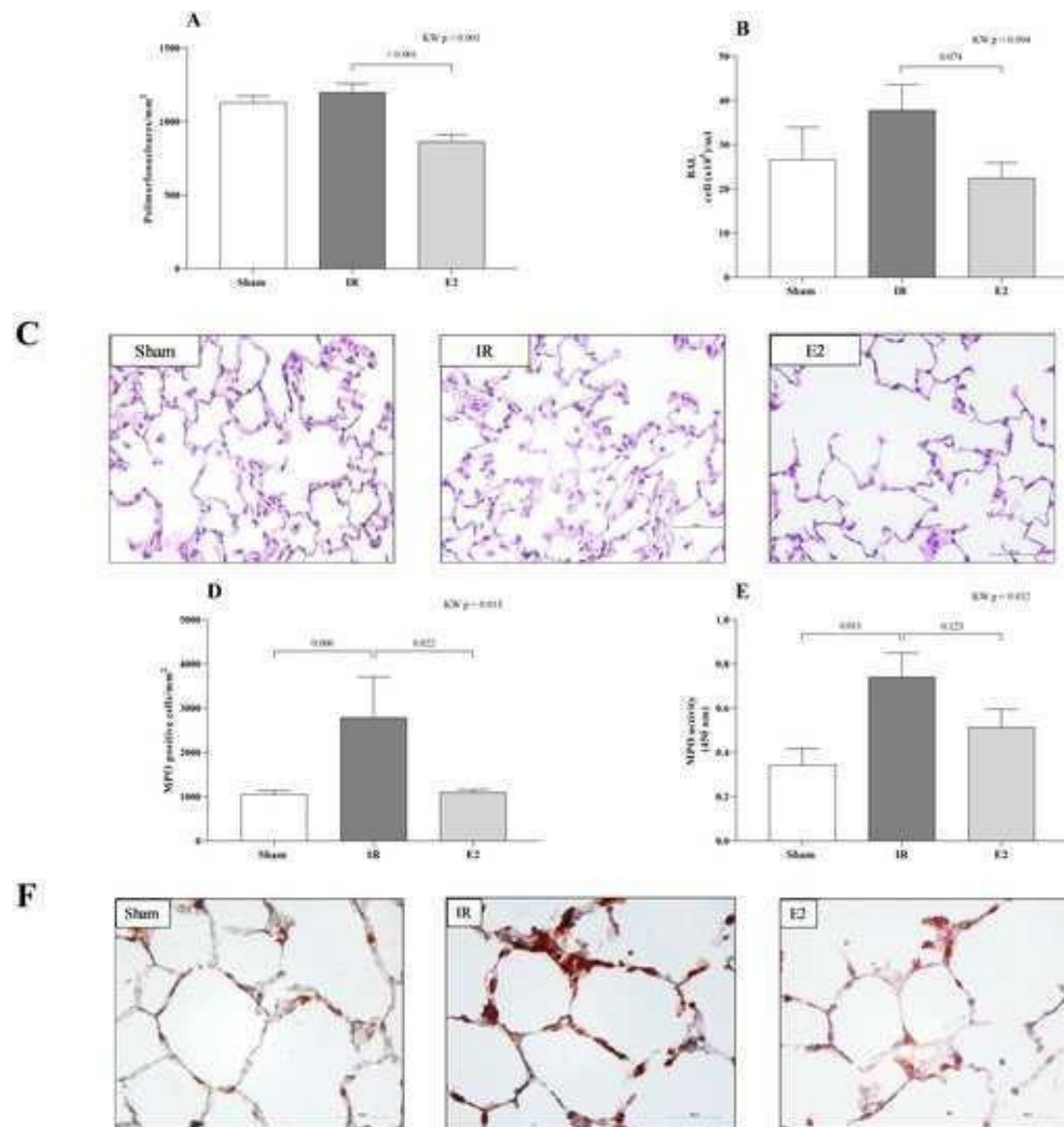
A**B**

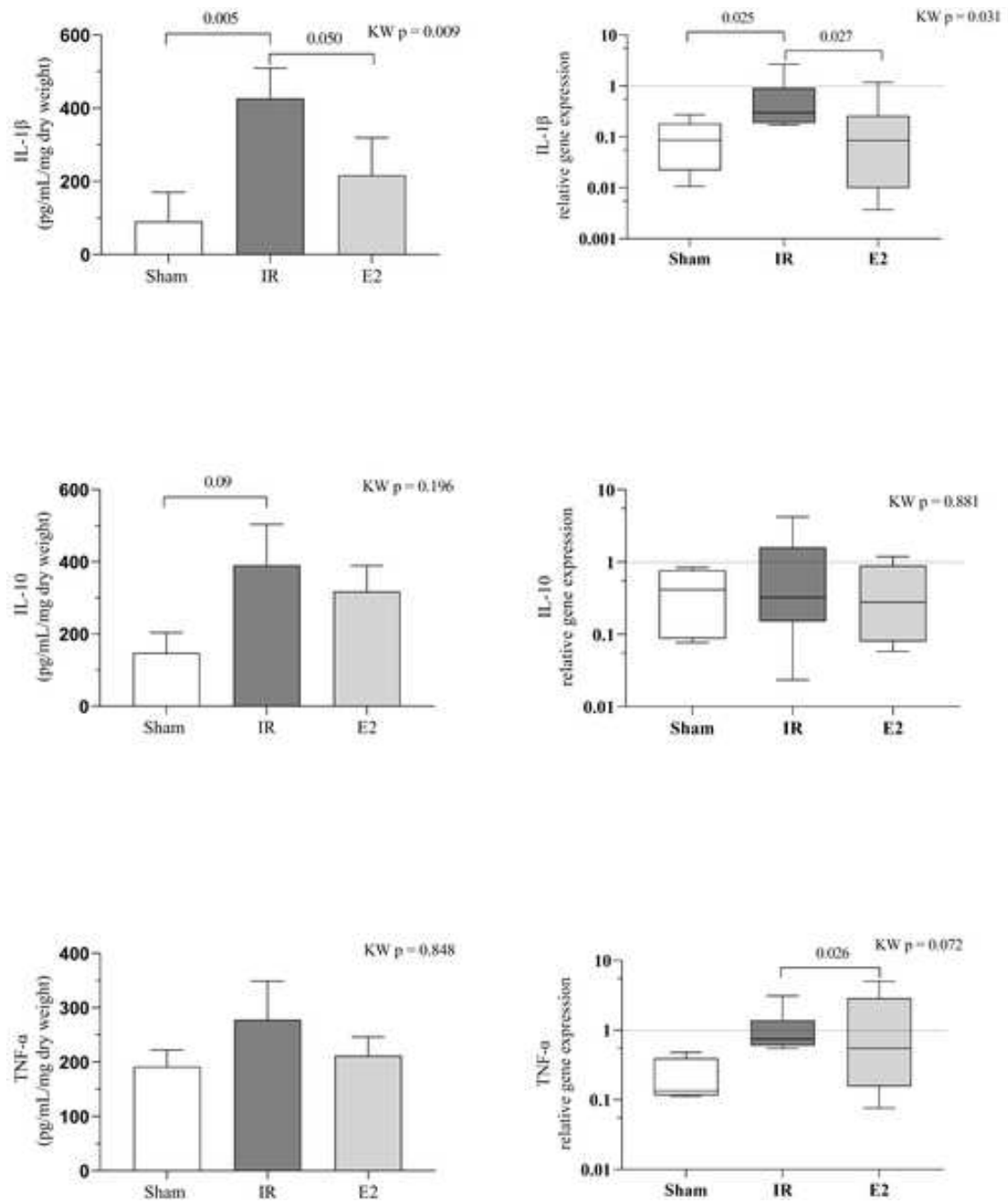


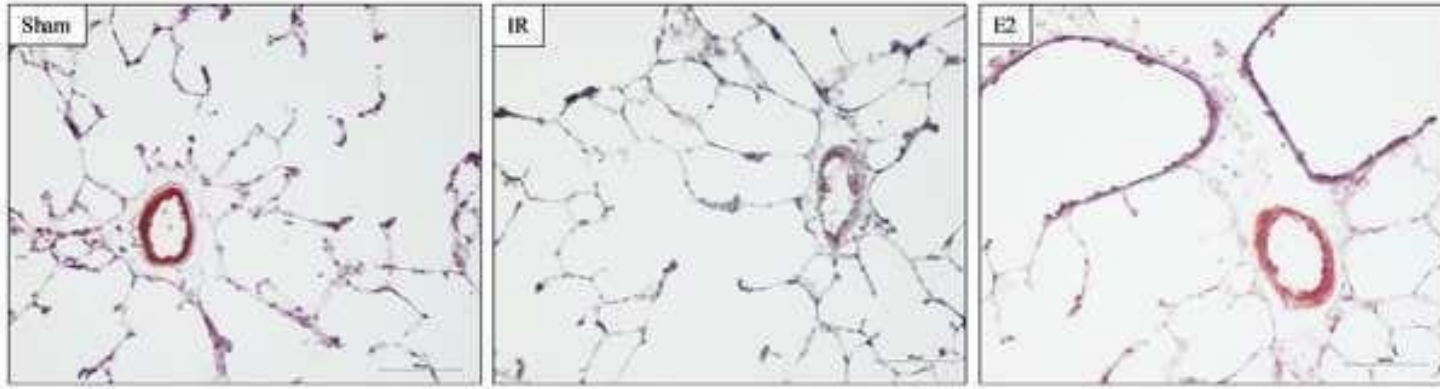
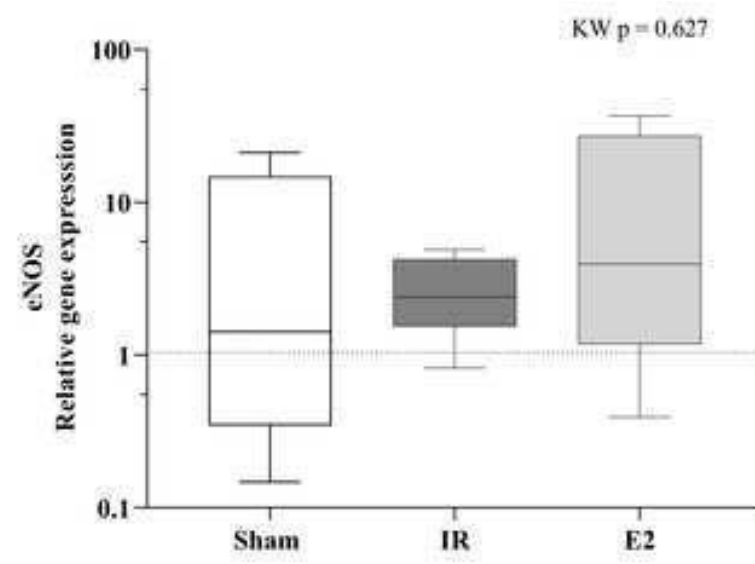
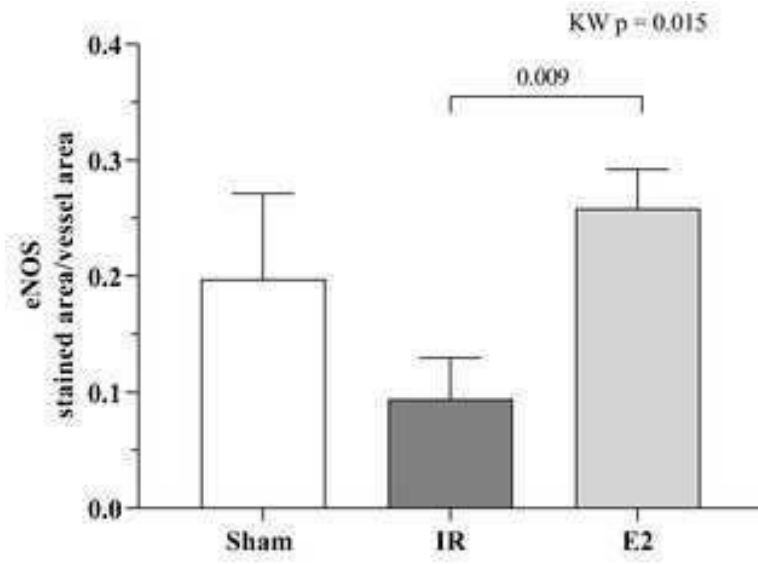


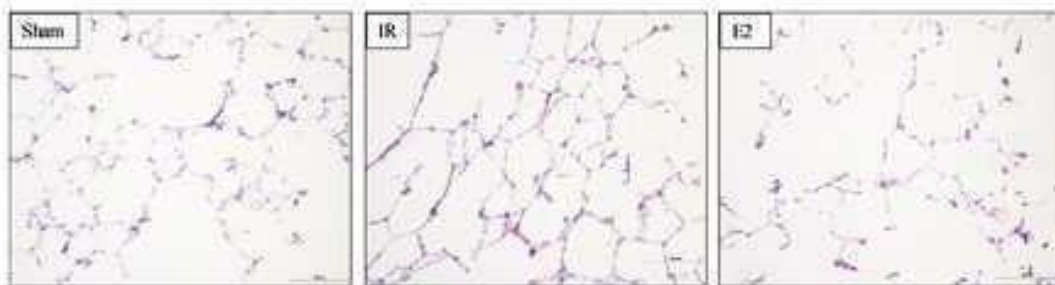
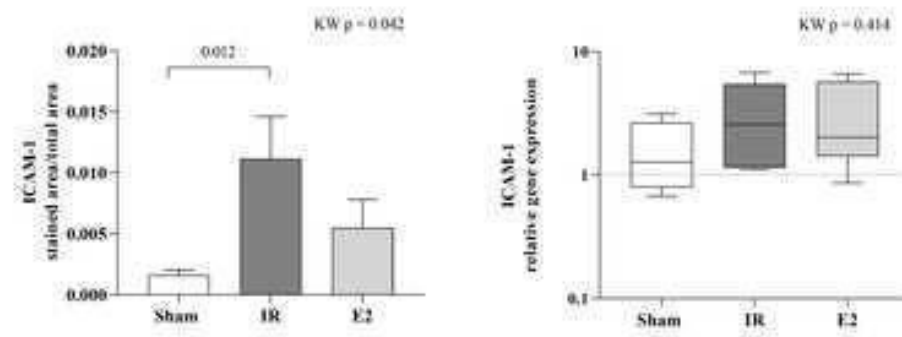










A**B**