Paulo Thales Rocha de Sousa

Avaliação dos efeitos do 17β-estradiol na lesão mesentérica 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: Prof.ª Dra. Paulina Sannomiya

Coorientador: Prof. Dr. Alfredo Inácio Fiorelli

São Paulo

2017

Paulo Thales Rocha de Sousa

Avaliação dos efeitos do 17β-estradiol na lesão mesentérica 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: Prof.ª Dra. Paulina Sannomiya

Coorientador: Prof. Dr. Alfredo Inácio Fiorelli

São Paulo

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Sousa, Paulo Thales Rocha de
Avaliação dos efeitos do 17β-estradiol na lesão mesentérica pela oclusão da aorta descendente proximal em ratos machos / Paulo Thales Rocha de Sousa. -- São Paulo, 2017.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Cirurgia Torácica e Cardiovascular.
Orientadora: Paulina Sannomiya.
Coorientador: Alfredo Inácio Fiorelli.

Descritores: 1.Isquemia mesentérica 2.Aorta torácica 3.Estradiol 4.Microcirculation 5.Ratos 6.Machos

USP/FM/DBD-149/17

À Professora Paulina Sannomiya, pela impecável orientação, ensinamentos inestimáveis, pela paciência, conselhos preciosos, profissionalismo ímpar e momentos de descontração ao longo desta árdua jornada científica. A senhora será sempre a minha referência científica e de pessoa.

Ao Professor Luiz Felipe Pinho Moreira, pelas proveitosas discussões, pela confiança e pelos ensinamentos.

À Doutora Ana Cristina Breithaupt Faloppa, pela imensa contribuição na execução, discussão, análises. Sem os seus prévios conhecimentos, essa tese certamente não se faria possível.

Ao biologista e aluno de Doutorado Cristiano de Jesus Correia que me acolheu cientificamente e pessoalmente. Obrigado pela indispensável e vasta ajuda neste estudo, paciência, além de momentos extraordinariamente divertidos.

À Professora Carlina Munhoz, pela rica contribuição a este trabalho.

À Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento deste projeto (2013/02563-2).

Ao Doutor Rafael Simas, pelos momentos joviais durante o inenarrável processo "*pesquisatório"*.

À jovem Doutora Laura Menegat, por ser essa pessoa incrível e adorável. Muito obrigado pelos momentos indizíveis e divertidos, além da imensa ajuda para a finalização das análises.

À técnica e aluna de Doutorado Sueli Gomes, pelas imensas contribuições

Ao pesquisador Fernando Luiz Zanoni, pelas ocasiões de descontração e divertimento.

Ao aluno de Doutorado Raphael dos Santos Coutinho e Silva, pelos momentos divertidos, conversas sobre séries e livros, além dos papos "*futeboleiras*".

Ao estudante de medicina, Raif Restivo Simão, pela contribuição nas análises e pelos momentos de divertimento.

Roberto Armstrong Jr, pela contribuição nas análises, pelos momentos de divertimento e pelas conversas "*futeboleiras*"

Ao Professor Luiz Fernando Ferraz da Silva, pelo auxílio na análise histopatológica.

Ao Doutor Ismael Guarda, pelas ocasiões de descontração e divertimento.

Ao Sérgio Sales, pela organização do espaço, pelos caprichados cuidados com os animais, pelos momentos de divertimento e pelas discussões "*futeboleiras*".

Ao Doutor Renato Assad, pela contribuição nas reuniões da pós-graduação.

Ao Doutor Gustavo Ieno Judas, pela referência científica neste modelo de oclusão aórtica.

Epígrafe

“So long, and thanks for all the fish.”

Douglas Adams

Normatização adotada

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

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

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

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

Sumário

Lista de abreviaturas
Lista de figuras
Lista de tabelas
Resumo
ABSTRACT
1. INTRODUÇÃO 1
1.1. Obstrução aórtica, isquemia mesentérica e manifestação clínica 1
1.2. Fisiopatologia da lesão de isquemia e reperfusão 2
1.3. Estradiol e lesão de isquemia e reperfusão 6
2. OBJETIVOS 9
2.1. Objetivo geral 9
2.2. Objetivos específicos 9
3. MÉTODOS 10
3.1. Animais 10
3.2. Delineamento experimental 10
3.3. Tratamento dos animais com 17β-estradiol 11
3.4. Anestesia e preparo dos animais 11
3.5. Indução da isquemia mesentérica 11
3.6. Análise histopatológica 12
3.7. Microscopia intravital *in situ* de mesentério e análise do fluxo sanguíneo 13
3.8. Imunohistoquímica para pesquisa de moléculas de adesão, eNOS e endotelina-1 14
3.9. Real time PCR para expressão gênica de eNOS e endotelina-1 15
3.10. Determinação do número total e diferencial de leucócitos circulantes 15
3.11. Detecção de citocinas séricas 15

3.12. Análise estatística 15

4. RESULTADOS 17

5. DISCUSSÃO 27

6. CONCLUSÕES 32

7. REFERÊNCIAS 33

Figura 1 Registro da pressão arterial distal e proximal de rato submetido à lesão de isquemia e reperfusão (I/R); rato controle falso-operado (FO); rato tratado com 17β-estradiol (E2) antes da indução da lesão de isquemia e reperfusão (E2 Pré I/R) e de rato tratado com 17β-estradiol ao início da reperfusão (E2 Pós I/R). A seta preta indica o momento da oclusão da aorta e a seta branca o início da reperfusão.....17

Figura 2 Análise histomorfométrica da espessura total da mucosa, da altura das vilosidades, da profundidade das criptas e da relação altura da vilosidade-profundidade da cripta no intestino. Ratos falso-operados (FO, n=5), ratos submetidos à lesão de isquemia-reperfusão (I/R, n = 5), ratos tratados com 17β-estradiol (E2, 280 µg/kg, iv) antes da indução da isquemia (E2 Pré I/R, n = 5) e ratos tratados no início da reperfusão (E2 Pós I/R, n = 5). Os valores representam a média ± EPM. ANOVA seguida por teste de Tukey para múltiplas comparações. Espessura total da mucosa: $^{*}P$ = 0,0072 I/R *versus* FO, $^{\Phi}P$ = 0,0437 E2 Pré I/R *versus* I/R; Altura da vilosidade: $^{*}P$ = 0,0053 I/R *versus* FO; Profundidade da cripta: $^{*}P$ = 0,0238 I/R *versus* FO.....19

Figura 3 Fotomicrografia do intestino de **A**, rato falso-operado (FO); **B**, rato submetido apenas à lesão de isquemia-reperfusão (I/R); **C**, rato tratado com 17β-estradiol (E2, 280 µg/kg, iv) antes da indução da lesão de I/R (E2 Pré I/R); e **D**, rato tratado ao início da reperfusão (E2 Pós I/R). Estrutura normal do intestino delgado em **A**; perda pronunciada da altura da vilosidade em **B**; preservação da altura da vilosidade em **C**; alterações menos intensas em **D**. Coloração com hematoxilina-eosina. Aumento final de 200x.....20

Figura 4 Avaliação do fluxo sanguíneo e de microvasos perfundidos no mesentério em relação à média dos valores obtidos no grupo falso-operado (FO, n = 5). Ratos submetidos à lesão de isquemia-reperfusão (I/R, n = 5) e ratos tratados com 17β-estradiol (E2, 280 µg/kg, iv) antes da indução de I/R (E2 Pré I/R, n = 5) ou tratados ao início da reperfusão (E2 Pós I/R, n = 5). Os valores representam a média ± EPM. ANOVA seguida de teste de Tukey para múltiplas comparações. $^{*}P$ = 0,0251 E2 Pré I/R *versus* I/R.....21

Figura 5 Quantificação da expressão de P-selectina e ICAM-1 nos vasos da microcirculação mesentérica em relação à média dos valores do grupo falso-operado (FO). Ratos submetidos à lesão de isquemia-

reperfusão (I/R) e ratos tratados com 17β-estradiol (E2, 280 µg/kg, iv) antes da indução da lesão de I/R (E2 Pré I/R) ou tratados ao início da reperfusão (E2 Pós I/R). Os valores representam a média ± EPM para 03 amostras/rato, 04 ratos/grupo. ANOVA seguida de teste de Tukey para múltiplas comparações. P-selectina: *P < 0,0001 E2 Pré I/R e E2 Pós I/R *versus* I/R. ICAM-1: *P = 0,0297 E2 Pré I/R *versus* I/R, $^{\delta}P$ < 0,0001 E2 Pós I/R *versus* I/R.....24

Figura 6 Quantificação das expressões proteica e gênica de eNOS e endotelina-1 no mesentério. Ratos submetidos à lesão de isquemia-reperfusão (I/R) e ratos tratados com 17β-estradiol (E2, 280 µg/kg, iv) antes da indução da lesão de I/R (E2 Pré I/R) ou tratados ao início da reperfusão (E2 Pós I/R). Os valores representam a média ± EPM para 03 amostras/rato, 04 ratos/grupo (imuno-histoquímica) e 06 ratos/grupo (RT-PCR). ANOVA seguida de teste de Tukey para múltiplas comparações. eNOS: *P < 0,0001 E2 Pré I/R e E2 Pós I/R *versus* I/R. Endotelina-1: *P < 0,0001 E2 Pós I/R *versus* I/R. Os dados da expressão proteica relacionam-se à média dos valores do grupo falso-operado (FO). Os dados de expressão gênica estão relacionados aos valores de ratos naïve. Kruskal Wallis seguido de teste de Dunn para múltiplas comparações. Não houve diferença significativa na expressão gênica de eNOS, e endotelina-1 entre os grupos.....25

Tabela I Taxa de mortalidade.....18

Tabela II Interações leucócito-endotélio na microcirculação mesentérica.....22

Tabela III Contagens total e diferencial de leucócitos no sangue periférico.....23

Tabela IV Concentração sérica de citocinas.....24

Sousa PTR. Avaliação dos efeitos do 17β-estradiol na lesão mesentérica pela oclusão da aorta descendente proximal em ratos machos [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

Objetivo: Na cirurgia de reconstrução aórtica ou cirurgia cardíaca com oclusão da aorta, a ocorrência de isquemia mesentérica e lesão intestinal está associada à maior mortalidade a curto prazo. A proteção vascular dos estrogênios tem sido investigada e é principalmente mediada pelo aumento da disponibilidade de óxido nítrico (NO). Portanto, este estudo investigou o papel do 17β-estradiol na lesão de isquemia-reperfusão visceral (I/R) decorrente da oclusão da aorta descendente em ratos machos.

Métodos: A isquemia mesentérica foi induzida em ratos Wistar machos através da inserção de cateter de embolectomia arterial Fogarty 2F (Edwards Lifesciences, Irvine, Calif.) na aorta descendente, que permaneceu ocluída por 15 minutos, seguida por 2 horas de reperfusão. Os ratos foram divididos em quatro grupos: (1) ratos submetidos apenas à manipulação cirúrgica (falso-operado, n = 22); (2) ratos submetidos à lesão de isquemia-reperfusão I/R (n = 22); (3) ratos tratados com 17β-estradiol intravenoso (280 µg/kg) 30 minutos antes de I/R (n = 22); (4) ou ao início da reperfusão (n = 22). As alterações histopatológicas intestinais foram avaliadas por histomorfometria. As alterações microcirculatórias mesentéricas foram avaliadas por meio de fluxometria por laser Doppler e técnica de microscopia intravital. A expressão proteica da molécula de adesão intercelular-1, P-selectina, NO sintase endotelial (eNOS) e endotelina-1 foram avaliadas por imuno-histoquímica; além disso, as expressões gênicas de eNOS e endotelina-1 foram quantificadas por Real time PCR. As citocinas séricas foram quantificadas por ensaio imunoenzimático.

Resultados: O grupo I/R mostrou perda expressiva da espessura da mucosa do intestino, diminuição do fluxo sanguíneo mesentérico (P = 0,0203), aumento do número de leucócitos migrados (P < 0,05) e alta mortalidade (35%). O tratamento

com 17-β-estradiol antes da oclusão da aorta preservou a espessura da mucosa intestinal (P = 0,0437) e o fluxo sanguíneo mesentérico (P = 0,0251), reduziu o número de leucócitos migrados (P < 0,05) e preveniu qualquer ocorrência fatal. Além disso, o 17-β-estradiol diminuiu a expressão da molécula de adesão intercelular-1 (P = 0,0001) e da P-selectina (P <0,0001) no endotélio e aumentou a expressão proteica da eNOS (P <0,0001). As expressões gênicas de eNOS e endotelina-1 não diferiram entre os grupos.

Conclusões: O tratamento profilático com 17β-estradiol mostrou melhor repercussão global, foi capaz de prevenir qualquer ocorrência fatal e aumentar a expressão de eNOS, preservando assim a perfusão mesentérica e a integridade intestinal, além de reduzir sua inflamação.

Descritores: isquemia mesentérica; aorta torácica; estradiol; microcirculação; ratos

Sousa PTR. 17β-Estradiol prevents mesenteric injury induced by occlusion of the proximal descending aorta in male rats [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2017.

Objective: In surgical aortic repair or cardiac surgery with aorta occlusion, the occurrence of mesenteric ischemia and bowel injury has been associated with higher short-term mortality. The vascular protection of estrogens has been investigated and is mainly mediated by increasing the availability of nitric oxide (NO). Therefore, this study investigated the role of 17β-estradiol on visceral ischemia-reperfusion (I/R) injury after descending aorta occlusion in male rats.

Methods: Mesenteric ischemia was induced in male Wistar rats by placing a 2F Fogarty arterial embolectomy catheter (Edwards Lifesciences, Irvine, Calif) in the descending aorta, which remained occluded for 15 minutes, followed by reperfusion for up to 2 hours. Rats were divided into four groups: (1) rats that underwent surgical manipulation only (sham, n = 22); (2) rats that underwent I/R injury (n = 22); (3) rats treated with intravenous 17β-estradiol (280 µmg/kg) 30 minutes before I/R (n = 22); (4) or at the beginning of reperfusion (n = 22). Intestinal histopathologic changes were evaluated by histomorphometry. Mesenteric microcirculatory alterations were assessed by laser Doppler flowmetry and intravital microscopy technique. Protein expression of intercellular adhesion molecule-1, P-selectin, endothelial NO synthase (eNOS), and endothelin-1 was evaluated by immunohistochemistry; in addition, eNOS and endothelin-1 gene expressions were quantified by real-time polymerase chain reaction. Serum cytokines were measured by enzyme-linked immunosorbent assay.

Results: Relative to the sham group, the I/R group exhibited a highly pronounced loss of intestine mucosal thickness, a reduction in mesenteric blood flow (P = 0,0203), increased migrated leukocytes (P < 0,05), and high mortality rate (35%). Treatment with 17-βestradiol before aorta occlusion preserved intestine mucosal

thickness (P = 0,0437) and mesenteric blood flow (P = 0,0251), reduced the number of migrated leukocytes (P < 0,05), and prevented any fatal occurrence. Furthermore, 17-βestradiol downregulated the expression of intercellular adhesion molecule-1 (P = 0,0001) and P-selectin (P < 0,0001) on the endothelium and increased the protein expression of eNOS (P < 0,0001). The gene expressions of eNOS and endothelin-1 did not differ between the groups.

Conclusions: The prophylactic treatment with 17-βestradiol showed better overall repercussions and was able to prevent any fatal occurrence, increase eNOS expression, thus preserving mesenteric perfusion and intestinal integrity, and reduce inflammation.

Descriptors: mesenteric ischemia; aorta, thoracic; estradiol; nitric oxide; microcirculation; rats

1. Introdução

1.1. Obstrução aórtica, isquemia mesentérica e manifestação clínica

A oclusão aórtica por pinçamento em processos cirúrgicos cardiovasculares envolvendo o reparo de aneurismas aórticos toracoabdominais ou dissecção da aorta, além de tumores, doenças genéticas e tromboembólicas, podem gerar alterações isquêmicas negativas acometendo não somente os órgãos próximos, como também os mais distantes da pinça aórtica. Complicações cardíacas, neurológicas, pulmonares, viscerais e periféricas associam-se à dissecção da aorta ou ao sangramento aórtico, uma vez que os ramos da aorta estão comprometidos ou afetados pela compressão mecânica. (Wu *et al*., 1999; Erbel *et al.*, 2014).

Os órgãos do trato gastrointestinal estão entre os mais sensíveis à lesão de isquemia e reperfusão. Dentre estes, o intestino é provavelmente o mais sensível, pois é composto por células lábeis que são facilmente lesadas por episódios de isquemia. A mucosa intestinal sofre, ainda, danos de natureza mais acentuada durante a subsequente fase de reperfusão (Eltzschig & Collard 2004; Mallick *et al*., 2004). Evidências experimentais indicam que a isquemia mesentérica está associada a danos na mucosa intestinal e diminuição da função da barreira intestinal que, sob condições fisiológicas normais, protege o organismo contra a translocação de bactérias do lúmen intestinal (Studer & Wu, 2000; Hajipour *et al*., 2009). As consequências da isquemia mesentérica são devastadoras para o paciente e, geralmente, resultam em diarreia, absorção deficiente de nutrientes e, em casos graves, infarto agudo do intestino e síndrome do intestino curto (Oldenburg *et al*., 2004; Mallick *et al*., 2004).

A isquemia mesentérica aguda é uma emergência potencialmente fatal com mortalidade global que varia de 60% a 80%. A taxa de sobrevivência não melhorou substancialmente nas últimas décadas, dado que a apresentação clínica é inespecífica na maioria dos casos, caracterizando-se por uma discrepância inicial entre dor abdominal intensa e achados clínicos irrelevantes (Oldenburg *et al*., 2004). É preciso ressaltar que a isquemia mesentérica aguda

não é uma entidade clínica isolada, mas compreende um complexo de doenças, como a embolia arterial mesentérica, a trombose venosa mesentérica e a isquemia mesentérica não-oclusiva. Destaca-se também que os pacientes com história de insuficiência cardíaca congestiva, arritmias cardíacas, aterosclerose, hipovolemia ou hipotensão e sepse, bem como pacientes recém-operados, com trombose venosa profunda, embolia arterial, ou doença do colágeno estão todos sob risco de sofrerem isquemia intestinal (Vollmar & Menger, 2011).

Pacientes em idade avançada e com múltiplas comorbidades, queixando-se de dor abdominal intensa desproporcional ao exame, caracterizam a apresentação clínica típica da isquemia mesentérica. Embora a dor seja o sintoma mais consistente, a apresentação varia significativamente de acordo com a etiologia da isquemia mesentérica aguda. Vômitos, diarreia, distensão e sangue nas fezes ocorrem com frequência, mas não universalmente. Alteração mental é comum, complicando ainda mais a avaliação dos pacientes. A isquemia do intestino delgado desencadeia dor de cólica e dor periumbilical; a sensibilidade ao exame é mínima até que a isquemia transmural se desenvolva, estágio no qual a lesão peritoneal torna-se evidente. A necrose intestinal, quando se desenvolve, leva à peritonite difusa, abdome rígido e sepse. O diagnóstico permanece desafiador, ilustrado pelo fato da isquemia mesentérica aguda ser cogitada em apenas uma minoria dos pacientes que vão a óbito em decorrência da doença (Carver *et al*., 2016).

1.2. Fisiopatologia da lesão de isquemia e reperfusão

Caracteriza-se como isquemia a redução do fluxo sanguíneo, de maneira generalizada ou parcial, para uma determinada área, circunstância que acarretará na diminuição da quantidade de oxigênio necessária para a manutenção da demanda metabólica tecidual (Jennings *et al*., 1975; Pinheiro *et al*., 1999).

A isquemia determina uma série de alterações metabólicas nos tecidos que podem culminar em morte celular. A ausência de oxigênio impede a fosforilação oxidativa na mitocôndria, de modo que a glicólise anaeróbica torna-

se o meio de obtenção de energia, sendo, entretanto, menos eficiente para a reposição do trifosfato de adenosina (ATP). O déficit de ATP prejudica o transporte ativo de íons através da membrana, levando a um acúmulo de sódio e água, além do aumento da permeabilidade ao cálcio no interior da célula. Este, por sua vez, potencializado pela diminuição de seu transporte ativo para o meio extracelular, processo dependente de ATP, apresenta vários efeitos deletérios, incluindo alteração da forma da célula por contração de seu esqueleto; ativação de fosfolipases, com consequente liberação de metabólitos do ácido araquidônico a partir da membrana celular e das organelas; e produção de radicais livres. Todos estes efeitos contribuem para a morte celular (Pinheiro *et al*., 1999).

É preciso ressaltar que embora a restauração do fluxo sanguíneo após a isquemia seja essencial para prevenir o dano celular irreversível, a reperfusão *per se* pode agravar a lesão associada ao episódio isquêmico, como resultado da disseminação sistêmica de produtos tóxicos gerados durante a fase de reperfusão tecidual (Castro e Silva Jr *et al*., 2002). O termo lesão de reperfusão foi introduzido em 1989 por Reimer e colaboradores ao descreverem a necrose celular como resultante da isquemia, e o papel dos radicais livres e dos neutrófilos na lesão estabelecida após a retomada do fluxo sanguíneo. A lesão de isquemia e reperfusão associa-se a uma ampla gama de condições fisiopatológicas, podendo apresentar-se de forma localizada ou adquirir caráter sistêmico (Girn *et al*., 2007; Eltzschig & Eckle, 2011).

Um fator primordial na indução da lesão intestinal após reperfusão é a geração de espécies reativas do oxigênio provenientes da cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria, metabolismo da xantina-oxidase, geração de prostaglandinas e ativação de neutrófilos. Considerando seu potencial óxido-redutor, as espécies reativas do oxigênio atuam danificando as membranas celulares através da peroxidação lipídica, ativando os leucócitos e estimulando a sua migração pela ativação da fosfolipase A_2 e formação do ácido araquidônico, precursor da síntese dos eicosanoides (Eltzschig & Collard, 2004; Cerqueira *et al.*, 2005).

Atribui-se à disfunção endotelial, o gatilho da lesão de reperfusão. As células endoteliais produzem endotelina (ET) e óxido nítrico (NO) dentre outros elementos moduladores da resposta vascular. O NO é uma molécula simples, ubíqua em sistemas biológicos, a qual possui uma potente ação vasodilatadora, controla o tônus vascular, inibe a agregação de plaquetas e a interação neutrófilo-endotélio (Durakbasa *et al*, 1998; Mallick *et al*., 2004). A síntese do NO, a partir da L-arginina, ocorre pela atuação de isoformas constitutivas da enzima, as quais incluem a sintase endotelial (eNOS) e a sintase neuronal (nNOS) e a forma induzível da sintase do NO (iNOS). O excesso de produção de NO pela iNOS contribui para a fisiopatologia da lesão de isquemia e reperfusão. No entanto, o NO produzido pela eNOS exerce um efeito protetor meritório sobre o intestino delgado no início da lesão de isquemia e reperfusão (Durakbasa *et al*, 1998; Pararajasingam *et al*., 2000; Mallick *et al*., 2004; Cerqueira *et al.*, 2005). O óxido nítrico atenua o desenvolvimento da aterosclerose através da prevenção da expressão de moléculas de adesão, agregação plaquetária e das interações leucócito-endotélio. Nas células endoteliais, a expressão e ativação da eNOS é o fator mais importante na regulação da homeostase vascular e na proteção contra a aterosclerose (Sumi e Ignarro, 2003). As endotelinas são peptídeos vasoconstritores produzidos pelo endotélio em resposta à hipóxia que regulam o tônus vascular, a pressão sanguínea e a proliferação celular da parede vascular. A diversidade na função biológica tornou-se aparente com várias outras funções para estes peptídeos. Três isoformas de endotelinas (ET-1, ET-2 e ET-3) codificadas por três genes diferentes foram identificadas. ET-1 é o agente vasoconstritor mais potente, tendo sido isolado e caracterizado a partir dos meios de cultura de células endoteliais aórticas. As endotelinas são secretadas de maneira constitutiva e de maneira regulatória. A secreção constitutiva é mais comum e envolve a transcrição de genes e aumento da estabilidade do mRNA para a pré-pro-ET, desta forma a secreção após o estímulo apropriado é muito lenta. No modo regulatório, a estimulação leva à rápida secreção de endotelina, com meia-vida inferior a 5 minutos, porém com um efeito muito mais duradouro (Yanagisawa - 4). Os principais efeitos benéficos, quando da inibição dos seus efeitos, incluem a redução da lesão de mucosa, a melhora do fluxo sanguíneo, o aumento de

ATP na mucosa e a diminuição da adesão leucocitária (Mallick *et al*., 2004; Girn *et al*., 2007).

Citocinas pró-inflamatórias, incluindo a interleucina (IL)-1β, o fator de necrose tumoral (TNF)-α e o interferon (IFN)-γ, produzidas por leucócitos e células endoteliais, desempenham um papel importante durante as fases precoce e tardia da cascata isquêmica. Sua produção após a lesão de isquemia e reperfusão é transitória, sendo consideradas marcadores do processo. Apesar de atuarem em grande parte localmente, também afetam a função e integridade dos órgãos distantes do local atingido pela lesão (Flessas *et al*., 2011; Mallick *et al*., 2004; Oruckaptan *et al*., 2009). Além do mais, as células endoteliais sob estímulo de citocinas, particularmente TNF-α e IL-1β, passam a expressar as moléculas de adesão responsáveis pelas interações leucócito-endotélio (Flessas *et al*., 2011).

Durante a inflamação, a microvasculatura da mucosa intestinal controla a natureza e a magnitude do influxo de subpopulações de células T através da expressão de moléculas de adesão celular (CAMs) e da secreção de quimiocinas, que amplificam a comunicação com leucócitos e outras células. Em particular, o recrutamento de leucócitos circulantes é um processo crucial em várias fases da inflamação, envolvendo a captura sequencial, o rolamento e aderência firme ao endotélio microvascular, transmigração através da parede vascular e posteriormente migração no tecido perivascular. Várias CAMs estão envolvidas na mediação de interações leucócito-endotélio, tais como selectinas, moléculas da superfamília das imunoglobulinas e integrinas. (Danese *et al*., 2005). A molécula de adesão intercelular (ICAM)-1 é expressa em leucócitos, fibroblastos, células epiteliais e células endoteliais e tem sua expressão aumentada durante a inflamação, favorecendo a adesão leucocitária (Danese *et al*., 2005). As selectinas mediam a adesão de células hematopoiéticas a superfícies vasculares. Estas interações são importantes para a defesa do hospedeiro, hematopoiese, vigilância das células do sistema imune, hemostasia e inflamação. Membros da família das selectinas compreendem as moléculas E-selectina, presente nas células endoteliais; P-selectina, presente nos corpúsculos de Weibel-Palade das células endoteliais e grânulos α das plaquetas; e L-selectina, molécula constitutiva expressa na maioria dos

leucócitos. Seus ligantes são estruturas constituidas de carboidratos incorporadas a proteínas e lipídeos (glicoconjugados). A P-selectina é rapidamente mobilizada a partir de grânulos secretores para as membranas plasmáticas de plaquetas e células endoteliais sob estímulo inflamatório. A expressão da E-selectina nas células endoteliais depende da sua transcrição gênica estimulada por mediadores inflamatórios, tais como TNF-α (Zarbock *et al*., 2011).

Os neutrófilos são as células efetoras da lesão de isquemia e reperfusão. Em modelo de transplante de intestino delgado, Massberg e colaboradores (1998) demonstraram que a manifestação da lesão de isquemia e reperfusão ocorre principalmente devido às interações leucócito-endotélio em vênulas da submucosa do intestino transplantado. Análises de tecidos expostos à lesão de isquemia e reperfusão, por técnica de microscopia intravital, revelam uma resposta inflamatória aguda caracterizada pelo aumento da adesão e emigração de leucócitos polimorfonucleares nas vênulas pós-capilares, associado ao aumento da permeabilidade vascular à proteína (Granger & Korthuis, 1995; Mallick *et al*., 2004). Além do mais, os neutrófilos contêm enzimas que reduzem o oxigênio molecular a íon superóxido e produzem ácido hipocloroso, fornecendo fonte adicional de espécies reativas do oxigênio (Nalini *et al.,* 1993; Mallick *et al*., 2004). As células epiteliais produzem oxidantes derivados da xantina-oxidase e iniciam a produção de agentes pró-inflamatórios, amplificando a migração leucocitária (Oldenburg *et al*., 2004).

1.3. Estradiol e lesão de isquemia e reperfusão

Evidências clínicas e experimentais indicam que os hormônios sexuais influenciam o curso da lesão inflamatória, destacando-se o efeito benéfico do hormônio feminino estrogênio e o efeito deletério do hormônio masculino testosterona. Dentro desse contexto, a maior parte dos estudos conduzidos ao longo da última década sugerem que a resposta ao choque, trauma e sepse pode diferir entre machos e fêmeas, sendo as fêmeas mais resistentes que os machos. Este conceito tem sido confirmado em uma variedade de modelos experimentais

utilizando ratos castrados ou intactos, inclusive em modelo de lesão intestinal (Homma *et al*, 2005; Deitch *et al*., 2006; Proctor, 2008; Doucet *et al*, 2010).

A isquemia esplâncnica associada ao choque hemorrágico, por exemplo, inicia de imediato a liberação de mediadores inflamatórios e espécies reativas do oxigênio e, ao adquirir caráter sistêmico, evolui para situações de alta morbidade e mortalidade (Kawasaki & Chaudry, 2012). O esteroide gonadal 17β-estradiol protege o sistema cardiovascular contra lesões isquêmicas, inflamatórias e metabólicas. Dados recentes indicam que a administração de 17β-estradiol a ratos machos ou fêmeas ovariectomizadas, submetidos ao choque hemorrágico, restaura as funções cardíacas, hepatocelular e do sistema imunológico. No intestino delgado de ratos machos este hormônio modula o efeito vasoconstritor da endotelina-1, melhorando a perfusão do órgão e o fluxo sanguíneo. Além do mais, reduz a atividade da mieloperoxidase intestinal, o lactato, citocinas inflamatórias, a expressão de ICAM-1 e fatores quimiotáxicos, tais como a quimiocina para neutrófilo induzida por citocina (CINC)-1 e a proteína inflamatória do macrófago (MIP)-2, variáveis desencadeadas pela lesão intestinal (Kuebler *et al*., 2002; Proctor, 2008; Kawasaki & Chaudry, 2012).

O estrogênio protege as células endoteliais na prevenção da aterosclerose, consequentemente este hormônio tem sido utilizado na prevenção de doenças cardiovasculares em mulheres após a menopausa. O estrogênio reduz a expressão de endotelina-1 (fator pro-miogênico e vasoconstritor), diminui a expressão de moléculas de adesão em resposta às citocinas e estimula a produção de NO pelas células endoteliais através da fosforilação e ativação da eNOS (efeito agudo ou imediato) e também pela regulação do aumento da expressão gênica da eNOS (efeito crônico) (Sumi e Ignarro, 2003; Florian *et al*., 2004).

Os efeitos dos hormônios sexuais resultam, primariamente, da sua interação com receptores (α e β) localizados em diversos tecidos e células. Estes receptores podem ser encontrados junto à membrana celular ou no núcleo. Ao se acoplar ao receptor há ativação seguida por uma dimerização, o que aumenta a afinidade pelo DNA. Ao se ligar ao DNA, o complexo estrógeno+receptor+DNA recruta uma cascata de co-ativadores e outras proteínas para a região promotora

dos genes-alvo. Esse tipo de interação do hormônio com o DNA é denominado de via genômica/clássica. Algumas respostas geradas pelo estradiol ocorrem minutos após a sua administração. Estas respostas, consideradas não genômicas/rápidas (Meyer *et al*., 2006), ocorrem por ativação de vias enzimáticas e canais iônicos presentes na membrana celular (Boonyarratanakornkit & Edwards, 2007). Ainda, a interação do estradiol com seu receptor na célula endotelial causa rápida estimulação da produção de NO (Caulin-Glaser *et al*., 1997). Considerando os efeitos do NO sobre o tônus da musculatura lisa vascular, seu aumento pode ter relevância adicional para a manutenção da homeostasia do sistema cardiovascular (Hogg *et al*., 2012). Além disso, existem evidências da influência do estradiol na redução da expressão de fatores de transcrição, como o NF-kB e AP-1 (proteína ativadora-1), na vigência de choque hemorrágico experimental (Shimizu *et al*., 2007).

Os dados, analisados em conjunto, indicam que o estradiol pode interferir com o curso da resposta inflamatória bem como exercer importante efeito na homeostasia. Todavia, ainda não existem informações acerca do papel desse hormônio sobre a lesão isquêmica, mesentérica e intestinal, causada pela obstrução da aorta descendente

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Este estudo tem por objetivo geral investigar a ação do 17β-estradiol na lesão mesentérica aguda decorrente da oclusão da aorta descendente proximal via cateter intravascular em ratos machos.

2.2. Objetivos específicos

- Analisar o grau de lesão intestinal;
- Avaliar o fluxo sanguíneo e a perfusão de microvasos na microcirculação mesentérica;
- Analisar as interações leucócito-endotélio e a expressão de moléculas de adesão endoteliais no mesentério;
- Determinar as concentrações séricas de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias;
- Investigar a expressão proteica e gênica da eNOS e da endotelina-1;
- Avaliar o leucograma e parâmetros hemodinâmicos;
- Determinar as concentrações séricas de estradiol e corticosterona.

3. Métodos

3.1. Animais

Neste estudo foram utilizados 88 ratos Wistar machos, provenientes do biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, com 8 semanas de idade (250 a 350 g). Os animais foram mantidos a 23 ± 2°C, período de claro e escuro de 12 horas, sem restrições a ingestão de água e ração. 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 as diretrizes do National Institutes of Health (1985) para o cuidado, manipulação e utilização de animais de laboratório. O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob nº SDC 3887/13/012.

3.2. Delineamento experimental

Os animais foram divididos nos seguintes grupos:

- Grupo falso-operado (FO) – ratos submetidos à manipulação cirúrgica, porém sem oclusão aórtica;

- Grupo isquemia/reperfusão (I/R) – ratos submetidos à lesão de isquemia e reperfusão por oclusão aórtica;

- Grupo estradiol pré-isquemia (E2 Pré I/R) – ratos tratados com 17β-estradiol (280 µg/Kg, iv) 30 minutos antes da isquemia aórtica;

- Grupo estradiol pós-isquemia (E2 Pós I/R) – ratos tratados com 17β-estradiol (280 µg/Kg, iv) ao final da isquemia aórtica.

3.3. Tratamento dos animais com 17β-estradiol

Os animais foram tratados com 280 µg/Kg de 17β-estradiol por via endovenosa 30 minutos antes da indução da isquemia por oclusão da aorta descendente proximal ou ao final da isquemia aórtica. Os animais do grupo I/R receberam solução de ciclodextrina (veículo do 17β-estradiol) por via endovenosa em volume equivalente.

3.4. Anestesia e preparo dos animais

A anestesia foi induzida em câmara fechada com isoflurano a 5%, seguida de intubação e ventilação mecânica através de ventilador para roedores (Harvard 683, Harvard Apparatus, Inc, Holliston, MA, EUA). Manteve-se o plano anestésico com isoflurano a 2%. Realizou-se a ventilação com FiO_2 de 60%, volume corrente de 10 mL/kg e frequência de 70 ciclos por minuto. Os animais foram colocados em decúbito dorsal horizontal, passaram por tricotomia e antissepsia da região cervical ventral e na região ventral próximo à inserção da cauda no abdômen.

Em seguida, os animais foram posicionados em plataforma cirúrgica com aquecimento local para manutenção da temperatura (37°C). Realizou-se a dissecção e cateterização da artéria caudal com um cateter tipo PE 10 para monitorização da pressão arterial distal e coleta de sangue para a gasometria. Monitorizou-se a pressão arterial proximal de maneira indireta através da dissecção e cateterização da artéria carótida comum esquerda com um cateter de politetrafluoretileno tipo PE 50.

3.5. Indução da isquemia mesentérica

Para a indução da isquemia mesentérica, administrou-se heparina por via arterial (100 U/kg) e progrediu-se por cerca de 10 a 12 cm, em sentido caudal, um cateter de Fogarty® 2F (Edwards Lifesciences LLC – Irvine, CA, EUA) pela artéria carótida comum esquerda (mesma incisão realizada para a monitorização

da pressão arterial proximal) até a aorta descendente proximal, em seguida, realizou-se a insuflação parcial (0,04 mL de solução fisiológica a 0,9%) e procedeu-se uma discreta tração em sentido cranial até o posicionamento correto do balão no óstio da artéria carótida comum esquerda. Nessa posição consegue-se, também, a oclusão do óstio da artéria subclávia esquerda – importante via de circulação colateral – o balão foi completamente insuflado até a oclusão total da aorta (aproximadamente 0,08 a 0,1 mL de solução fisiológica a 0,9%). A aorta permaneceu ocluída por um período total de 15 minutos sem correção adicional da pressão arterial proximal. Para a eficiência da oclusão da aorta, observou-se uma imediata e sustentada perda de qualquer detecção de pressão arterial distal (próximo de zero). Realizou-se, ainda, mensurações pressóricas seriadas durante a oclusão da aorta (isquemia mesentérica) e durante a reperfusão mesentérica (desinsuflação/retirada do cateter de Fogarty).

3.6. Análise histopatológica

A espessura total da mucosa, a altura das vilosidades, a profundidade da cripta e a relação altura da vilosidade-profundidade da cripta foram avaliadas por histomorfometria. Um segmento de 3 cm de comprimento do íleo foi removido, imerso em paraformaldeído a 10% durante 24 horas e incluído em parafina. Duas secções do intestino de cada rato, 5 ratos por grupo, foram coradas com hematoxilina e eosina e avaliadas por análise morfométrica. As secções foram digitalizadas (Pannoramic Viewer, 3DHISTECH, Budapeste, Hungria) e 10 áreas das 2 secções, de cada animal, foram exportadas para o NIS Elements Software Basic Research (NIS Elements, Nikon, Tóquio, Japão). As análises foram realizadas por dois observadores, e as médias dos valores de cada um foram submetidos a testes de correlação para determinar a variabilidade entre os avaliadores.

3.7. Microscopia intravital *in situ* de mesentério e análise do fluxo sanguíneo

Para a observação da microcirculação mesentérica realizou-se uma incisão cutânea e muscular na porção lateral direita do abdômen para a exteriorização do leito vascular mesentérico, conforme descrito anteriormente por Nakagawa e colaboradores (2006). Os animais foram mantidos em decúbito lateral direito sobre uma placa acrílica aquecida a 37°C. Manteve-se a preparação úmida e aquecida por superfusão com solução de Krebs-Henseleit (pH 7,2 a 7,4) com a seguinte composição (mM): 113 NaCl; 4,7 KCl; 2,5 $CaCl_2.2H_2O$; 25 $NaHCO_3$; 1,1 $MgSO_4$; 1,1 KH_2PO_4 e 5 de glicose, saturada com uma mistura de gases (95% N2 5% CO2). O sistema utilizado consiste de microscópio triocular (AxioCam HSc, Carl Zeiss Co., München-Hallbergmoos, Alemanha) acoplado a uma câmera digital para captura de imagens em movimento (Axiocam-HSB, Carl Zeiss Co., München-Hallbergmoos, Alemanha) e um computador. A quantificação de vasos perfundidos (< 30 µm de diâmetro) foi determinada usando um microscópico óptico (aumento de 100x) em uma área mesentérica de 1 mm^2 no monitor do computador. Classificou-se o fluxo sanguíneo de cada microvaso como contínuo ou intermitente/ausente. Cinco campos por animal foram selecionados. A interação dos leucócitos com a superfície luminal do endotélio venular (vênulas pós-capilares de 15 a 30 µm de diâmetro) em segmento escolhido do vaso foi analisada com uso de um microscópio óptico (aumento de 400x). Determinou-se, durante 03 minutos, o número de leucócitos que se moveram na periferia em contato com o endotélio. Determinou-se o número de células que permaneceram aderidas ao endotélio por mais de 30 segundos em uma extensão de 100 µm da vênula. Leucócitos migrados para o tecido perivascular foram contados em áreas equivalentes a 5.000 μm^2. Determinou-se o fluxo sanguíneo na microcirculação mesentérica *in situ* e *in vivo* pela utilização de probe (MNP110XP Fine Needle Probe) de 25 mm de extensão e 0.48 mm de diâmetro acoplado a fluxômetro a laser (IN191 Laser Doppler Flowmetry, AD Instruments, Colorado Springs, CO, EUA). O sinal captado é proporcional ao fluxo de células sanguíneas através da microvasculatura. Portanto, a perfusão microvascular é o produto da velocidade

média das células sanguíneas e do número médio de células sanguíneas presentes no tecido sob incidência do laser. Os sinais são registrados como unidades de perfusão sanguínea.

3.8. Imunohistoquímica para pesquisa de moléculas de adesão, eNOS e endotelina-1

Após exsanguinação pela aorta abdominal, o mesentério foi removido, imerso em hexano sob nitrogênio líquido e armazenado a -80ºC. Cortes seriados do mesentério (8 μm de espessura) foram colocados sobre lâminas de vidro previamente revestidas com organo-silane (Sigma Chemical Co, St. Louis, Mo, EUA) e as amostras, fixadas em acetona gelada por 10 minutos. As lâminas foram lavadas com solução tampão TRIS salina-tween 20 (TBST), posteriormente permeabilizadas com TBST e triton X-100, seguido de bloqueio de sítios inespecíficos com TBST contendo 1% de albumina sérica bovina (BSA) e bloqueio da peroxidase endógena (solução de H_2O_2 2%). Para a imunodetecção das moléculas de adesão, ICAM-1 e P-selectina, foram utilizados anticorpos primários anti-ICAM-1 de rato (CD54, Abcam, Cambridge, EUA) e anti-P-selectina humana (CD62P, R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA) diluídos em solução de TBST contendo 1% de BSA 1:100 e 1:40 respectivamente. Para a imunodetecção de eNOS e endotelina-1, foram utilizados anticorpos primários (Abcam, Cambridge, EUA) diluídos 1:100 em solução de TBST contendo 1% de BSA. A incubação dos cortes foi realizada por 1 hora a 37ºC, lavadas com TBST e incubadas com solução 1:200 de anticorpo secundário anti-camundongo ou anti-coelho IgGs associados a HRP (Millipore, Billerica, MA, EUA) por 2 horas a 37ºC. Após nova lavagem com TBST, as lâminas foram incubadas com solução de substrato 3-amino-9-etilcarbazol (AEC) por 5 a 10 minutos e contra coradas com hematoxilina. Para o controle negativo as amostras foram incubadas com solução fosfato salina (PBS). A análise foi realizada através de sistema de aquisição de imagens com câmera digital DS-Ri1 (Nikon, Toquio, Japão), acoplada a microscópio de fluorescência (Nikon) e analisadas com auxílio do software NIS-Elements (Nikon).

3.9. Real time PCR para expressão gênica de eNOS e endotelina-1

Os genes foram quantificados quanto à expressão através de PCR em tempo real, em aparelho Step One Plus® (Applied Biosystem, EUA). A extração de RNA dos tecidos (pulmão e mesentério) foi realizada com a utilização de kit comercial (Mirvana®, Ambion, MA, EUA), 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, EUA): GAPDH (Rn01775763_g1), β-actin (Rn00667869_m1*), iNOS (Rn00561646_m1*), eNOS (Rn02132634_s1*), endothelin-1 (Rn00561129_m1*). As condições de ciclagem foram: 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C seguido de 40 ciclos de 15 segundos 95°C e 1 minuto a 60°C.

3.10. Determinação do número total e diferencial de leucócitos circulantes

Coletou-se amostras de sangue (20 µL) da cauda dos animais antes da indução da isquemia e após o término do período de reperfusão. Realizou-se as contagens total e diferencial das células com auxílio de analisador hematológico (BC-2800vet, Mindray, China).

3.11. Detecção de citocinas séricas

Procedeu-se a quantificação de IL-6, IL-10 e CINC-1 por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) utilizando-se o kit *Duo-set* (R&D Systems, MN, EUA). Os ensaios foram conduzidos seguindo as especificações do fabricante.

3.12. Análise estatística

Os dados das amostras foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguido de teste de Tukey para múltiplas comparações ou Kruskal

Wallis seguido de teste de Dunn para múltiplas comparações. Teste de qui-quadrado seguido de teste de Fischer para múltiplas comparações foi utilizado para a análise estatística da taxa de mortalidade. As análises estatísticas foram conduzidas utilizando *GraphPad Prism Software* v.6. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM). Valores de $P < 0,05$ foram considerados significantes.

4. Resultados

Para a indução da lesão isquêmica, a aorta permaneceu ocluída por um período total de 15 minutos sem correção adicional da pressão arterial proximal. As pressões arteriais distal e proximal foram registradas antes do início do procedimento isquêmico, durante a oclusão aórtica (isquemia) e durante a reperfusão (desinsuflação / remoção do cateter Fogarty). A eficiência na oclusão da aorta é indicada por uma imediata e sustentada perda de qualquer detecção de pressão arterial distal (próximo de zero). Conforme ilustrado 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). Situação semelhante foi observada em animais submetidos a injúria de isquemia-reperfusão, tratados ou não com 17β-estradiol ($P > 0,05$). Não houve variações de pressões arteriais, distal e proximal, nos controles falso-operados.

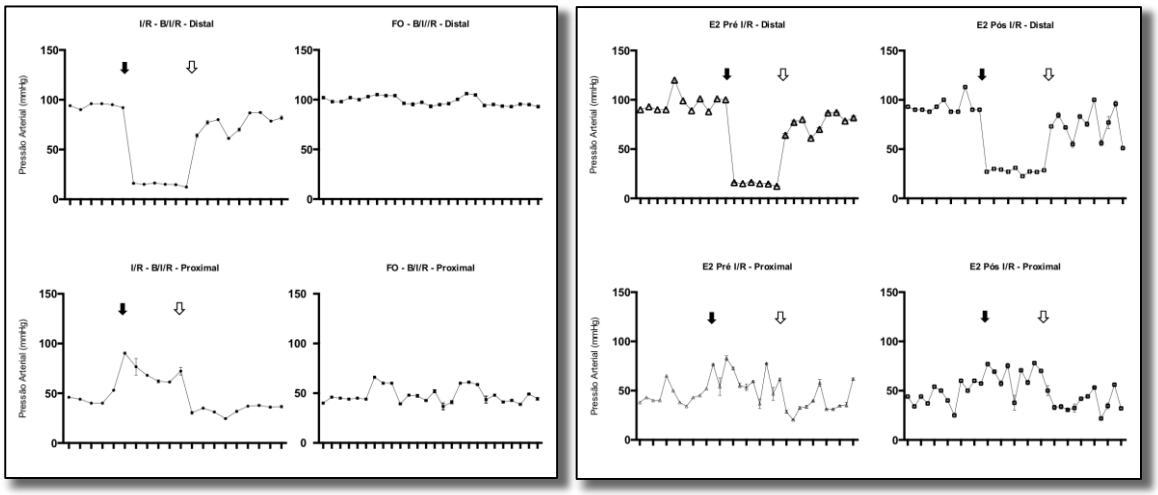

Figura 1. Registro da pressão arterial distal e proximal de rato submetido à lesão de isquemia e reperfusão (I/R); rato controle falso-operado (FO); rato tratado com 17β-estradiol (E2) antes da indução da lesão de isquemia e reperfusão (E2 Pré I/R) e de rato tratado com 17β-estradiol ao início da reperfusão (E2 Pós I/R). A seta preta indica o momento da oclusão da aorta e a seta branca o início da reperfusão.

Conforme mostrado na Tabela I, houve uma redução na taxa de mortalidade quando os animais foram tratados com 17β-estradiol previamente à oclusão da aorta, sem ocorrência fatal no grupo E2 Pré I/R.

Tabela I. Taxa de mortalidade

Grupos	Mortes/n	Taxa de mortalidade (%)
FO	0/22	0
I/R	12/34	35
E2 Pré I/R	0/22	0*
E2 Pós I/R	06/28	21

Ratos falso-operados (FO); ratos submetidos à lesão de isquemia-reperfusão (I/R); ratos tratados com 17β-estradiol (E2, 280 µg/kg, iv) antes da lesão de I/R (E2 Pré I/R); ou no início da reperfusão (E2 Pós I/R). n representa o número de animais por grupo. Teste de qui-quadrado seguido de teste de Fischer para múltiplas comparações *P = 0,0017 E2 Pré I/R *versus* I/R; P = 0,2716 E2 Pós I/R *versus* I/R.

A análise histomorfométrica do intestino mostrou que os ratos submetidos à lesão de I/R exibiram perda muito expressiva da espessura total da mucosa, altura das vilosidades e profundidade da cripta quando comparados aos ratos do grupo FO. Os animais tratados com 17β-estradiol previamente à indução da lesão de I/R preservaram a espessura da mucosa intestinal, como demonstrado (Figura 1). As fotomicrografias estão ilustradas na Figura 2.

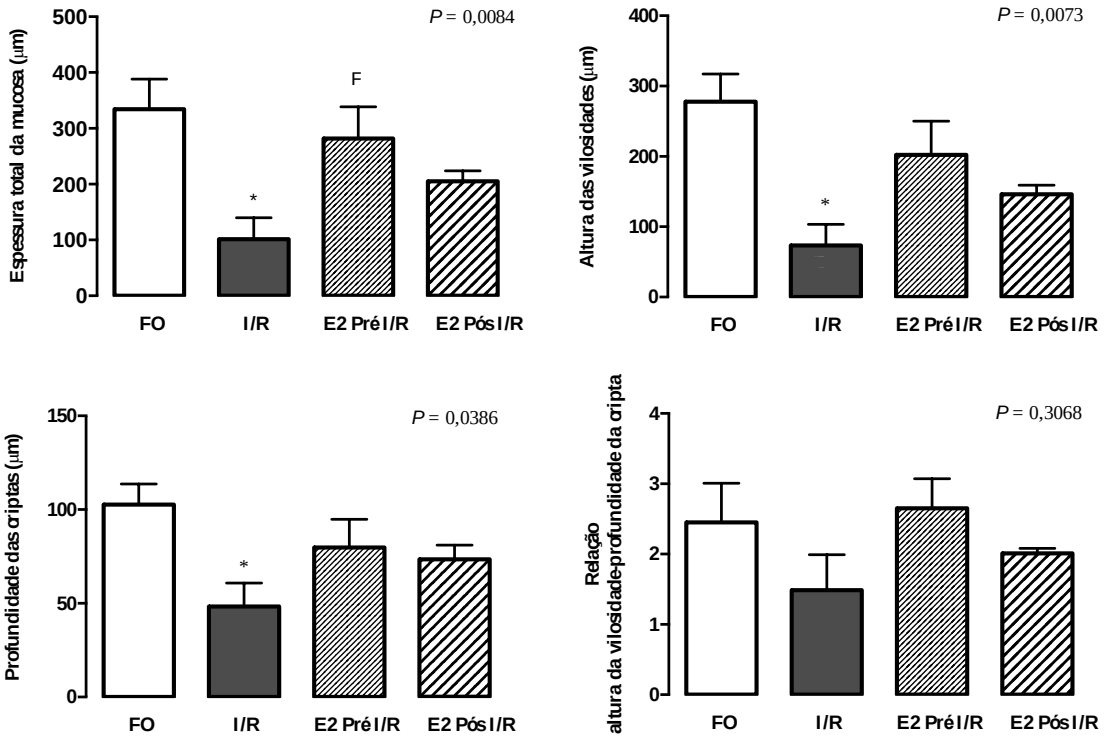

Figura 2. Análise histomorfométrica da espessura total da mucosa, da altura das vilosidades, da profundidade das criptas e da relação altura da vilosidade-profundidade da cripta no intestino. Ratos falso-operados (FO, n=5), ratos submetidos à lesão de isquemia-reperfusão (I/R, n = 5), ratos tratados com 17β-estradiol (E2, 280 µg/kg, iv) antes da indução da isquemia (E2 Pré I/R, n = 5) e ratos tratados no início da reperfusão (E2 Pós I/R, n = 5). Os valores representam a média ± EPM. ANOVA seguida por teste de Tukey para múltiplas comparações. Espessura total da mucosa: **P* = 0,0072 I/R *versus* FO, $^{\Phi}P$ = 0,0437 E2 Pré I/R *versus* I/R; Altura da vilosidade: **P* = 0,0053 I/R *versus* FO; Profundidade da cripta: **P* = 0,0238 I/R *versus* FO.

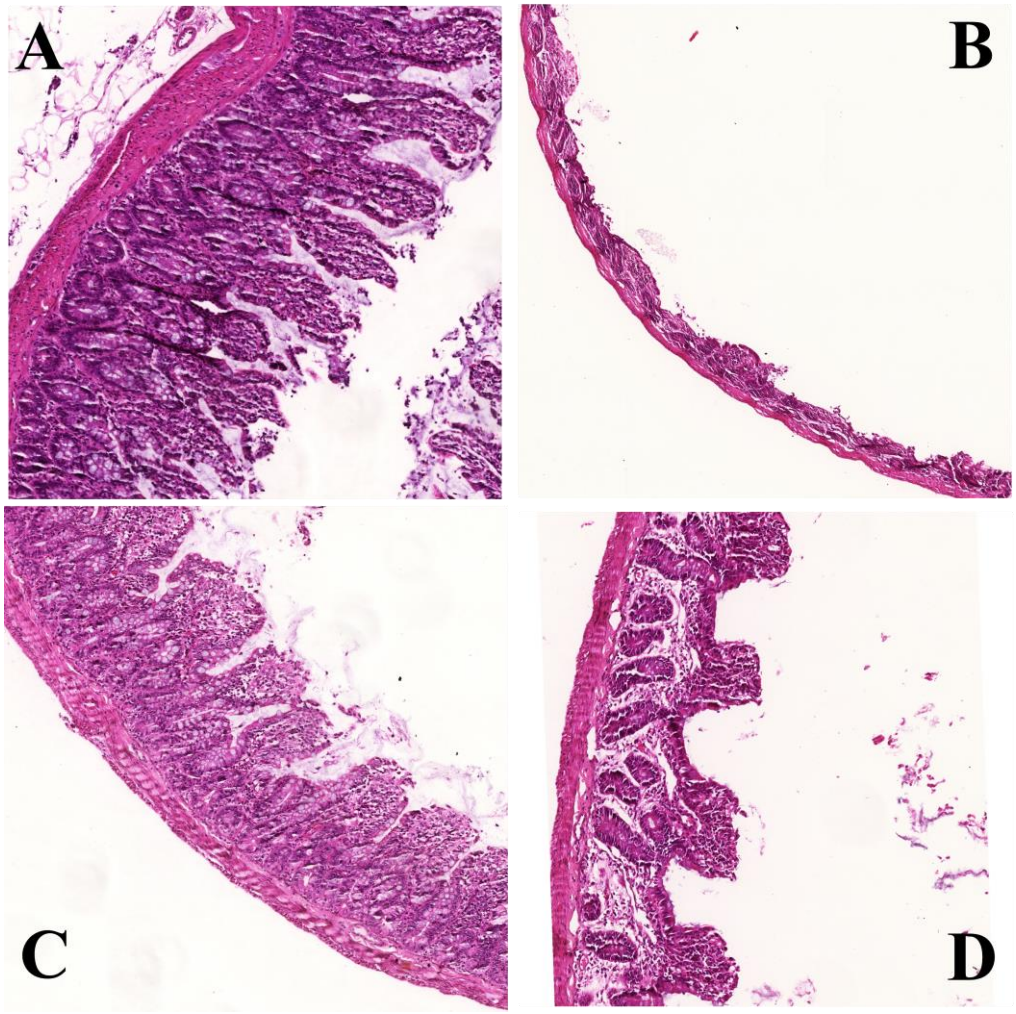

Figura 3. Fotomicrografia do intestino de **A**, rato falso-operado (FO); **B**, rato submetido apenas à lesão de isquemia-reperfusão (I/R); **C**, rato tratado com 17β-estradiol (E2, 280 µg/kg, iv) antes da indução da lesão de I/R (E2 Pré I/R); e **D**, rato tratado ao início da reperfusão (E2 Pós I/R). Estrutura normal do intestino delgado em **A**; perda pronunciada da altura da vilosidade em **B**; preservação da altura da vilosidade em **C**; alterações menos intensas em **D**. Coloração com hematoxilina-eosina. Aumento final de 200x.

Com o objetivo de investigar as alterações microcirculatórias decorrentes da lesão de isquemia e reperfusão, induzida pela oclusão da aorta descendente proximal, procedeu-se o registro do fluxo sanguíneo e a quantificação do percentual de microvasos perfundidos (<30 µm de diâmetro) no leito vascular mesentérico dos animais por técnica de microscopia intravital. Verificou-se, inicialmente, redução no fluxo sanguíneo mesentérico (~20%) no grupo I/R comparado ao grupo FO, indicando que a manobra cirúrgica foi efetiva na indução da lesão. O fluxo sanguíneo foi completamente restaurado no grupo E2

Pré I/R (*P* = 0,0251). Não houve diferença significativa entre os grupos quanto à avaliação de microvasos perfundidos no mesentério. Os resultados encontram-se ilustrados na Figura 4.

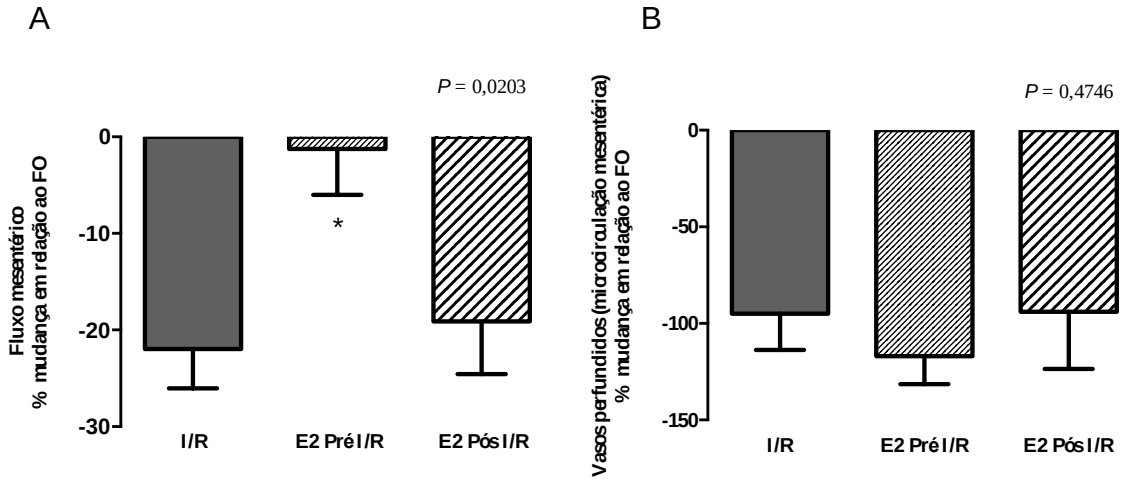

Figura 4. Avaliação do fluxo sanguíneo e de microvasos perfundidos no mesentério em relação à média dos valores obtidos no grupo falso-operado (FO, n = 5). Ratos submetidos à lesão de isquemia-reperfusão (I/R, n = 5) e ratos tratados com 17β-estradiol (E2, 280 µg/kg, iv) antes da indução de I/R (E2 Pré I/R, n = 5) ou tratados ao início da reperfusão (E2 Pós I/R, n = 5). Os valores representam a média ± EPM. ANOVA seguida de teste de Tukey para múltiplas comparações. **P* = 0,0251 E2 Pré I/R *versus* I/R.

Procedeu-se, na sequência, a avaliação das interações leucócito-endotélio na microcirculação mesentérica. Os resultados apresentados na Tabela II demonstram que não houve diferença no diâmetro dos microvasos analisados. Observa-se ainda que todos os grupos submetidos à isquemia e reperfusão, tratados ou não com o hormônio, exibiram redução no número de leucócitos *rollers* quando comparados ao grupo FO. Não houve diferença significativa entre os grupos quanto ao número de leucócitos aderidos. No entanto, observou-se um aumento no número de leucócitos migrados para o tecido perivascular no grupo I/R comparado ao grupo FO. O tratamento com 17β-estradiol realizado previamente à indução da lesão de I/R restaurou completamente o número de células migradas a valores observados no grupo FO.

Tabela II. Interações leucócito-endotélio na microcirculação mesentérica

Grupos	Diâmetro microvascular (µm)	Leucócitos		
		rollers (03 min)	aderidos (100 µm de vênula)	migrados (5.000 µm^2)
FO	21.7 ± 0.5	89 ± 20*	4.4 ± 0.6	1.7 ± 0.2
I/R	20.7 ± 0.6	29 ± 8	4.9 ± 0.3	3.1 ± 0.4$^{\Phi}$
E2 Pré I/R	20.7 ± 0.6	36 ± 8	5.9 ± 1.2	1.8 ± 0.3$^{\delta}$
E2 Pós I/R	22.0 ± 1.0	36 ± 11	4.8 ± 0.7	2.4 ± 0.2
P ANOVA	0,5108	0,0143	0,5349	0,0331

Ratos falso-operado (FO); ratos submetidos à lesão de isquemia-reperfusão (I/R) e ratos tratados com 17β-estradiol (E2, 280 µg/kg, iv) antes da lesão de I/R (E2 Pre I/R) ou ao início da reperfusão (E2 Pós I/R). Os valores representam a média ± EPM de 5 animais por grupo. ANOVA seguida de teste de Tukey para múltiplas comparações. $^*P < 0,05$ *versus* demais grupos; $^{\Phi}P < 0,05$ I/R *versus* FO; $^{\delta}P < 0,05$ E2 Pré I/R *versus* I/R.

Com relação ao leucograma dos animais, verificou-se que: (i) as contagens iniciais, total e diferencial, foram equivalentes em todos os grupos; (ii) ao final dos experimentos, animais de todos os grupos exibiram leucocitose devido, essencialmente, à neutrofilia; (iii) animais tratados com 17β-estradiol mobilizaram mais células que os demais grupos, FO e IR, comparando-se o número total de leucócitos circulantes. Os dados estão indicados na Tabela III.

Tabela III - Contagens total e diferencial de leucócitos no sangue periférico

		Leucócitos (células/mm³)			
Grupo	n	Total	Linfócitos	Neutrófilos	Monócitos
FO inicial	11	14245 ± 522	8209 ± 297	5509 ± 329	527 ± 42
FO final	11	19750 ± 991*	9991 ± 955	9227 ± 1311‡	531 ± 38
I/R inicial	11	13800 ± 520	9927 ± 505	4564 ± 447	536 ± 67
I/R final	11	23409 ± 2380*	9917 ± 1168	13908 ± 1590*	955 ± 177
E2 Pré I/R inicial	16	16138 ± 878	9725 ± 504	5788 ± 396	625 ± 57
E2 Pré I/R final	16	27664 ± 2162†Φ	11413 ± 782	11060 ± 2364‡	778 ± 97
E2 Pós I/R inicial	16	14388 ± 1014	9081 ± 704	4831 ± 406	475 ± 32
E2 Pós I/R final	16	26857 ± 1893†Φ	11482 ± 964	15413 ± 1688†	475 ± 32

Ratos falso-operados (FO); ratos submetidos à lesão de isquemia-reperfusão (I/R) e ratos tratados com 17β-estradiol (E2, 280 µg/kg, iv) antes da lesão de I/R (E2 Pré I/R) ou ao início da reperfusão (E2 Pós I/R). Os valores representam a média ± EPM. n representa o número de animais em cada grupo. Two-way ANOVA seguida de teste de Tukey para múltiplas comparações. †P < 0,0001, *P < 0,001, ‡P < 0,05 *versus* contagens iniciais do mesmo grupo. ΦP<0,0001 *versus* contagens finais nos grupos FO e I/R.

Em seguida, procedeu-se a pesquisa da expressão das moléculas de adesão endoteliais responsáveis pelo rolamento e adesão dos leucócitos ao endotélio microvascular, respectivamente as moléculas P-selectina e ICAM-1. Os resultados indicam que ambos os tratamentos com o hormônio 17β-estradiol, E2 Pré I/R e E2 Pós I/R, reduziram de modo importante a expressão de P-selectina e ICAM-1 nos vasos da microcirculação (Figura 5). Avaliando-se a participação das citocinas (IL-6, IL-10) e quimiocina (CINC-1), verificou-se que houve significância estatística (P = 0,0261) apenas em relação à IL-6 (Tabela IV).

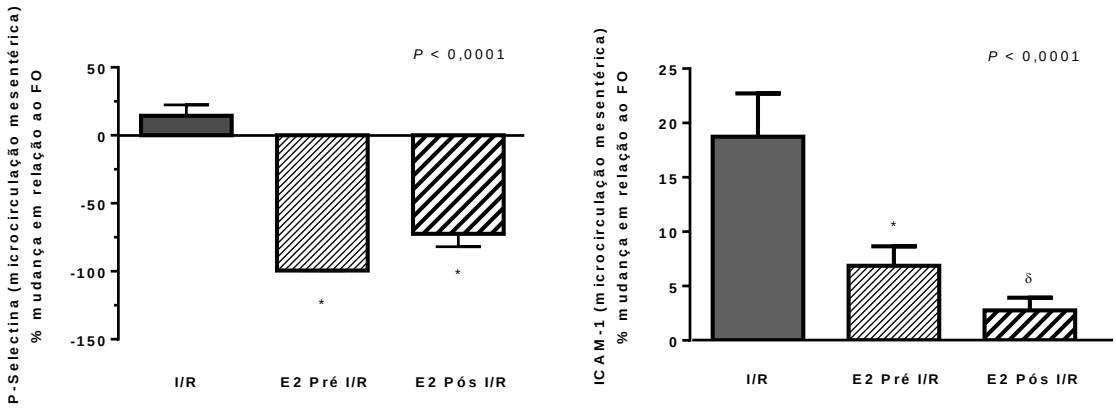

Figura 5. Quantificação da expressão de P-selectina e ICAM-1 nos vasos da microcirculação mesentérica em relação à média dos valores do grupo falso-operado (FO). Ratos submetidos à lesão de isquemia-reperfusão (I/R) e ratos tratados com 17β-estradiol (E2, 280 µg/kg, iv) antes da indução da lesão de I/R (E2 Pré I/R) ou tratados ao início da reperfusão (E2 Pós I/R). Os valores representam a média ± EPM para 03 amostras/rato, 04 ratos/grupo. ANOVA seguida de teste de Tukey para múltiplas comparações. P-selectina: *P < 0,0001 E2 Pré I/R e E2 Pós I/R *versus* I/R. ICAM-1: *P = 0,0297 E2 Pré I/R *versus* I/R, $^{\delta}P$ < 0,0001 E2 Pós I/R *versus* I/R.

Tabela IV – Concentração sérica de citocinas

Grupo	n	IL-6	IL-10	CINC-1
FO	5	271 ± 142	90 ± 86	2921 ± 1195
I/R	6	3904 ± 1994	250 ± 94	3765 ± 838
E2 Pré I/R	5	173 ± 48	561 ± 119	2693 ± 541
E2 Pós I/R	5	1762 ± 1149	279 ± 63	3508 ± 484
P ANOVA		0,0261	0,0796	0,7033

Ratos falso-operados (FO); ratos submetidos à lesão de isquemia-reperfusão (I/R) e ratos tratados com 17β-estradiol (E2, 280 µg/kg, iv) antes da indução da lesão de I/R (E2 Pré I/R) ou tratados ao início da reperfusão (E2 Pós I/R). IL, interleucina; CINC-1, quimiocina para neutrófilo induzida por citocina. Os valores representam a média ± EPM. n representa o número de animais em cada grupo. Kruskal Wallis seguido de teste de Dunn para múltiplas comparações.

Avaliando-se a expressão proteica e gênica de eNOS e endotelina-1 no mesentério constatou-se que o grupo I/R apresentou redução na expressão

proteica de eNOS e aumento na expressão de endotelina-1 (Figura 5). O tratamento prévio com 17β-estradiol aumentou a expressão de eNOS e não modificou a expressão de endotelina-1. Por outro lado, o tratamento com o hormônio após o evento isquêmico aumentou a expressão de eNOS concomitantemente com o aumento da expressão de endotelina-1 (Figura 6). A expressão gênica de ambos, no entanto, não apresentou variação entre os grupos. (Figura 6).

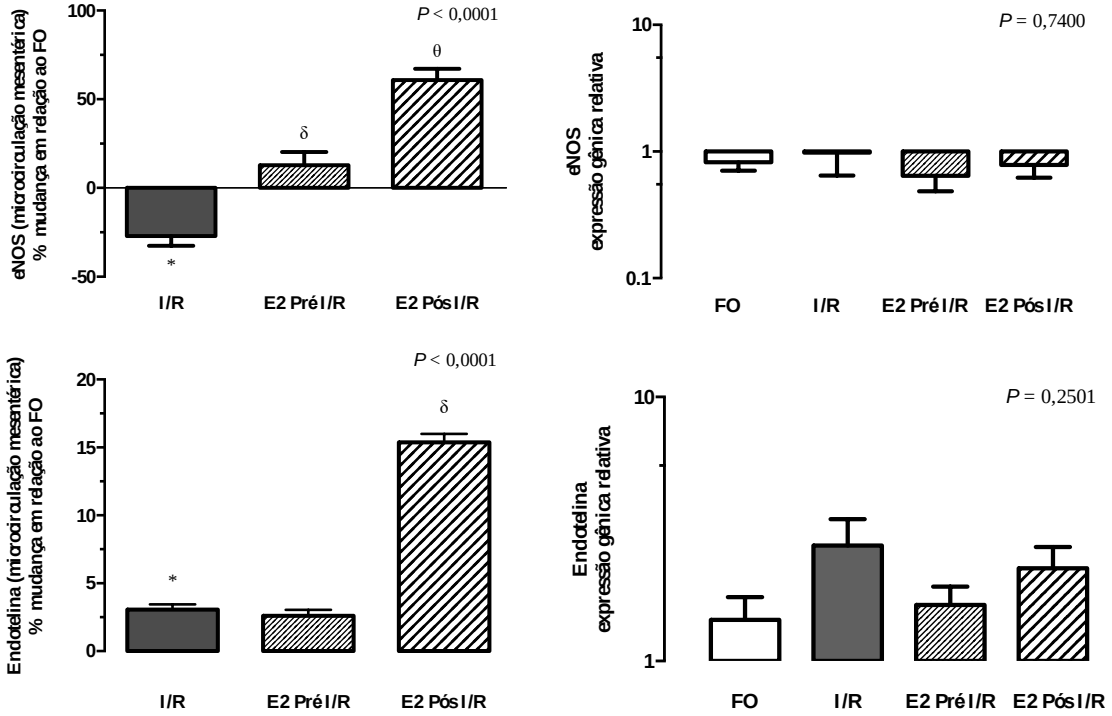

Figura 6. Quantificação das expressões proteica e gênica de eNOS e endotelina-1 no mesentério. Ratos submetidos à lesão de isquemia-reperfusão (I/R) e ratos tratados com 17β-estradiol (E2, 280 µg/kg, iv) antes da indução da lesão de I/R (E2 Pré I/R) ou tratados ao início da reperfusão (E2 Pós I/R). Os valores representam a média ± EPM para 03 amostras/rato, 04 ratos/grupo (imuno-histoquímica) e 06 ratos/grupo (RT-PCR). ANOVA seguida de teste de Tukey para múltiplas comparações. eNOS: *P < 0,0001 E2 Pré I/R e E2 Pós I/R *versus* I/R. Endotelina-1: *P < 0,0001 E2 Pós I/R *versus* I/R. Os dados da expressão proteica relacionam-se à média dos valores do grupo falso-operado (FO). Os dados de expressão gênica estão relacionados aos valores de ratos naïve. Kruskal Wallis seguido de teste de Dunn para múltiplas comparações. Não houve diferença significativa na expressão gênica de eNOS, e endotelina-1 entre os grupos.

As dosagens séricas de 17β-estradiol foram (média ± EPM): 974±561 pg/mL no grupo E2 Pré I/R; 6.031±3.352 pg/mL no grupo E2 Pós I/R e 10.81±2.78 pg/mL nos ratos naïve (n = 5).

As dosagens de corticosterona sérica nos grupos de estudo foram (média ± EPM): 10.363±295 pg/mL no grupo FO; 8.386±839 pg/mL no grupo I/R; 8.605±442 pg/mL no grupo E2 Pré I/R; 10.022±790 pg/mL no grupo E2 Pós I/R ($P > 0,05$). O valor de referência para a corticosterona é 1.356±196 pg/mL.

5. Discussão

Os dados apresentados sugerem que o tratamento com 17β-estradiol previamente à oclusão da aorta apresenta efeitos benéficos no curso da isquemia mesentérica e da lesão intestinal, abrangendo nenhuma ocorrência fatal, manutenção do fluxo sanguíneo mesentérico, preservação da integridade da mucosa intestinal e redução da inflamação.

Apesar dos avanços na identificação de pacientes com alto risco de desenvolvimento de isquemia intestinal, e do aperfeiçoamento de estratégias eficazes (reposição volêmica, uso de antibióticos de amplo espectro, tratamento cirúrgico convencional, abordagem endovascular) em diminuir os danos causados ao mesentério pela lesão isquêmica resultante dos principais procedimentos cirúrgicos cardíacos, a lesão de isquemia-reperfusão visceral ainda é uma complicação importante associada ao aumento da morbidade e mortalidade (Sastry *et al*., 2014; Carver *et al*., 2016; Grootjans *et al.*, 2016).

Os dados apresentados evidenciaram comprometimento acentuado da mucosa intestinal associado à queda sustentada da pressão arterial sistêmica resultante da oclusão aórtica, confirmando, desta forma, a validade do modelo experimental estabelecido para a condução deste estudo. Além disso, a perda da espessura total da mucosa, incluindo altura da vilosidade e profundidade da cripta, resultou em alto índice de mortalidade no grupo não tratado. Estes achados estão de acordo com estudos anteriores que demonstraram que as repercussões histopatológicas na mucosa intestinal, resultantes do pinçamento aórtico supracelíaco em ratos, são intensas e focadas principalmente nas vilosidades (Erling *et al*., 2013). Vale ressaltar, ainda, que lesão extensa da mucosa intestinal com destruição de vilosidades está descrita em modelo porcino de pinçamento aórtico torácico (Kalder *et al.*, 2012). Conforme demonstrado no presente estudo, o 17β-estradiol mostrou-se eficaz na atenuação da lesão da mucosa intestinal e na prevenção da mortalidade conseguinte à oclusão da aorta em ratos machos. Estudos clínicos e experimentais fornecem evidências adicionais que dão suporte ao efeito protetor do estrogênio contra o desenvolvimento de aneurismas da aorta abdominal (Lo e Schermerhornet, 2016; Sinha *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2009).

A fluxometria por laser Doppler é um método exequível e uma técnica sensível para avaliar a viabilidade do intestino após ser submetido à lesão de isquemia-reperfusão (Liu *et al.*, 1997; Redaelli *et al.*,1998). De fato, observou-se redução do fluxo sanguíneo na microcirculação mesentérica após indução de isquemia-reperfusão via oclusão aórtica descendente. Resultados semelhantes foram relatados em estudo que registrou redução de 76% no fluxo sanguíneo da mucosa intestinal decorrente da oclusão da porção supracelíaca da aorta por balão em suínos (Hörer *et al.*,2014). No presente estudo, verificou-se preservação do fluxo sanguíneo mesentérico quando os animais receberam 17β-estradiol antes da indução da isquemia. Este achado está em consonância com os resultados de estudos anteriores nos quais o tratamento de ratos machos com 17β-estradiol determina melhora no fluxo de perfusão intestinal em modelo de choque hemorrágico e aumenta a densidade capilar funcional na microcirculação intestinal durante sepse experimental (Ba *et al.*, 2005; Sharawy *et al.*, 2011).

A hipoperfusão e a isquemia do intestino, seguido de restauração do fluxo sanguíneo, resultam em disfunção microvascular e lesão tecidual (Grootjans *et al.*, 2016). A deterioração microcirculatória é determinante na manifestação da lesão intestinal de isquemia-reperfusão com os sinais clássicos de hipoperfusão, resposta celular inflamatória e rompimento da barreira epitelial, favorecendo a translocação bacteriana. Existem evidências substanciais de que a bacteremia e/ou respostas sistêmicas associadas à endotoxemia, tais como a síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS), sepse, síndrome do desconforto respiratório agudo e disfunção cardíaca estão fortemente relacionadas ao mau prognóstico associado com à lesão de isquemia-reperfusão intestinal aguda (Vollmar e Menger, 2011).

Na tentativa de investigar os efeitos do 17β-estradiol sobre a inflamação, as interações leucócito-endotélio foram avaliadas no mesentério por microscopia intravital. Os dados apresentados mostraram que o 17β-estradiol, quando infundido antes da lesão de isquemia-reperfusão, foi capaz de reduzir o infiltrado inflamatório a valores observados no grupo falso-operado. Este achado aparentemente não está relacionado ao número de leucócitos circulantes, uma vez que todos os grupos apresentaram leucocitose, principalmente devido à

neutrofilia. Esta mobilização de leucócitos foi ainda mais proeminente em ambos os grupos tratados com estradiol.

Glicoproteínas expressas em leucócitos e células endoteliais desempenham papel relevante no recrutamento neutrofílico. A P-selectina expressa em células endoteliais medeia a captura e rolamento de neutrófilos durante o processo inflamatório, e a ativação de células endoteliais aumenta a expressão de ICAM-1, levando à adesão e à migração de neutrófilos para o tecido perivascular (Zarbock *et al*., 2011; Kolaczkowska e Kubes, 2013). Os dados apresentados demonstram que o aumento do número de leucócitos migrados foi acompanhado por intensificação na expressão de ICAM-1. Estes achados estão de acordo com estudos anteriores indicando que a isquemia visceral prolongada, como no pinçamento aórtico, leva à ativação de neutrófilos, à expressão de moléculas de adesão e ao aumento da mortalidade (Barry *et al*., 1997; Erling, 2010). Além disso, o aumento das concentrações sistêmicas de IL-6 e do fator de necrose tumoral-α está associado à disfunção de órgãos no pós-operatório em pacientes submetidos ao reparo de aneurisma da aorta thoracoabdominal (Hanssen *et al*., 2008; Welborn *et al*., 2000). De fato, demonstrou-se a ocorrência precoce de resposta inflamatória aguda durante o reparo eletivo do aneurisma da aorta abdominal, com aumento das concentrações sistêmicas de proteína C reativa, ICAM-1 e IL-6 (Galle *et al*., 2000).

Em contraste com a resposta inflamatória desencadeada pela oclusão da aorta, o tratamento com 17β-estradiol mostrou-se eficaz em diminuir a expressão de ICAM-1, reduzindo, portanto, o infiltrado inflamatório. Sugere-se que o 17β-estradiol possa modular o grau de ativação das células endoteliais, baseado nas seguintes observações: (i) o hormônio administrado antes ou após o pinçamento da aorta reduziu a expressão de ICAM-1; (ii) a expressão da P-selectina também foi reduzida em ambos os grupos tratados, apesar de sua menor contribuição para a inflamação neste modelo de oclusão aórtica. Além disso, as concentrações de IL-6 foram significativamente reduzidas quando os ratos receberam o hormôniol antes da indução da isquemia. Portanto, é razoável supor que o 17β-estradiol desempenha efeito benéfico em relação à isquemia mesentérica e lesão intestinal induzidas pela oclusão da aorta em ratos machos.

Os benefícios observados foram obtidos a partir do tratamento dos animais com dose única de 17β-estradiol (280 µg/kg) por via endovenosa, em concordância com resultados de estudos recentes que pontuaram o efeito atenuante do hormônio na inflamação desencadeada pela isquemia-reperfusão (Breithaupt-Faloppa *et al*., 2014).

Apesar do fato dos glicocorticoides endógenos serem secretados em quantidades maiores nos estágios iniciais da reação inflamatória, caracterizando o estresse associado a procedimentos cirúrgicos de alta complexidade, as concentrações séricas de corticosterona mostraram-se elevadas em todos os grupos, como demonstrado no presente estudo (Sternberg, 2001). Portanto, sugere-se que os benefícios observados sejam decorrentes de atuação direta do 17β-estradiol no endotélio. De fato, este efeito protetor do estrogênio descrito na lesão de isquemia-reperfusão é mediado pela sua ação na expressão e atividade da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) responsável pelo aumento da produção de NO (Menazza e Murphy, 2016). O NO é uma molécula versátil com ampla gama de funções, incluindo a regulação do tônus vascular e sinalização neuronal (Shu *et al*., 2015). As células endoteliais também produzem endotelina-1, um mediador vasoconstritor, entre outros elementos moduladores da resposta vascular (Bourque *et al*., 2011).

Existem pelo menos três receptores de estradiol (ERs) estão envolvidos em seus efeitos vasculares. Os subtipos clássicos, ER-α e ER-β são fatores de transcrição nucleares ativados por ligante, que também podem agir na membrana plasmática, ativando outras vias de sinalização. O outro receptor é o receptor de membrana acoplado à proteína G, que ativa cascatas de sinalização rápida. De modo a aumentar a liberação vascular de NO, o estradiol estimula a expressão gênica, a atividade enzimática e aumenta a expressão proteica de eNOS (Chambliss e Shaul, 2002).

Na tentativa de investigar os mecanismos subjacentes aos efeitos do 17β-estradiol no curso da isquemia mesentérica e da lesão intestinal, avaliou-se as expressões proteica e gênica da eNOS e da endotelina-1. Conforme demonstrado, observou-se a diminuição da expressão proteica de e-NOS e o aumento concomitante da expressão de endotelina-1 após a oclusão da aorta em ratos não tratados. Estes achados sugerem que um desequilíbrio entre estes

dois mediadores pode ser, pelo menos em parte, o elemento responsável pela redução do fluxo sanguíneo mesentérico nestes animais, como sugerido anteriormente (Bourque *et al*., 2011). O pré-tratamento com 17β-estradiol promoveu o aumento na expressão da eNOS sem alterar a expressão da endotelina-1, normalizando assim o fluxo sanguíneo. Curiosamente, o tratamento com 17β-estradiol administrado após a lesão isquêmica também aumentou a expressão da proteína eNOS, porém aumentou concomitantemente a expressão de endotelina-1. Dado que os efeitos do estradiol estão relacionados à redução da síntese e dos efeitos da endotelina-1 e à liberação rápida de NO, sugere-se que o aumento da endotelina-1 nestes animais seja uma resposta vascular para restaurar o equilíbrio entre endotelina-1 e NO para a manutenção do tônus.

Considerando que neste estudo não houve diferenças entre os grupos na na expressão gênica de eNOS e endotelina-1, propõe-se que os efeitos do tratamento com 17β-estradiol resultem de ações rápidas não genômicas do hormônio. De fato, as vias de sinalização não genômicas provocadas pela ativação de receptores do hormônio localizados na membrana plasmática podem ser responsáveis pelos efeitos agudos do 17β-estradiol sobre a microcirculação mesentérica (Menazza e Murphy, 2016).

Os dados, analisados em conjunto, sugerem que o 17β-estradiol possa ser uma estratégia suplementar na prevenção da isquemia mesentérica e da lesão intestinal causada por procedimentos cirúrgicos de alta complexidade, particularmente aqueles que envolvem o pinçamento aórtico.

6. Conclusões

Com base nos resultados obtidos, é possível concluir que a administração de 17β-estradiol previamente à oclusão aórtica:

- Preveniu a lesão intestinal e a ocorrência de fatalidade;
- Restaurou o fluxo sanguíneo na microcirculação mesentérica;
- Reduziu o infiltrado inflamatório e a expressão de ICAM-1 e P-Selectina no mesentério;
- Não alterou significativamente as concentrações séricas de IL-6, IL-10 e CINC-1;
- Aumentou a expressão proteica de eNOS sem alterar a expressão proteica de endotelina-1;
- Não alterou as expressões gênicas de eNOS e endotelina-1.

7. Referências

Ba ZF, Shimizu T, Szalay L, Bland KI, Chaudry IH. Gender differences in small intestinal perfusion following trauma hemorrhage: the role of endothelin-1. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2005;288:G860–5.

Barry MC, Wang JH, Kelly CJ, Sheehan SJ, Redmond HP, Bouchier-Hayes DJ. Plasma factors augment neutrophil and endothelial cell activation during aortic surgery. Eur J Vasc Endovasc Surg 1997;13(4):381-7.

Boonyaratanakornkit V, Edwards DP. Receptor mechanisms mediating non-genomic actions of sex steroids. Semin Reprod Med, 25:139-53, 2007.

Bourque SL, Davidge ST, Adams MA. The interaction between endothelin-1 and nitric oxide in the vasculature: new perspectives. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2011;300:R1288–95.

Breithaupt-Faloppa AC, Fantozzi ET, Romero DC, Rodrigues AS, Sousa PTR, Franco ALS, et al. Acute Effects of Etradiol on Lung Inflammation due to Intestinal Ischemic Insult in Male Rats. Shock 2014;41(3):208-13.

Carver TW, Vora RS, Taneja A. Mesenteric Ischemia. Crit Care Clin. 2016 Apr;32(2):155-71.

Castro E Silva Jr O, Centurion S, Pacheco EG, Brisotti JL, Oliveira AF, Sasso KD. Aspectos básicos da lesão de isquemia e reperfusão e do pré-condicionamento isquêmico. Acta Cir Bras, 17:96-100, 2002.

Caulin-Glaser T, Garcia-Cardena G, Sarrel P, Sessa WC, Bender JR. 17beta-Estradiol regulation of human endothelial cell basal nitric oxide release, independent of cytosolic Ca^{2+} mobilization. Circ Res, 81:885-92, 1997.

CERQUEIRA NF, HUSSNI CA, YOSHIDA WB. Pathophysiology of mesenteric ischemia/reperfusion: a review. Acta Cir Bras, 20:336-43, 2005.

Chambliss KL, Shaul PW. Estrogen modulation of endothelial nitric oxide synthase. Endocr Rev 2002;23(5):665-86.

Durakbasa CU, Dagli TE, Mouni H, Bilsel AS, Yuksel M, Aktan AO. Nitric oxide and endothelin relationship in intestinal ischemia/reperfusion injury. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 59:379-83, 1998

Eltzschig HK, Collard CD. Vascular ischaemia and reperfusion injury. Br Med Bull. 2004 Oct 19;70:71-86.

Eltzschig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion-from mechanism to translation. Nat Med, 17:1391-401, 2011.

Erbel R, Aboyans V, Boileau C, Bossone E, Bartolomeo RD, Eggebrecht H, Evangelista A, Falk V, Frank H, Gaemperli O, Grabenwöger M, Haverich A, Iung B, Manolis AJ, Meijboom F, Nienaber CA, Roffi M, Rousseau H, Sechtem U, Sirnes PA, Allmen RS, Vrints CJ; ESC Committee for Practice Guidelines. 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). Eur Heart J. 2014 Nov 1;35(41):2873-926.

Erling Jr N, Montero EFS, Sannomiya P, Poli-de-Figueiredo LF. Local and remote ischemic preconditioning protect against intestinal ischemic/reperfusion injury after supraceliac aortic clamping. Clinics 2013;68(12):1548-54.

Erling Jr N, Nakagawa NK, Cruz JWMC, Zanoni FL, Baptista-Silva JCC, Sannomiya P, et al. Microcirculatory effects of local and remote ischemic preconditioning in supraceliac aortic clamping. J Vasc Surg 2010;52:1321-9.

Florian M, Lu Y, Angle M, Magder S. Estrogen induced changes in Akt-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase and vasodilation. Steroids. 2004 Sep;69(10):637-45.

Galle C, De Maertelaer V, Motte S, Zhou L, Stordeur P, Delville JP, et al. Early inflammatory response after elective abdominal aortic aneurysm repair: A comparison between endovascular procedure and conventional surgery. J Vasc Surg 2000;32(2):234-46.

Girn HR, Ahilathirunayagam S, Mavor AI, Homer-Vanniasinkam S. Reperfusion syndrome: cellular mechanisms of microvascular dysfunction and potential therapeutic strategies. Vasc Endovascular Surg, 41:277-93, 2007.

Grootjans J, Lenaerts K, Buurman WA, Dejong CHC, Derikx JPM. Life and death at the mucosal-luminal interface: New perspectives on human intestinal ischemia-reperfusion. World J Gastroenterol 2016;22(9):2760-70.

Hajipour B, Somi MH, Saberifar F, Hemmati MR, Asl NA, Moein A, Vatankhah AM, Nourazar AR, Nasirizade MR. Simvastatin attenuates intestinal ischemia/reperfusion induced injury in rat. Folia Morphol (Warsz). 2009 Aug;68(3):156-62.

Hanssen SJ, Derikx JP, Vermeulen Windsant IC, Heijmans JH, Koeppel TA, Schurink GW, et al. Visceral Injury and Systemic Inflammation in Patients Undergoing Extracorporeal Circulation During Aortic Surgery. Ann Surg 2008;248:117–25.

Hogg ME, Vavra AK, Banerjee MN, Martinez J, Jiang Q, Keerfer LK, Chambon P, Kibbe MR. The role of estrogen receptor α and β in regulating vascular smooth muscle cell proliferation is based on sex. J Surg Res, 173:1-10, 2012.

Hörer TM, Skoog P, Nilsson KF, Oikonomakis I, Larzon T, Norgren L, et al. Intraperitoneal Metabolic Consequences of Supraceliac Aortic Balloon Occlusion in an Experimental Animal Study Using Microdialysis. Ann Vasc Surg 2014; 28:1286–95.

Jennings RB, Ganote CE, Reimer KA. Ischemic tissue injury. Am J Pathol. 1975 Oct; 81(1): 179–198.

Kalder J, Keschenau P, Hanssen SJ, Greiner A, Vermeulen Windsant IC, Kennes LN, et al. The impact of selective visceral perfusion on intestinal macrohemodynamics and microhemodynamics in a porcine model of thoracic aortic cross-clamping. J Vasc Surg 2012;56(1):149-58.

Kolaczkowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. Nature Rev Immunol 2013;13:159-75.

Liu DL, Svanberg K, Wang I, Andersson-Engels S, Svanberg S. Laser Doppler perfusion imaging: new technique for determination of perfusion and reperfusion of splanchnic organs and tumor tissue. Lasers Surg Med 1997;20(4):473-9.

Lo RC, Schermerhorn ML. Abdominal aortic aneurysms in women. J Vasc Surg 2016;63:839-44.
Menazza S, Murphy E. The Expanding Complexity of Estrogen Receptor Signaling in the Cardiovascular System. Circ Res 2016;118:994-1007.

Mallick IH, Yang W, Winslet MC, Seifalian AM. Ischemia-reperfusion injury of the intestine and protective strategies against injury. Dig Dis Sci. 2004 Sep;49(9):1359-77

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

Nakagawa NK, Nogueira RA, Correia CJ, Shiwa SR, Cruz JWC, Poli-De-Figueiredo LF, Rocha-E-Silva M, Sannomiya P. Leukocyte-endothelium interactions after hemorrhagic shock/reperfusion and cecal ligation/puncture: an intravital microscopic study in rat mesentery. Shock, 26:180-6, 2006.

Pararajasingam R, Weight SC, Bell PR, Nicholson ML, Sayers RD. Pulmonary nitric oxide metabolism following infrarenal aortic cross-clamp-induced ischaemia–reperfusion injury. Eur J Vasc Endovasc Surg, 19:47-51, 2000.

Pinheiro BV, Holanda MA, Araujo FG, Romaldini H. Lesão pulmonar de reperfusão. J Pneumologia, 25:124-36, 1999.

Redaelli CA, Schilling MK, Büchler MW. Intraoperative laser Doppler flowmetry: a predictor of ischemic injury in acute mesenteric infarction. Dig Surg 1998;15(1):55-9.

Sastry P, Hardmana G, Pagea A, Parkerb R, Goddarda M, Largea S, et al. Mesenteric ischaemia following cardiac surgery: the influence of intraoperative perfusion parameters. Interac CardioVasc Thoracic Surg 2014;19:419–25.

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

Shimizu T, Yu HP, Suzuki T, Szalay L, Hsieh YC, Choudhry MA, Bland KI, Chaudry IH. The role of estrogen receptor subtypes in ameliorating hepatic injury following trauma-hemorrhage. J Hepatol, 46:1047-54, 2007.

Shu X, Stevenson Keller TC, Begandt D, Joshua, Butcher JT, Biwer L,et al. Endothelial nitric oxide synthase in the microcirculation. Cell Mol Life Sci 2015;72:4561–75.

Sinha I, Cho BS, Roelofs KJ, Stanley JC, Henke PK, Upchurch Jr GR. Female Gender Attenuates Cytokine and Chemokine Expression and Leukocyte Recruitment in Experimental Rodent Abdominal Aortic Aneurysms. Ann N Y Acad Sci 2006;1085:367–79.

Sternberg EM. Neuroendocrine regulation of autoimmune/inflammatory disease. J Endocrinol 2001;169 ;429–35.

Studer W, Wu X. Supraceliac aortic cross-clamping and declamping. Effects of dopexamine and dopamine on systemic and mesenteric hemodynamics, metabolism and intestinal tonometry in a rat model. Acta Anaesthesiol Scand. 2000 Mar;44(3):241-8.

Sumi D, Ignarro LJ. Estrogen-related receptor alpha 1 up-regulates endothelial nitric oxide synthase expression. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Nov 25;100(24):14451-6.

Welborn MB, Oldenburg HSA, Hess PJ, Huber TS, Martin TD, Rauwerda JA, et al. The relationship between visceral ischemia, proinflammatory cytokines, and organ injury in patients undergoing thoracoabdominal aortic aneurysm repair. Crit Care Med 2000;28(9):3191-7.

Wu XF, Zhang J, Paskauskas S, Xin SJ, Duan ZQ. The role of estrogen in the formation of experimental abdominal aortic aneurysm. Am J Surg 2009;197:49–54.

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

8. Anexos

JVS