

**CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO CAMILO**  
**Curso de graduação de Biomedicina**

**Larissa Juliana de Lima Basilio**

**ESTUDO DOS EFEITOS DO ESTRADIOL SOBRE A REDUÇÃO  
DA INFLAMAÇÃO MIOCÁRDICA CAUSADA PELA MORTE  
ENCEFÁLICA**

**São Paulo**  
**2018**

**Larissa Juliana de Lima Basilio – RA: 001215**

**ESTUDO DOS EFEITOS DO ESTRADIOL SOBRE A REDUÇÃO  
DA INFLAMAÇÃO MIOCÁRDICA CAUSADA PELA MORTE  
ENCEFÁLICA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Biomedicina do Centro Universitário São Camilo sob a orientação da Profa. Dra. Maria Anete Lallo, como requisito parcial para nota obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

**São Paulo**

**2018**



**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Padre Radrizzani**

Basilio, Larissa Juliana de Lima

Estudo dos efeitos do estradiol sobre a redução da inflamação miocárdia causada pela morte encefálica / Larissa Juliana de Lima Basilio.-- São Paulo: Centro Universitário São Camilo, 2018.

53 p.

Orientação de Maria Anete Lallo

Trabalho de Conclusão de Curso de Biomedicina (Graduação), Centro Universitário São Camilo, 2018.

1. Estradiol 2. Inflamação 3. Miocárdio 4. Morte encefálica 5. Transplante I. Lallo, Maria Anete II. Centro Universitário São Camilo III. Título

CDD: 617.0251

**LARISSA JULIANA DE LIMA BASILIO**

**ESTUDO DOS EFEITOS DO ESTRADIOL SOBRE A REDUÇÃO  
DA INFLAMAÇÃO MIOCÁRDICA CAUSADA PELA MORTE  
ENCEFÁLICA**

São Paulo, 24 de maio de 2018

---

Maria Anete Lallo

---

Adriano Pereira

## DEDICATÓRIA

Dedico esta monografia à Deus e aos meus pais, Eliseu Basilio e Maria Aparecida de Lima Rorato, que sempre me apoiaram em todas as decisões, auxiliando em todas as minhas escolhas.

Á minha avó Maria Francisca Ferreira Lima e a minha tia Cemaia Escher Basilio que sempre acreditaram no meu sonho, aos meus amigos que de muitas formas incentivaram-me.

Aos meus companheiros de quatro patas que foram importantes nos meus momentos de descontração e estresse.

Aos meus avós paternos, ao meu avô Antônio Ferreira Lima, ao meu Tio Nelson Escher e ao meu irmão Leandro Basilio (*in memoriam*), sei que vocês estão sentindo muito orgulho de mim nesta conquista.

Vocês estiveram ao meu lado durante esta longa caminhada.

Muito obrigada pelo apoio de cada um de vocês para que fosse possível a concretização deste trabalho e desta conquista.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por dirigir minha vida, fazendo-me forte, capacitando-me a cada dia e por permitir que eu não perdesse minha fé, que por mais difícil o caminho fosse.

Aos meus pais que foram de inestimável importância durante todos os momentos da minha graduação e também aos meus familiares que acreditaram no meu potencial.

Àqueles que contribuíram diretamente para a realização deste trabalho, sem a dedicação de vocês seria completamente inviável.

Aos meus professores com quem mantive grande oportunidade de aprender. Vocês foram importantes na minha vida acadêmica e por toda minha caminhada para a conclusão do meu curso e no desenvolvimento desta monografia e, em especial à minha orientadora Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria Anete Lallo que sempre mostraram que eu poderia superar a cada frase escrita.

Aos meus amigos que sempre me apoiaram em todos os momentos de alegrias e dificuldades durante todos esses anos.

Enfim, agradeço a todos que me apoiaram nos meus estudos.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.- Descrição estrutural e ilustração da sinalização do estrogênio.....	5
Figura 2.- Organograma do protocolo experimental.....	9
Figura 3.- Concentrações séricas de estradiol (pg/mL) e corticosterona (pg/mL).....	15
Figura 4.- Pressão arterial média de ratas submetidas ou não à morte encefálica, monitorizadas do momento da inserção do cateter (0) até o término do período experimental (6 h).....	16
Figura 5.- Atividade da mieloperoxidase no coração em ratas submetidas à morte encefálica.....	18
Figura 6 - Determinação da permeabilidade vascular para avaliação do edema no coração.....	19
Figura 7.- Efeito do tratamento com estradiol na expressão tecidual de Bcl-2 em ratas submetidas à morte encefálica.....	20
Figura 8.- Efeito do tratamento com estradiol na expressão tecidual de Caspase-3 em ratas submetidas à morte encefálica.....	21
Figura 9.- Análise comparativa do número de leucócitos nos grupos tratados ou não após a morte encefálica.....	22
Figura 10.- Análise comparativa da hemorragia nos grupos tratados ou não após a morte encefálica.....	24

## LISTA DE TABELA

Tabela 1.- Leucograma de ratas submetidas ou não à morte encefálica, monitorizados no momento da inserção do cateter (inicial) até o término do período experimental (6h).....	17
--	----

Basilio, L. J. L. **Estudo dos efeitos do estradiol sobre a redução da inflamação miocárdica causada pela morte encefálica** [monografia]. São Paulo: “Centro Universitário São Camilo”; 2018.

Evidências clínicas e experimentais ressaltam o grande impacto da morte encefálica (ME) sobre a viabilidade do órgão a ser transplantado. Durante a ME ocorrem diversas disfunções hormonais, imunológicas e hemodinâmicas, comprometendo o órgão a ser destinado ao transplantado, evoluindo para a perda da função, conseqüentemente tornando-o inviável para o transplante. Os hormônios sexuais femininos participam da modulação da resposta inflamatória e reduções agudas na concentração de hormônios sexuais femininos podem causar alteração em diversos sistemas, incluindo o imunológico. Uma vez que o estradiol protege o sistema cardiovascular contra lesões isquêmicas, inflamatórias e metabólicas. O objetivo deste estudo é investigar os efeitos do tratamento com estradiol sobre a inflamação do coração após a indução da morte encefálica em ratas. A ME foi induzida em ratas Wistar anestesiados pela insuflação de um cateter balão implantado no espaço subdural, exceto nos animais falso-operados (SHAM). Após a indução da ME, os animais controle não receberam tratamento (grupo ME). Os animais tratados com estradiol foram divididos em dois grupos, o grupo com tratamento após 3h da indução da ME (ME E3h) e o grupo 6h com tratamento contínuo após indução da ME (ME E6h). Os marcadores de lesão miocárdica foram analisados pela histologia, os marcadores de resposta inflamatória e as proteínas relacionadas à apoptose celular foram dosados no soro ou em fragmentos de tecido cardíaco por imunohistoquímica ou ensaio-imuno-enzimático. A ME provocou um pico hipertensivo seguido de uma hipotensão, levando a uma instabilidade hemodinâmica. A utilização de estradiol após a indução da ME melhorou o quadro inflamatório, diminuiu a hemorragia e infiltração leucocitária no miocárdio. Além do mais, o tratamento proporcionou o aumento da expressão da BCL-2 e diminuição na expressão da Caspase-3 no tecido cardíaco. Os resultados obtidos neste trabalho mostram que a administração do estradiol, por 6h, reduz o dano provocado pela ME.

**Descritores:** Morte encefálica, estradiol, inflamação, ratas Wistar.

Basilio, L. J. L. **Reduction of myocardial inflammation caused by brain death with estradiol** [monography]. São Paulo: “Centro Universitário São Camilo”; 2018.

Clinical and experimental evidences highlight the great impact of brain death (BD) on the viability of the organ to be transplanted. During BD, several hormonal, immunological and hemodynamic dysfunctions occur compromising the organ at the point of function loss, consequently making it unfeasible for transplantation. Sex female hormones participate in the modulation of the inflammatory responses and acute reductions in its concentration may cause changes in several systems, including the immune system. It is important to notice that the estradiol protects the cardiovascular system against ischemic, metabolic and inflammatory lesions. The goal of this study was to investigate the treatment effects with estradiol on heart inflammation after brain death induction in female rats. BD was induced in female Wistar rats anesthetized by inflating a subdurally placed balloon catheter, except in false-operated animals (SHAM). After brain death induction, control animals were not treated (BD). The animals treated with estradiol were divided into two groups: the treatment group after 3h-induction (BD E3h) and the 6h group with continuous treatment after BD induction (BD E6h). Markers of myocardial injury were analyzed by histology, while inflammatory response markers and proteins related to cellular apoptosis were investigated in serum or tissue fragments by immunohistochemistry or immunoenzymatic-assays, when appropriate. BD provoked a hypertensive peak followed by hypotension, leading to hemodynamic instability. The use of estradiol after BD induction has improved the inflammatory frame, decreased the hemorrhage and leukocyte infiltration in the myocardial. Besides, the treatment resulted in increased expression of BCL-2 and decreased expression Caspase-3. The results obtained in this study show that administration of estradiol for 6 hours reduces the damage caused by BD.

**Descriptors:** Brain death; estradiol; inflammation; rats wistar.

# Sumário

<b>DEDICATÓRIA</b>	
<b>AGRADECIMENTOS</b>	
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	
<b>LISTA DE TABELA</b>	
<b>RESUMO</b>	
<b>ABSTRACT</b>	
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1 Morte encefálica e suas consequências sobre o coração.....	1
1.2 Estradiol, sistema imunológico e inflamação.....	4
<b>2. OBJETIVO</b> .....	<b>7</b>
2.1 Objetivos específicos.....	7
<b>3. METODOLOGIA</b> .....	<b>8</b>
3.1 Protocolo experimental.....	8
3.2 Identificação da fase do ciclo estral.....	10
3.3 Anestesia.....	10
3.4 Indução a morte encefálica.....	10
3.5 Tratamento.....	11
3.6 Eutanásia e descarte dos animais.....	11
3.7 Determinação das concentrações plasmáticas hormonais.....	11
3.8 Parâmetros hemodinâmicos.....	11
3.9 Determinação do número total e diferencial de leucócitos circulantes.....	11
3.10 Determinação da presença de neutrófilos pela atividade da mieloperoxidase.....	12
3.11 Permeabilidade vascular.....	12
3.12 Determinação da presença de neutrófilos pela atividade da mieloperoxidase.....	13
3.13 Análise histopatológica.....	13
3.14 Imunohistoquímica para pesquisa de moléculas de apoptose.....	13
3.15 Análise dos resultados.....	14
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>15</b>

4.1	Dosagem da concentração sérica de estradiol e corticosterona....	15
4.2	Efeitos da morte encefálica sobre a pressão arterial.....	16
4.3	Efeitos da morte encefálica sobre os leucócitos.....	17
4.4	Determinação da atividade da mieloperoxidase no coração.....	18
4.5	Determinação da permeabilidade vascular no coração.....	19
4.6	Expressão tecidual de Bcl-2.....	20
4.7	Expressão da Caspase- 3.....	21
4.8	Análise histológica do coração.....	22
5.	<b>DISCUSSÃO</b> .....	26
6.	<b>CONCLUSÃO</b> .....	30
7.	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	31
8.	<b>ANEXO</b> .....	40

## 1. INTRODUÇÃO

Evidências clínicas e experimentais ressaltam o grande impacto da morte encefálica (ME) sobre a viabilidade de um órgão a ser transplantado (PRATSCHKE et al., 2005; WILHELM et al., 2000). Embora o transplante cardíaco tenha uma grande taxa de sucesso a qualidade do órgão a ser transplantado pode afetar o seu desempenho posterior. Durante a ME ocorrem diversas disfunções hormonais, imunológicas e hemodinâmicas, comprometendo o órgão a ser destinado ao transplantado, evoluindo para a perda da função, conseqüentemente tornando-o inviável para o transplante (MENEGAT, 2016).

### 1.1 Morte encefálica e suas conseqüências sobre o coração

Historicamente, em 1959 um grupo de neurologistas franceses desenvolveu a primeira concepção de morte encefálica (ME), constatada pela condição clínica em que se encontra um encéfalo morto em um corpo vivo, que na época foi denominada como: coma *dépassé*. Após quase 30 anos de discussões sobre esse tema foi criada, nos Estados Unidos da América (EUA), uma comissão presidencial que definiu a ME como uma cessação irreversível das funções circulatória e respiratória ou a parada irreversível do funcionamento de todo o encéfalo. Esses critérios são utilizados até hoje para se realizar o diagnóstico da ME (FREIRE, et al., 2012).

Durante a ME ocorrem diversas disfunções hormonais, um aumento da resposta inflamatória sistêmica e instabilidades hemodinâmicas, comprometendo a viabilidade do órgão (MENEGAT, 2016; SIMAS, 2012).

A ME decorrente de infarto, trauma ou hemorragia intracraniana, resulta, na maioria das vezes, em aumento da pressão intracraniana seguida pela instabilidade hemodinâmica ocasionada pelo aumento na concentração sérica de catecolaminas (tempestade autonômica). As catecolaminas são liberadas pelas glândulas adrenais e terminações nervosas e causam uma fase hiperdinâmica caracterizada por hipertensão, taquicardia, aumento da resistência sistêmica periférica e da pressão do átrio esquerdo. Como conseqüência, haverá um desbalanço no consumo e disponibilidade de oxigênio

no coração, ocorrerá um dano isquêmico, que é seguido de episódio hipotensivo, em grande parte consequente à dilatação dos vasos (RECH, 2007). A vasodilatação causará hipotensão arterial, acompanhado por intenso estímulo simpático, ocasionando uma intensa vasoconstrição, além de um aumento da resistência vascular sistêmica e taquicardia (NOVITSKY, 1987).

Nessa fase, a perfusão dos órgãos periféricos diminui e, como consequência da isquemia, do edema e da hipoperfusão, observa-se o desenvolvimento de resposta imunológica, envolvendo a inflamação. O resultado a maior expressão de mediadores inflamatórios como citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão, acompanhado pela infiltração de células imunes em diversos órgãos, como coração, pulmão, fígado e rim (TAKADA et al., 1998; VAN DER HOEVEN et al., 2003).

Segundo Roelsgaard et al. 1996, diversas mudanças hormonais e metabólicas importantes acontecem após falência hipofisária em modelos experimentais de ME e o metabolismo está diretamente ligado ao processo inflamatório, portanto estas mudanças associadas aos eventos que precedem a ME, como trauma e hemorragia, somam-se e aumentam a resposta inflamatória. Além disso, a redução significativa da concentração de cortisol, associada à interrupção da liberação de hormônio adrenocorticotrófico pela hipófise anterior, compromete a resposta endógena do doador ao estresse gerado pela morte encefálica (CHEN et al., 1996).

A ME não deve ser considerada uma situação estática, mas sim um processo dinâmico que, de um modo direto e por múltiplos mecanismos, pode ter influência impactante na qualidade e viabilidade dos órgãos destinados ao transplante (DOMÌNGUES-ROLDÁN et al., 2009). Há associação de alterações hemodinâmicas, neuro-humorais e imunológicas, que colaboram com o processo de deterioração da qualidade intrínseca do órgão, e a lesão de isquemia e reperfusão gerada é ampliada durante os procedimentos de preservação e transplante (CHAMORO et al., 2009). Portanto, órgãos e doadores com ME estariam imunologicamente ativados e com possíveis alterações antes do transplante, o que interferiria no resultado, em comparação aos órgãos provenientes de doadores vivos (BUGGE, 2009; PRATSCHKE et al., 2005).

Em modelos experimentais a ME se dá pela inserção de um cateter para o aumento da pressão intracraniana através da trepanação levando ao aumento de neutrófilos na corrente sanguínea e expressão de moléculas de adesão endotelial, causando aumento na migração leucocitária, ou seja, ocorre uma resposta inflamatória importante decorrente a ME (SIMAS, et al., 2012).

O estresse decorrente da ME resulta em lesões orgânicas levando a um influxo leucocitário ao órgão tornando-os mais imunogênicos, ou seja, os processos ocasionados pela ME contribuem para a deterioração da qualidade intrínseca do órgão (D'IMPERIO, 2007; CHAMORRO et al., 2009).

A ME pode ser considerada uma síndrome inflamatória e os efeitos sobre os órgãos foi estudado inicialmente nos rins, por meio de biópsias renais de doadores em ME que apresentavam níveis mais elevados de moléculas de adesão, aumento na infiltração leucocitária de linfócitos e citocinas do que nas biópsias de rins de doadores vivos, indicando o estado inflamatório no órgão levando ao comprometimento dos mesmos a serem transplantados (SCHWARZ, 2017). Outros estudos demonstram que episódios de rejeição aguda de órgãos transplantados são mais comuns e mais graves em órgãos captados de doadores com ME do que naqueles doadores vivos (RECH, 2007).

No coração, a indução da ME conduz para uma reação hiperdinâmica, causando alterações ecocardiográficas, diminuindo isoenzimas miocárdicas e resultando em uma injúria histológica. Essas consequências da ME estão associadas à alteração da expressão de genes do miocárdio, relacionados à apoptose. Contudo, há uma diminuição da expressão de proteínas anti-apoptóticas, como a Bcl-2 (MAGALHÃES, 2017). Advém também em particular a ativação do receptor  $\alpha$ -adrenérgico (SILVA et al, 2010; YEH JR et al., 1993). A redução da função cardíaca em doadores em ME pode ser gerada pelo desequilíbrio entre a demanda e o suprimento de oxigênio para o tecido miocárdico ou mesmo pela injúria direta causada pela liberação maciça de catecolaminas (HALEJCIO-DELOPHONT et al., 1998). Uma das principais causas de morte após o transplante cardíaco é a disfunção primária do enxerto, cujo risco pode ser influenciado pelas características do doador (MANGINI, et al., 2015).

## 1.2 Estradiol, sistema imunológico e inflamação

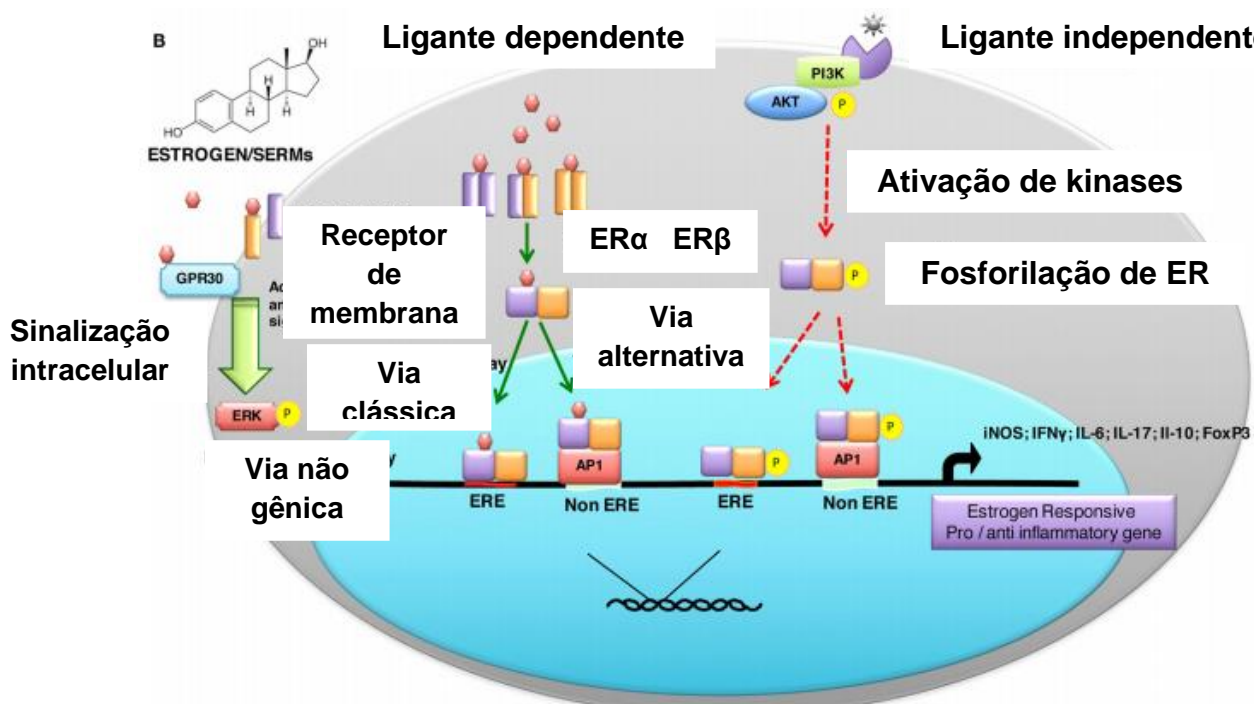
Hibi et al. (20012) confirmaram que o gênero do doador é um dos fatores que influenciam o resultado do transplante de órgãos e que a combinação de gênero pode fazer a diferença nas taxas de sobrevida do transplante (CURY; CALDARELLI; TENUTA, 2015). No que se refere ao papel do estrógeno na modulação da resposta imunológica, estudos apontam para a ação protetora deste hormônio, reforçando que o gênero feminino é menos suscetível a infecções que o gênero masculino (OBERHOLZER et al., 2000). Os esteroides sexuais podem também exibir efeitos diretos sobre as células do sistema imune. Estudos têm demonstrado a presença de receptores do estradiol (ER - estradiol receptores, ER- $\alpha$  e ER- $\beta$ ) em células leucocitárias, o que sugere que os estrógenos podem ter um papel na regulação da imunocompetência (CURRAN et al., 2001; CUTOLO et al., 1995; DOUCET et al., 2010; ERLANDSSON et al., 2001; FISH, 2008).

O estradiol é um hormônio produzido, principalmente, pelas células ovarianas e possui uma grande diversidade de ações funcionais nos sistemas biológicos mediadas pela presença de receptores (ER- $\alpha$  e ER- $\beta$ ) para esse hormônio. Existem abrangentes estudos que defendem os benefícios antiinflamatórios do estradiol no sistema cardiovascular, impedindo o aumento de marcadores inflamatórios e do estresse oxidativo. Na expressão de moléculas de adesão celular também é apresentada a influência hormonal, como fator importante na diminuição de sua manifestação no endotélio, como a E-selectina (Endothelial selectin), a molécula de adesão vascular-1 (VCAM-1) e a molécula de adesão intracelular-1 (ICAM-1), acarretando em mudanças e diminuindo a migração celular de leucócitos para os sítios inflamatórios (CUZZOCREA et al., 2000; ESPOSITO et al., 2005).

O papel dos receptores ER- $\alpha$  e ER- $\beta$  foi avaliado em modelos deficientes destes receptores. Os camundongos deficientes em ER- $\alpha$  e tratados com 17- $\beta$ -Estradiol desenvolveram sinais clínicos agudos e graves, assim como lesões histopatológicas, mesmo na presença de níveis altos de 17- $\beta$ -Estradiol. Em camundongos deficientes em ER- $\beta$  houve ausência de lesões inflamatórias. Isto demonstra que o efeito protetor do estradiol ocorre via ER- $\alpha$  e independente de ER- $\beta$  (SILVA, 2010).

Existe um crescente número de investigações na participação dos hormônios sexuais femininos em processos inflamatórios (CHERNYSHOV et al., 2002; JOOST et al., 2000; NIJBOER, et al., 2005; WILHELM, et al., 2000). Os estrógenos nas mulheres mudam seus níveis circulantes em relação à função reprodutiva e diferentes níveis de exposição afeta a imunidade. Quando as concentrações de estrógenos estão elevadas, tal como na gravidez, o estrogênio inibe vias pró-inflamatórias Th1 (TNF-alfa, IL-1 e IL-6) e estimula vias antiinflamatórias Th2 (IL-4, IL-10, TGF-beta), descrito na figura 1. Em situações fisiológicas como na menopausa, níveis baixos desses hormônios estimulam vias pró-inflamatórias (TNF-alfa e IL-1) (DIAS, 2016).

**Figura 1. Descrição estrutural e ilustração da sinalização do estrogênio.**



**Fonte:** Adaptado de: KHAN; AHMED, 2016 - Nas setas vermelhas estão representando a via de sinalização independente de ligante (via não clássica ou alternativa) e as setas verdes estão representando via de sinalização dependente de ligante.

Estudos apontam que o estrogênio diminui a expressão de moléculas de adesão (VCAM-1 e ICAM-1), levando a diminuição do acúmulo de leucócitos no endotélio. Já foi visto que monócitos, linfócitos T e B e neutrófilos expressam ER- $\alpha$ , e na falta do estrogênio, essas células, estão mais ativas, sugerindo um efeito

modulador do estrogênio sobre a atividade dessas células. Além disso, a deficiência do estrogênio durante os primeiros anos da menopausa induz a produção de várias citocinas pró-inflamatórias, como interleucinas (IL-6 e IL-1) e a expressão de seus receptores (CEROVOLO, et al., 2007).

Uma das principais causas de morte após o transplante cardíaco é a disfunção primária do enxerto, cujo risco pode ser influenciado pelas características do doador. Os registros da Sociedade Internacional para o Transplante de Coração e Pulmão demonstram que a não correspondência de gênero entre doador e receptor é um dos fatores que impactam na sobrevida ao transplante cardíaco, principalmente depois do primeiro ano após o transplante (DOUCET et al., 2010). A deficiência de estradiol foi associada com o insucesso do transplante de rim em ratos (FISH, 2008).

Na avaliação da inflamação pulmonar causada pela ME, Breithaupt-Faloppa e colaboradores (2016) evidenciaram um quadro inflamatório mais importante em fêmeas, somado à redução aguda dos hormônios sexuais femininos, tendo em vista que os hormônios sexuais femininos participam da manutenção da atividade funcional dos órgãos e sistemas, estes podem ser considerados potenciais moduladores da inflamação após a ME em indivíduos do gênero feminino.

Experimentalmente, os dados revelam que as repercussões do trauma em fêmeas são menos intensas do que em machos, os quais sob tratamento com estradiol desenvolvem, a modo experimental, lesões menos intensas (DEITCH, 2008). Em resultados recém-publicados, evidenciam alterações histológicas inflamatórias no coração de ratas submetidas à ME, com aumento significativo no número de células polimorfonucleares e linfomononucleares quando comparados aos ratos. Estes dados sugerem que a inflamação gerada pela ME possa ser exacerbada em animais do gênero feminino devido à queda abrupta dos hormônios sexuais, e que esses funcionam como moduladores da resposta imune e, podem ser considerados potenciais moduladores dos eventos desencadeados pela ME (SIMÃO, et al., 2016).

## **2. OBJETIVO**

O objetivo deste estudo é investigar os efeitos tratamento com estradiol sobre a inflamação no coração após a indução da morte encefálica em ratas.

### **2.1 Objetivos específicos**

- Avaliação das alterações inflamatórias após a morte encefálica;
- Avaliação das alterações histopatológicas do coração após a morte encefálica;
- Avaliação da expressão das moléculas de apoptose no coração após morte encefálica.

### 3. MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Neste projeto de estudo foram utilizados 100 ratos *Wistar* fêmeas SPF com aproximadamente 60 dias, provenientes do Biotério Central de Ratos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP). Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Investigação Médica (LIM) -11 da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e no Centro de Cirurgia Experimental do Instituto do Coração de São Paulo, onde os animais foram mantidos a  $23 \pm 2$  °C, período de claro e escuro de 12 h, sem restrições à ingestão de água e ração, sendo que até a cirurgia foram mantidas de 3 a 4 ratas por gaiola.

O atual projeto de estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Coordenadoria de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, nº de protocolo do projeto 036/16, SDC 4350/16/016. Os animais foram manipulados de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA – 2013) para o cuidado, manipulação e utilização de animais de laboratório.

#### 3.2 Protocolo experimental

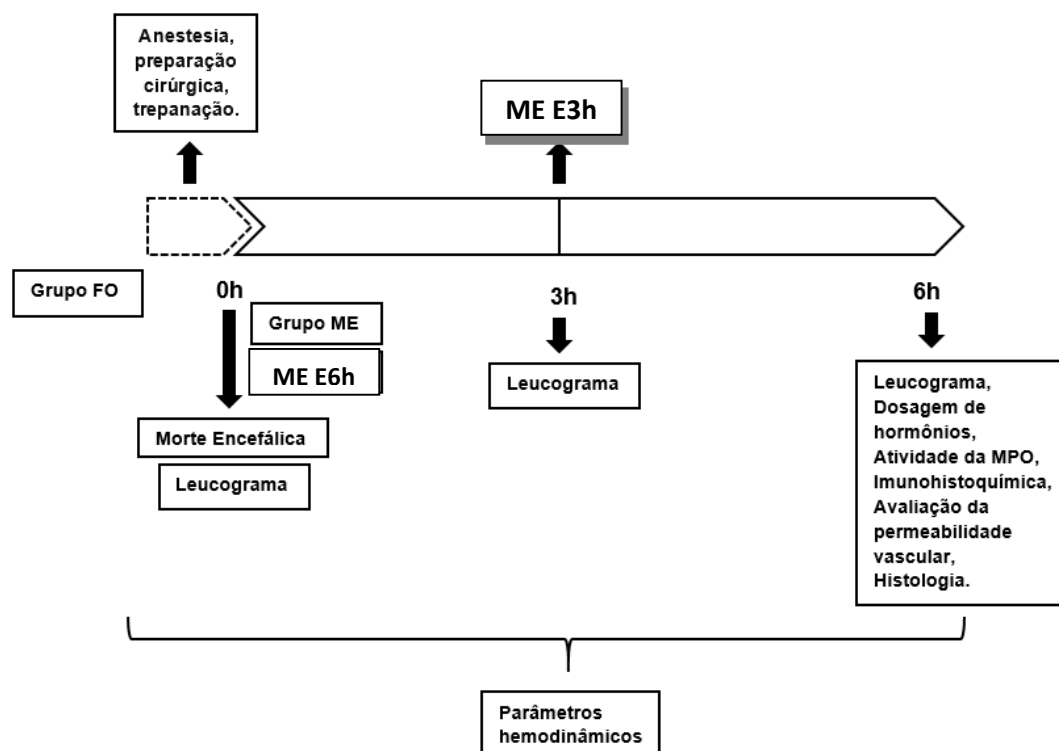
Foram utilizados 100 animais, divididos em 4 grupos, monitorizados durante 6h consecutivas, sendo que dois grupos receberam tratamento com estradiol na velocidade de 2 mL/h.

- **Grupo SHAM (falso operado):** ratas na fase de estro e proestro do ciclo estral submetidas à trepanação, sem a morte encefálica;
- **Grupo ME (morte encefálica):** ratas na fase de estro e proestro do ciclo estral submetidas à morte encefálica;
- **Grupo ME E6h:** ratas em fase de estro e proestro do ciclo estral submetidas à morte encefálica, tratadas com infusão contínua de estradiol durante 6h a partir da confirmação da morte encefálica.

- **Grupo ME E3h:** ratas em fase de estro e proestro do ciclo estral submetidas à morte encefálica, tratadas com infusão contínua de estradiol a partir de 3h após a confirmação da morte encefálica.

Foi feito um organograma esquemático da linha de tempo (horas), onde estão evidenciados os momentos em que houve intervenção. O período inicial corresponde ao tempo de estabilização (preparação cirúrgica). O tempo zero indica o momento em que foi induzida a ME, pela insuflação do dispositivo intracraniano (trepanação); os demais momentos representam o período em que o tratamento foi instituído e no qual alguma coleta de material foi realizada para análise (Figura 2).

**Figura 2: Organograma do protocolo experimental adotado neste estudo.**



**FO=** falso operado; **ME=** morte encefálica; **E=** estradiol; **ME E3h=** infusão do estradiol após 3h de ME; **ME E6h=** infusão do estradiol no início da ME; **MPO=** mieloperoxidase

### 3.3 Identificação da fase do ciclo estral

As ratas foram selecionadas de acordo com a fase do ciclo estral em que se encontraram maior concentração estrogênica (estro e proestro). A identificação da fase foi realizada por esfregaço vaginal, com o auxílio de um conta-gotas e solução salina tamponada com fosfato (PBS) que foi introduzida na vagina e o lavado vaginal (LV) retirado. Amostras do LV foram colocadas sobre lâmina de vidro e a seguir coradas em 5 µL de corante azul de metileno (5%), e analisadas por microscopia óptica.

### 3.4 Anestesia

A anestesia foi realizada com a combinação de isoflurano e oxigênio ( $FiO_2$ ) em câmara fechada. Em seguida, as ratas foram submetidas à intubação oro-traqueal (jelco 16G), integradas a um ventilador para roedores e mantidas a  $FiO_2$  de 100 %, volume corrente de 10 ml/kg e frequência respiratória de 70 ciclos/minuto. O esquema anestésico proposto esteve amparado com isoflurano a 2 %. Os animais foram colocados em uma plataforma cirúrgica aquecida (37° C) e a artéria carótida e a veia jugular interna direita foram canuladas. O cateter da artéria foi ligado a um transdutor de pressão e a veia jugular foi utilizada para infusão contínua de ciclodextrina (veículo do tratamento com estradiol) em solução (NaCl 0,9%) a 2 mL/h.

### 3.5 Indução da Morte Encefálica

Após a exposição da calota craniana, fez-se uma perfuração total da tábua óssea com uma broca esférica motorizada na região parietal direita para inserção de um cateter de balão (*Fogarty*<sup>®</sup> 4F). A morte encefálica foi induzida pela infusão rápida de 400 µL de NaCl a 0,9% no cateter *Fogarty*<sup>®</sup> e foi confirmada por um pico hipertensivo, ausência de reflexos, midríase bilateral e apneia. O uso de isoflurano foi interrompido após a constatação da ME e a ventilação mecânica foi continuamente mantida.

### **3.6 Tratamento**

Um grupo de animais foi tratado com 17- $\beta$ -estradiol (100  $\mu$ g/kg, intravenoso), continuamente e imediatamente após a confirmação da morte encefálica por infusão contínua, utilizando como diluente (veículo de infusão) a ciclodextrina em solução fisiológica, 2 mL/h.

### **3.7 Eutanásia e descarte dos animais**

Os animais, já em morte encefálica, foram eutanasiados através de dessangramento pela aorta abdominal e foram incinerados.

### **3.8 Determinação das concentrações plasmáticas hormonais**

Ao término do período de 6 h de morte encefálica foram coletadas alíquotas de sangue para execução de dosagens de estradiol e corticosterona. O sangue foi retirado da aorta porção abdominal e as concentrações circulantes dos hormônios foram mensuradas utilizando kits de Imnoensaio enzimático - Elisa (USCN, EUA). Substancialmente foi executado o protocolo proposto pelo fabricante.

### **3.9 Parâmetros hemodinâmicos**

Para a avaliação dos parâmetros hemodinâmicos, a artéria carótida direita foi ligada ao transdutor de pressão (*P23XL*, *Viggo-Spectramed* Inc., EUA), conectado a um sistema de multicanal de aquisição de dados biológicos (*Acqknowledge – Biopac Systems, Inc.*, EUA). Os parâmetros hemodinâmicos foram obtidos continuamente.

### **3.10 Determinação do número total e diferencial de leucócitos circulantes**

As alíquotas de sangue de 20  $\mu$ L foram obtidas da cauda dos animais após a anestesia. Foi utilizada uma pipeta automática para coletar a amostra, que posteriormente foi homogeneizada em diluente do próprio equipamento e submetida à contagem automática total e diferencial em analisador hematológico automático (BC-2800vet, Mindray, China).

### **3.11 Permeabilidade vascular**

A determinação da permeabilidade vascular para a avaliação do edema no coração foi realizada por meio da técnica de determinação da concentração do corante azul de Evans (AE), com base na metodologia descrita em Sirois et al. (1988). Para tanto, 25 mg/kg do corante foram injetados por via intravenosa, 20 minutos antes do término do tempo de estudo da inflamação induzida pela ME (6 h). Os animais foram então submetidos à eutanásia por dessangramento da aorta abdominal. A remoção do sangue intravascular no pulmão foi realizada pela perfusão da artéria pulmonar com PBS e a seguir fragmentos do tecido cardíaco foram removidos limpos e pesados. Um fragmento de cada tecido foi incubado em formamida (4 mL/g de peso tecidual), à temperatura ambiente por 24 horas enquanto outro foi mantido em estufa a 37 °C por 3 dias consecutivos, para determinação posterior de seu peso seco. A densidade óptica (DO) das amostras de AE extraído com formamida foi obtida em espectrofotômetro (*VersaMax™ Tunable Microplate, Molecular Devices, EUA*) em comprimento de onda de 620 nm. A concentração de AE das amostras foi determinada com base em uma curva padrão de absorbância do corante. Os valores foram expressos em  $\mu$ g de AE/g de peso seco de tecido.

### **3.12 Determinação da presença de neutrófilos pela atividade da mieloperoxidase**

A atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) cardíaca será analisada com base na metodologia de Goldblum et al. (1985). Após 6 h da indução da morte cerebral os animais serão submetidos à eutanásia. A cavidade torácica será exposta e os vasos da base do coração serão perfundidos com 5 ml de PBS por meio de uma cânula inserida na artéria pulmonar. O coração será extraído e imediatamente congelado. Os tecidos coletados serão pesados e homogeneizados com 3 ml/g de tampão fosfato pH 6,0 contendo 0,5% de brometo de hexadecil-tri-metil-amônio (HTAB) e 5 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (gentleMACS™ Dissociator, Miltenyi Biotec, Alemanha). As alíquotas serão centrifugadas a 12000 rpm durante 15 minutos a 4 °C, e o sobrenadante colhido será utilizado para mensurar a atividade de MPO. O ensaio da atividade de MPO será regido adicionando a placas com 96 poços: 185 µl de tampão fosfato pH 6,0, 50 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,0005%), 50 µl de orto-dianisidina (1,75 mg/ml) e 20 µl das alíquotas. Após 10 minutos, a reação será suspensa pela adição de 50 µl de azida sódica (1,3%). A avaliação será feita em espectrofotômetro (VersaMax™ Tunable Microplate, Molecular Devices, EUA) com comprimento de onda de 450 nm.

### **3.13 Análise histopatológica**

Fragmentos do coração foram fixados em solução de formaldeído (10%). Os tecidos foram processados, emblocados em parafina, cortados e corados com 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. As análises foram realizadas por dois observadores e foram indicados escores de acordo com a intensidade das alterações.

### 3.14 Imunohistoquímica para pesquisa de moléculas de apoptose

Após exsanguinação pela aorta abdominal, o coração foi removido, imerso em hexano sob nitrogênio líquido e armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Foram realizados cortes seriados de  $8\ \mu\text{m}$  e colocados em lâminas de vidro previamente revestidas com organo-silane (*Sigma Chemical Co*, EUA) e as amostras, fixadas em acetona gelada por 10 minutos. As lâminas foram lavadas com solução tampão TRIS salina-tween (TBST), em seguida permeabilizadas com TBST e triton X-100, subsequente a isso foi feito um bloqueio de sítios inespecíficos com tampão de bloqueio (solução de albumina sérica bovina 1% em TBST – TBST/BSA) e um bloqueio da peroxidase endógena (solução de  $\text{H}_2\text{O}_2$  2). Para a imunodeteção de Bcl-2 e Caspase-3, os anticorpos empregados foram policlonais anti-Bcl-2 (Abcam Inc., Cambridge, MA, USA) e anti-caspase-3 (Abcam Inc. Cambridge, MA, USA), na diluição de 1:50 e de 1:100 respectivamente. O anticorpo secundário empregado foi anti-camundongo e anti-coelho, respectivamente, na diluição de 1:200, associados à enzima peroxidase de rábano (HRP) (Millipore, Billerica, MA, EUA) por 2 h a  $37^{\circ}\text{C}$ . As lâminas foram incubadas com solução de substrato 3-amino-9-AEC por 5 a 10 min e contra-coradas com hematoxilina. Para o controle negativo as amostras foram incubadas com PBS, sem a presença de anticorpos.

A captação foi realizada através de sistema de aquisição de imagens com câmera digital *DS-Ri1* (Nikon, Japão), conectado ao microscópio de fluorescência (Nikon, Japão) e a análise será feita com auxílio do software *NIS-Elements-BR* (Nikon, Japão).

### 3.15 Análise dos resultados

Os dados das amostras foram submetidos ao teste de análise de variância (ANOVA) seguido do pós-teste de *Tukey* para múltiplas comparações. As análises estatísticas foram realizadas utilizando *GraphPad Prism Software v.5*. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Valores de  $P < 0,05$  foram considerados como significantes.

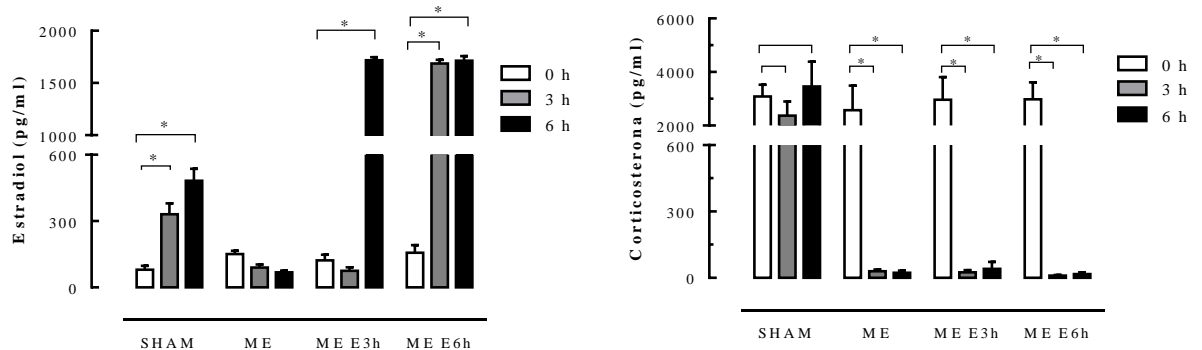
## 4. RESULTADOS

Com finalidade a de constatar os efeitos do estradiol em ratas submetidas à morte encefálica, foram feitas avaliações dos parâmetros funcionais, celulares, estruturais e hormonais nos distintos grupos experimentais.

### 4.1 Dosagem da concentração sérica de estradiol e corticosterona

Os resultados da quantificação da concentração de estradiol mostram um aumento nos grupos ME E3h e ME E6h indicam a indução do tratamento proposto para este estudo. Na quantificação de corticosterona, os resultados obtidos em dosagem de amostra de soro indicam que os grupos submetidos a ME apresentam uma redução significativa na concentração de corticosterona (Figura 3).

**Figura 3. Concentrações séricas de estradiol (pg/mL) e corticosterona (pg/mL). As amostras foram coletadas antes da indução da morte encefálica, após 3 e 6 h.**



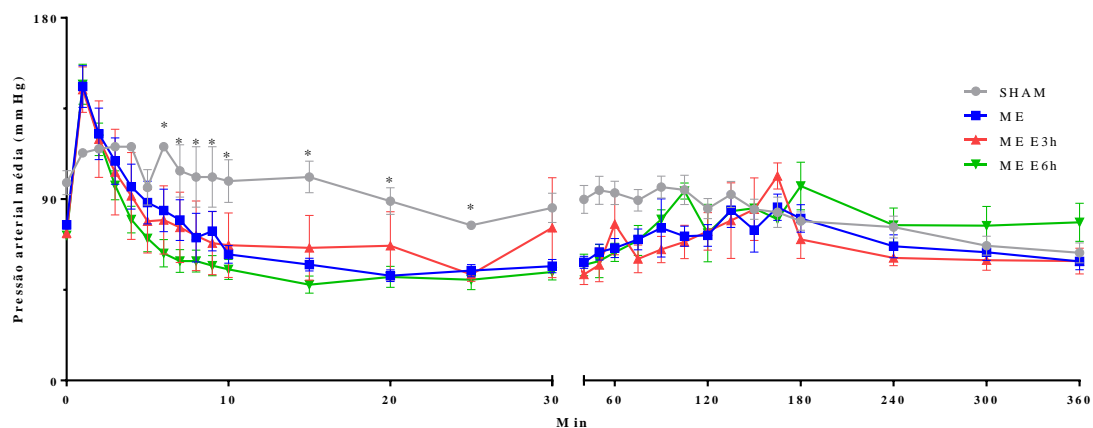
**SHAM**= grupo falso operado; **ME**= grupo morte encefálica; **ME E3h**= grupo com infusão contínua de estradiol a partir de 3h após a confirmação da morte encefálica; **ME E6h**= grupo com infusão contínua de estradiol durante 6h a partir da confirmação da morte encefálica.

Teste análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey \* $P < 0.05$  em relação aos respectivos valores iniciais.

## 4.2 Efeitos da morte encefálica sobre a pressão arterial

A partir da técnica do cateter de microcondutância foi feita a mensuração da pressão arterial. Antes da indução da ME não houve diferenças significativas da pressão arterial entre os grupos experimentais. Após alguns minutos da indução a ME, observa-se o pico de hipertensão arterial seguido de uma hipotensão arterial, caracterizando a ME (Figura 4).

**Figura 4. Pressão arterial média de ratas submetidas ou não à morte encefálica, monitorizadas do momento da inserção do cateter (0) até o término do período experimental (6 h).**



**SHAM**= grupo falso operado; **ME**= grupo morte encefálica; **ME E3h**= grupo com infusão contínua de estradiol a partir de 3h após a confirmação da morte encefálica; **ME E6h**= grupo com infusão contínua de estradiol durante 6h a partir da confirmação da morte encefálica.

Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 8 animais por grupo. Teste análise de variância (ANOVA) com pós-teste de *Tukey* \* $P < 0.05$  em relação aos respectivos valores iniciais.

### 4.3 Efeitos da morte encefálica sobre os leucócitos

A avaliação do leucograma pela contagem automática total e diferencial em analisador hematológico automático mostra que o número de células/mm<sup>3</sup> apresentou diferença significativa entre os grupos avaliados. O grupo ME apresentou maior valor quando comparado aos grupos que receberam estradiol. Houve diferença significativa entre os grupos, quando comparado ao grupo ME (tabela 1).

**Tabela 1. Leucograma de ratas submetidas ou não à morte encefálica, monitorizados do momento da inserção do cateter (inicial) até o término do período experimental (6 h).**

Tempos	Total de leucócitos por mm <sup>3</sup>	Linfócitos por mm <sup>3</sup>	Granulócitos por mm <sup>3</sup>	Monócitos por mm <sup>3</sup>
<b>SHAM</b>				
0h	11180 ± 1153	6580 ± 528,9	4200 ± 765,4	400 ± 65
3h	25244,5 ± 3181,4*φ	4566,7 ± 816,7φ	19733,3 ± 2361,9*	944,4 ± 129,2*φ
6h	18050 ± 4472	3987 ± 627,2φ	13425 ± 3736,5φ	637,5 ± 182,2
<b>ME</b>				
0h	10918 ± 973,6	5936,4 ± 487,2	4536,4 ± 534,5	445,5 ± 47,4
3h	12762,5 ± 2311,3	2562 ± 408,4φ	8237,5 ± 2224	387,5 ± 89,5
6h	18636,4 ± 3016,1φ	4600 ± 622,6	13381 ± 2374,4	654,5 ± 131
<b>ME 3h</b>				
0h	9825 ± 1471,4	5475 ± 934	4012,5 ± 571,8	337,5 ± 80
3h	8416,7 ± 1549,9	2714,3 ± 402,6φ	8971,4 ± 3318,6	328,6 ± 122,9
6h	7312,5 ± 1064,8†	3150 ± 358,1φ	3925 ± 708,6†	237,5 ± 37,5†
<b>ME 6h</b>				
0h	11357,1 ± 980,5	6385,7 ± 707,6	4542,8 ± 404,6	428,6 ± 42,1
3h	11114,3 ± 968,4	3228,6 ± 387,7φ	7500 ± 672,9	385,7 ± 93,7
6h	10757,1 ± 1972,3	3442,9 ± 463,4φ	6900 ± 1595,2	414,3 ± 73,8

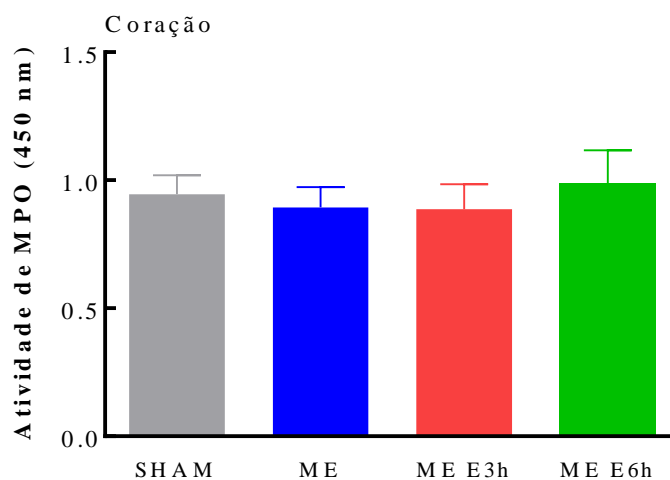
**SHAM**= grupo falso operado; **ME**= grupo morte encefálica; **ME E3h**= grupo com infusão contínua de estradiol a partir de 3h após a confirmação da morte encefálica; **ME E6h**= grupo com infusão contínua de estradiol durante 6h a partir da confirmação da morte encefálica.

Teste análise de variância (ANOVA) com pós-teste de *Tukey* \* $P < 0.05$  em relação aos respectivos valores iniciais. † $P < 0,05$  em relação aos valores 6h dos grupos Sham e ME.  $\phi P < 0,05$  em relação aos respectivos valores iniciais

#### 4.4 Determinação da atividade da mieloperoxidase no coração

Para avaliarmos a presença de neutrófilos, através do espectrofotômetro, foi quantificada a atividade da mieloperoxidase (MPO), não foi identificado diferença entre os grupos (Figura 5).

**Figura 5. Atividade da mieloperoxidase no coração em ratas submetidas à morte encefálica.**



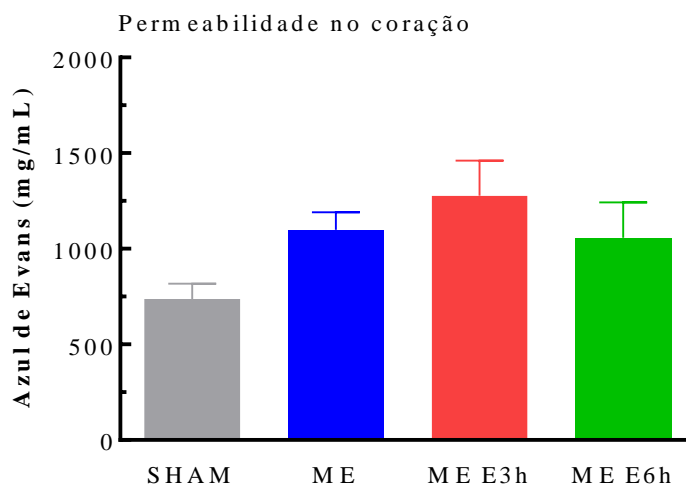
**SHAM**= grupo falso operado; **ME**= grupo morte encefálica; **ME E3h**= grupo com infusão contínua de estradiol a partir de 3h após a confirmação da morte encefálica; **ME E6h**= grupo com infusão contínua de estradiol durante 6h a partir da confirmação da morte encefálica.

Teste análise de variância (ANOVA) com pós-teste de *Tukey*

#### 4.5 Determinação da permeabilidade vascular

Os dados deste experimento demonstram que não tem diferença estatística entre os grupos (Figura 6).

**Figura 6. Determinação da permeabilidade vascular para avaliação do edema no coração.**



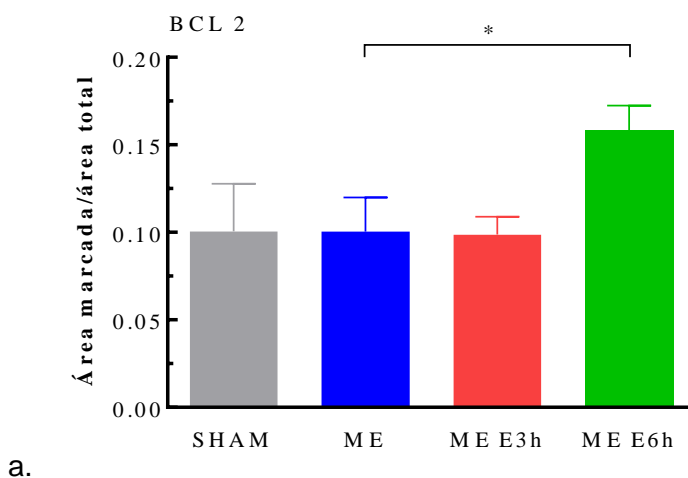
**SHAM**= grupo falso operado; **ME**= grupo morte encefálica; **ME E3h**= grupo com infusão contínua de estradiol a partir de 3h após a confirmação da morte encefálica; **ME E6h**= grupo com infusão contínua de estradiol durante 6h a partir da confirmação da morte encefálica.

Teste análise de variância (ANOVA) com pós-teste de *Tukey*.

#### 4.6 Expressão tecidual de Bcl-2

Após a técnica para imunodeteção, foi possível observar um aumento significativo da expressão tecidual de Bcl-2 no grupo ME E6h, quando comparado ao grupo ME. Não houve diferença significativa entre o grupo ME E3h, quando comparado ao grupo ME (Figura 7).

**Figura 7. Efeito do tratamento com estradiol na expressão tecidual de Bcl-2 em ratas submetidas à morte encefálica.**



a.

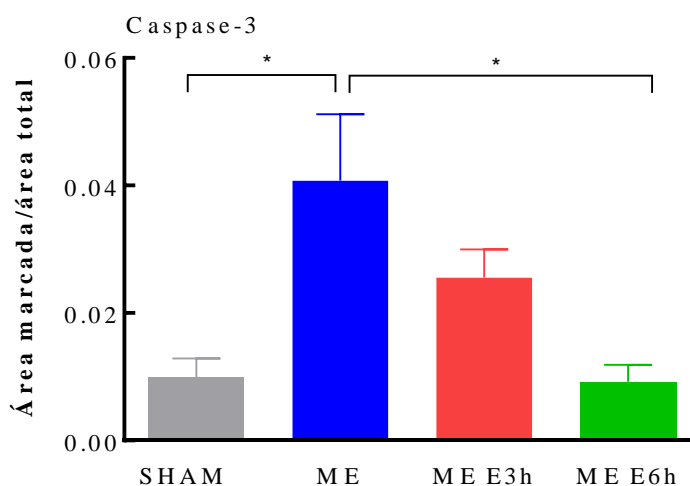
**SHAM**= grupo falso operado; **ME**= grupo morte encefálica; **ME E3h**= grupo com infusão contínua de estradiol a partir de 3h após a confirmação da morte encefálica; **ME E6h**= grupo com infusão contínua de estradiol durante 6h a partir da confirmação da morte encefálica.

Teste análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey \* $P < 0.05$  em relação aos respectivos valores iniciais.

#### 4.7 Expressão da Caspase-3

Os dados deste experimento mostram que houve um aumento da expressão da caspase-3 no grupo ME e houve uma diminuição significativa no grupo ME E6h, quando comparado ao grupo ME. (Figura 8).

**Figura 8: Efeito do tratamento com estradiol na expressão tecidual de Caspase-3 em ratas submetidas à morte encefálica.**



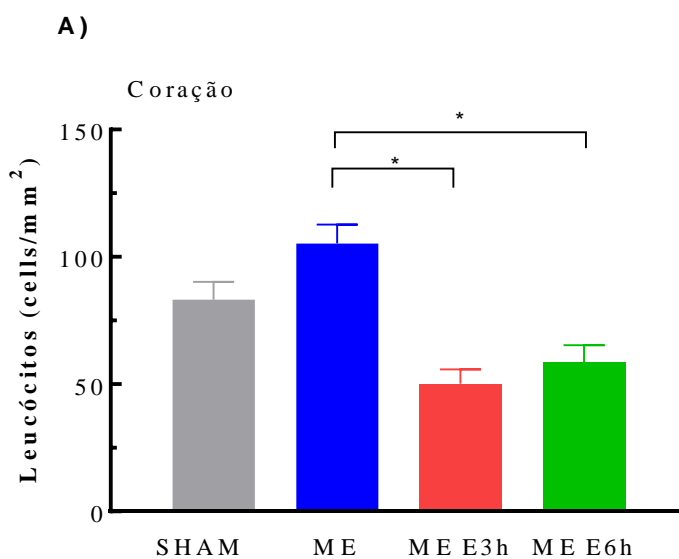
**SHAM**= grupo falso operado; **ME**= grupo morte encefálica; **ME E3h**= grupo com infusão contínua de estradiol a partir de 3h após a confirmação da morte encefálica; **ME E6h**= grupo com infusão contínua de estradiol durante 6h a partir da confirmação da morte encefálica.

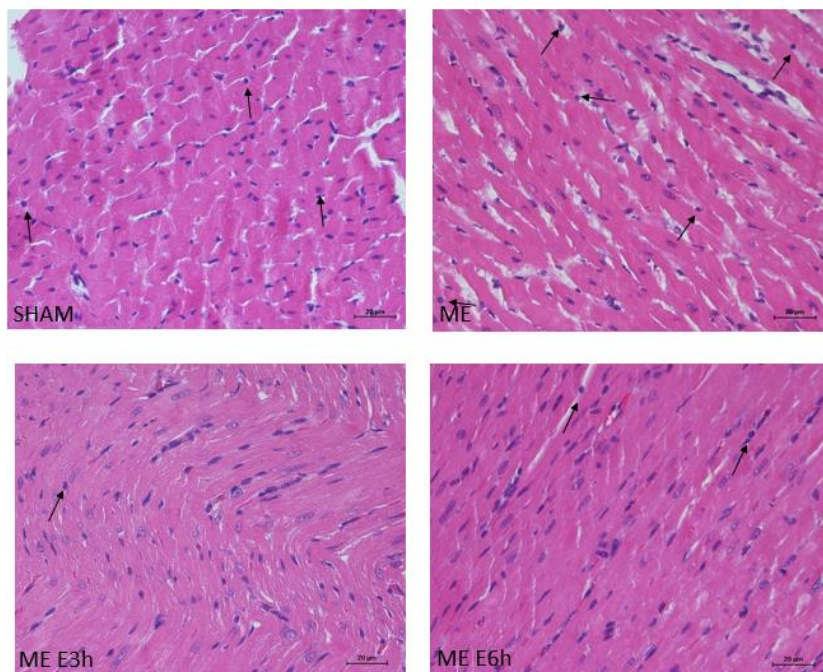
Teste análise de variância (ANOVA) com pós-teste de *Tukey* \* $P < 0.05$  em relação aos respectivos valores iniciais.

#### 4.8 Análise histológica do coração

Por microscopia de luz foi feita a análise histológica do coração e os dados mostram uma diminuição significativa entre os grupos tratados quando comparado ao grupo ME. Por sua vez, houve uma diminuição significativa da hemorragia no grupo ME E6h, quando comparado ao grupo ME (Figura 10).

**Figura 9. Análise comparativa do número de leucócitos nos grupos tratados ou não após a morte encefálica.**



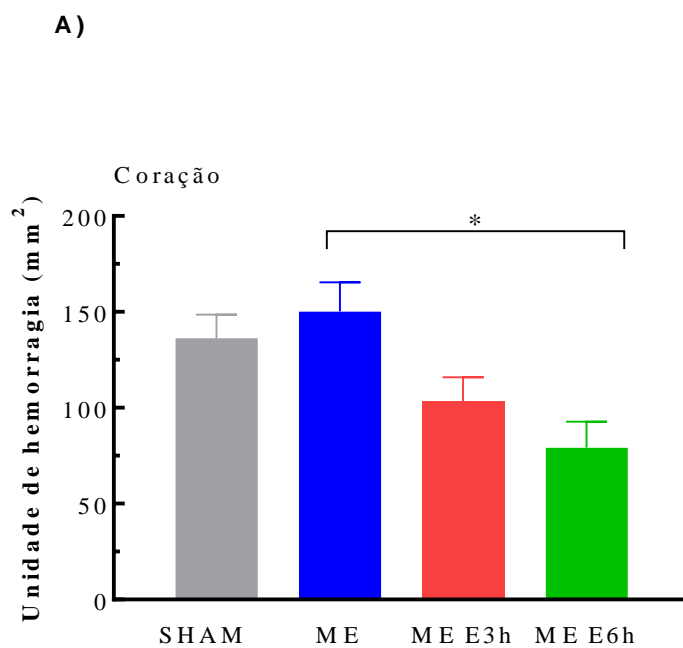
**B)**

**SHAM**= grupo falso operado; **ME**= grupo morte encefálica; **ME E3h**= grupo com infusão contínua de estradiol a partir de 3h após a confirmação da morte encefálica; **ME E6h**= grupo com infusão contínua de estradiol durante 6h a partir da confirmação da morte encefálica.

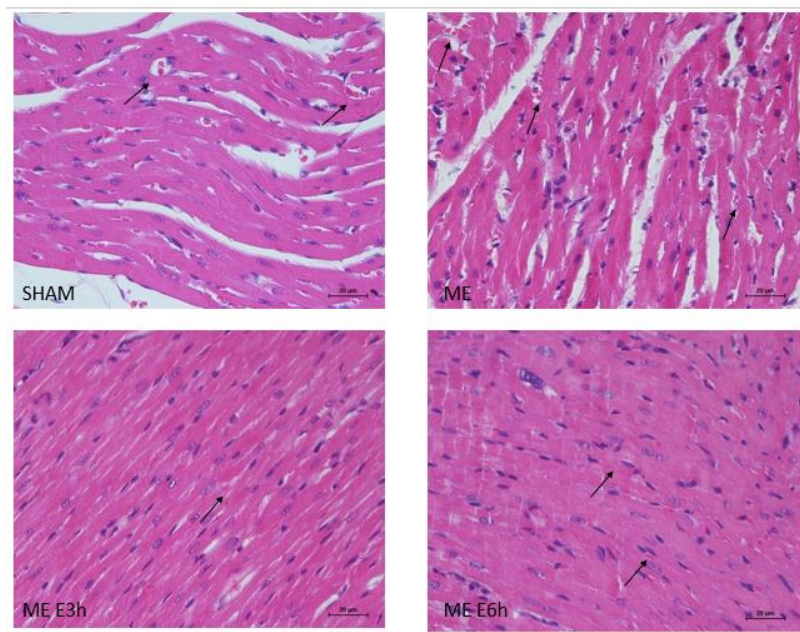
Teste análise de variância (ANOVA) com pós-teste de *Tukey*. \* $P < 0.05$  em relação aos respectivos valores iniciais.

- A) Representação gráfica da comparação de infiltrado leucocitários entre os grupos tratados ou não após morte encefálica e o grupo sham.
- B) Corte histológico do coração evidenciando leucócitos (setas). Coloração H&E. Para as fotos foi utilizado a objetiva de 40x.

**Figura 10. Análise comparativa da hemorragia nos grupos tratados ou não após a morte encefálica.**



**B)**



**SHAM**= grupo falso operado; **ME**= grupo morte encefálica; **ME E3h**= grupo com infusão contínua de estradiol a partir de 3h após a confirmação da morte encefálica; **ME E6h**= grupo com infusão contínua de estradiol durante 6h a partir da confirmação da morte encefálica.

Teste análise de variância (ANOVA) com pós-teste de *Tukey* \* $P < 0.05$  em relação aos respectivos valores iniciais.

- A) Representação gráfica da comparação da hemorragia por mm<sup>3</sup> em grupos tratados ou não após a ME e o grupo sham
- B) Fotomicrografia de corte histológico do coração, evidenciando a presença de hemorragia (setas) nos diferentes grupos experimentais. Coloração de H&E. Para esta foto foi utilizada a objetiva de 40x.

## 5. DISCUSSÃO

Neste estudo foi utilizado modelo de morte encefálica com indução por meio da insuflação rápida de um cateter de balão no espaço intracraniano. Em consequência, há aumento da pressão intracraniana, ativação simpática, seguida de liberação aguda de catecolaminas, instabilidade hemodinâmica e hipertensão transitória e está de acordo com os achados da literatura (FODSTAD et al., 2006; WEYMANN et al., 2013; BREITHAUPT-FALOPPA et al., 2016; MAGALHÃES, 2017). Ainda de acordo com outros autores, após cessar a intensa atividade autonômica ocorre uma perda do tônus simpático com uma vasodilatação, resultando na hipotensão e bradicardia, conforme foi visto neste estudo também (D'IMPÉRIO, 2007; COOPER, NOVITZKY, WICOMB, 1998; WESTPHAL, et al, 2012).

A vasoconstrição transitória causa diminuição da perfusão tecidual e ativação da resposta inflamatória com aumento da expressão de moléculas de adesão intercelular (ICAM-1) e redução dos níveis séricos de corticosterona (SIMAS et al., 2012). Estes autores, descrevem que o infiltrado e a expressão de moléculas de adesão leucocitária está associado à redução dos níveis de corticosterona. A redução na concentração sérica de corticosterona é resultado da ruptura do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal pela morte encefálica, desencadeando uma inflamação sistêmica. Nossos dados apontam também para redução da concentração de corticosterona após a morte encefálica.

Em um estudo de perfil imunológico dos possíveis doadores de órgãos em estado de ME, Mello (2009) demonstrou que há aumento na concentração sérica de citocinas, tais como a IL-6 (interleucina pró inflamatória secretada por linfócitos T), IL-4 (interleucina que induz a diferenciação de linfócitos) e IL-5 (interleucina que induz a secreção de imunoglobulinas). Ocorre também a liberação de quimiocinas, além do aumento da expressão de moléculas de adesão, determinando o recrutamento de leucocitário para os tecidos de diferentes órgãos (CYPEL et al., 2011).

Wilhelm e colaboradores (2000) descreveram que a inflamação no coração de doadores com ME pode acelerar o processo de rejeição do órgão.

Diversos estudos demonstram a influência dos hormônios sexuais femininos na expressão de moléculas de adesão por leucócitos circulantes

(CHERNYSHOV, 2002; FERREIRA, 2016). Breithaupt-Faloppa e colaboradores (2013) demonstraram que a administração de estradiol em ratos machos, em modelo de isquemia e reperfusão intestinal, reduz a migração leucocitária e a expressão das moléculas de adesão. O estradiol liga-se a receptores clássicos presentes no sistema cardiovascular. Esses receptores são encontrados no endotélio e na musculatura lisa (NOVELLA et al., 2012). A morte encefálica em ratas resulta na redução aguda das concentrações de hormônios sexuais femininos. Breithaupt-Faloppa, e colaboradores (2016) demonstraram que os pulmões de ratas exibem, após a indução da ME, uma quantidade maior de células polimorfonucleares em comparação aos machos, indicando maior inflamação pulmonar em ratas paralelamente à redução na concentração de hormônios sexuais femininos. A inflamação está associada com o aumento da expressão de moléculas de adesão e citocinas, o estradiol diminui a expressão das moléculas de adesão (ICAM-1 e VCAM-1), levando a diminuição do infiltrado leucocitário no endotélio (SALTIKI et al., 2007; TOSTES et al., 2003), como podemos observar em nossos estudos.

Conforme Simas et al. (2012) e Menegat (2016) ratos machos possuem uma leucopenia evidente após a indução da ME. O que não é evidenciado em ratas. O tratamento com estradiol, após a indução da ME, demonstrou uma diminuição no número de granulócitos circulantes, mas não uma leucopenia, evidenciando seus efeitos sobre a inflamação, assim como descrito por Breithaupt-Faloppa e colaboradores (2016). Xing e colaboradores (2004) indicam que o estradiol possui um efeito na regulação de granulócitos e que mecanismos relacionados com ER-dependente estão presentes na inibição da quimiotaxia de neutrófilos. Também é importante mostrar a relação entre o estradiol e seus efeitos moduladores no sistema cardiovascular. Estudos demonstram que a incidência de doenças cardiovasculares nas mulheres em pré-menopausa é menor que nas mulheres após a menopausa (CURRAN, 2001; DOUCET, 2010; ERLANDSSON, 2001; FISH, 2008; RAJU, 2008;). Outros estudos demonstram os efeitos benéficos, como o efeito cardioprotetor, da administração do estradiol ou agonistas de receptores ER que são expressos em cardiomiócitos (DEITCH, 2010; YU, et al., 2005).

Com a sua modulação sobre o sistema imune, o estradiol regula o número de neutrófilos, a quimiotaxia, a mieloperoxidase e a indução por citocinas pró-

inflamatórias (KHAN, AHMED, 2016). A avaliação da atividade de mieloperoxidase permite quantificar indiretamente a presença e/ou ativação de neutrófilos no tecido (NEKRASOVA, SHIRSHEV, 2013; REUMAUX, et al., 2003). HSU et al. (2013) indicam que o tratamento com estradiol diminui as consequências do trauma hemorrágico, pela redução da apoptose, da atividade da MPO e da quantidade de mediadores inflamatórios, porém, em nosso estudo não houve diferença na atividade da MPO entre os grupos. Ferreira (2016) indica que ratas, após a ME, apresentam um aumento na atividade da MPO, indicando que a queda abrupta do estradiol e a ME agrava o quadro inflamatório. Um estudo recente mostrou que o estradiol é eficaz em reduzir a expressão de ICAM-1, levando a diminuição do infiltrado inflamatório (SOUSA, 2017), assim como podemos observar no nosso estudo com a diminuição do infiltrado de leucócitos para o tecido cardíaco.

A piora funcional e deterioração dos enxertos para o transplante, de maneira geral, está interligado a morte celular causada pela apoptose. Em consequência da resposta inflamatória sistêmica observada na ME (LÓPEZ, et al., 2008). Em um estudo clínico. Adrie et al. (2010) demonstram que pacientes que sofreram ME, apresentam um número maior na expressão de genes pró-apoptóticos. Neste estudo observou-se a expressão de proteínas relacionadas à apoptose, com aumento da expressão da caspase-3. Por outro lado, houve a diminuição da expressão de proteínas anti-apoptóticas como a Bcl-2, como também havia mostrado López et al. (2008).

Observamos que o tratamento com estradiol contínuo, no grupo ME E6h, diminuiu a expressão da caspase-3 e um aumento na expressão da Bcl-2. De acordo com Jover et al. (2002) e Patten et al. (2004), o estradiol favorece um bloqueio na ativação da caspase-3, exercendo a função de prevenção da ativação apoptótica e o aumento da expressão da Bcl-2. Esse aumento da Bcl-2 acontece, pois a Bcl-2 atua para combater a morte celular, inibindo os radicais livres e suprime a ativação de caspases (DUBAL, et al., 1999).

Simão e colaboradores (2016) evidenciaram que ratas ovariectomizadas que sofreram ME apresentaram maior hemorragia nos órgãos, devido à redução do nível de estradiol. Estudos recentes mostram que ratos machos, após a ME, que sofreram administração de estradiol, apresentaram uma melhora no quadro hemorrágico pulmonar (VIEIRA, 2018). Neste estudo, também observamos a

presença de hemorragia no grupo com ME, porém nos grupos tratados houve diminuição, o que reforça o papel do estradiol na diminuição da inflamação.

Os dados apresentados neste estudo mostram que a ME é uma condição sistêmica que está relacionada ao dano orgânico. Até o presente momento, os estudos ainda não deixaram claro qual a melhor estratégia para reduzir a instabilidade hemodinâmica ocasionada pela ME. Como demonstrado neste estudo, o tratamento com estradiol é um método de manejo fácil, capaz de melhorar a deterioração pela ME, bem como diminuir a apoptose, hemorragia e a atividade inflamatória.

## **6. CONCLUSÃO**

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que, a administração do estradiol provoca uma melhora na resposta inflamatória de animais submetidos à ME, sendo que, o tratamento por 6h resultou em um aumento da expressão de proteínas relacionados a inibição da apoptose celular, levando a uma diminuição na expressão dos proteínas pró-apoptóticos, além de diminuir o quadro hemorrágico no tecido cardíaco.

## 7. REFERÊNCIAS

BREITHAUPT-FALOPPA, A. C.; FERREIRA, S. G.; KUDO, G. K.; ARMSTRONG, R. JR.; TAVARES-DE-LIMA, W.; DA SILVA, L. F.; SANNOMIYA, P.; MOREIRA, L. F. Sex-related differences in lung inflammation after brain death. **Journal of Surgical Research**, v. 200, n. 2, p. 714-21. 2016.

BREITHAUPT-FALOPPA, A. C.; THAIS FANTOZZI, E, ROMERO, D. C, RODRIGUES ADA, S.;; DE SOUSA , P. T.; LINO DOS SANTOS FRANCO, A.;; OLIVEIRA-FILHO, R. M.;; BORIS VARGAFTIG, B.;; TAVARES DE LIMA, W. Acute effects of estradiol on lung inflammation due to intestinal ischemic insult in male rats. **Shock**, v. 41, n. 3, p. 208-213. 2013.

BUGGE, K.E.; HELSETH, S.; DARBYSHIRE, P. Parents' experiences of a Family Support Program when a parent has incurable cancer. **Journal of Clinical Nursing**, v. 18, n. 24, p. 3480- 3488. 2009.

CERAVOLO, G. S.; TOSTES, R. C.; FORTES, Z. B.; CATELLI, M. H. Estrogen effects on the cardiovascular system. **Sociedade Brasileira de Hipertensão**, v. 10, n. 4, p. 124-130. 2007.

CHAMORRO C.; FALCÓN, J. A.; MICHELENA, J. C. Controversial Points in Organ Donor Management. **Transplantation Proceedings**, v. 41, n. 8, p. 3473–3475. 2009.

CHEN, E.; BITTNER, H. B.; KENDALL, S. W.; WAN TRIGT, P. Hormonal and hemodynamic changes in a validated animal model of brain death. **Critical Care Medicine**, v. 24, n. 8, p. 1352- 1359. 1996.

CHERNYSHOV, V. P.; VODIANYK, M. O.; HREKOVA, S. P. Effect of female steroid hormones on expression of adhesion molecules by peripheral blood leukocytes. **Fiziolohichni Zhurnal**, v. 48, n. 6, p. 46-53, 2002.

COOPER, D. K. C.; NOVITZKY, D.; WICOMB, W. B. Pathophysiology of brain death in the experimental animal: extracranial aspects. **Transplantation Proceedings**, v. 30, n. 7, p. 25-28. 1998.

CURRAN, E. M.; BERGHAUS, L. J.; VERNETTI, N. J.; SAPORITA, A. J.; LUBAHN, D. B.; ESTES, D. M. Natural killer cells express estrogen receptor-alpha and estrogen receptor-beta and can respond to estrogen via a non-estrogen receptor-alpha-mediated pathway. **Cellular Immunology**, v. 214, p. 12-20. 2001.

CURY, J. A.; CALDARELLI, P. G.; TENUTA, L. M. A. Necessidade de revisão da regulamentação brasileira sobre dentifrícios fluoretados. **Revista de Saúde Pública**, v. 49, n. 74, p. 1-7. 2015 .

CUTOLO, M; SULLI, A.; SERIOLO, B.; ACCARDO, S.; MAIS, A. T. Estrogens, the immune response and autoimmunity. **Clinical and experimental rheumatology**, v. 13, n.12, p. 217-26. 1995.

CUZZOCREA S.; MAZZON E.; COSTANTINO, G.; SERRAINO, I.; DUGO, L.; ,CALABRÒ, G.; CUCINOTTA, G.; SARRO, A.; CAPUTI, A. P. Beneficial effects of n-acetylcysteine on ischaemic brain injury. **British Journal of Pharmacology**, v. 130, n. 6, p. 1219-1226. 2000.

CYPEL, M.; JONATHAN, C.; YEUNG; KESHAVJEE; FRESC. Novel approaches to expanding the lung donor pool: donation after cardiac death and ex vivo conditioning. **Clinical Ches Medicine**, v. 32, p. 233-244. 2011.

DEITCH E. A.; FEKETEOVA, E.; LU, Q.; ZAETS, S.; BEREZINA, T. L.; MACHIEDO, G. W.; HAUSER, C. J.; LIVINGSTON, D. H.; XU, D. Z. 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**, v. 29, n. 1, p. 78-83. 2008.

DEITCH, E. A.; LIVINGSTON, D. H.; LAVERY, R. F.; MONAGHAN S. F.; BONGU, A.; MACHIEDO, G. W. Hormonally active women tolerate shock-trauma better than do men a prospective study of over 4000 trauma patients. **Annals of Surgery**, v. 246, n. 3, p. 447-455. 2007.

DIAS, A. T. **Modulação da genisteína sobre receptores toll like e a imunidade adaptativa durante o desenvolvimento da encefalomielite autoimune experimental.** 2016, 120f, Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), Universidade federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora. 2016

D'IMPERIO, F. Morte encefálica, cuidados ao doador de órgãos e transplante de pulmão. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 19, n. 1, p. 74-84. 2007.

DOMÍNGUEZ-ROLDÁN, J. M.; GARCÍA-ALFARO, C.; JIMÉNÉZ-GONZÁLEZ, P. I.; HERNÁNDEZ-HAZAÑAS, F.; GASCÓN-CASTILLO, M. L.; EGEEA-GUERRERO, J. J. Brain death: repercussion on the organs and tissues. **Medicina Intensiva**. v. 33, n. 9, p. 434-441. 2009.

DOUCET, D. R.; BONITZ, R. P.; FEINMAN, R.; COLORADO, I.; RAMANATHAN, M.; FEKETEOVA, E.; CONDON, M.; MACHIEDO, G. W.; HAUSER, C. J.; XU, D. Z.; DEITCH, E. A. Estrogenic hormone modulation abrogates changes in red blood cell deformability and neutrophil activation in trauma hemorrhagic shock. **Journal of trauma**, v. 68, n. 1, p. 35-41. 2010.

DUBAL, D. B.; SHUGHRUE, P. J.; WILSON, M. E.; MERCHENTHANLER, I.; WISE, P. M. Estradiol modulates bcl-2 in cerebral ischemia: A potential role for estrogen receptors. *The Journal of Neuroscience*, v. 19, n. 15, p. 6385- 6393. 1999.

ERLANDSSON, M. C.; OHLSSON, C.; GUSTAFSSON, J. A.; CARLSTEN, H. Role of oestrogen receptors alpha and beta in immune organ development and in oestrogen-mediated effects on thymus. **Immunology**, v. 103, n. 1, p. 17-25. 2001.

ESPOSITO, E.; IACONO, A.; RASO, G. M.; PACILIO, M.; COPPOLA, A.; DI CARLO, R.; MELI, R. Raloxifene, a selective estrogen receptor moduladorr, reduces carrageenan-induced acute inflammation in normal and ovariecomized rats. **Endocrinology**, v. 146, n. 8, p. 3301- 3308. 2005.

FERREIRA, S. G. **Influência do gênero nas alterações microcirculatórias e no processo inflamatório em modelo de morte**

**encefálica em ratos.** 2017. 94f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. São Paulo. 2017.

FISH, E. N. The X-files in immunity: sex-based differences predispose immune responses. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 9, p. 737-744. 2008.

FREIRE, Izaura Luiza Silvério et al . Morte encefálica e cuidados na manutenção do potencial doador de órgãos e tecidos para transplante. **Rev. Eletr. Enf.** [Internet], v. 14, n. 4, p. 903-912, Dez. 2012.

FODSTAD, H.; KELLY, P. J.; BUCHFELDER, M. History of the cushing reflex. *Journal of Neurosurgery*. v. 59, n. 5 p.1132-1137. 2006.

GOLDBLUM; S.E; WU; K. M; JAY, M. Lung myeloperoxidase as a measure of pulmonary leukostasis in rabbits. **American Physiological Society**, v. 59, n. 6, p. 1978- 1985. 1985.

HALEJCIO-DELOPHONT, P.; SIAGHY, E. M.; DEVAUX, Y.; UNGUREANU-LONGROIS, D.; RICHOUX, J. P.; BECK, B.; BURLET, C.; VILLEMOT, J. P.; MERTES, P. M. Increase in myocardial interstitial adenosine and net lactate production in brain-dead pigs: an in vivo microdialysis study. **Transplantation**. v. 66, n. 10, p. 1278-1284. 1998.

HIBI, T.; SAGESHIMA, J.; MOLINA, E.; CIANCIO, G.; NISHIDA, S.; CHEN, L.; AROSEMENA, L.; MATTIAZZI, A.; GUERRA, G.; KUPIN, W.; TEKIN, A.; SELVAGGI, G.; LEVI, D.; RUIZ, P.; LIVINGSTONE, A. S.; ROTH, D.; MARTIN, P.; TZAKIS, A.; BURKE, G. W. Predisposing Factors of Diminished Survival in Simultaneous Liver/Kidney Transplantation. **American Journal of Transplantation**, v. 12, n. 11, p. 2966- 2973. 2012.

HSU, J.; YEH, H. C.; CHEN, T. H.; KUO, C. J.; LIN, C. J.; CHIANG, K. C.; YEH, T. S.; HWANG, T. L. Role of Akt/HO-1 pathway in estrogen-mediated attenuation of trauma-hemorrhage-induced lung injury. **Journal of Surgical Research**, v. 182, p. 319-325. 2013.

JOOST, A. B.; GERT, J.; HORST, T.; MOLEMA, G.; VOS, P.; GIRBES, A. R. J.; POSTEMA, F.; FREUND, R. L.; WIERSEMA, J.; SCHILFGAARDE,

R. V.; PLOEG, R. J. Effects of Brain Death and Hemodynamic Status on Function and Immunologic Activation of the Potential Donor Liver in the Rat. **Annals of Surgery**, v. 232, n. 6, p. 804-813. 2000.

JOVER, T.; TANAKA, H.; CALDERONE, A.; OGURO, K.; BENNETT, M. V.; ETGEN, A. M.; ZUKIN, R. S. Estrogen protects against global ischemia-induced neuronal death and prevents activation of apoptotic signaling cascades in the hippocampal CA1. **Journal of Neuroscience**. v. 22, n. 6, p. 2115-2124. 2002.

KHAN, D.; AHMED, S. A. The immune system is a natural target for estrogen action: opposing effects of estrogen in two prototypical autoimmune diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. 635, p. 1-8. 2016.

LÓPEZ, P. S.; VÁZQUEZ MORENO, N.; ESCUDERO AUGUSTO, D.; ASTUDILO GONZÁLEZ, A.; ALVAREZ MENÉNDEZ, F.; GOVACHE, G. F.; OTERO, H. J. A molecular approach to apoptosis in the human heart during brain death. **Transplantation**, v. 86, n. 7, p. 977- 982. 2008.

MAGALHÃES, D. M. **Estudo dos efeitos da solução salina hipertônica sobre a função e alterações do tecido cardíaco em modelo de morte encefálica em ratos**. 2017. 106f. Tese (Doutorado em Cirurgia Torácica) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. São Paulo. 2017.

MANGINI, S.; ALVES, B. R.; SILVESTRE, O. M.; PIRES, P. V.; PIRES, L. J. T.; CURIATI, M. N. V.; BACAL, F. Transplante cardíaco: revisão. **Einstein**, v. 13, n. 2, p. 310-318. 2015 .

MELLO, S. L. **Estudo do perfil clínico e imunológico dos possíveis e potenciais doadores de órgãos no hospital de pronto socorro João XXIII**. 2009. 68f, Dissertação (Mestrado em Medicina) – Faculdade de Medicina da Universidade de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

MENEGAT, L. **Estudos dos processos de mobilização, ativação e apoptose das células da medula óssea em modelo de morte encefálica em ratos**. 2016. 90f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. São Paulo. 2016.

NAKADA, D.; OGURO, H.; LEVI, B. P.; RYAN, N.; KITANO, A.; SAITOH, Y.; TAKEICHI, M.; WENDT, G. R.; MORRISON, S. J. Estrogen increases haematopoietic stem cell self-renewal in females and during pregnancy. **Nature**, v. 505, n. 7484, p. 555-558. 2014.

NIJBOER, W. N.; SCHUURS, T. A.; VAN DER HOEVEN, J. A.; LEUVENINK, H. G.; VAN DER HEIDE, J. J.; VAN GOOR, H.; PLOEG R. J. Effects of Brain Death on Stress and Inflammatory Response in the Human Donor Kidney. **Transplantation proceedings**, v. 37, p. 367-369. 2005.

NOVELLA, S.; HERAS, M.; HERMENEGILDO, C.; DASNTAS, A. P. Effects of estrogen on vascular inflammation a matter of timing. **Atherosclerosis, Thrombosis, and vascular biology**, v. 32, p. 2035-2042. 2012.

NOVITZKY, D.; COOPER, D. K.; ROSENDALE, J. D.; KAUFFMAN, H. M. Hormonal therapy of the brain-dead organ donor: experimental and clinical studies. **Transplantation**, v. 82, n. 11, p. 1396- 1401. 2006.

NOVITZKY, D.; WICOMB, W. N.; COOPER, D. K. C.; ROSE, A. G.; REICHHART, B. Prevention of myocardial injury during brain death by total cardiac sympathectomy in the chacma baboon. **Annals of Thoracic Surgery**, v. 41, p. 520-524. 1986.

NOVITZKY, D.; WICOMB, W. N.; COOPER, D. K. C.; ROSE, A. G.; REICHHART, B. Pathophysiology of pulmonary edema following experimental brain death in the chacma baboon. **Annals of Thoracic Surgery**. v. 43, p. 288-294. 1987.

OBERHOLZER, A.; KEEL, M.; ZELLWEGER, R.; STECKHOLZER, U.; TRENTZ, O.; ERTEL, W. Incidence of septic complications and multiple organ failure in severely injured patients is sex specific. **Journal of Trauma**, v. 48, n. 5, p. 932-937, Mai. 2000.

PATTEN, R. D.; POURATI, I.; ARONOVITZ, M. J.; BAUR, J.; CELESTIN, F.; CHEN, X.; MICHAEL, A.; HAQ, S.; NUEDLING, S.; GROHE, C.; FORCE, T.; MENDELSON, M. E.; KARAS, R. H. 17beta-estradiol reduces cardiomyocyte apoptosis in vivo and in vitro via activation of

phospho-inositide-3 kinase/Akt signaling. *Circulation research*, v. 95, n. 7, p. 692- 699. 2004.

PRATSCHKE, A.; NEUHAUS, P.; TULLIUS, S. G. What can be learned from brain-death models. ***Transplant International***, v. 18, n. 1, p. 15-21. 2005.

RAJU, R.; BLAND, K. I.; CHAUDRY, I. H. Estrogen: a novel therapeutic adjunct for the treatment of trauma-hemorrhage-induced immunological alterations. ***Molecular Medicine***, v. 14, n. 3, p. 213-221. 2008.

RECH, T, H.; RODRIGUES-FILHO, É. M. Entrevista familiar e consentimento. ***Revista Brasileira de Terapia Intensiva***, v. 19, n. 1, p. 85-89. 2007 .

REUMAUX, D.; BOER, M.; MEIJER, A. B.; DUTHILLEUL, P.; ROOS, D. Expression of myeloperoxidase (MPO) by neutrophils is necessary for their activation by anti-neutrophil cytoplasm autoantibodies (ANCA) against MPO. ***Journal of Leukocyte Biology***, v. 73, p. 841-850. 2003.

ROELSGAARD, K.; BOTKER, H. E.; STODKILDE-JORGENSEN, H.; ANDREASEN, F.; JENSEN, S. L.; KEIDING, S. Effects of brain death and glucose infusion on hepatic glycogen and blood hormones in the pig. ***Hepatology***, v. 28, n. 4, p. 871-875. 1996.

SALTIKI, K; ALEVIZAKI, M. Coronary heart disease in postmenopausal women the role of endogenous estrogens and their receptors. *Hormones*, v. 6, n. 1, p. 9- 24. 2007.

SCHWARZ, P. **Atividade inflamatória induzida pela morte encefálica em comparação à atividade inflamatória induzida pela doença crítica**. 2017. 46f. Dissertação (Mestrado em Endocrinologia); Universidade federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2017.

SILVA, A. K. G. **Avaliação do efeito imunomodulador do 17- $\beta$ -estradiol na encefalomielite auto-imune experimental murina**. 2010. 60f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)- Universidade de Juiz de Fora. Juiz de Fora. 2010.

SIMÃO, R.; GOMES-FERREIRA, S.; KUDOI, G. K.; ARMSTRONG, R. JR.; SILVA, L. F. F.; SANNOMIYA, P.; BREITHAUPT-FALOPPA, A. C.; MOREIRA, L. F. P. Sex differences on solid organ histological characteristics after brain death1. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 31, n. 4, p. 278-285. 2016.

SIMAS, R.; KOGISO, D. H.; CORREIA, C. J.; SILVA L. F. F.; SILVA, I. A.; CRUZ, J. W. M. C.; SANNOMIYA P.; MOREIRA, L. F. P. Influence of brain death and associated trauma on solid organ histological characteristics. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 27, n. 7, p. 465-470. 2012.

SIROIS, M.G; JANCARS.; BRAQUETP; PLANTEG, E. SIROISP. PAF increases vascular permeability in selected tissues: Effect of BN-52021 and L-655,240, **Prostaglandins**, v. 36, n. 5, p. 631- 644. 1988.

SOUSA. P. T. R. **Avaliação dos efeitos do 17 $\beta$ -estradiol na lesão mesentérica pela oclusão da aorta descendente proximal em ratos machos**. 2017. 55f. Tese (Doutorado em ciências), Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo. 2017.

TAKADA, Y.; TANIGUCHI, H.; YUZAWA, K.; OTSUKA, M.; TODOROKI, T.; GOTO, K.; FUKAO, K. Protecting the viability of hepatic allografts procured from non-heart-beating donors by blockade of endothelin and platelet activating factor in porcine liver transplantation. **International Surgery**, v. 83, n. 3, p. 226-231. 1998.

TOSTES, R. C.; NIGRO, D.; FORTES, Z. B.; CARVALHO, M. H. C. Efeccts of estrogen on the vascular system. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 36, p. 1143- 1158. 2003.

VAN DER HOEVEN, J. A. B; MOSHAGE, H.; SCHUURS, T.; NIJBOER, M.; SCHILFGAARDE, R. V.; PLOEG, R. J. Brain death induces apoptosis in donor liver of the rat. **Transplantation**, v. 76, n. 8, p. 1150-1154. 2003.

VIEIRA, R. F. **Estudo dos efeitos do 17 $\beta$ -estradiol sobre a microcirculação em modelo de morte encefálica em ratos machos**. 2018. 92f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. São Paulo. 2018

WILHELM, M. J.; PRATSCHKE, J.; BEATO, F.; TAAL, M.; KUSAKA, M.; HANCOCK, W. W.; TILNEY, N. L. Activation of the heart by donor brain death accelerates acute rejection after transplantation. **Circulation**, v. 102, n. 9, p. 2426-2433. 2000.

XING, D.; MILLER, A.; NOVAK, L.; ROCHA, R.; CHEN, Y.; OPARIL, S. Estradiol and progestins differentially modulate leukocyte infiltration after vascular injury. **Circulation**. v. 137, n. 18, p. 234- 241. 2004.

YEH, T. JR.; CONNELLY, M. S.; COLES, J. G.; WEBB, G. D.; MCLAUGHLIN, P. R.; FREEDOM, R. M.; CERRITO, P. B.; WILLIAMS, W. G. Atrioventricular discordance: results of repair in 127 patients. **Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 117, n. 6, p. 1190-1203. 1993.

YU, H. P.; HSIEH, Y. C.; SUZUKI, T.; CHOUDHRY, M. A.; SCHWACHA, M. G.; BLAND, K. I.; CHAUDRY, I. H. Mechanism of the nongenomic effects of estrogen on intestinal myeloperoxidase activity following trauma-hemorrhage: up-regulation of the PI- 3K/Akt pathway. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 82, n. 3, p. 774-80. 2007.

YU, H.; SHIMIZU, T.; CHOUDHRY, M. A.; HSIEH, Y. C.; SUZUKI, T.; BLAND, K. I.; CHAUDRY, I. H. Mechanism of cardioprotection following trauma-hemorrhagic shock by a selective estrogen receptor- $\beta$  agonist: up-regulation of cardiac heat shock factor-1 and heat shock proteins. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**. v. 40, p. 185-194. 2006.

## 8. ANEXO

São Paulo, 02 de junho de 2017.

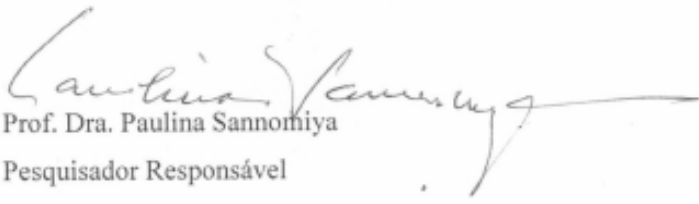
Ilmo Sr.  
Dr. Eduardo Pompeo  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
HC-FMUSP

Prezado Doutor,

Venho por meio desta, solicitar a inclusão da aluna Larissa Juliana de Lima Basílio no protocolo de pesquisa nº 036/16, intitulado “Estudo dos efeitos da morte encefálica sobre a inflamação e a função cardíaca em ratas: tratamento com estradiol”, cuja aprovação data de 27/04/2016. Ressalto que a aluna será responsável pela execução de parte das análises previstas, especificamente análise histopatológica e Imunohistoquímica para pesquisa de moléculas de adesão.

Com meus protestos de estima e consideração, despeço-me.

Atenciosamente,

  
Prof. Dra. Paulina Sannomiya  
Pesquisador Responsável