

Marcelo Luiz Peixoto Sobral

**Efeitos protetores do 17 β -estradiol na coagulação e na inflamação
sistêmica, após a oclusão total da porção proximal da aorta
descendente, em ratos machos**

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

Programa de Cirurgia Torácica e Cardiovascular
Orientador: Dr. Ricardo Ribeiro Dias
Coorientadora: Dra. Ana Cristina Breithaupt
Faloppa

São Paulo

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Sobral, Marcelo Luiz Peixoto
Efeitos protetores do 17beta-estradiol na
coagulação e na inflamação sistêmica, após oclusão
total da porção proximal da aorta descendente, em
ratos machos / Marcelo Luiz Peixoto Sobral. -- São
Paulo, 2020.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Cirurgia Torácica e Cardiovascular.
Orientador: Ricardo Ribeiro Dias.
Coorientadora: Ana Cristina Breithaupt Faloppa.

Descritores: 1.Aorta torácica 2.Estradiol
3.Microcirculação 4.Fígado 5.Coagulação sanguínea
6.Ratos Wistar

USP/FM/DBD-106/20

Responsável: Erivalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedicatória

Aos doentes que tive a honra de operar, com a anuência e auxílio dos meus protetores espirituais.

Ao meu pai e minha mãe, pelo esforço de uma vida toda.

À minha querida esposa, pelo apoio incondicional às minhas escolhas.

Aos meus filhos Maria Clara e Heitor; que esta minha trajetória sirva de exemplo a eles.

À minha família.

Ao meu sogro Nelson Molinari (*in memoriam*).

Agradecimientos

Ao meu orientador Dr. Ricardo Ribeiro Dias, pelo incentivo e cobranças.

Ao Dr. Cristiano de Jesus Correia, pelo auxílio na execução dos experimentos deste trabalho; vale ressaltar sua extrema habilidade.

À Dra. Ana Cristina Breithaupt Faloppa, pelas horas de paciência na condução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Luiz Felipe Pinho Moreira, pelas enormes contribuições desde o início deste estudo.

À funcionária Dra. Sueli Gomes Ferreira que, por mais que tenha me deixado prematuramente, marcou sua presença neste estudo.

Ao Funcionário Sérgio do LIM11, pelo empenho no cuidado dos animais.

À bióloga Caroline Silvério Faria, do Laboratório de Análises Especiais (LAE) do LIM03, departamento de Patologia, pelo auxílio nos exames laboratoriais (perfil de coagulação e bioquímicos).

Ao Prof. Dr. Luiz Fernando Ferraz da Silva “Burns”, pelo auxílio na histologia do fígado.

Ao biólogo Maurício Montecchio Gomes, pelo auxílio no teste da agregação plaquetária.

À banca de qualificação: Prof. Dr. Renato Samy Assad, Prof. Dr. Walter José Gomes e Profa. Dra. Carolina Demarchi Munhoz, pelas críticas construtivas.

Aos colegas e alunos do LIM 11, pelo apoio e sugestões.

Às funcionárias da pós-graduação do INCOR, pela atenção e profissionalismo, em especial à Juliana Lattari.

À minha sogra, Dona Eleusa, pela correção e pelas aulas de Português.

À FAPESP, pelo suporte financeiro.

Aos animais, parte fundamental deste trabalho.

À comissão organizadora do 46º Congresso da Sociedade Brasileira de Cirurgia Cardiovascular, pelo aceite de parte deste trabalho para ser apresentado como Tema Livre Especial.

À comissão organizadora do 57th Annual Meeting of the Eastern Cardiothoracic Surgical Society em Naples, Flórida, pelo aceite de parte deste trabalho para ser apresentado em pôster.

Se, eventualmente, eu possa ter esquecido alguém, peço desculpa; de qualquer forma, muito obrigado a todos que, de alguma maneira, colaboraram com este projeto.

Epígrafe

“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito.”

(Chico Xavier)

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 Medicus.

Sumário

	Pág.
Lista de abreviaturas	
Lista de figuras	
Lista de tabelas	
Resumo	
Abstract	
1 INTRODUÇÃO	01
2 OBJETIVOS	06
2.1 Objetivo primário	07
2.2 Objetivo secundário	07
3 MATERIAL E MÉTODOS	08
3.1 Anestesia e preparo cirúrgico	09
3.2 Parâmetros hemodinâmicos	10
3.3 Indução da isquemia	10
3.4 Grupos experimentais	12
3.5 Coleta de sangue e tecido	13
3.6 Análises realizadas	13
3.6.1 Determinação dos níveis plasmáticos hormonais	13
3.6.2 Hemograma	13
3.6.3 Avaliação da coagulação	14
3.6.3.1 Contagem de plaquetas e agregação plaquetária	14
3.6.3.2 Fibrinogênio	15
3.6.3.6 Coagulograma	16
3.6.3.4 Tromboelastometria rotacional	16
3.6.4 Avaliação da resposta inflamatória sistêmica	18
3.6.5 Determinação dos níveis sorológicos de enzimas ligadas à lesão hepática	19
3.6.6 Avaliação da perfusão, microcirculação hepática e infiltrado leucocitário	19

3.6.7	Análise histológica	20
3.6.8	Avaliação da resposta vascular	21
3.6.8.1	Imunohistoquímica para pesquisa de eNOS, endotelina-1 e moléculas de adesão (ICAM-1, VCAM, e P-selectina)	21
3.6.8.2	Real time PCR para expressão gênica de eNOS, endotelina-1, VCAM e ICAM-1	22
3.6.9	Avaliação da resposta inflamatória no fígado	23
3.6.10	Avaliação da apoptose hepatocelular	24
4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	26
5	RESULTADOS	28
5.1	Pressão arterial e concentração sérica de estradiol	29
5.2	Avaliação do hemograma	31
5.3	Avaliação da coagulação	33
5.4	Avaliação da resposta inflamatória sistêmica	41
5.5	Enzimas hepáticas	43
5.6	Avaliação histológica do tecido hepático	44
5.7	Avaliação da perfusão, microcirculação hepática e infiltrado leucocitário pela microscopia de fluorescência intravital	47
5.8	Resposta vascular	50
5.9	Avaliação da resposta inflamatória no fígado	54
5.10	Apoptose hepatocelular	56
6	DISCUSSÃO	58
7	CONCLUSÃO	67
8	REFERÊNCIAS	69
9	APÊNDICE	

ACF - real firmeza do coágulo

ADP - adenosina difosfato

AEC - 3-amino-9-etilcarbazol

ALT - alanina aminotransferase

AP-1 - proteína ativadora-1

AST - aspartatoaminotransferase

BCL-2 - *B-cell lymphoma protein-2*

BSA - albumina sérica bovina

cAMP - mediador hormonal intracelular cíclico

CCL3 - quimiocina ligante 3

CFR - taxa de formação do coágulo

CFT - tempo de formação do coágulo

CINC-1 - quimiocina para neutrófilo induzida por citocina-1

CT - tempo de coagulação

CXCL2 - quimiocina X ligante 2

DHL - desidrogenase láctea

DNA - ácido desoxirribonucleico

E2 - estradiol

ELISA - ensaio de imunoabsorção enzimática

ERE - elementos de resposta ao estrogênio

ERK - fatores extracelulares quinase regulados

ET - endotelina

eNOS - óxido nítrico sintase endotelial

EPM - erro padrão da média

ER - receptor de estradiol

FiO₂ - fração inspirada de oxigênio

FITC - isotiocianato de fluoresceína

GPIIb/IIIa - glicoproteína IIb/IIIa

GPER - receptor do estrogênio acoplado à proteína G

GRO/KC - quimiocina de crescimento oncogênico/quimioatrativo de queratinócitos

H₂O₂ - água oxigenada

HRP - *Horseradish* peroxidase

ICAM-1 - molécula de adesão intercelular-1

IFN- γ - interferon- γ

Ig - imunoglobulina

IL - interleucina

INR- razão de normatização internacional

IR - referente ao grupo de isquemia e reperfusão

I/R - isquemia e reperfusão

MAPK - proteíno-quinases ativadas por mitógenos

MCE - máxima elasticidade do coágulo

MCF - máxima firmeza do coágulo

MCF-t - tempo para a máxima firmeza do coágulo

MIP-1 - proteína inflamatória de macrófago-1

MIP-2 - proteína inflamatória de macrófago-2

ML - lise máxima

NO - óxido nítrico

NF-kB - fator nuclear kappa B

NFT- α - fator de necrose tumoral- α

P2Y - receptor P2 acoplados à proteína G

PAD - pressão arterial distal

PAF - fator ativador de plaquetas

PAM - pressão arterial média

PAP - pressão arterial proximal

PBS - tampão fosfato salina

Pg/ml - picograma por mililitro

PI3K - fosfoinositídeo 3-quinase

PLCy2 - fosfolipase Cy2

PRP - plasma rico em plaquetas

RNA - ácido ribonucleico

ROS - espécie reativa de oxigênio

Rpm - rotações por minuto

RT-PCR - reação em cadeia da polimerase em tempo real

SF - soro fisiológico

TBST - TRIS salina tamponada

TNF α - Fator de necrose tumoral- α

TP - tempo de protrombina

TRIS - Tris (Hidroximetil) Aminometano

TTPA - tempo de tromboplastina parcial ativada

VCAM-1 - molécula de adesão de célula vascular-1

UV - ultravioleta

VEGF - fator de crescimento endotelial vascular

	Pág.
Figura 1. Desenho esquemático do procedimento cirúrgico e da oclusão do arco distal/aorta descendente.	11
Figura 2. Ensaios de agregação plaquetária no agregômetro (A) e seu registro experimental (B). A: plaquetas normais (acima) tratadas com antagonista plaquetário (abaixo) e testadas com agonista ADP, resultando em diferentes registros; B: registro experimental de um ensaio no agregômetro utilizando plaquetas normais, mostrando o início do experimento (1), após a adição do agonista, quando ocorre a mudança de forma da plaqueta com posterior secreção dos grânulos (2), e a agregação plaquetária (3).	15
Figura 3. Parâmetros da tromboelastometria rotacional. Pedro-Rodrigues, 2014.	17
Figura 4. Curvas mostrando a evolução da pressão arterial proximal ao longo do experimento (artéria carótida esquerda). Sham (rato com manipulação cirúrgica, sem lesão de isquemia e reperfusão); IR (rato submetido à lesão de isquemia e reperfusão); E2 (rato tratado com 17 β -estradiol, 30 minutos antes da indução de isquemia e reperfusão). Os valores representam a média \pm EPM.	29
Figura 5. Curvas mostrando a evolução da pressão arterial ao longo do experimento (artéria caudal). Sham (rato com manipulação cirúrgica, sem lesão de isquemia e reperfusão); IR (rato submetido à lesão de isquemia e reperfusão I/R); E2 (rato tratado com 17 β -estradiol, 30 minutos antes da indução de isquemia e reperfusão). Os valores representam a média \pm EPM.	30
Figura 7. Leucograma no pré e pós-operatório. (*) Pós <i>versus</i> pré-operatório ($p < 0,05$). Sham (rato com manipulação cirúrgica, sem lesão de isquemia e reperfusão); IR (rato submetido à lesão de isquemia e reperfusão); E2 (rato tratado com 17 β -estradiol, 30 minutos antes da indução de isquemia e reperfusão). Os valores representam a média \pm EPM.	32

- Figura 8.** Número de hemáceas, hemoglobina e hematócrito no pré e pós-operatório. (*) IR *versus* Sham ($p < 0,05$) e (ϕ) E2 *versus* IR ($p < 0,05$). Sham (rato com manipulação cirúrgica, sem lesão de isquemia e reperfusão); IR (rato submetido à lesão de isquemia e reperfusão); E2 (rato tratado com 17β -estradiol, 30 minutos antes da indução de isquemia e reperfusão). Os valores representam a média \pm EPM. 33
- Figura 9.** Contagem de plaquetas no pré e no pós-operatório. Sham (rato com manipulação cirúrgica, sem lesão de isquemia e reperfusão); IR (rato submetido à lesão de isquemia e reperfusão); E2 (rato tratado com 17β -estradiol, 30 minutos antes da indução de isquemia e reperfusão). Os valores representam a média \pm EPM. 34
- Figura 10.** Formação do coágulo até 30 minutos (EXTEM). Sham (rato com manipulação cirúrgica, sem lesão de isquemia e reperfusão); IR (rato submetido à lesão de isquemia e reperfusão); E2 (rato tratado com 17β -estradiol, 30 minutos antes da indução de isquemia e reperfusão). Os valores representam a média \pm EPM. 37
- Figura 11.** Formação do coágulo até 30 minutos (INTEM). Sham (rato com manipulação cirúrgica, sem lesão de isquemia e reperfusão); IR (rato submetido à lesão de isquemia e reperfusão); E2 (rato tratado com 17β -estradiol, 30 minutos antes da indução de isquemia e reperfusão). Os valores representam a média \pm EPM. (*) IR *versus* Sham ($p < 0,05$). 39
- Figura 12.** Formação do coágulo até 30 minutos (FIBTEM). Sham (rato com manipulação cirúrgica, sem lesão de isquemia e reperfusão); IR (rato submetido à lesão de isquemia e reperfusão); E2 (rato tratado com 17β -estradiol, 30 minutos antes da indução de isquemia e reperfusão). Os valores representam a média \pm EPM. (*) E2 *versus* IR ($p < 0,05$). 41
- Figura 13.** Dosagem de interleucinas IL-1, IL-6, IL10 e IFN-gama no soro. Sham (rato com manipulação cirúrgica, sem lesão de isquemia e reperfusão); IR (rato submetido à lesão de isquemia e reperfusão); E2 (rato tratado com 17β -estradiol, 30 minutos antes da indução de isquemia e

- reperfusão). Os valores representam a média \pm EPM. (*) IR *versus* Sham ($p < 0,05$). 42
- Figura 14.** Dosagem de TNF-alfa, Cinc-1, MIP-1 e MIP-2 no soro. Sham (rato com manipulação cirúrgica, sem lesão de isquemia e reperfusão); IR (rato submetido à lesão de isquemia e reperfusão); E2 (rato tratado com 17β -estradiol, 30 minutos antes da indução de isquemia e reperfusão). Os valores representam a média \pm EPM. (*) IR *versus* Sham ($p < 0,05$). 43
- Figura 15.** Concentração sérica das enzimas hepáticas (AST, ALT e DHL). Sham (rato com manipulação cirúrgica, sem lesão de isquemia e reperfusão); IR (rato submetido à lesão de isquemia e reperfusão); E2 (rato tratado com 17β -estradiol, 30 minutos antes da indução de isquemia e reperfusão). Os valores representam a média \pm EPM. (*) IR *versus* Sham ($p < 0,001$). 44
- Figura 16.** Avaliação histológica do tecido hepático (congestão, balonização, inflamação e hemorragia). Sham (rato com manipulação cirúrgica, sem lesão de isquemia e reperfusão); IR (rato submetido à lesão de isquemia e reperfusão); E2 (rato tratado com 17β -estradiol, 30 minutos antes da indução de isquemia e reperfusão). Os valores representam a média \pm EPM. (*) IR *versus* Sham ($p < 0,05$). 45
- Figura 17.** Amostras de análises histológicas. Sham (rato com manipulação cirúrgica, sem lesão de isquemia e reperfusão); IR (rato submetido à lesão de isquemia e reperfusão); E2 (rato tratado com 17β -estradiol 30 minutos antes da indução de isquemia e reperfusão). Os cortes ($4\mu\text{m}$) de fragmentos do lobo esquerdo do fígado foram corados com hematoxilina e eosina. (A) Sham, hepatócitos com importante balonização; (B) IR, congestão intensa e inflamação periportal discreta; (C) E2, discreta congestão centrolobular e esteatose, sem balonização. 46
- Figura 18.** Perfusão hepática. Sham (rato com manipulação cirúrgica, sem lesão de isquemia e reperfusão); IR (rato submetido à lesão de isquemia e reperfusão); E2 (rato tratado com 17β -estradiol, 30 minutos antes da indução de isquemia e reperfusão). Os valores representam a média \pm

- EPM. (*) IR *versus* Sham ($p < 0,05$). 47
- Figura 19.** Microcirculação hepática. Sham (rato com manipulação cirúrgica, sem lesão de isquemia e reperfusão); IR (rato submetido à lesão de isquemia e reperfusão); E2 (rato tratado com 17β -estradiol, 30 minutos antes da indução de isquemia e reperfusão). Os valores representam a média \pm EPM. (*) IR *versus* Sham ($p < 0,05$). Para avaliar a formação de microagregados, o isotiocianato de fluoresceína (FITC), conjugado a um anticorpo anti-CD49B (BD Biosciences, Brasil), foi infundido pela veia jugular. (A) Sham, baixa agregação plaquetária; (B) IR, intensa agregação plaquetária; (C) E2, agregação plaquetária intermediária. 48
- Figura 20.** Infiltrado leucocitário. Sham (rato com manipulação cirúrgica, sem lesão de isquemia e reperfusão); IR (rato submetido à lesão de isquemia e reperfusão); E2 (rato tratado com 17β -estradiol, 30 minutos antes da indução de isquemia e reperfusão). Os valores representam a média \pm EPM. O número de leucócitos, no endotélio dos vasos, no fígado, foi determinado após a infusão de rodamina 6G na veia jugular. (A) Sham, baixo infiltrado leucocitário; (B) IR, alto infiltrado leucocitário; (C) E2, infiltrado leucocitário intermediário. 49
- Figura 21.** Avaliação da expressão da eNOS por imuno-histoquímica. Sham (rato com manipulação cirúrgica, sem lesão de isquemia e reperfusão); IR (rato submetido à lesão de isquemia e reperfusão); E2 (rato tratado com 17β -estradiol, 30 minutos antes da indução de isquemia e reperfusão). Os valores representam a média \pm EPM. (*) IR *versus* Sham ($p = 0,0001$) e (ϕ) E2 *versus* IR ($p < 0,05$). 50
- Figura 22.** Avaliação da expressão da endotelina-1 por imuno-histoquímica. Sham (rato com manipulação cirúrgica, sem lesão de isquemia e reperfusão); IR (rato submetido à lesão de isquemia e reperfusão); E2 (rato tratado com 17β -estradiol, 30 minutos antes da indução de isquemia e reperfusão). Os valores representam a média \pm EPM. (*) IR *versus*

- Sham ($p=0,0004$) e (ϕ) E2 *versus* IR ($p<0,0001$). 51
- Figura 23.** Avaliação da expressão gênica de eNOS e endotelina-1 por reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR). Sham (rato com manipulação cirúrgica, sem lesão de isquemia e reperfusão); IR (rato submetido à lesão de isquemia e reperfusão); E2 (rato tratado com 17β -estradiol, 30 minutos antes da indução de isquemia e reperfusão). Os valores representam a média \pm EPM. 52
- Figura 24.** Avaliação da expressão gênica por reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) e por imuno-histoquímica do ICAM-1 e VCAM. Sham (rato com manipulação cirúrgica, sem lesão de isquemia e reperfusão); IR (rato submetido à lesão de isquemia e reperfusão); E2 (rato tratado com 17β -estradiol, 30 minutos antes da indução de isquemia e reperfusão). Os valores representam a média \pm EPM. 53
- Figura 25.** Avaliação da expressão da P-seletina. Sham (rato com manipulação cirúrgica, sem lesão de isquemia e reperfusão); IR (rato submetido à lesão de isquemia e reperfusão); E2 (rato tratado com 17β -estradiol, 30 minutos antes da indução de isquemia e reperfusão). Os valores representam a média \pm EPM. (*) IR *versus* Sham ($p<0,05$). 54
- Figura 26.** Dosagem de MIP-1, MIP-2, de interleucinas (IL-1, IL-6 e IL10) e de IFN-gama, TNF-alfa e Cinc-1 no homogenato do fígado. Sham (rato com manipulação cirúrgica, sem lesão de isquemia e reperfusão); IR (rato submetido à lesão de isquemia e reperfusão); E2 (rato tratado com 17β -estradiol, 30 minutos antes da indução de isquemia e reperfusão). Os valores representam a média \pm EPM. 55
- Figura 27.** Avaliação da expressão de BCL-2 por imuno-histoquímica. Sham (rato com manipulação cirúrgica, sem lesão de isquemia e reperfusão); IR (rato submetido à lesão de isquemia e reperfusão); E2 (rato tratado com 17β -estradiol, 30 minutos antes da indução de isquemia e reperfusão). Os valores representam a média \pm EPM. (*) IR *versus* Sham ($p=0,0004$) e (ϕ) E2 *versus* IR ($p<0,0001$). 56

Figura 28. Avaliação da expressão da caspase-3 por imuno-histoquímica. Sham (rato com manipulação cirúrgica, sem lesão de isquemia e reperfusão); IR (rato submetido à lesão de isquemia e reperfusão); E2 (rato tratado com 17β -estradiol, 30 minutos antes da indução de isquemia e reperfusão). Os valores representam a média \pm EPM.

	Pág.
Tabela 1. Glóbulos brancos totais	31
Tabela 2. Variáveis do teste de agregação plaquetária	34
Tabela 3. Perfil de coagulação	35
Tabela 4. Variáveis do EXTEM	36
Tabela 5. Variáveis do INTEM	38
Tabela 6. Variáveis do FIBTEM	40

Resumo

Sobral MLP. *Efeitos protetores do 17 β -estradiol na coagulação e na inflamação sistêmica, após oclusão total da porção proximal da aorta descendente, em ratos machos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2020.

Introdução: As doenças da aorta torácica apresentam alta morbimortalidade e seu tratamento cirúrgico pode comprometer o fluxo sanguíneo do trato gastrointestinal. Em estudo experimental anterior, demonstrou-se que o uso profilático do 17 β -estradiol foi capaz de reduzir a inflamação e a mortalidade, pela preservação mesentérica e da integridade intestinal. Pretendemos investigar a influência do estradiol na coagulação, inflamação sistêmica e na lesão hepática após a isquemia e reperfusão (I/R) devido à oclusão proximal da aorta descendente. **Métodos:** Ratos Wistar machos foram randomizados e alocados em três grupos: (Sham) falsamente operados (n = 8); (IR) animais submetidos à oclusão da aorta por 20 minutos, seguidos por período de reperfusão de 2 horas (n = 8) e (E2) animais tratados com 17 β -estradiol (280 μ g/kg, iv) 30 minutos antes dos 20 minutos de isquemia e das 2 horas de reperfusão (n = 8). Ao final, amostras de sangue e de tecido hepático foram coletadas. Foram analisados: a coagulação (contagem de plaquetas, agregação plaquetária, fibrinogênio, coagulograma e tromboelastometria rotacional) e a resposta inflamatória sistêmica (citocinas inflamatórias MIP1 alfa, MIP2, CINC-1, IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF-alfa e interferon- γ); no fígado, os níveis sorológicos de enzimas hepáticas, avaliação da perfusão, da microcirculação e infiltrado leucocitário, análise histológica, avaliação da resposta vascular (eNOS, endotelina-1), moléculas de adesão (ICAM-1, VCAM-1 e P-selectina), avaliação da resposta inflamatória e avaliação da apoptose. **Resultados:** O grupo IR apresentou aumento da agregação plaquetária (Sham=45,1; IR=79,1; E2=40,8%; p=0,02), firmeza do coágulo (Sham=65,8; IR=80,4; E2=68,9 mm; p=0,012), menor concentração e maior tempo de ativação do fibrinogênio e fibrinólise (p=0,031), em comparação ao grupo tratado com estradiol. Na análise dos oito mediadores inflamatórios no soro, foram observadas diferenças entre IR e Sham e entre IR e E2 nas dosagens da IL-1 (p=0,022), IL-10 (p=0,016) e do IFN-gama (p=0,032). Houve aumento da atividade hepática da AST, ALT e DHL nos dois grupos submetidos a I/R. Na perfusão e microcirculação houve diferença entre o grupo IR e o Sham (p=0,0018 e p=0,003, respectivamente). Na avaliação histológica do fígado houve maior congestão e menor balonização no IR em relação ao Sham (p=0,009 e p=0,01). Além disso, houve redução da expressão hepática da eNOS e ET-1 no grupo IR em relação ao Sham e E2 (Sham=0,22, IR=0,12, E2=0,19; p=0,0002). A análise de apoptose do fígado mostrou redução de BCL-2 no grupo IR e o tratamento com estradiol foi capaz de prevenir essa redução (Sham=0,201, IR=0,043, E2=0,453; p<0,0001). **Conclusão:** A infusão profilática de 17 β -estradiol exerceu efeito protetor na coagulação e na inflamação sistêmica, no fígado, efeito protetor na resposta vascular e apoptose após a lesão por I/R. Suporte financeiro: processo 2016/14025-3, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Descritores: Aorta torácica; Estradiol; Microcirculação; Fígado; Coagulação sanguínea; Ratos Wistar.

Abstract

Sobral MLP. *Protective effects of 17 β -estradiol on coagulation and systemic inflammation after occlusion of the proximal portion of descending aorta in male rats* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2020.

Objective: Aortic diseases still remains with high mortality and morbidity, and their surgical treatment may compromise blood flow of the gastrointestinal tract. Previous experimental study showed that prophylactic steroid 17 β -estradiol was able to reduce mortality and inflammation, preserving mesenteric perfusion and intestinal integrity. Once sex hormone levels in the early posttraumatic period are associated with alterations in the hemostatic response, here we intend to investigate estradiol influence on secondary coagulation, systemic inflammation and liver injury after ischemic-reperfusion (I/R) injury due to descending thoracic aorta occlusion. **Method:** Wistar male rats were randomized and allocated in three groups: (Sham) surgically manipulated only (n=8); (IR) animals submitted to aortic occlusion for 20 minutes, followed by reperfusion for up to 2 hours (n=8) and (E2) animals treated with 17 β -estradiol (280 μ g/kg, i.v.) 30 minutes before I/R (n=8). Samples of blood and hepatic tissue were collected for analysis at the end of the protocol. Were analyzed: coagulation (coagulation profile, platelets, fibrinogen, rotational thromboelastometry and platelet aggregation) and systemic inflammatory response (MIP1 alpha, MIP2, CINC-1, IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF-alpha and interferon- γ); In liver, injury markers (AST, ALT and LDH), perfusion, microcirculation and leukocyte infiltrate by intravital fluorescence microscopy, histology, vascular response (immunohistochemistry and PCR for gene expression of eNOS, endothelin-1) adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1 and P-selectina), inflammatory response and apoptosis. **Results:** The IR group showed an increase in platelet aggregation (Sham=45.1; IR=79.1; E2=40.8%; p=0.02), clot firmness (Sham=65.8; IR=80.4; E2=68.9 mm; p=0.012), lower concentration and longer fibrinogen activation and fibrinolysis time (p=0.031) compared to the group treated with estradiol. In the analysis of the eight inflammatory mediators in the serum, differences were observed between IR versus Sham and IR versus E2 in the dosages of IL-1 (p=0.022), IL-10 (p=0.016) and IFN-gamma (p=0.032). There was an increase in the hepatic activity of AST and ALT in the two groups submitted to I/R (AST: Sham=78U/L, IR=324U/L, E2=242U/L; p=0.0016; ALT: Sham=43.9U/L, IR=270.4U/L, E2=184.8U/L; p=0.0007). In perfusion and microcirculation, there was a difference between the IR and Sham groups (p=0.0018 and p=0.03, respectively). Histological evaluation of the liver showed no differences when edema and cell infiltrate were analyzed. In addition, there was a reduction in hepatic expression of eNOS in the IR group in relation to the other groups (Sham=0.22, IR=0.12, E2=0.19; p=0.0002). Analysis of liver apoptosis showed a reduction in BCL-2 in the IR group and treatment with estradiol was able to prevent this reduction (Sham=0.201, IR= 0.043, E2=0.453; p<0.0001). **Conclusion:** The data indicated that the prophylactic infusion of 17 β -estradiol had a protective effect on coagulation, systemic inflammation, liver vascular response and apoptosis after I/R injury. Financial support: process 2016/14025-3, São Paulo State Research Support Foundation (FAPESP).

Descriptors: Aorta, thoracic; Estradiol; Microcirculation; Liver; Blood coagulation; Rats, Wistar.

1 Introdução

As doenças da aorta torácica apresentam elevada morbimortalidade e são responsáveis por uma parcela significativa de óbitos por doenças cardiovasculares.^{1,2} Apesar dos avanços contínuos que têm sido feitos na tecnologia médica para o procedimento cirúrgico, ela ainda carrega uma alta taxa de mortalidade.³

A abordagem cirúrgica nos casos mais complexos, quando há envolvimento do arco aórtico e da aorta descendente, muitas vezes, necessita de parada circulatória sistêmica em níveis variados de hipotermia, por tempo, às vezes, prolongado.⁴ Como consequência desse período de isquemia para o seguimento corpóreo perfundido pela aorta torácica distalmente à artéria subclávia, podem ocorrer diversas complicações relacionadas ao conhecido fenômeno de lesão por isquemia e reperfusão (I/R)⁵⁻⁷, principalmente o processo inflamatório sistêmico. A ativação da coagulação em conjunto ao processo inflamatório pode causar danos na microcirculação e contribuir para a falência de múltiplos órgãos. Os principais fatores de coagulação do sangue são produzidos pelo fígado e secretados no sangue em formas ativas.⁸

A lesão por I/R, presente nesse tipo de operação, pode resultar em graus variados de sangramento perioperatório secundário à coagulopatia, o que também já foi observado e demonstrado em alguns estudos experimentais (seja pela isquemia hepática propriamente dita ou pela inflamação sistêmica). Esta complicação que, muitas vezes, resulta na necessidade de transfusão de vários hemoderivados e até reoperação, tem impacto direto na morbimortalidade hospitalar desses pacientes.⁹ Entretanto, os mecanismos envolvidos na interação entre as plaquetas e o endotélio na microcirculação hepática, após I/R, não estão totalmente esclarecidos. Porém, estudos destacam a expressão de P-selectina (CD62P), que é uma glicoproteína armazenada tanto nos

grânulos alfa secretores das plaquetas, como nos corpos de Weibel-Palade das células endoteliais, e é uma das principais responsáveis por esta interação.⁶ Após a isquemia, a expressão de P-selectina na superfície das plaquetas é rápida (após 5 a 10 minutos), permitindo seu rolamento e a firme adesão ao endotélio microvascular durante a reperfusão pós-isquêmica, podendo levar até à obstrução total dos vasos, comprometendo a microcirculação hepática.^{6,10}

Para que se tenha o melhor monitoramento da coagulação, dois testes (entre outros) podem ser realizados: a tromboelastometria rotacional (ROTEM[®])¹¹, que mede e mostra graficamente as alterações viscoelásticas em todos os estágios da formação, manutenção e destruição do coágulo, proporcionando, assim, uma avaliação global dinâmica da coagulação, e a agregação plaquetária¹², que é um teste que avalia a função das plaquetas pela exploração de diferentes vias de ativação plaquetária *in vitro*.

Nas lesões hepáticas por I/R, observa-se significativo acometimento da sua microcirculação e diferentes mecanismos contribuem para seu desenvolvimento, tais como: o estresse oxidativo, a inflamação, o dano mitocondrial, a ativação das células de Kupffer, o dano endotelial¹³⁻¹⁵ a liberação anormal do óxido nítrico (NO), a vasoconstrição e a inadequada vasodilatação secundária à diminuição do NO¹⁶. As células de Kupffer, quando ativadas, promovem a liberação de citocinas pró-inflamatórias, incluindo o fator de necrose tumoral (NFT- α) e a interleucina-6. Essas citocinas aumentam a resposta inflamatória que resulta na disfunção hepatocelular, necrose ou apoptose hepática¹⁷. A microscopia intravital revelou muitas características do fígado doente nas últimas décadas e ainda oferece inúmeras aplicações. Esta técnica *in vivo* foi utilizada em uma variedade de modelos animais, variando de lesão hepática induzida por drogas¹⁸, mudanças pelo envelhecimento na microcirculação hepática¹⁹,

disfunção da microcirculação hepática induzida por TNF- α ²⁰ e lesão necrótica focal²¹. Assim sendo, compreender as alterações microscópicas que ocorrem no fígado através da microscopia intravital, em tempo real, oferece valiosos benefícios e novas possibilidades terapêuticas²²⁻²⁴.

Com o objetivo de reduzir os efeitos deletérios provocados pela lesão de I/R hepática, tem-se tentado identificar mecanismos que reduzam essa lesão tecidual. Opções como o pré-condicionamento isquêmico regional²⁵ ou remoto²⁶, a hipotermia²⁷ e o uso de topiramato²⁸, foram testadas com sucesso em ratos, reduzindo o dano provocado pela isquemia localizada e/ou parcial do fígado. Hormônios como, por exemplo, o estradiol já se mostraram capazes de prevenir a lesão intestinal secundária à isquemia mesentérica⁸.

Conforme demonstrado por Breithaupt-Faloppa et al. (2014)²⁹, a administração de 17 β -estradiol a ratos machos reduziu a migração de leucócitos e a expressão das moléculas de adesão, ICAM-1 (molécula de adesão intercelular-1) e VCAM-1 (molécula de adesão de célula vascular-1), na microcirculação pulmonar, em modelo de I/R intestinal. Rocha de Sousa et al. (2018)⁸ demonstraram que o hormônio reduziu a expressão de ICAM-1 e da P-selectina no mesentério de ratos, em modelo de oclusão aórtica, e também reduziu a lesão secundária à isquemia mesentérica e a mortalidade dos animais. Em cultura de células endoteliais oriundas de aorta humana, Hou e Pei (2015) demonstraram haver redução na expressão de ICAM-1 e VCAM-1 sob efeito do 17 β -estradiol, sendo esse efeito mais proeminente sobre a molécula VCAM-1. Portanto, atuando a nível da microcirculação, o hormônio 17 β -estradiol reduziu, de um modo geral, a ativação endotelial associada à lesão.³⁰

O hormônio 17β -estradiol liga-se aos receptores clássicos $ER\alpha$ e $ER\beta$ ³¹, assim como ao receptor do estrogênio acoplado à proteína G (GPER). Ao se ligar aos receptores $ER\alpha$ e $ER\beta$, o hormônio, através desse mecanismo de ação, desempenha sua função fisiológica, tanto na ação genômica quanto na ação rápida, não genômica. Na regulação genômica, a ligação de E2 ao receptor estrogênico (ER) promove a formação de homo/hetero dímeros, translocação ao núcleo, e ligação direta a elementos de resposta ao estrogênio (ERE) ou a fatores de transcrição que regulam a transcrição de seu gene alvo, incluindo o VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), que é um fator pró-angiogênico. Na regulação não genômica, a ligação de E2 a ERs e, também, a receptor acoplado à proteína G na membrana plasmática leva à ativação de MAPK (proteína-quinases ativadas por mitógenos), ERK (fatores extracelulares quinase reguladas), PI3K (fosfoinosítídeo 3-quinase) e cAMP (mediador hormonal intracelular cíclico), que induzem a expressão gênica incluindo a eNOS, que estimula a produção de óxido nítrico (NO)³². O NO atua na regulação do tônus da musculatura lisa vascular, desempenhando um papel importante no relaxamento do músculo liso ao redor das arteríolas e na manutenção da função vascular por inibição da vasoconstrição, agregação plaquetária e adesão de leucócito.³³

Por evidências da atuação do estradiol na redução do NF- κ B (fator nuclear kappa B) e AP-1 (proteína ativadora-1), acredita-se que possa reduzir a resposta inflamatória associada ao evento I/R. O E2 também se liga a ERs localizados na membrana mitocondrial, melhorando a função, diminuindo a produção de ROS (espécies reativas ao oxigênio) e aumentando a sobrevivência celular.³⁴⁻³⁶ Todavia, ainda não existem informações acerca do papel desse hormônio sobre a lesão de I/R hepática, secundária à oclusão proximal da aorta descendente.

2 Objetivos

2.1 Objetivo primário

Avaliar, em ratos machos, os benefícios na coagulação e na inflamação sistêmica, do uso intravenoso do 17 β -estradiol após a oclusão da aorta descendente proximal.

2.1 Objetivo secundário

Avaliação da lesão hepática e os benefícios do uso intravenoso do 17 β -estradiol após a oclusão da aorta descendente proximal.

3 Material e Métodos

Este estudo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), com número de protocolo SDC 4444/16/110.

Os animais utilizados foram obtidos junto ao Biotério da mesma Faculdade, e os experimentos conduzidos no laboratório de Cirurgia Cardiovascular e Fisiopatologia da Circulação (LIM-11), em conjunto com o laboratório experimental do Instituto do Coração do HC-FMUSP. Os animais foram manipulados de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica – DBCA (2016) do CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal).

Foram utilizados 48 ratos Wistar machos, de aproximadamente dois meses de idade e pesando entre 350g a 450g. Os animais foram mantidos em ambiente com controle de temperatura ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade e exposição à luz, com ciclo claro e escuro de 12 horas, e acesso livre à ração e água.

3.1 Anestesia e preparo cirúrgico

A indução da anestesia foi realizada em câmara fechada, com isoflurano a 5%, seguida de intubação e ventilação mecânica através de ventilador para roedores (Harvard Apparatus, Inc., Holliston, MA, USA), sendo mantido o plano anestésico com isoflurano a 2%. A ventilação mecânica foi realizada com FiO_2 de 60%, volume corrente de 10ml/kg a 70 ciclos/min. Os animais foram colocados em decúbito dorsal sob placa aquecida, para a manutenção da temperatura (37°C) e submetidos à tricotomia

e antissepsia da região cervical (para dissecação e cateterização da artéria carótida comum esquerda e veia jugular direita), ventral e da região de inserção da cauda ao abdômen (dissecação da artéria caudal). Durante o período de reperfusão, todos os animais foram hidratados com SF 0,9% a 20ml/kg/h.

3.2 Parâmetros hemodinâmicos

Foi utilizado um cateter de politetrafluoretileno (PE) 50, inserido na artéria carótida comum esquerda em sentido cranial após ligadura proximal, acoplado a um transdutor de pressão (P23XL, Viggo-Spectramed Inc., Oxnard, CA, USA) conectado a um sistema multicanal de aquisição de dados biológicos (Acqknowledge – Biopac Systems, Inc., Goleta, CA, USA), para o registro contínuo da pressão arterial proximal (PAP), de maneira indireta, durante todo o procedimento cirúrgico. Um cateter similar foi inserido na artéria caudal para registro da pressão arterial distal (PAD) (figura 1).

3.3 Indução da isquemia

Um cateter Fogarty® 2F (Edwards Lifesciences LLC – Irvine, CA, EUA) foi inserido na artéria carótida comum esquerda até a aorta descendente (11 ± 1 mm no sentido caudal), seguido de insuflação parcial (40 μ L de solução salina). O cateter, parcialmente insuflado, foi tracionado até o posicionamento correto do balão, no óstio da artéria carótida comum esquerda, posição esta que permitiu, também, a oclusão do

óstio da artéria subclávia esquerda, importante via de circulação colateral. Com o cateter na posição correta, o balão foi completamente insuflado ($90\pm 10\mu\text{L}$ de solução salina) mantendo a aorta ocluída.

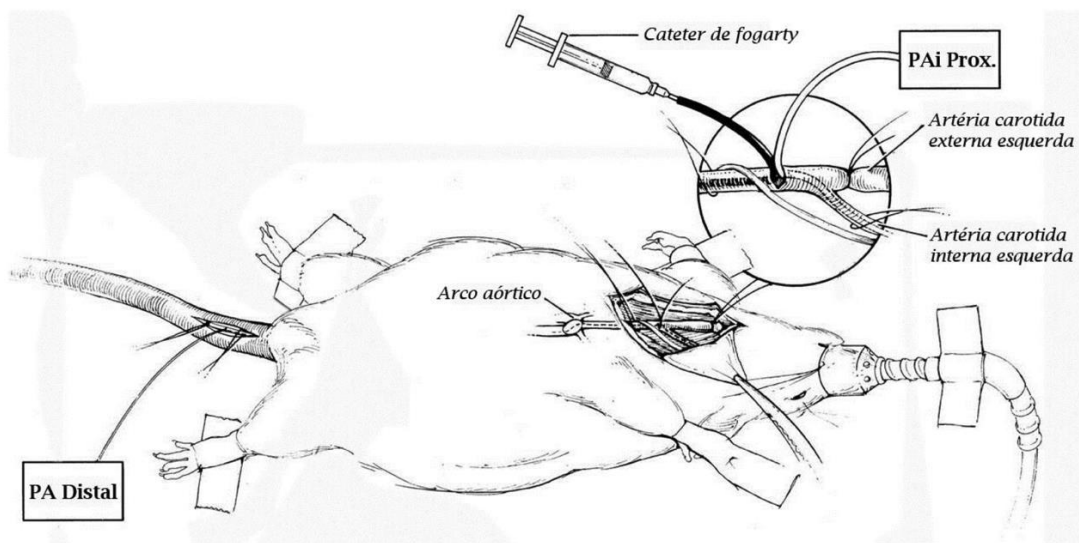


Figura 1 - Desenho esquemático do procedimento cirúrgico e da oclusão da aorta descendente.

Durante a oclusão da aorta, foi realizado o controle da pressão arterial média (PAM) proximal. Buscou-se manter os valores entre 50 e 60mmHg, por meio do aumento, quando necessário, da concentração do isoflurano inalado para até 5%, logo após a insuflação completa do balão. A confirmação da eficiência da isquemia foi baseada em dois parâmetros: PAM distal abaixo de 10mmHg e observação de cianose nas extremidades dos membros inferiores.

3.4 Grupos experimentais

Os animais foram divididos randomicamente em três grupos:

1) Sham (n=8): submetidos à manipulação cirúrgica, porém sem indução da lesão de isquemia e reperfusão, e sem infusão intravenosa de 17β -estradiol;

2) IR (n=8): submetidos à isquemia normotérmica distalmente ao clampeamento endovascular do arco distal/aorta descendente por 20 minutos, seguidos de 120 minutos de reperfusão. Trinta minutos antes do clampeamento, foi realizada a infusão intravenosa somente do veículo do 17β -estradiol (ciclodextrina em solução fisiológica que promove o aumento da solubilidade, dissolução e biodisponibilidade de fármacos pouco solúveis³⁷);

3) E2 (n=8): submetidos à isquemia normotérmica distalmente ao clampeamento endovascular do arco distal/aorta descendente por 20 minutos, seguidos de 120 minutos de reperfusão. Foi realizada a infusão intravenosa do 17β -estradiol (280 μ g/Kg), 30 minutos antes da isquemia;

Após os 120 minutos de reperfusão, foram colhidas amostras de sangue e tecido hepático (lobo esquerdo), para avaliação dos marcadores séricos, da histologia e da imuno-histoquímica. A seguir, os animais foram eutanasiados (exsanguinados através da aorta abdominal) e descartados, seguindo as normas preconizadas pela Sociedade Protetora dos Animais.

3.5 Coleta de sangue e tecido

Para as análises histológica, imuno-histoquímica e RT-PCR foram retiradas quatro amostras de tecido hepático (lobo esquerdo). Uma amostra foi fixada em formaldeído (10%); uma, colocada em 1ml de solução de RNA later e as restantes armazenadas a -80°C.

3.6 Análises realizadas

3.6.1 Determinação dos níveis plasmáticos hormonais

Após o término do período de 120 minutos, foram coletadas amostras de sangue para realização de dosagens do estradiol. O sangue foi coletado da aorta abdominal e a concentração circulante do hormônio 17β -estradiol foi determinada por ELISA (Cayman Chemical, Michigan, USA), conforme protocolo do fabricante.

3.6.2 Hemograma

Amostras de sangue (20 μ L) foram coletadas e os números de glóbulos brancos, de hemácias, de hemoglobina e de hematócrito foram obtidos na linha de base

(0 minutos) e no final do experimento por um analisador automático de hematologia (Mindray BC 2800 Vet, Shenzhen, China).

3.6.3 Avaliação da coagulação

3.6.3.1 Contagem de plaquetas e agregação plaquetária

Amostras de sangue (20 μ L), foram coletadas na linha de base (0 minutos) e 120 minutos após a reperfusão e a contagem de plaquetas foi obtida por um analisador automático de hematologia (Mindray BC 2800 Vet, Shenzhen, China).

Para o teste de agregação plaquetária, as amostras foram coletadas em tubo com citrato de sódio 3,2% e centrifugadas, por 4 a 6 minutos, em 1.000 a 1.500 rpm, para obtenção de plasma rico em plaquetas (PRP), no equipamento AggRAM (Helena Laboratories, Beaumont, Texas, USA), utilizado o ADP na concentração de 10 μ M como agonista. Um PRP é continuamente agitado por uma esfera de ferro, em um aparelho denominado agregômetro de plaquetas. Esse aparelho mede uma combinação de absorção e dispersão de luz, tendo-se hoje aparelhos que permitem tanto medições nefelométricas (método analítico de laboratório, que se baseia na diminuição da intensidade pela difração da luz), quanto fotométricas. Constitui um processo que registra alterações na transmissão da luz, pois, ao adicionar agentes agonistas, tem-se um decréscimo da mesma devido à mudança na forma das plaquetas, que passam de discóides a esféricas. Isso é seguido de um aumento gradual na transmissão de luz,

devido à agregação das plaquetas, o que torna o meio mais claro. Esse teste é válido para mostrar o defeito da hemostasia primária. (figura 2)

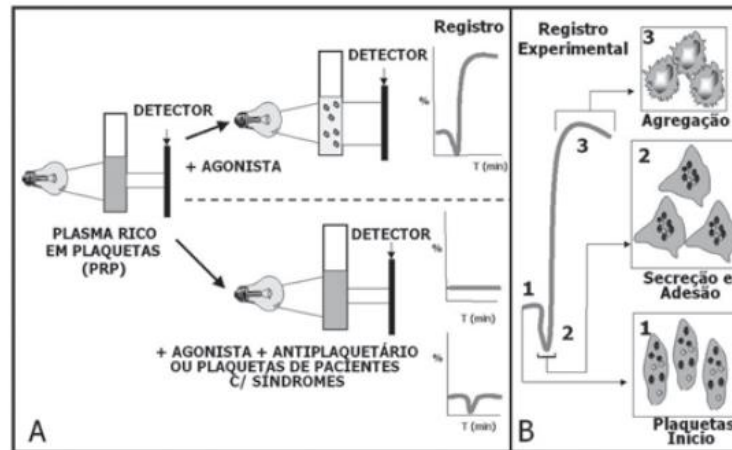


Figura 2 - Ensaios de agregação plaquetária no agregômetro (A) e seu registro experimental (B). A: plaquetas normais (acima) tratadas com antagonista plaquetário (abaixo) e testadas com agonista ADP, resultando em diferentes registros; B: registro experimental de um ensaio no agregômetro utilizando plaquetas normais, mostrando o início do experimento (1), após a adição do agonista, quando ocorre a mudança de forma da plaqueta com posterior secreção dos grânulos (2), e a agregação plaquetária (3).³⁸

3.6.3.2 Fibrinogênio

Amostras de sangue, coletadas 120 minutos após a reperfusão, foram utilizadas para determinação da dosagem do fibrinogênio, assim como do tempo de ativação, pelo método Clauss modificado, respectivamente, no equipamento Start 4/Stago (Diagnóstica Stago S.A.S - Asnières sur Seine, França). O método de Clauss mediu a taxa de conversão do fibrinogênio em fibrina em um plasma diluído, na presença de um excesso de trombina. O tempo de coagulação é inversamente proporcional à concentração de fibrinogênio (mg/dL).

3.6.3.3 Coagulograma

O tempo de protrombina (TP) e o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) foram verificados por metodologia Quick modificado e Proctor & Rapaport modificado, respectivamente, no equipamento Start 4/Stago (Diagnóstica Stago S.A.S - Asnières sur Seine, França).

3.6.3.4 Tromboelastometria rotacional

As amostras de sangue foram coletadas em tubo com anticoagulante citrato de sódio a 3,2%, 120 minutos após reperfusão e foram submetidas à avaliação dinâmica da formação do coágulo (processo global da coagulação com a participação das plaquetas, células sanguíneas e proteínas da coagulação). Foi utilizado o equipamento ROTEM[®], modelo gamma (tromboelastometria rotacional, Haemoview diagnostics, Munique, Alemanha), com os reagentes FIB-TEM[®], INTEM[®] e EXTEM[®].

No ROTEM[®], uma amostra de sangue (300µL) é colocada em uma cubeta cilíndrica plástica. Após a adição de um ativador da coagulação à amostra, o sinal do pino suspenso no sangue, que oscila 4,45° em ciclos de 10 segundos, é transmitido por um sistema de detecção óptica; a movimentação é realizada pelo pino, e não pela cuba.^{39,40}

O FIB-TEM[®] foi utilizado para avaliação da firmeza do coágulo, que foi influenciado, principalmente, pelas concentrações de fibrinogênio e de Fator XIII

presentes no sangue, e por alterações da polimerização da fibrina. A citocalasina D utilizada nesse teste inibe a reorganização do citoesqueleto plaquetário e previne a ligação irreversível do fibrinogênio com o receptor GPIIb/IIIa.⁴¹ O INTEM[®] foi utilizado para a avaliação da via intrínseca, que se baseia na ativação da coagulação pela adição de ácido elárgico (fator de contato). Nesse teste, podem ser identificadas deficiências dos fatores de coagulação, desordens de polimerização da fibrina e plaquetárias. O EXTEM[®] foi utilizado para avaliação da via extrínseca, que se baseia na ativação da coagulação pela adição de fator tecidual (cérebro de coelho). A tromboelastometria rotacional é a expressão gráfica da polimerização da fibrina, desde a formação até a lise do coágulo, e suas variáveis, que são: tempo, dinâmica, tamanho e firmeza do coágulo (figura). A tromboelastometria foi programada para encerrar após 30 minutos do CFT (tempo da formação do coágulo), por não apresentar significantes alterações após este período.⁴²

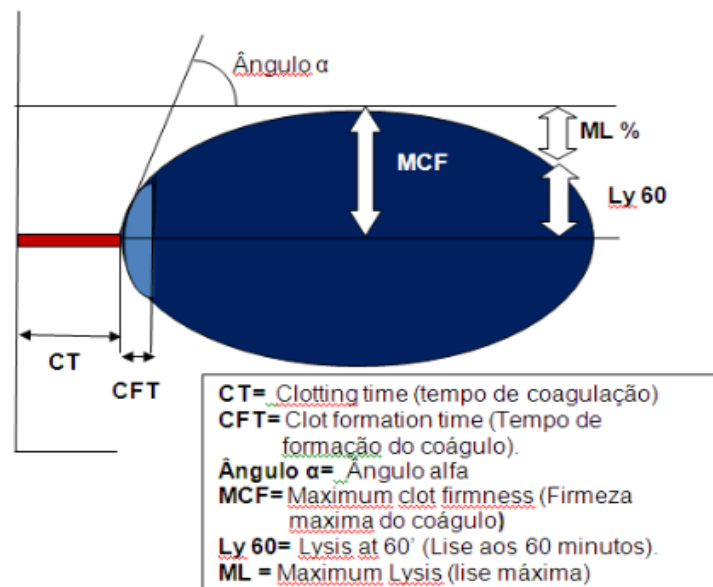


Figura 3 - Parâmetros da tromboelastometria rotacional. Pedro-Rodrigues, 2014.

3.6.4 Avaliação da resposta inflamatória sistêmica

A reação inflamatória sistêmica secundária ao fenômeno de I/R provocada pelo modelo experimental foi avaliada a partir da análise das seguintes citocinas: MIP1 alfa (CCL3), MIP2 (CXCL2), GRO/KC (CINC-1), IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF-alfa e interferon (IFN)- γ , dosadas através da utilização de kits comerciais (Milliplex[®], Millipore). Os ensaios foram conduzidos conforme as especificações do fabricante e a densidade óptica obtida em aparelho multiplex. A tecnologia xMAP da Luminex[®] possui princípio similar ao ELISA “sanduíche”, porém utiliza microesferas coloridas fluorescentes (*beads*) que se ligam, de forma covalente, aos anticorpos de captura. Os anticorpos de captura são colocados diretamente contra o biomarcador desejado.

As amostras de sangue foram coletadas em tubo seco e centrifugadas a 1000g a 4°C por 15 minutos, separando-se o soro, que foi congelado a -80°C. Para a realização do ensaio, as amostras foram descongeladas e centrifugadas a 1000g, em temperatura ambiente, por 10 minutos.

Para a reconstituição do padrão, foi feita diluição seriada para curva padrão, diluição de microesferas, amostras de soro (diluídos 1:2), anticorpos, estreptavidina-ficoeritrina, solução de lavagem, seguindo as instruções da bula do kit, de acordo com o fabricante.

3.6.5 Determinação dos níveis sorológicos de enzimas ligadas à lesão hepática

As atividades do aspartato aminotransferase (AST), da alanina aminotransferase (ALT) e da desidrogenase láctea (DHL) foram mensuradas por método automatizado cinético UV, em equipamento COBAS C111 (ROCHE, Indianápolis, USA), de acordo com as recomendações da “International Federation of Clinical Chemistry”. As amostras para exames de coagulação foram coletadas em tubo de citrato de sódio, centrifugados por 15 minutos à 4°C, 4.500 rpm, 120 minutos após a reperfusão.

3.6.6 Avaliação da perfusão, da microcirculação e do infiltrado leucocitário

Para análise do fluxo sanguíneo hepático, foi utilizada uma sonda miniatura de superfície MSP310XP (12mm de diâmetro e 5mm de espessura; AD Instruments, Colorado Springs, CO, EUA) em cinco áreas diferentes do fígado de cada animal, acoplada a um fluxômetro a laser (IN191 Doppler a laser; AD Instrumentos). O fluxo sanguíneo avaliado foi o da microcirculação, que compreendeu vasos de primeira a terceira ordem de diâmetro.

A microcirculação hepática foi avaliada em um sistema de microscopia intravital de epifluorescência (Carl Zeiss, Alemanha).

Para a realização da análise da microcirculação hepática, todo o experimento foi replicado, na sua integralidade, respeitando a randomização dos grupos. Esses

animais foram submetidos exclusivamente a essa avaliação, duas horas após a reperusão. Foi criada uma janela, através de incisão na linha alba do rato, para a exposição do fígado. Para avaliar a formação de microagregados, o isotiocianato de fluoresceína (FITC), conjugado a um anticorpo anti-CD49B (BD Biosciences, Brasil), foi infundido pela veia jugular. Foi criado um escore para determinar o grau de agregação plaquetária em microvasos com diâmetro inferior a 30 μm , em uma área de 0,2 mm^2 (0 - sem agregação; 1 - agregação leve, com fluxo normal; 2 - agregações leves, com fluxo comprometido; 3 - graves agregações, com fluxo prejudicado). O número de leucócitos, no endotélio dos vasos no tecido hepático, foi determinado após a infusão de rodamina 6G na veia jugular na mesma área. Todos os vídeos foram gravados com lente objetiva (20x). A rolagem e o número dos leucócitos no tecido hepático foram determinados, após infusão de rodamina 6G, no mesmo sistema de microscopia intravital de epifluorescência (Carl Zeiss, Alemanha).

3.6.7 Análise histológica

Os fragmentos do lobo esquerdo do fígado foram fixados em solução de formol a 10% e emblocados em parafina, conforme procedimento de rotina. Cortes (4 μm) foram montados sobre lâminas de vidro e corados com hematoxilina e eosina. As lâminas coradas foram submetidas à análise semiquantitativa das principais alterações morfológicas hepáticas, graduadas como 0 (ausente), 1 (discreta), 2 (moderada) e 3 (intensa). Os parâmetros quantificados foram os seguintes: congestão sinusoidal (aumento do volume sanguíneo nos sinusóides), balonização hepatocitária

(caracterizada pelo aspecto tumefeito dos hepatócitos, resultado de alterações da membrana celular e do citoesqueleto citoplasmático, comumente provocadas por agressão inflamatória não específica; as células se apresentam aumentadas de volume, com contornos arredondados, citoplasma claro e levemente granuloso), infiltrado inflamatório e hemorragia.

Esses parâmetros foram selecionados considerando-se a característica aguda da lesão e considerando o protocolo do estudo, buscando, dessa forma, contemplar os processos morfológicos mais prevalentes nessa fase da lesão tecidual.

3.6.8 Avaliação da resposta vascular

3.6.8.1 Imuno-histoquímica para pesquisa de eNOS, endotelina-1 e moléculas de adesão (ICAM-1, VCAM-1 e P-selectina)

Após os 120 minutos de reperfusão, o lobo esquerdo do fígado foi removido, imerso em hexano sob nitrogênio líquido e armazenado a -80°C . Cortes seriados de $8\mu\text{m}$ foram colocados sobre lâminas de vidro previamente revestidas com organossilane (Sigma ChemicalCo, St. Louis, Mo, USA) e as amostras fixadas em acetona gelada, por 10 minutos. As lâminas foram lavadas com solução tampão TRIS salina-tween (TBST), posteriormente permeabilizadas com TBST e triton X-100, seguido de bloqueio de sítios inespecíficos com tampão de bloqueio (Superblock[®], ThermoScientific, Illinois, EUA) e bloqueio da peroxidase endógena (solução de H_2O_2 2%). Para a imunodeteção das moléculas de adesão, ICAM-1, VCAM-1 e P-selectina, foram utilizados anticorpos

primários anti-ICAM-1, anti-VCAM-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 soro albumina bovina (BSA) 1:100 e 1:40, respectivamente. Para a imunodeteção 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 1h a 37°C. As lâminas foram lavadas com TBST e incubadas com solução 1:200 de anticorpo secundário anti-camundongo ou anti-coelho IgGs, associados à HRP (Millipore, Billerica, MA, EUA), por 2 horas a 37°C. Após nova lavagem com TBST, as lâminas foram incubadas com solução de substrato 3 amino-9-etilcarbazol (AEC), por 5 a 10 minutos, e coradas com hematoxilina. Para o controle negativo, as amostras foram incubadas com PBS (*Phosphate buffered saline*). A análise foi realizada através de sistema de aquisição de imagens com câmera digital DS-Ri1 (Nikon, Tokyo, Japan), acoplada a microscópio de fluorescência (Nikon) e analisadas com auxílio do software NIS-Elements-BR (Nikon).

3.6.8.2 Real time PCR para expressão gênica de eNOS, endotelina-1, VCAM e ICAM-1

Quanto à expressão, os genes foram quantificados por intermédio de PCR em tempo real, em aparelho Step One Plus[®] (Applied Biosystem, EUA). A extração de RNA do tecido hepático 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) em tempo real, o mesmo

ocorrendo com a reação de PCR. As condições de ciclagem foram: 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, seguidos de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C.

3.6.9 Avaliação da resposta inflamatória no fígado

Realizada a partir da análise das seguintes citocinas inflamatórias dosadas no homogenato hepático: MIP1 alfa (CCL3), MIP2 (CXCL2), GRO/KC (CINC-1), IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF-alfa e interferon (IFN)- γ foi realizada com a utilização de kits comerciais (Milliplex[®], Millipore). Os ensaios foram conduzidos conforme as especificações do fabricante, e a densidade óptica obtida em aparelho multiplex. A tecnologia xMAP da Luminex[®] possui princípio similar ao ELISA “sanduíche”, porém utiliza microesferas coloridas fluorescentes (*beads*) que se ligam, de forma covalente, aos anticorpos de captura. Os anticorpos de captura são colocados diretamente contra o biomarcador desejado.

As amostras do homogenato de fígado passaram por dosagem de proteína total pelo método colorimétrico automatizado, no equipamento COBAS C111 da Roche (Indianápolis, USA), para posterior normalização dos resultados, em que o valor da concentração de citocinas (expresso em pg/ml) foi dividido pelo valor de proteínas totais (expressos em mg/ml), obtendo-se, assim, um valor em pg/mg.

Resumidamente, foram pipetadas microesferas coloridas revestidas com anticorpos de captura contra as citocinas de interesse, em uma placa com 96 poços. A seguir, foram pipetadas as amostras dos pacientes, controles e curva padrão e branco, e incubadas em agitador de placas (IKA MTS 2/4 digital). Após lavagens, o anticorpo de

detecção foi adicionado à placa, que passou por novo período de incubação. As lavagens foram realizadas em uma lavadora magnética (Bio-plex PRO II Wash Station, USA) e as microesferas permaneceram retidas na placa pela ação de um ímã. Foi adicionada, posteriormente, a estreptavidina-ficoeritrina, que emitiu sinal fluorescente quando excitada pelos LEDs do equipamento de leitura, e incubada por um breve período. Após a lavagem para remoção dos reagentes não aderidos, foi adicionada aos poços uma solução tampão, para serem analisadas no equipamento leitor de microesferas Magpix Milliplex (Luminex Corp, Austin, TX, USA), onde foram utilizados dois LEDs: um verde, com comprimento de ondas de 525nm, para identificação das citocinas, e um LED vermelho (635nm), para identificação da microesfera. A seguir, uma câmera CCD capturava essas imagens e enviava para o software Xponent 4.2 (Luminex Corp, Austin, TX, USA).

A análise dos dados foi realizada pelo software Milliplex Analyst 5.1 (EMD Millipore, USA) e os níveis das citocinas foram expressos em pg/ml, de acordo com a curva padrão obtida na mesma placa.

3.6.10 Avaliação da apoptose hepatocelular

Foram realizados cortes em série do fígado (8 μ m), posteriormente fixados em acetona fria durante 10 minutos, permeabilizados com solução salina tamponada com TRIS Tween-20 (TBST) e Triton X-100, procedimento seguido por bloqueio de sítios inespecíficos com tampão SuperBlock (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA). Os cortes foram incubados durante 1h, a 37°C, com anticorpos primários: anti-Caspase3

(1:200; Abcam) e anti-BCI2 (1:100; Abcam). Os anticorpos primários foram diluídos em solução TBST contendo 1% de albumina de soro bovino (BSA). A peroxidase endógena foi bloqueada (2% de solução de peróxido de hidrogênio) durante 15 minutos, à temperatura ambiente. Os cortes foram incubados com anticorpos secundários anti-coelho, que são Gs de imunoglobulina ligados a peroxidase de Horseradich (1:200; Millipore, Billerica, MA, EUA) durante 2h, a 37°C. Após a lavagem com TBST, as lâminas foram incubadas com solução de substrato de 3-amino-9-etilcarbazole (AEC), durante 5 a 10 minutos, e contra coradas com hematoxilina de Mayer. As amostras de controle negativo foram incubadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS). As imagens foram obtidas com uma câmera digital (DSRi1, Nikon, Tóquio, Japão) conectada a um microscópio (Nikon). As amostras foram analisadas usando um software de imagem-computador (software NIS-Elements BR, Nikon). Os resultados são apresentados como a área corada/total (corante AEC).

4 Análise Estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), após o teste de Tukey para múltiplas comparações, ou o teste de Kruskal-Wallis, após o teste de Dunn para múltiplas comparações (não paramétricos). As análises estatísticas foram conduzidas utilizando o programa GraphPad Prism Software v.8.3.1. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

5 Resultados

5.1 Pressão arterial e concentração sérica de estradiol

A apresentação da variação da curva pressórica secundária à oclusão da aorta, ao nível da artéria subclávia esquerda, para os grupos Sham, IR e E2, pode ser observada a partir da análise temporal das curvas de pressão arterial proximal e distal, respectivamente, medidas nas artérias carótida esquerda e caudal dos ratos (figuras 4 e 5).

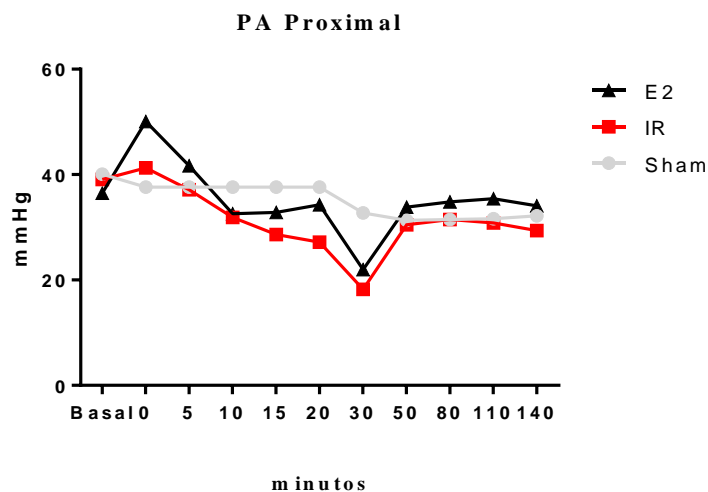


Figura 4 - Curvas mostrando a evolução da pressão arterial proximal ao longo do experimento (artéria carótida esquerda). Sham (rato com manipulação cirúrgica, sem lesão de isquemia e reperfusão); IR (rato submetido à lesão de isquemia e reperfusão); E2 (rato tratado com 17β -estradiol, 30 minutos antes da indução de isquemia e reperfusão). Os valores representam a média \pm EPM.

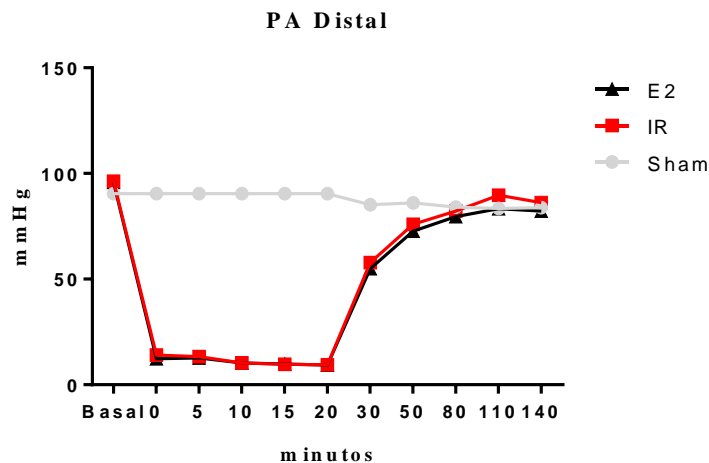


Figura 5 - Curvas mostrando a evolução da pressão arterial distal ao longo do experimento (artéria caudal). Sham (rato com manipulação cirúrgica, sem lesão de isquemia e reperfusão); IR (rato submetido à lesão de isquemia e reperfusão); E2 (rato tratado com 17β -estradiol, 30 minutos antes da indução de isquemia e reperfusão). Os valores representam a média \pm EPM.

As concentrações séricas médias do 17β -estradiol, aferidas após o término do procedimento, foram de $68,8 \pm 24,96$ pg/ml para o Sham; $112,4 \pm 42,1$ pg/ml para o IR e $2257 \pm 229,8$ pg/ml ($p > 0,0001$) para o E2 (Figura 6).

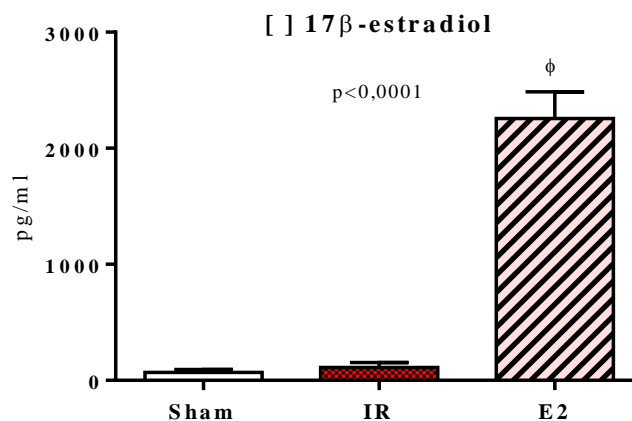


Figura 6 - Concentração plasmática média do estradiol. Sham (rato com manipulação cirúrgica, sem lesão de isquemia e reperfusão); IR (rato submetido à lesão de isquemia e reperfusão); E2 (rato tratado com 17β -estradiol, 30 minutos antes da indução de isquemia e reperfusão). Os valores representam a média \pm EPM. (ϕ) E2 versus IR ($p < 0,0001$).

5.2 Avaliação do hemograma

Na Tabela 1, observamos as contagens de leucócitos antes e após a indução de I/R. Os resultados indicaram que a manipulação cirúrgica (Sham) ou a I/R foram capazes de induzir uma mobilização sistêmica de leucócitos. Na figura 7, é possível observar o detalhamento da leucocitose, em que nos grupos Sham, IR e E2, no pós-operatório, houve aumento dos números de monócitos ($p=0,0009$, $p=0,0080$ e $p=0,0163$, respectivamente) e de granulócitos ($p=0,0006$, $p=0,0006$ e $p=0,0066$ respectivamente). Porém, o tratamento com E2 não influenciou esse influxo celular.

Tabela 1 – Glóbulos brancos totais

	Sham	IR	E2	<i>p</i>
Glóbulos brancos totais				
<i>Inicial</i>	14066±1421	11760±1004	12936±1214	<0.0001
<i>Final</i>	31266±4641 ^α	25479±3401 ^α	26020±3019 ^α	

Grupos: Sham (rato com manipulação cirúrgica, sem lesão de isquemia e reperfusão); IR (rato submetido à lesão de isquemia e reperfusão); E2 (rato tratado com 17β-estradiol, 30 minutos antes da indução de isquemia e reperfusão). Os valores representam a média ± EPM. ^α Final *versus* inicial IR.

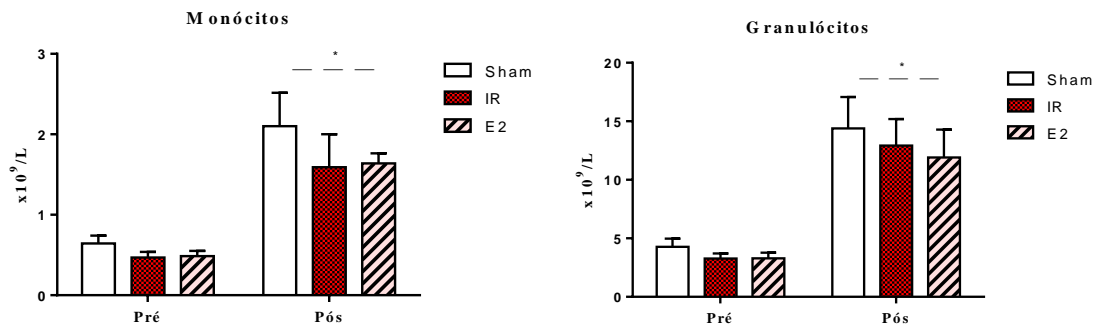


Figura 7 – Leucograma no pré e pós-operatório. (*) Pós *versus* pré-operatório ($p < 0,05$). Sham (rato com manipulação cirúrgica, sem lesão de isquemia e reperfusão); IR (rato submetido à lesão de isquemia e reperfusão); E2 (rato tratado com 17β -estradiol, 30 minutos antes da indução de isquemia e reperfusão). Os valores representam a média \pm EPM.

Não houve diferença, entre o pré e o pós-operatório, em relação ao número de hemáceas, hemoglobina e hematócrito. Entretanto, no pós-operatório, em IR *versus* Sham e IR *versus* E2 houve diferença no número de hemáceas ($p=0,001$ e $p=0,011$, respectivamente), no número de hemoglobina ($p=0,002$ e $p=0,015$, respectivamente) e no de hematócrito ($p=0,004$ e $p=0,032$, respectivamente) (figura 8).

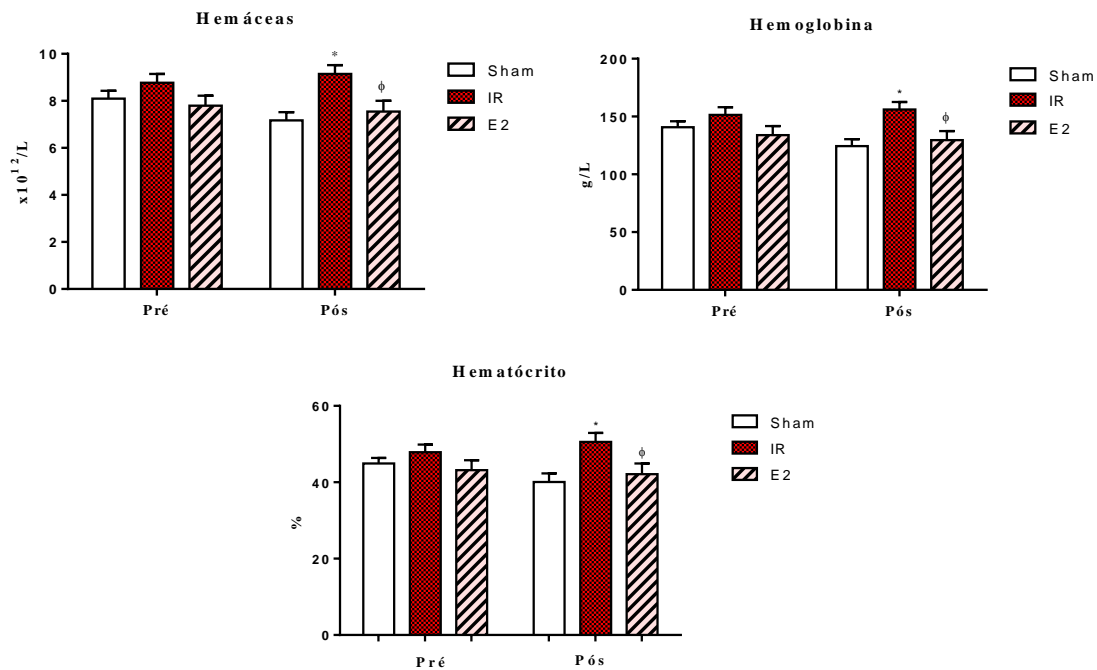


Figura 8 - Número de hemácias, hemoglobina e hematócrito no pré e pós-operatório. (*) IR *versus* Sham ($p < 0,05$) e (ϕ) E2 *versus* IR ($p < 0,05$). Sham (rato com manipulação cirúrgica, sem lesão de isquemia e reperfusão); IR (rato submetido à lesão de isquemia e reperfusão); E2 (rato tratado com 17β -estradiol, 30 minutos antes da indução de isquemia e reperfusão). Os valores representam a média \pm EPM.

5.3 Avaliação da coagulação

Em relação à contagem de plaquetas, não houve diferença entre o número de plaquetas no pré e pós-operatório, e nem, na comparação entre os grupos (figura 9). Porém, no teste de agregação plaquetária, houve diferença entre o IR e Sham ($p = 0,035$) e entre E2 e IR ($p < 0,021$), na variável agregação máxima (%) (tabela 2).

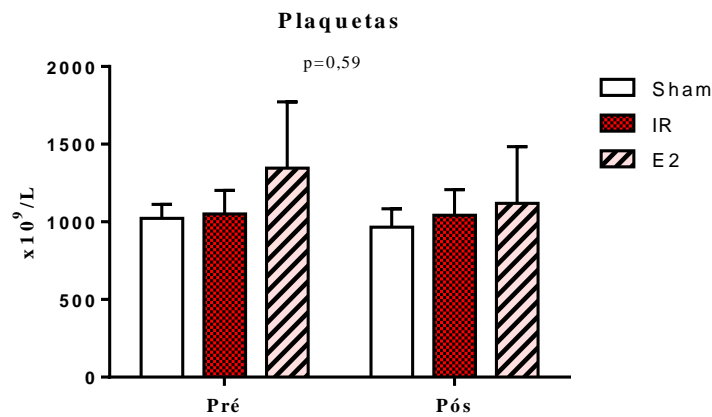


Figura 9 - Contagem de plaquetas no pré e no pós-operatório. Sham (rato com manipulação cirúrgica, sem lesão de isquemia e reperfusão); IR (rato submetido à lesão de isquemia e reperfusão); E2 (rato tratado com 17 β -estradiol, 30 minutos antes da indução de isquemia e reperfusão). Os valores representam a média \pm EPM.

Tabela 2 – Variáveis do teste de agregação plaquetária

	Sham	IR	E2	<i>p</i>
Agregação Máx. (%)	45,14 \pm 7,99	79,06 \pm 10,15*	40,77 \pm 10,31 ^ϕ	0,021
Tmáx. Agregação (s)	147,10 \pm 25,06	95,00 \pm 27,94	152,30 \pm 37,11	0,360
Slope	77,18 \pm 14,85	135,50 \pm 42,22	89,99 \pm 21,62	0,624
Desagregação (%)	27,49 \pm 11,24	31,27 \pm 13,90	36,86 \pm 16,65	0,891
Tdesagregação (s)	152,90 \pm 25,06	119,60 \pm 33,84	133,40 \pm 29,58	0,721

Grupos: Sham (rato com manipulação cirúrgica, sem lesão de isquemia e reperfusão); IR (rato submetido à lesão de isquemia e reperfusão); E2 (rato tratado com 17 β -estradiol, 30 minutos antes da indução de isquemia e reperfusão). Os valores representam a média \pm EPM. (*) IR *versus* Sham ($p < 0,05$) e (^ϕ) E2 *versus* IR ($p < 0,05$). Agregação Máx.: agregação máxima; Tmáx. Agregação: tempo máximo para a agregação; Tdesagregação: tempo para a desagregação.

Houve alteração da coagulação em função da variação do fibrinogênio, tanto em relação ao tempo de ativação como na sua concentração plasmática. Observa-se diferença entre IR e E2 ($p=0,028$ e $p=0,023$, respectivamente) (tabela 3).

Na tromboelastometria, alterações específicas foram observadas no EXTEM (tabela 4), no tempo de coagulação (CT), diferença entre IR e E2 ($p=0,016$). Não houve diferença entre os três grupos, quando analisada a formação do coágulo até 30 minutos do exame (figura 10).

Tabela 3 – Perfil de coagulação

	Sham	IR	E2	<i>p</i>
TP				
INR	1,73 ± 0,28	2,22 ± 0,19	2,22 ± 0,12	0,056
%	54,70 ± 8,21	40,33 ± 2,54	39,61 ± 2,48	0,056
Segundos	17,89 ± 2,31	21,94 ± 1,36	22,06 ± 0,95	0,056
TTPA				
Razão	1,98 ± 0,31	1,93 ± 0,23	1,86 ± 0,25	0,627
Segundos	65,56 ± 10,74	72,83 ± 11,62	60,83 ± 8,17	0,713
Fibrinogênio				
Segundos	31,74 ± 1,56	35,88 ± 2,29	28,69 ± 1,67 ^ϕ	0,046
(mg/dl)	154,70 ± 8,07	138,50 ± 7,88	171,80 ± 9,82 ^ϕ	0,040

Grupos: Sham (rato com manipulação cirúrgica, sem lesão de isquemia e reperfusão); IR (rato submetido à lesão de isquemia e reperfusão); E2 (rato tratado com 17β-estradiol, 30 minutos antes da indução de isquemia e reperfusão). Os valores representam a média ± EPM. (^ϕ) E2 *versus* IR ($p<0,05$). (INR) Razão de normatização internacional; (TP) Tempo de protrombina; (TTPA) Tempo de tromboplastina parcial ativada.

Tabela 4 – Variáveis do EXTEM

	Sham	IR	E2	<i>p</i>
CT (s)	48,88 ± 2,03	56,56 ± 3,90	41,57 ± 3,94 ^ϕ	0,020
CFT (s)	43,00 ± 3,92	50,56 ± 12,93	44,57 ± 6,06	0,823
alfa (°)	81,25 ± 0,84	80,00 ± 2,39	81,71 ± 0,75	0,755
CFR (°)	82,63 ± 0,71	82,11 ± 1,17	82,43 ± 0,78	0,924
MCF (mm)	71,38 ± 2,19	73,56 ± 2,94	73,86 ± 2,72	0,780
MCF-t (s)	1598 ± 123,3	1766 ± 237,6	1948 ± 308,9	0,591
ML (%)	9,38 ± 2,33	6,44 ± 2,56	4,43 ± 1,67	0,352
ACF (mm)	66,00 ± 2,03	69,83 ± 3,16	71,90 ± 2,72	0,323
MCE	261,0 ± 24,64	330,7 ± 65,41	248,8 ± 14,43	0,424

Grupos: Sham (rato com manipulação cirúrgica, sem lesão de isquemia e reperfusão); IR (rato submetido à lesão de isquemia e reperfusão); E2 (rato tratado com 17β-estradiol, 30 minutos antes da indução de isquemia e reperfusão). Os valores representam a média ± EPM. (ϕ) E2 versus IR ($p < 0,05$). CT: *coagulation time* (tempo de coagulação); CFT: *clot formation time* (tempo de formação do coágulo); CFR: *clot formation rate* (taxa de formação do coágulo); MCF: *maximum clot firmness* (máxima firmeza do coágulo); MCF-t: *time to maximum clot firmness* (tempo para a máxima firmeza do coágulo); ML: *maximum lysis* (lise máxima); ACF: *actual clot firmness* (real firmeza do coágulo); MCE: *maximum clot elasticity* (máxima elasticidade do coágulo). (s) segundos; (°) grau; (mm) milímetros; (%) porcentagem.

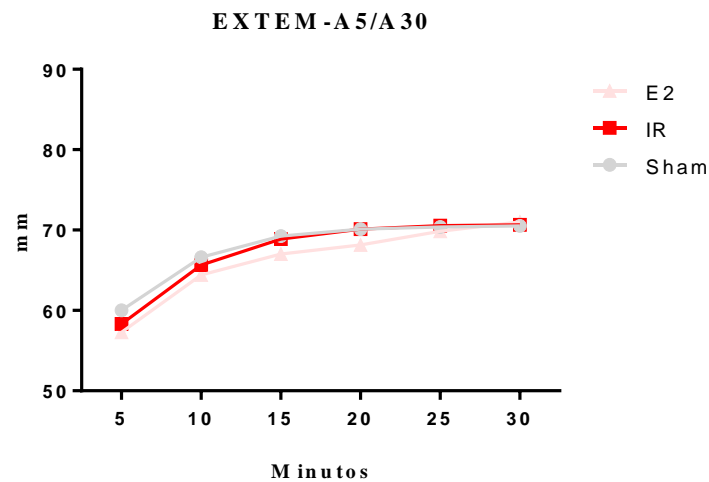


Figura 10 - Formação do coágulo até 30 minutos (EXTEM). Sham (rato com manipulação cirúrgica, sem lesão de isquemia e reperfusão); IR (rato submetido à lesão de isquemia e reperfusão); E2 (rato tratado com 17β -estradiol, 30 minutos antes da indução de isquemia e reperfusão). Os valores representam a média \pm EPM.

No INTEM (tabela 5), foi observada diferença entre IR e Sham, nas variáveis MCF ($p=0,015$) e ML ($p=0,022$); entretanto, na variável ACF, houve diferença tanto de IR para o Sham, como de IR para E2 ($p=0,009$ e $p=0,046$, respectivamente). Nos 5 e 30 minutos da formação do coágulo, houve diferença entre IR e Sham ($p=0,033$ e $p=0,049$, respectivamente) (figura 11).

Tabela 5 – Variáveis do INTEM

	Sham	IR	E2	<i>p</i>
CT (s)	125,4 ± 16,31	136,1 ± 13,18	136,1 ± 31,78	0,922
CFT (s)	38,63 ± 3,99	34,25 ± 2,58	43,86 ± 5,64	0,288
alfa (°)	79,38 ± 2,87	83,25 ± 0,53	81,57 ± 0,95	0,329
CFR (°)	81,25 ± 2,16	84,13 ± 0,35	83,00 ± 0,76	0,338
MCF (mm)	70,75 ± 2,27	81,13 ± 2,84*	73,86 ± 2,45	0,024
MCF-t (s)	1477 ± 95,30	1658 ± 180,10	1456 ± 90,12	0,500
ML (%)	8,50 ± 1,82	2,38 ± 1,13*	7,14 ± 1,81	0,031
ACF (mm)	65,75 ± 3,02	80,38 ± 3,40*	68,86 ± 3,57 ^ϕ	0,012
MCE	253,9 ± 21,03	285,0 ± 14,33	310,4 ± 49,88	0,498

Grupos: Sham (rato com manipulação cirúrgica, sem lesão de isquemia e reperfusão); IR (rato submetido à lesão de isquemia e reperfusão); E2 (rato tratado com 17β-estradiol, 30 minutos antes da indução de isquemia e reperfusão). Os valores representam a média ± EPM. (^ϕ) E2 *versus* IR (*p*<0,05) e (*) IR *versus* Sham (*p*<0,05). CT: *coagulation time* (tempo de coagulação); CFT: *clot formation time* (tempo de formação do coágulo); CFR: *clot formation rate* (taxa de formação do coágulo); MCF: *maximum clot firmness* (máxima firmeza do coágulo); MCF-t: *time to maximum clot firmness* (tempo para a máxima firmeza do coágulo); ML: *maximum lysis* (lise máxima); ACF: *actual clot firmness* (real firmeza do coágulo); MCE: *maximum clot elasticity* (máxima elasticidade do coágulo). (s) segundos; (°) grau; (mm) milímetros; (%) porcentagem.

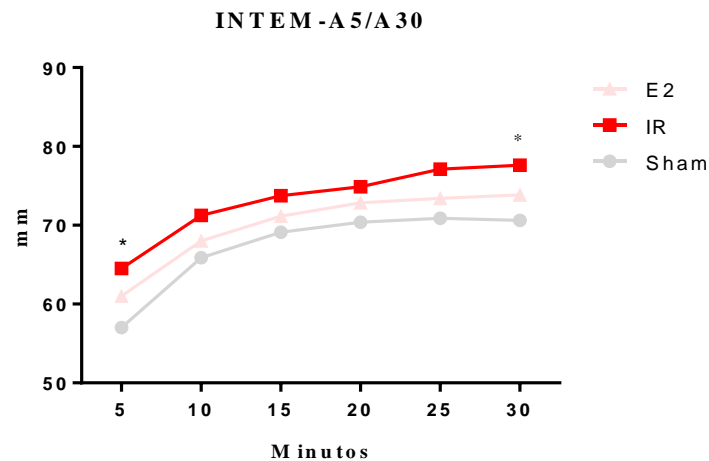


Figura 11 - Formação do coágulo até 30 minutos (INTEM). Sham (rato com manipulação cirúrgica, sem lesão de isquemia e reperfusão); IR (rato submetido à lesão de isquemia e reperfusão); E2 (rato tratado com 17β -estradiol, 30 minutos antes da indução de isquemia e reperfusão). Os valores representam a média \pm EPM. (*) IR *versus* Sham ($p < 0,05$).

No FIBTEM (tabela 6), foi observada diferença entre IR e Sham e entre IR e E2 na variável MCF ($p=0,049$). Nos 5 minutos da formação do coágulo, houve diferença significativa entre IR e E2 ($p=0,035$) (figura 12).

Tabela 6 – Variáveis do FIBTEM

	Sham	IR	E2	<i>p</i>
CT (s)	44,38 ± 2,46	49,44 ± 2,33	41,86 ± 3,56	0,158
CFT (s)	-	-	-	-
alfa (°)	75,75 ± 1,31	77,00 ± 0,85	77,43 ± 1,21	0,564
CFR (°)	76,88 ± 1,04	78,63 ± 0,73	78,14 ± 1,18	0,435
MCF (mm)	13,63 ± 0,86	15,11 ± 1,12	18,00 ± 1,45	0,049
MCF-t (s)	183,60 ± 48,84	665,60 ± 315,80	547,7 ± 247,40	0,350
ML (%)	5,25 ± 1,29	6,56 ± 2,21	6,14 ± 2,52	0,896
ACF (mm)	18,13 ± 2,57	22,33 ± 2,49	19,57 ± 2,38	0,473
MCE	15,63 ± 1,21	18,11 ± 1,61	22,00 ± 2,29	0,057

Grupos: Sham (rato com manipulação cirúrgica, sem lesão de isquemia e reperfusão); IR (rato submetido à lesão de isquemia e reperfusão); E2 (rato tratado com 17β-estradiol, 30 minutos antes da indução de isquemia e reperfusão). Os valores representam a média ± EPM. CT: *coagulation time* (tempo de coagulação); CFT: *clot formation time* (tempo de formação do coágulo); CFR: *clot formation rate* (taxa de formação do coágulo); MCF: *maximum clot firmness* (máxima firmeza do coágulo); MCF-t: *time to maximum clot firmness* (tempo para a máxima firmeza do coágulo); ML: *maximum lysis* (lise máxima); ACF: *actual clot firmness* (real firmeza do coágulo); MCE: *maximum clot elasticity* (máxima elasticidade do coágulo). (s) segundos; (°) grau; (mm) milímetros; (%) porcentagem.

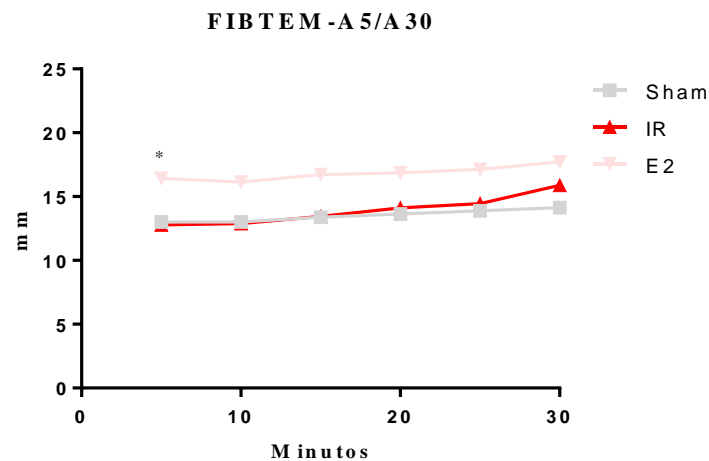


Figura 12 – Formação do coágulo até 30 minutos (FIBTEM). Sham (rato com manipulação cirúrgica, sem lesão de isquemia e reperfusão); IR (rato submetido à lesão de isquemia e reperfusão); E2 (rato tratado com 17β -estradiol, 30 minutos antes da indução de isquemia e reperfusão). Os valores representam a média \pm EPM. (*) E2 *versus* IR ($p < 0,05$).

5.4 Avaliação da resposta inflamatória sistêmica

Na análise dos oito mediadores inflamatórios no soro, houve aumento da concentração sérica das IL-1, IL-6 e IL-10 no grupo IR, sendo observada a diminuição destas concentrações no grupo E2. (figuras 13 e 14)

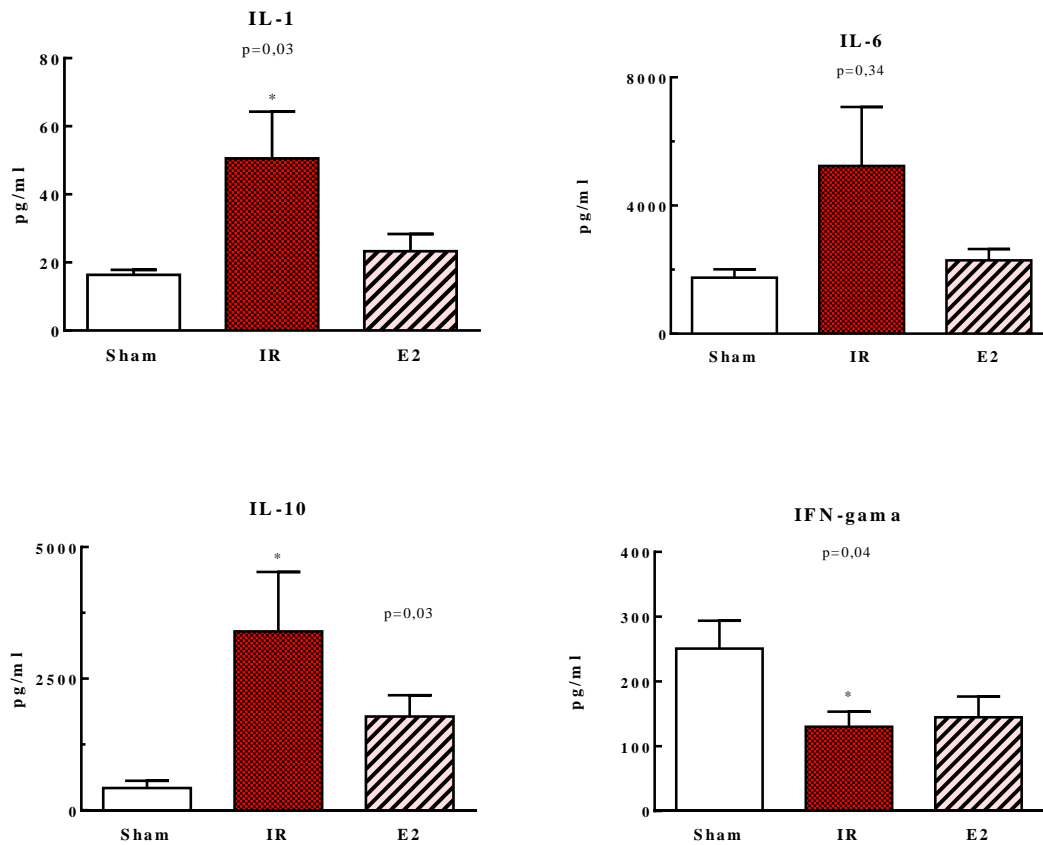


Figura 13 – Dosagem de interleucinas IL-1, IL-6, IL10 e IFN-gama no soro. Sham (rato com manipulação cirúrgica, sem lesão de isquemia e reperfusão); IR (rato submetido à lesão de isquemia e reperfusão); E2 (rato tratado com 17β -estradiol, 30 minutos antes da indução de isquemia e reperfusão). Os valores representam a média \pm EPM. (*) IR *versus* Sham ($p < 0,05$).

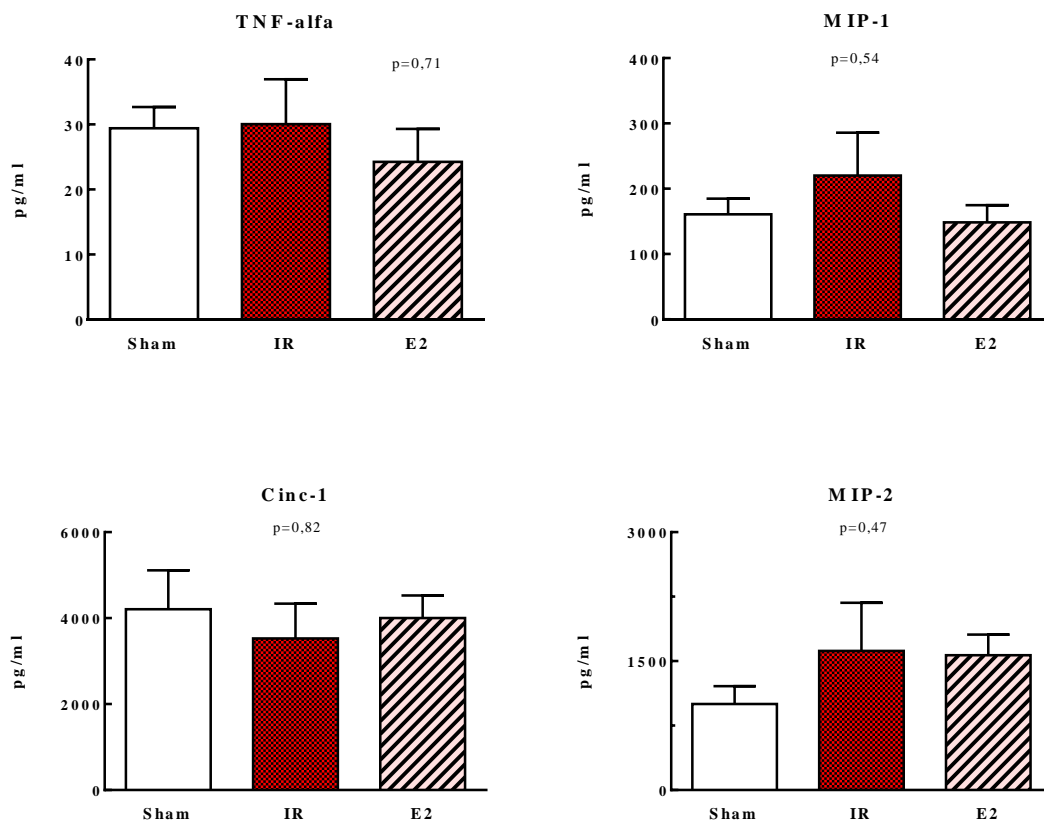


Figura 14 – Dosagem de TNF-alfa, Cinc-1, MIP-1 e MIP-2 no soro. Sham (rato com manipulação cirúrgica, sem lesão de isquemia e reperfusão); IR (rato submetido à lesão de isquemia e reperfusão); E2 (rato tratado com 17β -estradiol, 30 minutos antes da indução de isquemia e reperfusão). Os valores representam a média \pm EPM. (*) IR *versus* Sham ($p < 0,05$).

5.5 Enzimas hepáticas

Houve aumento significativo nas enzimas hepáticas AST, ALT e DHL em resposta à isquemia, quando comparados os grupos IR e E2 ao Sham. Entre os grupos IR e E2 não houve diferença de dosagens. AST: diferença entre IR e Sham ($p=0,001$), entre E2 e Sham ($p=0,043$) e entre IR e E2 ($p=0,404$); ALT: diferença entre IR e Sham ($p=0,0005$), entre E2 e Sham ($p=0,039$) e entre IR e E2 ($p=0,255$); DHL: diferença entre

IR e Sham ($p=0,0004$), entre E2 e Sham ($p=0,069$) e entre IR e E2 ($p=0,148$) (figura 15).

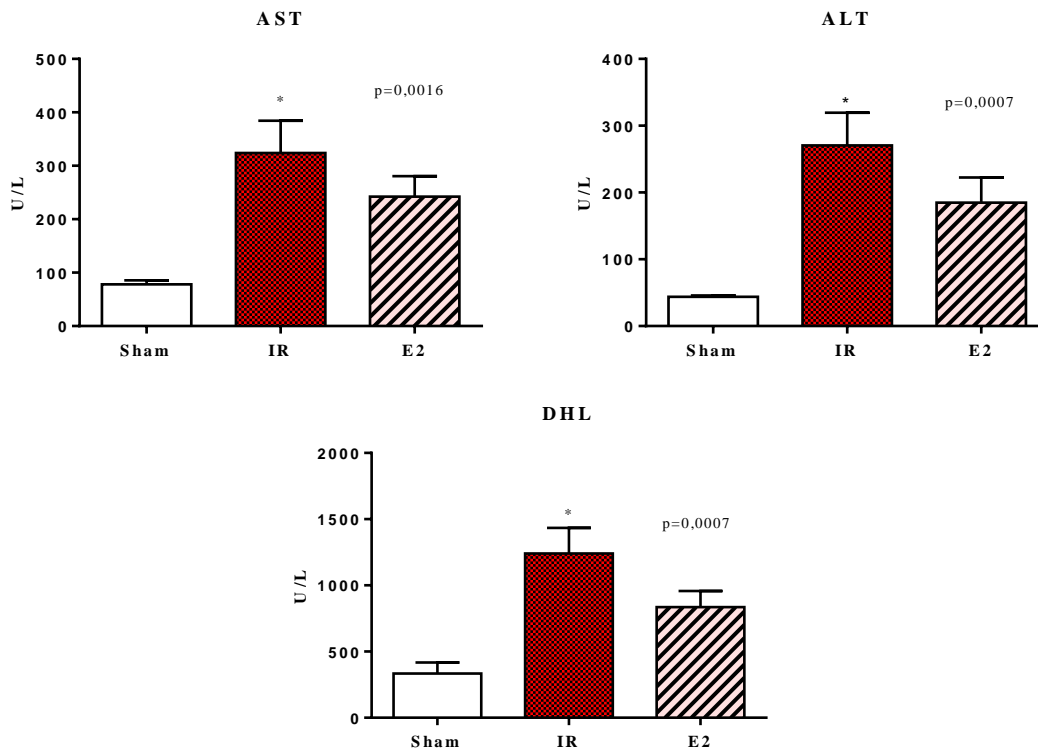


Figura 15 – Concentração sérica das enzimas hepáticas (AST, ALT e DHL). Sham (rato com manipulação cirúrgica, sem lesão de isquemia e reperfusão); IR (rato submetido à lesão de isquemia e reperfusão); E2 (rato tratado com 17β -estradiol, 30 minutos antes da indução de isquemia e reperfusão). Os valores representam a média \pm EPM. (*) IR *versus* Sham ($p < 0,001$).

5.6 Avaliação histológica do tecido hepático

Foram avaliados: congestão vascular, balonização, infiltrado leucocitário e hemorragia. Em relação à congestão, houve diferença entre o grupo IR e o grupo Sham, entretanto, o grupo com administração do estradiol não mostrou diferença em relação ao Sham. Situação similar ocorreu na balonização, em que houve diferença entre os grupos

IR e Sham, e não entre os grupos E2 e Sham. Não houve diferença entre os grupos quando analisadas inflamação e hemorragia (figura 16). Não houve diferença entre E2 e IR em nenhuma das alterações histológicas avaliadas. As particularidades histológicas dos grupos podem ser observadas na figura 17.

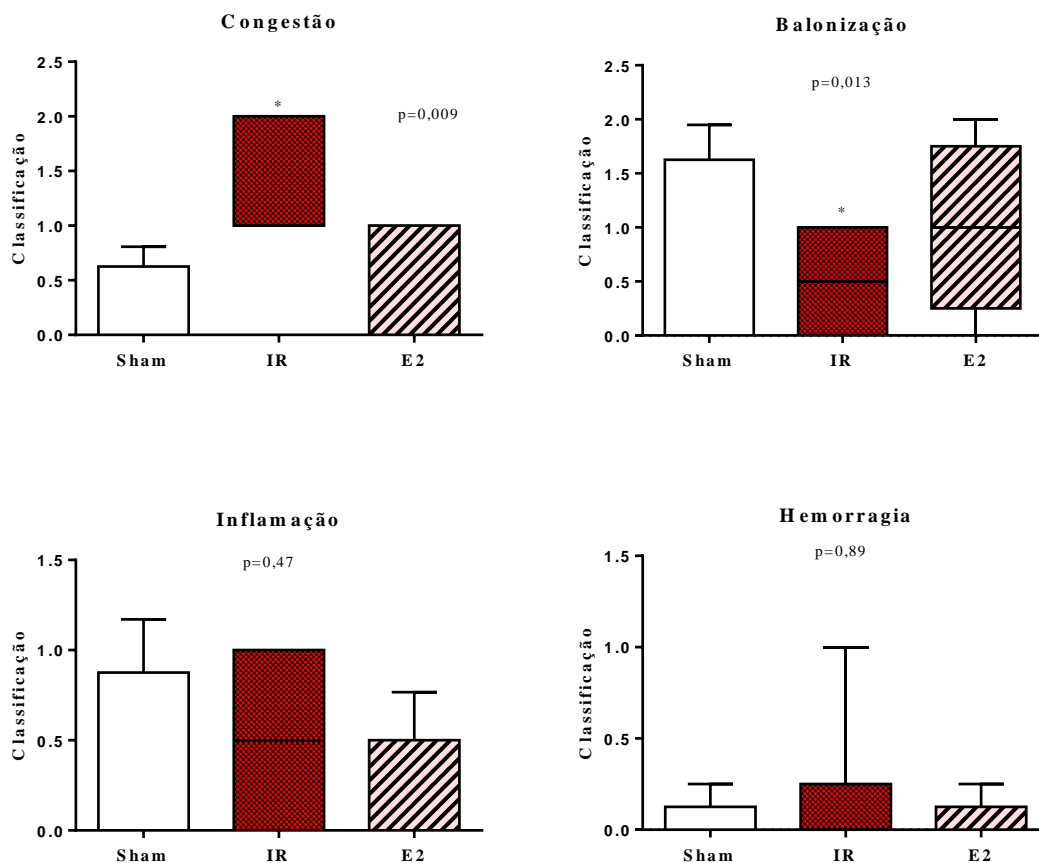


Figura 16 – Avaliação histológica do tecido hepático (congestão, balonização, inflamação e hemorragia). Sham (rato com manipulação cirúrgica, sem lesão de isquemia e reperfusão); IR (rato submetido à lesão de isquemia e reperfusão); E2 (rato tratado com 17β -estradiol, 30 minutos antes da indução de isquemia e reperfusão). Os valores representam a média \pm EPM. (*) IR *versus* Sham ($p < 0,05$).

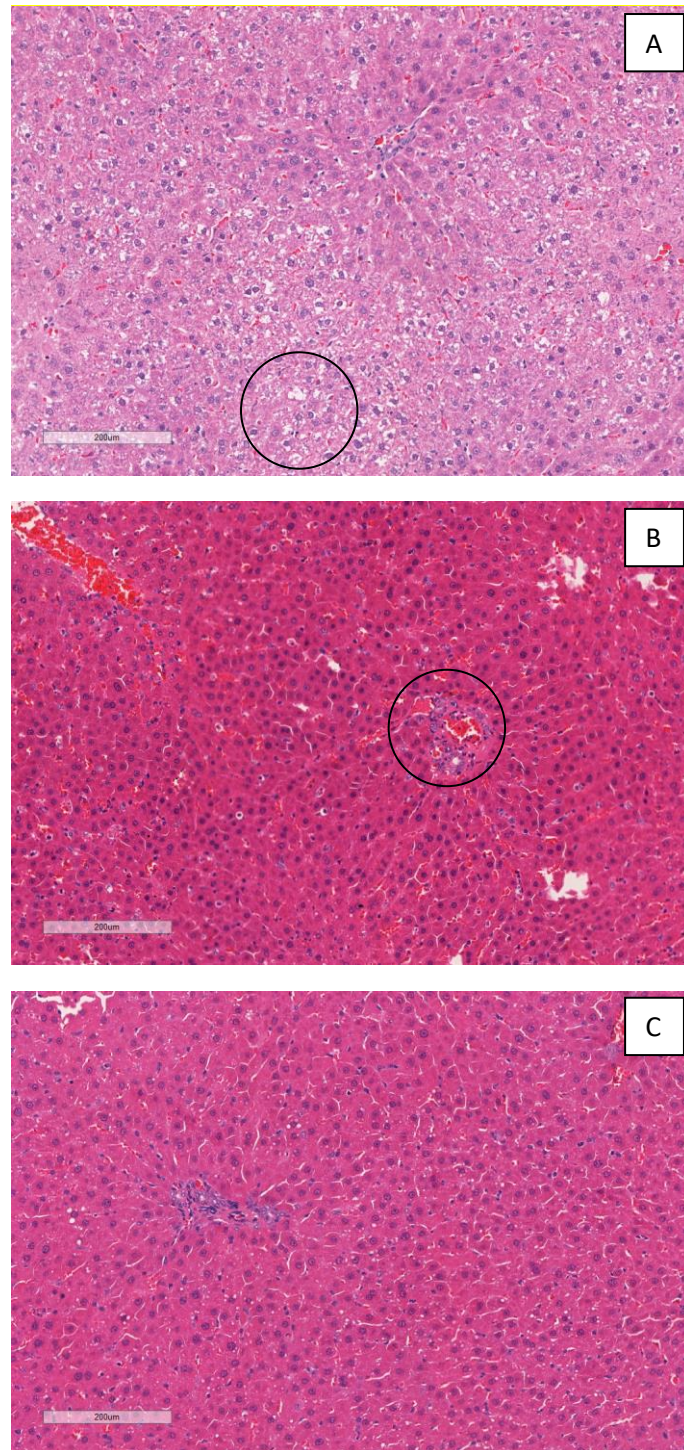


Figura 17 – Amostras de análises histológicas. Sham (rato com manipulação cirúrgica, sem lesão de isquemia e reperfusão); IR (rato submetido à lesão de isquemia e reperfusão); E2 (rato tratado com 17β -estradiol 30 minutos antes da indução de isquemia e reperfusão). Os cortes ($4\mu\text{m}$) de fragmentos do lobo esquerdo do fígado foram corados com hematoxilina e eosina. (A) Sham, hepatócitos com importante balonização; (B) IR, congestão intensa e inflamação periportal discreta; (C) E2, discreta congestão centrolobular e esteatose, sem balonização.

5.7 Avaliação da perfusão e microcirculação hepática e infiltrado leucocitário pela microscopia de fluorescência intravital

Na avaliação da perfusão hepática, houve diferença entre IR e Sham ($p=0,040$) não sendo o mesmo observado entre E2 e IR ($p>0,990$) (figura 18). Na microcirculação hepática, houve diferença entre IR e Sham ($p=0,003$), diferença não observada entre E2 e IR ($p=0,190$) (figura 19). No infiltrado leucocitário não foi observada diferença entre os grupos. (figura 20)

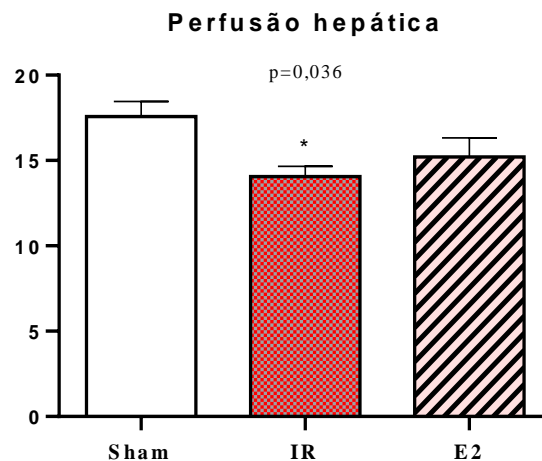


Figura 18 - Perfusão hepática. Sham (rato com manipulação cirúrgica, sem lesão de isquemia e reperfusão); IR (rato submetido à lesão de isquemia e reperfusão); E2 (rato tratado com 17β -estradiol, 30 minutos antes da indução de isquemia e reperfusão). Os valores representam a média \pm EPM. (*) IR *versus* Sham ($p<0,05$).

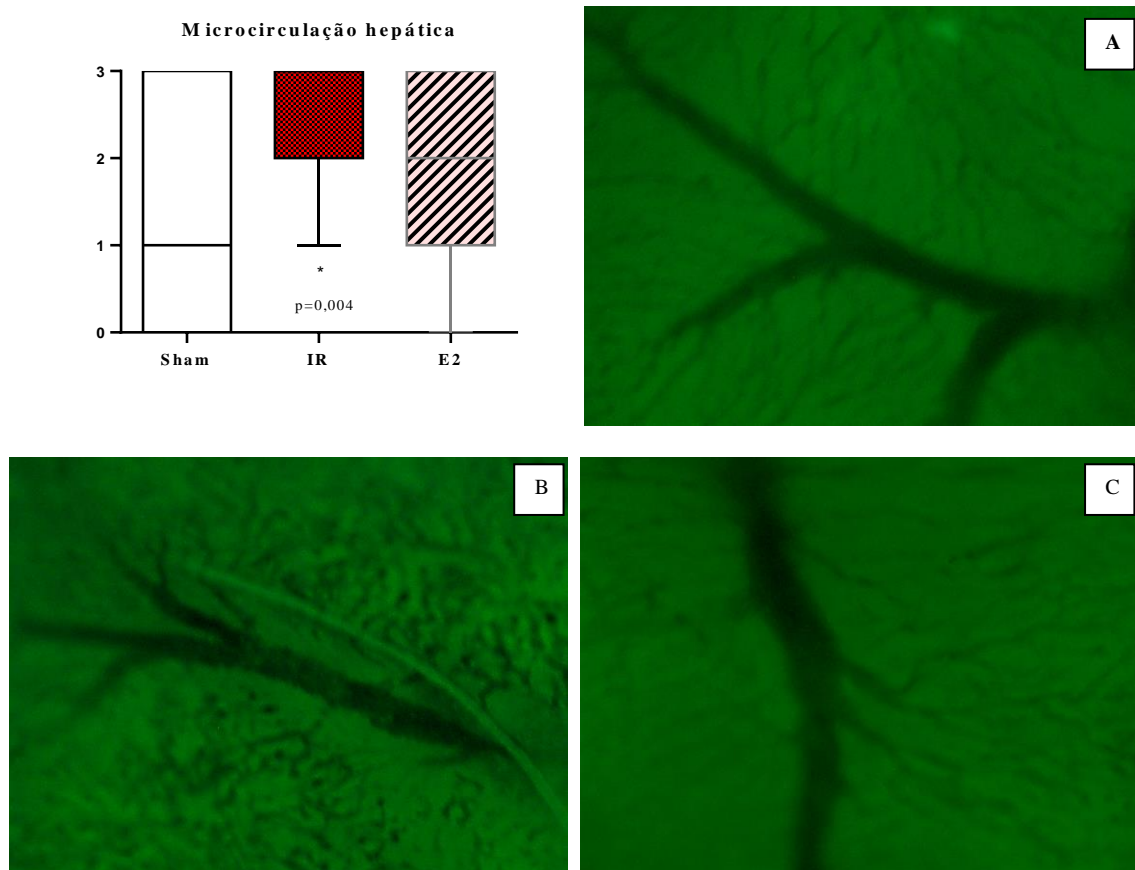


Figura 19 - Microcirculação hepática. Sham (rato com manipulação cirúrgica, sem lesão de isquemia e reperfusão); IR (rato submetido à lesão de isquemia e reperfusão); E2 (rato tratado com 17β -estradiol, 30 minutos antes da indução de isquemia e reperfusão). Os valores representam a média \pm EPM. (*) IR *versus* Sham ($p < 0,05$). Para avaliar a formação de microagregados, o isotiocianato de fluoresceína (FITC), conjugado a um anticorpo anti-CD49B (BD Biosciences, Brasil), foi infundido pela veia jugular. (A) Sham, baixa agregação plaquetária; (B) IR, intensa agregação plaquetária; (C) E2, agregação plaquetária intermediária.

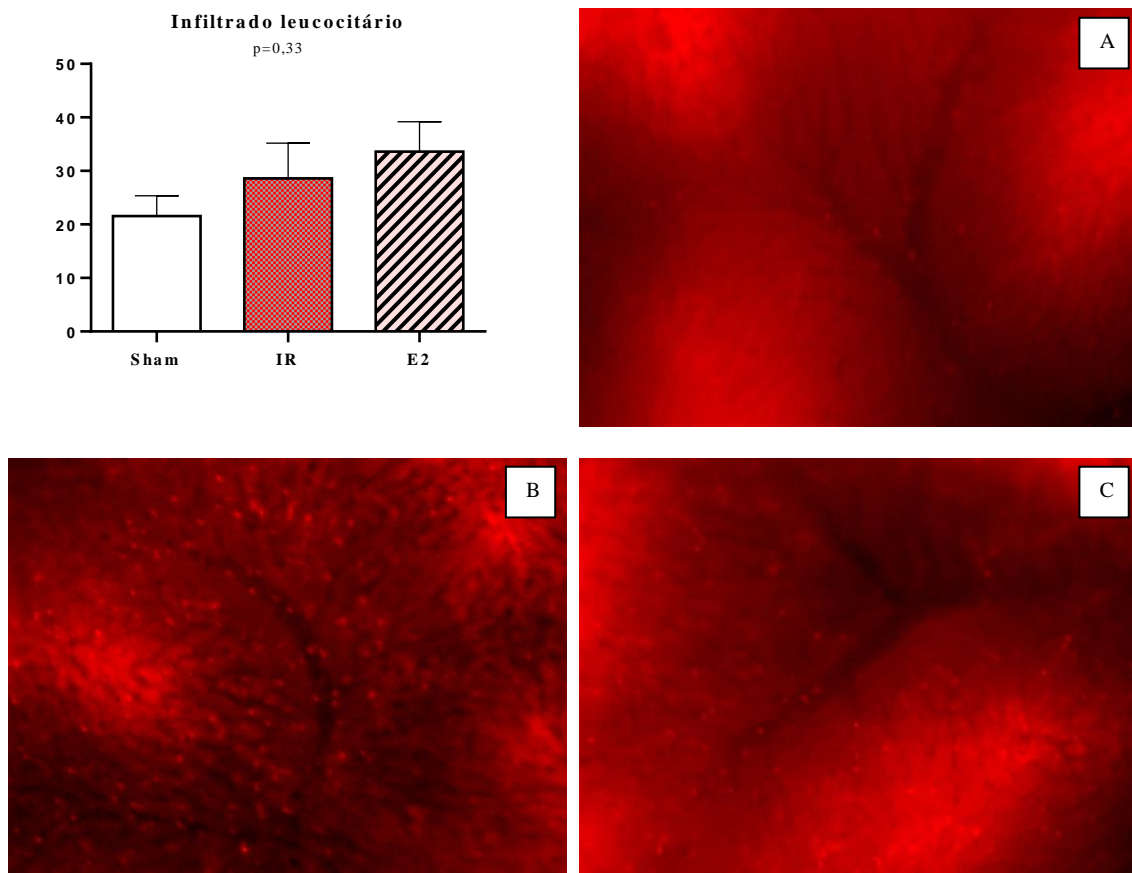


Figura 20 - Infiltrado leucocitário. Sham (rato com manipulação cirúrgica, sem lesão de isquemia e reperfusão); IR (rato submetido à lesão de isquemia e reperfusão); E2 (rato tratado com 17β -estradiol, 30 minutos antes da indução de isquemia e reperfusão). Os valores representam a média \pm EPM. O número de leucócitos, no endotélio dos vasos, no fígado, foi determinado após a infusão de rodamina 6G na veia jugular. (A) Sham, baixo infiltrado leucocitário; (B) IR, alto infiltrado leucocitário; (C) E2, infiltrado leucocitário intermediário.

5.8 Resposta vascular

Foi analisada a expressão proteica e gênica da eNOS e endotelina-1 por imunohistoquímica e por reação em cadeia de polimerase em tempo real (RT-PCR). Houve diferença entre Sham e IR ($p=0,0001$) e entre IR e E2 ($p=0,022$), na avaliação imunohistoquímica da eNOS, e diferença entre Sham e IR ($p=0,009$), na avaliação por imunohistoquímica da endotelina-1 (figuras 21 e 22). Na avaliação por PCR não houve diferença entre os grupos (figura 23).

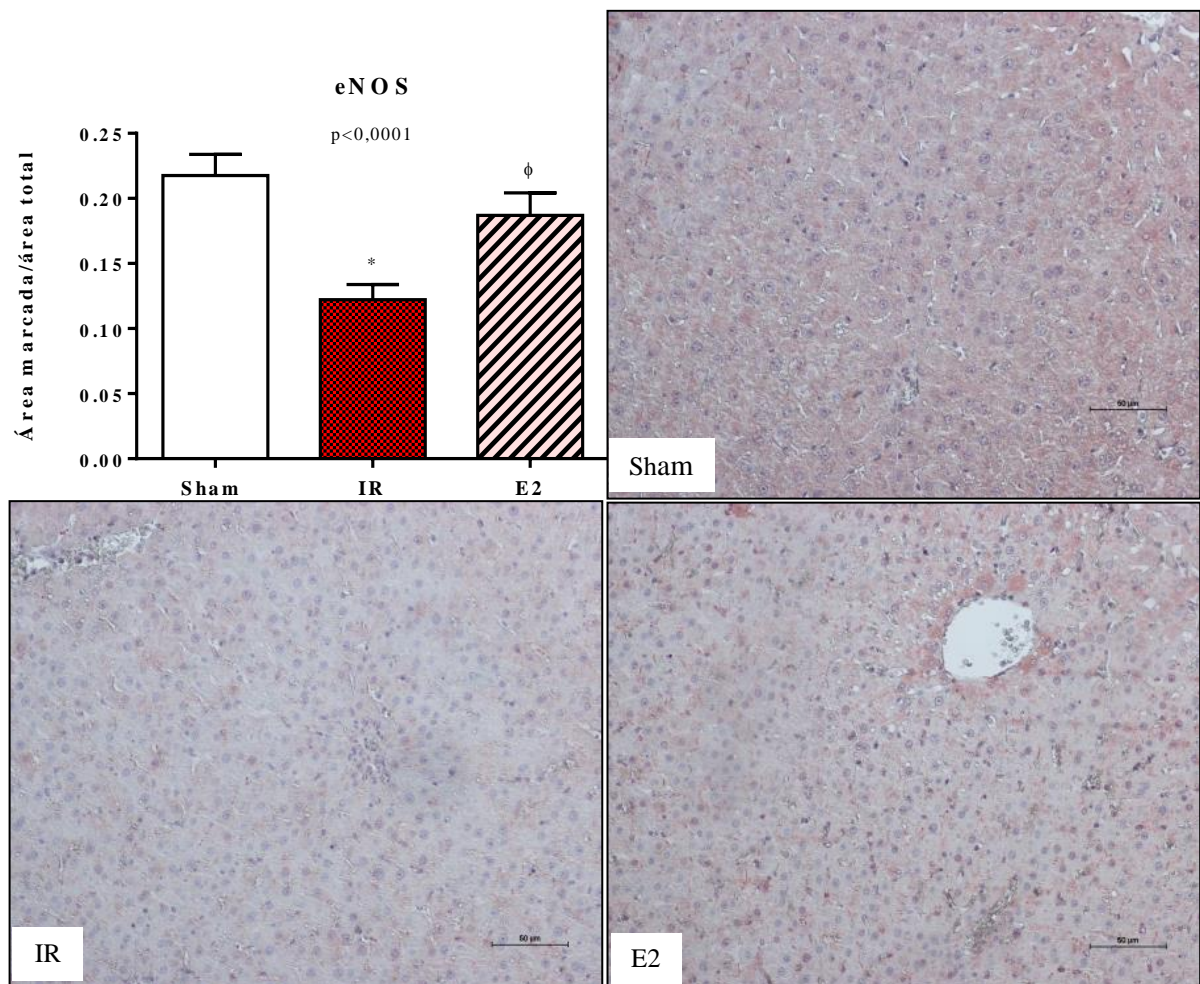


Figura 21 - Avaliação da expressão da eNOS por imunohistoquímica. Sham (rato com manipulação cirúrgica, sem lesão de isquemia e reperfusão); IR (rato submetido à lesão de isquemia e reperfusão); E2 (rato tratado com 17β -estradiol, 30 minutos antes da indução de isquemia e reperfusão). Os valores representam a média \pm EPM. (*) IR versus Sham ($p=0,0001$) e (^φ) E2 versus IR ($p<0,05$).

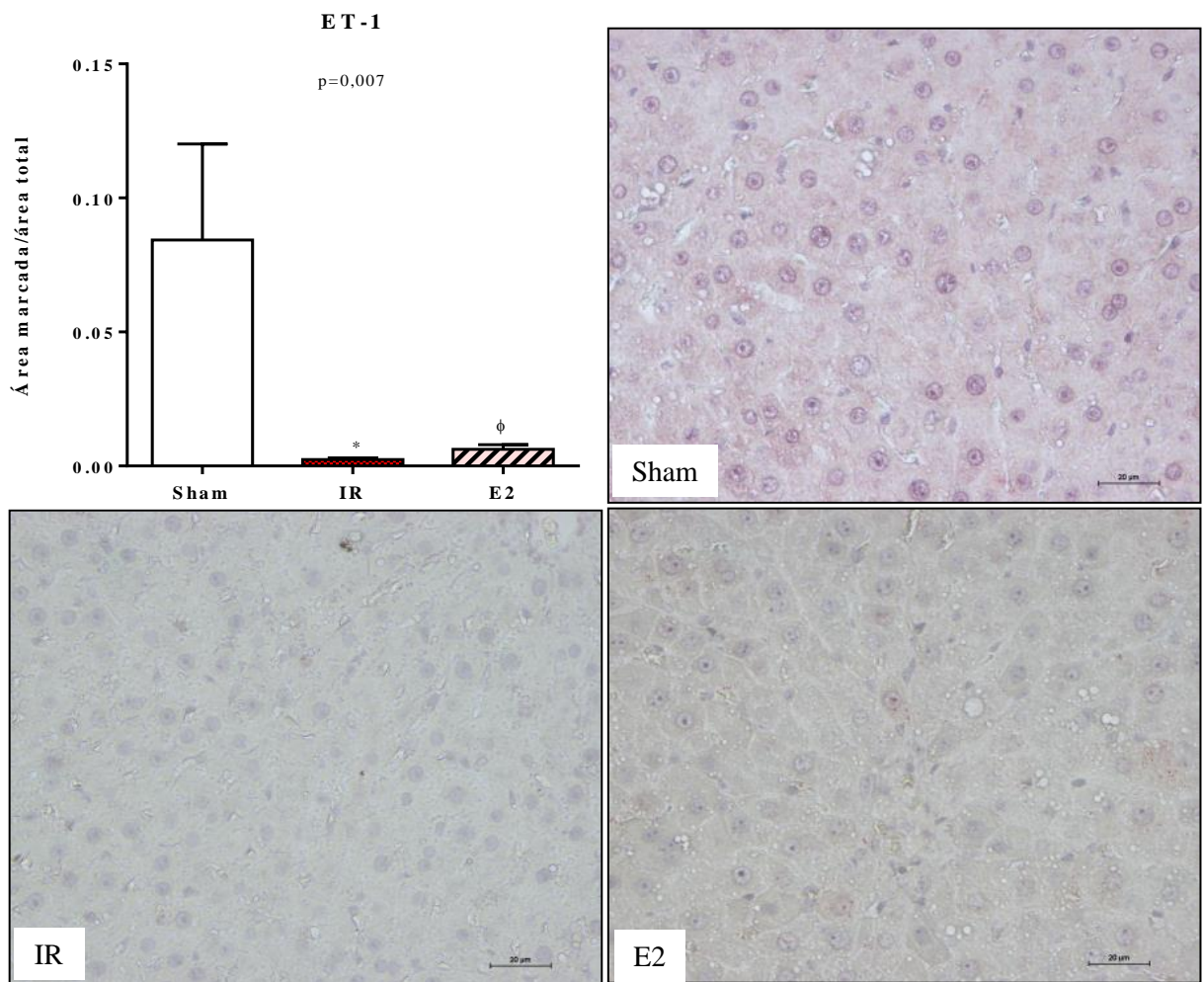


Figura 22 - Avaliação da expressão da endotelina-1 por imuno-histoquímica. Sham (rato com manipulação cirúrgica, sem lesão de isquemia e reperfusão); IR (rato submetido à lesão de isquemia e reperfusão); E2 (rato tratado com 17β -estradiol, 30 minutos antes da indução de isquemia e reperfusão). Os valores representam a média \pm EPM. (*) IR *versus* Sham ($p=0,0004$) e (ϕ) E2 *versus* IR ($p<0,0001$).

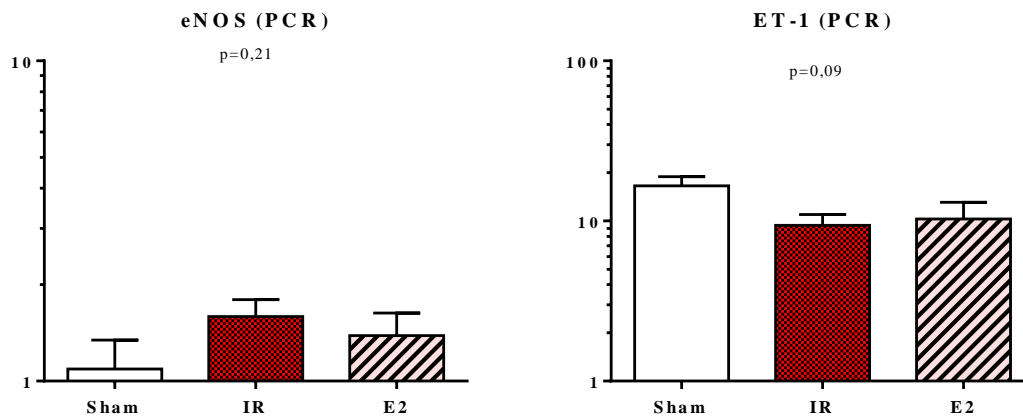


Figura 23 - Avaliação da expressão gênica de eNOS e endotelina-1 por reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR). Sham (rato com manipulação cirúrgica, sem lesão de isquemia e reperfusão); IR (rato submetido à lesão de isquemia e reperfusão); E2 (rato tratado com 17β -estradiol, 30 minutos antes da indução de isquemia e reperfusão). Os valores representam a média \pm EPM.

Na avaliação da expressão proteica e gênica das moléculas de adesão endoteliais, ICAM-1 e VCAM, por RT-PCR e por imuno-histoquímica, não houve diferença entre os grupos (figura 24). Na avaliação da expressão da P-seletina por imuno-histoquímica, houve diferença entre o grupo IR e o Sham ($p=0,012$) (figura 25).

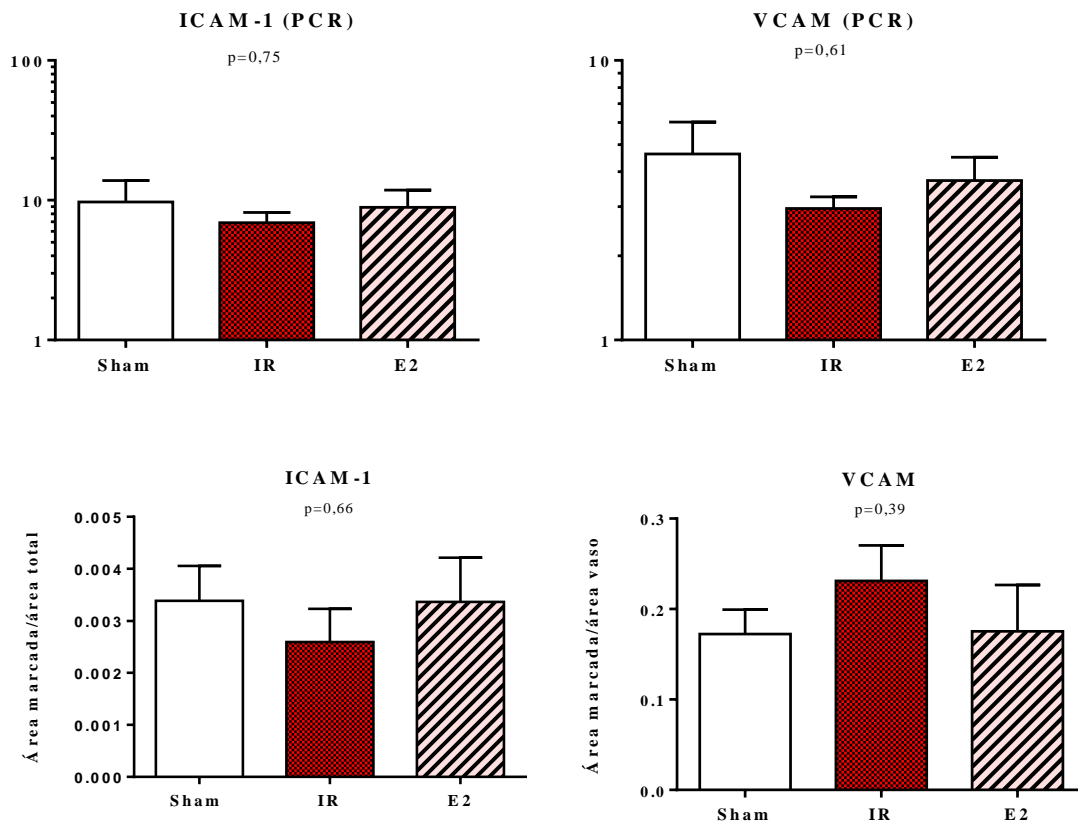


Figura 24 - Avaliação da expressão gênica por reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) e por imuno-histoquímica do ICAM-1 e VCAM. Sham (rato com manipulação cirúrgica, sem lesão de isquemia e reperfusão); IR (rato submetido à lesão de isquemia e reperfusão); E2 (rato tratado com 17β -estradiol, 30 minutos antes da indução de isquemia e reperfusão). Os valores representam a média \pm EPM.

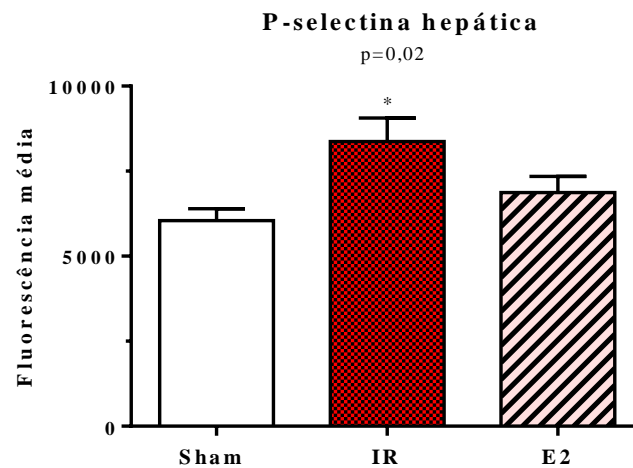


Figura 25 - Avaliação da expressão da P-selectina. Sham (rato com manipulação cirúrgica, sem lesão de isquemia e reperfusão); IR (rato submetido à lesão de isquemia e reperfusão); E2 (rato tratado com 17β -estradiol, 30 minutos antes da indução de isquemia e reperfusão). Os valores representam a média \pm EPM. (*) IR *versus* Sham ($p < 0,05$).

5.9 Avaliação da resposta inflamatória no fígado

Na análise dos oito mediadores inflamatórios no homogenato do fígado, não foram observadas diferenças entre os grupos. (Figura 26)

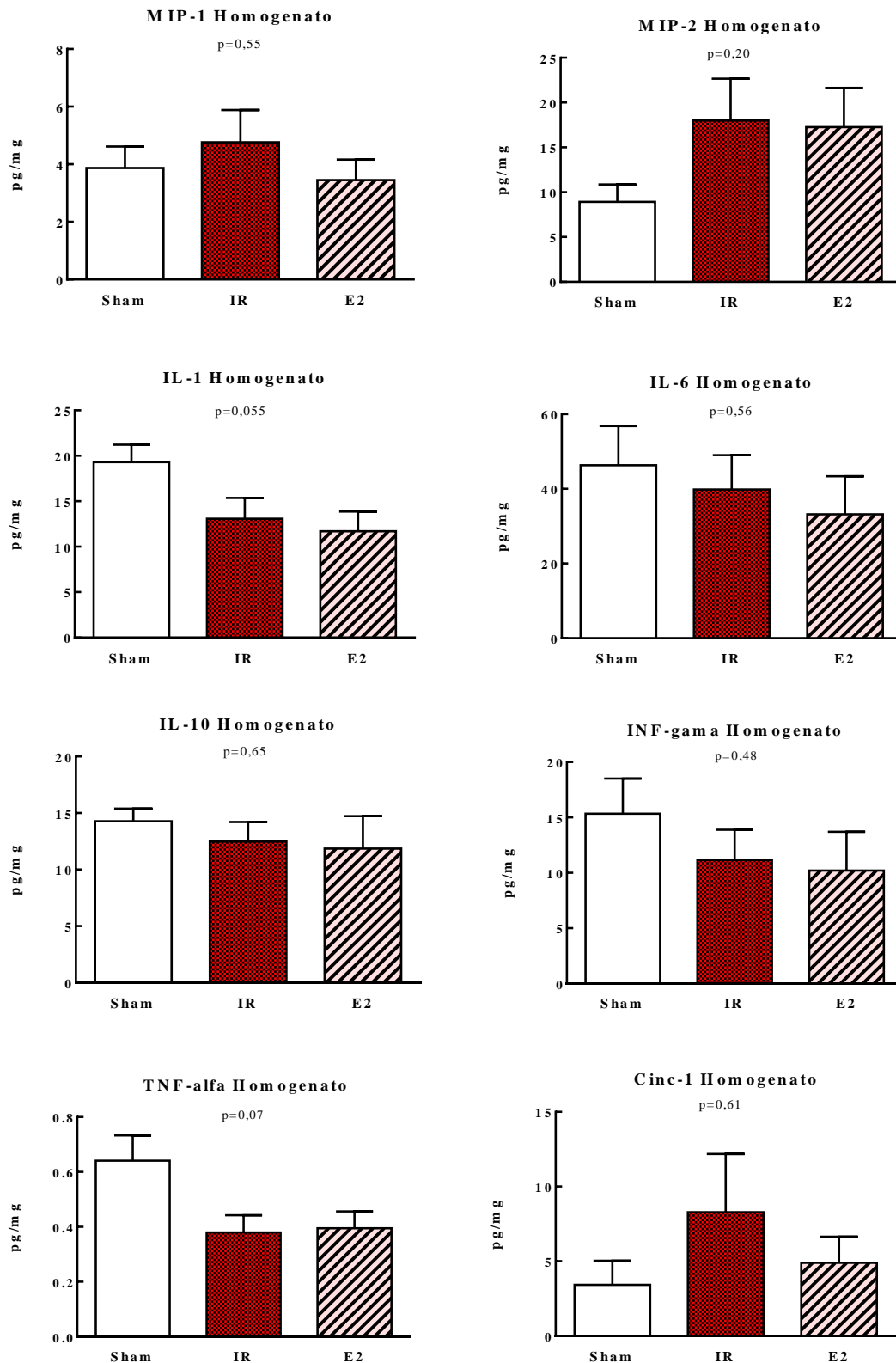


Figura 26 – Dosagem de MIP-1, MIP-2, de interleucinas (IL-1, IL-6 e IL10), de IFN-gama, TNF-alfa e Cinc-1 no homogenato do fígado. Sham (rato com manipulação cirúrgica, sem lesão de isquemia e reperusão); IR (rato submetido à lesão de isquemia e reperusão); E2 (rato tratado com 17 β -estradiol, 30 minutos antes da indução de isquemia e reperusão). Os valores representam a média \pm EPM.

5.10 Apoptose hepatocelular

Para avaliação do grau de lesão celular, foram analisadas as expressões de caspase-3 e de BCL-2 por imuno-histoquímica. Houve diferença entre Sham e IR ($p=0,0004$), Sham e E2 ($p=0,0002$) e IR e E2 ($p<0,0001$) no BCL-2. (figuras 27 e 28)

Na avaliação da caspase-3 não houve diferenças entre os grupos.

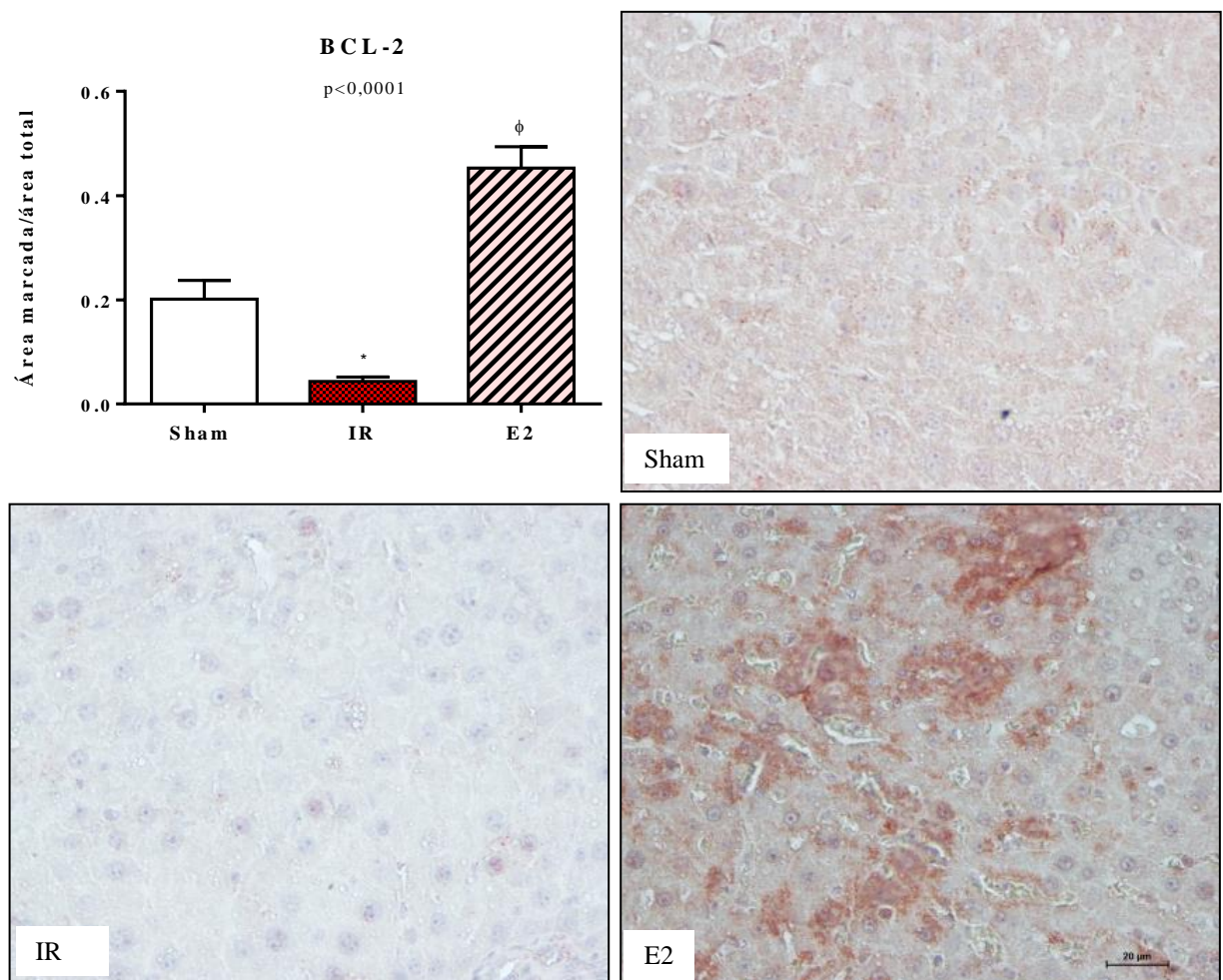


Figura 27 - Avaliação da expressão de BCL-2 por imuno-histoquímica. Sham (rato com manipulação cirúrgica, sem lesão de isquemia e reperfusão); IR (rato submetido à lesão de isquemia e reperfusão); E2 (rato tratado com 17β -estradiol, 30 minutos antes da indução de isquemia e reperfusão). Os valores representam a média \pm EPM. (*) IR *versus* Sham ($p=0,0004$) e (^φ) E2 *versus* IR ($p<0,0001$).

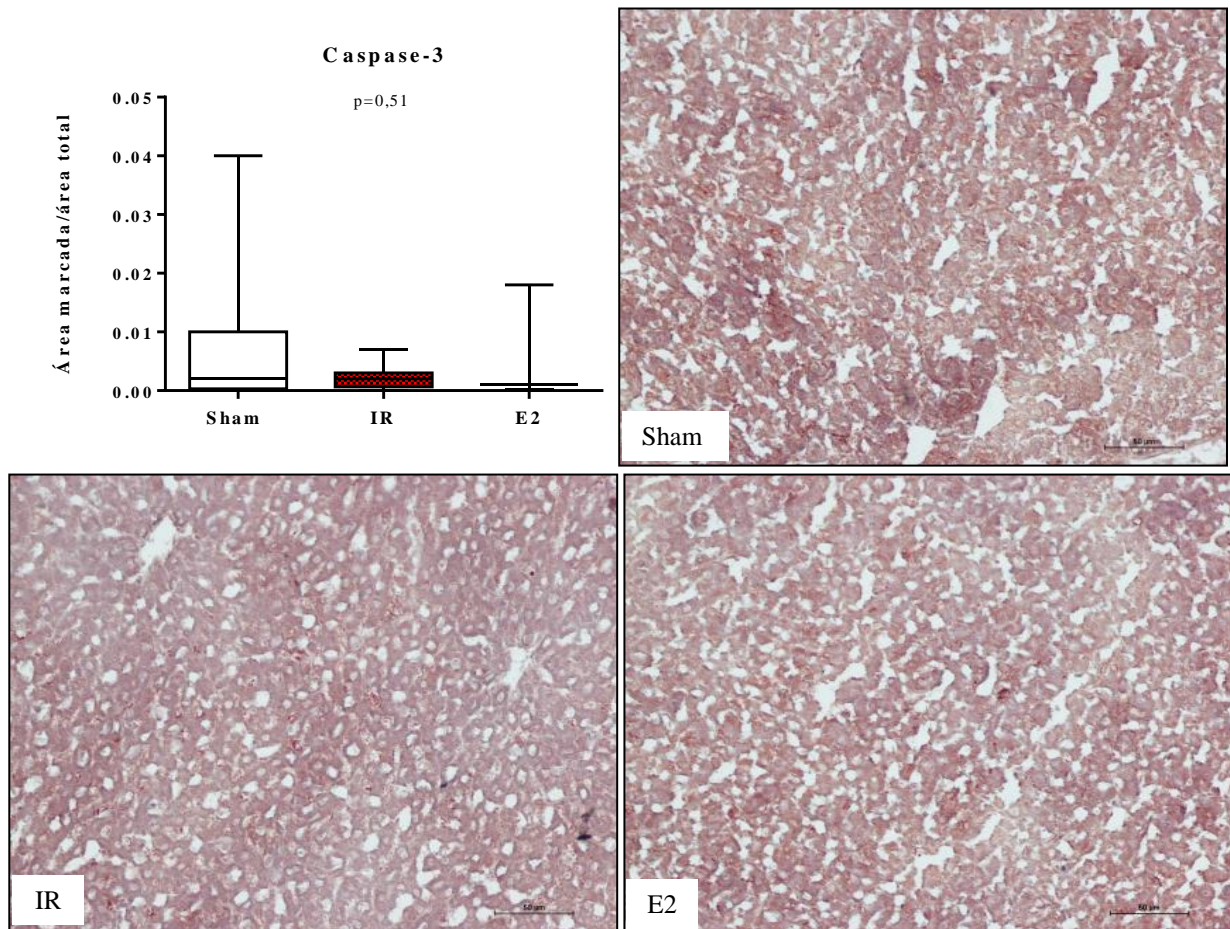


Figura 28 - Avaliação da expressão da caspase-3 por imuno-histoquímica. Sham (rato com manipulação cirúrgica, sem lesão de isquemia e reperfusão); IR (rato submetido à lesão de isquemia e reperfusão); E2 (rato tratado com 17β -estradiol, 30 minutos antes da indução de isquemia e reperfusão). Os valores representam a média \pm EPM. ($p=0,51$)

6 Discussão

Segundo Nakazato et al., 2018, a lesão por I/R pode ser dividida em três estágios: Inicial, em que ocorre, a partir da interrupção do fluxo sanguíneo, a privação de nutrientes e oxigênio, levando à reduzida disponibilidade de ATP e à falha nos canais iônicos, com consequente acúmulo de cálcio, ácido lático, desequilíbrio do pH, alteração da permeabilidade mitocondrial e disfunção celular; Intermediário, em que se inicia a produção de radicais livres de oxigênio, que deflagará a produção de citocinas e da resposta inflamatória, levando ao comprometimento do território microvascular e células endoteliais sinusoidal; Tardio, 2 a 24 horas após a reperfusão, quando são observadas a migração leucocitária, as moléculas de adesão, a liberação de mediadores inflamatórios (TNF-alfa, IL-1) e a produção do óxido nítrico (NO).⁴³

Após eventos de I/R, ocorre uma resposta sistêmica com ativação endotelial, síntese de mediadores inflamatórios e mobilização de células imunes. Entre as alterações induzidas por I/R, fatores sistêmicos liberados, interagem com plaquetas e leucócitos; as plaquetas ativadas aumentam sua interação com o endotélio e os fatores de coagulação são desencadeados.⁴⁴ Neste estudo, encontramos maior agregação plaquetária *in vitro* após a lesão de I/R e um coágulo excessivamente firme com redução da lise. Paralelamente, a concentração sistêmica de mediadores inflamatórios foi aumentada. O tratamento preventivo com E2 foi capaz de reduzir a agregação plaquetária, restaurar a lise do coágulo e reduzir a concentração sérica de citocinas. O tratamento com estradiol (grupo E2) foi baseado em estudo anterior, utilizando o mesmo modelo com oclusão aórtica, no qual foram evidenciados efeitos benéficos do estradiol na lesão mesentérica e intestinal, com preservação do fluxo sanguíneo mesentérico, melhora da integridade da mucosa intestinal, redução da inflamação e da mortalidade.⁸ O E2 pode promover vasodilatação, regular a função plaquetária e reduzir

a proliferação do músculo liso vascular.⁴⁵ Sabido que as plaquetas expressam receptores para estrogênios⁴⁶ é provável que os estrogênios possam afetar sua função. Após lesão grave, as mulheres apresentam um benefício de sobrevivência e desempenho diferencial das plaquetas, o que pode estar relacionado a respostas distintas à sinalização do receptor ADP, PAF e P2Y.⁴⁷ Alguns estudos demonstraram que o estrogênio inibe a função plaquetária *in vitro* e *in vivo*.⁴⁸⁻⁵⁰ Wu et al. (2010) mostram que o 17 β -estradiol inibe a ativação plaquetária via AMP-eNOS/NO-GMP cíclico e inibição da fosforilação PLC γ 2 e p38 MAPK em plaquetas lavadas *in vitro*. É possível que a exposição de plaquetas circulantes a níveis elevados de 17 β -estradiol *in vivo* possa ter o mesmo efeito que níveis suprafisiológicos de 17 β -estradiol *in vitro*, reduzindo a ativação plaquetária.⁵¹

O restabelecimento do fluxo sanguíneo pela reperfusão potencializa a lesão causada pelo período isquêmico, agravando o dano causado ao nível celular. A reperfusão desencadeia a coagulação por mediadores inflamatórios e a ativação plaquetária em várias vias.⁵²⁻⁵⁴ A lesão endotelial resulta em diminuição do nível de anticoagulantes e aumento do nível de pró-coagulantes, que desencadeiam agregação plaquetária e trombose.⁵⁵ Além disso, as plaquetas “per si” também contribuem para aumentar a inflamação e são liberadas em um ambiente ideal para ativação.⁵⁶

Bester & Pretorius (2016) mostraram que a adição de IL-1 β , IL-6 e IL-8 ao sangue total causam hiperativação plaquetária, com disseminação e aglomeração pronunciadas. IL-1 β atua como um pró-coagulante, prejudicando a atividade da proteína C.⁵⁷ A liberação de IL-1 β tem relação com a síntese de IL-6, que influencia a produção de fibrinogênio e inibidor do ativador de plasminogênio-1 (PAI-1) entre outros fatores pró-coagulantes, enquanto diminui a produção de antitrombina, levando a um estado

hipofibrinolítico.^{58,59} O processo de reperfusão leva ao aumento da inflamação, resultando na liberação de proteínas reagentes de fase aguda, que incluem fibrinogênio, protrombina, fator VIII e fator de von Willebrand. O fibrinogênio afeta o tempo de coagulação e seu acúmulo pode, portanto, contribuir diretamente para o recrutamento plaquetário durante a reperfusão pós-isquêmica. Forma a rede de fibrina por ação da trombina, na qual leucócitos, eritrócitos e plaquetas são incluídos na formação do trombo. O aumento de microtrombos na microvasculatura pós-isquêmica pode contribuir significativamente para a manifestação de lesão de I/R, uma vez que as plaquetas liberam mediadores pró-inflamatórios e modulam a função leucocitária.⁶⁰ Nossos resultados durante a análise de microscopia intravital mostraram aumento da formação de microtrombos no fígado no grupo IR, mas nenhum efeito significativo do E2 foi observado.

Os resultados, neste estudo, apontam para o efeito do estradiol na concentração e atividade do fibrinogênio, com aumento da atividade e maior concentração, situação observada no aumento da firmeza do coágulo no FIBTEM. Ainda, os resultados da tromboelastometria apontam para efeitos do tratamento com E2 no aumento da firmeza e redução da lise do coágulo, na análise pelo INTEM. Estudos experimentais indicam que o 17β -estradiol atua como regulador dos genes do fator de coagulação sanguínea, induzindo a transcrição de fatores, como o FXII (fator de Hageman), envolvido na fibrinólise, produção de quininas e processo inflamatório, desempenhando papel essencial na ativação de vias proteolíticas da cascata de coagulação.⁶¹ A terapia com estradiol aumenta a fibrinólise em ratas ovariectomizadas, aumentando a atividade do ativador do plasminogênio.⁶²

Sabe-se, por trabalho anterior com o mesmo modelo experimental, que a isquemia mesentérica imposta foi irreversível para quase a totalidade dos animais⁸ por redução importante no fluxo sanguíneo mesentérico microcirculatório após indução de I/R aórtica. No presente estudo, mesmo não havendo tempo de se observar, no fígado, esse grau de irreversibilidade da lesão, demonstrou-se haver graus variados de acometimento hepático. Pode-se então, inferir que houve indícios de alterações compatíveis com repercussões mais vasculares do que inflamatórias, E, apesar da eficácia da agressão isquêmica imposta ao modelo experimental, verificada através das variações das curvas de pressão arterial, os marcadores de lesão hepática não foram tão relevantes. Vale salientar que o fígado recebe um suprimento sanguíneo único, que consiste em 80% de sangue venoso da veia porta e 20% de sangue oxigenado pela artéria hepática. Essa mistura, rica em nutrientes e com baixa tensão de oxigênio, flui através de uma enorme rede de microvasos hepáticos de paredes finas, denominados sinusoides.²³ Neste contexto, o fígado funciona como um importante tampão entre o conteúdo intestinal e a circulação sistêmica, em paralelo à análise de coagulação, avaliamos sua perfusão microvascular. O fluxo sanguíneo de baixa pressão do fígado, o endotélio fenestrado e a falta de uma membrana basal, permitem interações próximas entre as células imunes residentes e as células hepáticas não hematopoiéticas.⁶³ Além da diminuição do fluxo sanguíneo venoso, a tensão de oxigênio da isquemia também resulta em uma regulação positiva de múltiplos genes de resposta ao estresse, incluindo fator induzível por hipóxia e P-selectina, bem como outros genes responsáveis por proteínas pró-coagulantes. A P-selectina é armazenada em grânulos intracelulares de células endoteliais e plaquetas e pode ser rapidamente mobilizada para a superfície celular em resposta a vários estímulos independentes de mRNA de novo ou síntese de proteína.⁶⁴ Nossos resultados mostraram aumento da expressão de P-selectina no fígado

de ratos do grupo IR associado à redução do fluxo sanguíneo hepático e, como mencionado anteriormente, aumento da formação de microtrombos. Esses eventos podem estar relacionados às alterações da coagulação induzidas pela IR aórtica. É importante considerar que o fígado apresenta uma estrutura anatômica particular com um sistema vascular com dois influxos, uma população de células imunes residente diversa e um estado de estimulação constante. Essas características determinam o equilíbrio entre inflamação e tolerância às agressões no fígado saudável. A concentração de mediadores inflamatórios aqui encontrados no homogenato de tecido hepático sugere que o fígado não está em estado inflamatório após I/R aórtica, uma vez que as citocinas medidas não foram alteradas, ou não se alteraram por ser um tempo curto para avaliação desse modelo experimental hiperagudo. Em contraste, nossos resultados apontaram para um aumento das enzimas hepáticas no grupo I/R, mas mudanças nas transaminases devido ao manuseio e procedimentos diagnósticos realizados em animais podem representar uma resposta a perturbações físicas gerais e não se correlacionam diretamente com a lesão hepática específica.⁶⁵ O DHL, por exemplo, é um marcador altamente sensível de dano tecidual⁶⁶, porém não pode ser considerado tecido específico e sua elevação pode estar relacionada à lesão intestinal, conforme observado em estudo anterior utilizando o mesmo modelo.⁸

Segundo Khandoga et al. 2003, a I/R hepática induz ao rolamento de plaquetas e a adesão nas arteríolas terminais e vênulas pós-sinusoidais, bem como o acúmulo de plaquetas nos sinusóides já após 20 minutos de reperfusão. O número de plaquetas interagindo com o endotélio aumenta significativamente à medida que o tempo de isquemia se prolonga, de 30 a 90 minutos. A adesão plaquetária pós-isquêmica é associada a um aumento na atividade da trombina e uma perda de plaquetas da

circulação sistêmica. Além disso, a adesão plaquetária induzida por I/R é linearmente correlacionada a um comprometimento da perfusão sinusoidal, já o prolongamento do tempo de reperfusão até 4 horas não aumentou as interações plaquetas-células endoteliais. Esses resultados *in vivo* indicam que a I/R hepática induz interações plaquetas-células endoteliais em arteríolas, sinusóides e vênulas já durante a reperfusão inicial. A extensão dessas interações depende da duração da isquemia, mas não do tempo de reperfusão. As plaquetas aderentes parecem participar do desenvolvimento da falha de perfusão sinusoidal no fígado pós-isquêmico.⁶⁷ Pela característica deste experimento de avaliação hiperaguda da lesão hepática, supõe-se que alguns dos marcadores estudados não tiveram tempo de apresentar as alterações esperadas, como também demonstrado por Correia Miranda et al., 2010.⁶⁸

Os dados das análises histológicas apontaram para um aumento da congestão vascular nos animais IR, e o grupo tratado com estradiol sugeriu uma redução dessa congestão. De maneira geral, houve indícios de alterações compatíveis com repercussões vasculares, alterações essas que podem estar associadas à fase inicial do processo inflamatório, porém não foram observadas outras alterações, provavelmente pela necessidade de tempo maior para sua manifestação.

Atribui-se, à disfunção endotelial, o gatilho da lesão de reperfusão. As células endoteliais produzem ET e NO, dentre outros elementos moduladores da resposta vascular. Está bem estabelecido que o papel protetor cardiovascular do estradiol seja baseado na sinalização do óxido de nitrogênio (NO) por meio da ativação do ER.⁶⁹ O NO é o vasodilatador local mais importante e a redução de sua síntese no período inicial da lesão hepática devido à reperfusão causa diminuição do fluxo sanguíneo e aumento das alterações ocorridas.⁷⁰ Um efeito importante do estradiol é mediar a geração de NO

via eNOS.⁶⁹ Os resultados demonstraram a redução da presença da eNOS no fígado dos animais do grupo IR e o tratamento foi capaz de restaurar a expressão de eNOS e exerceu pouco efeito na expressão da ET. Esses efeitos foram observados ao nível da proteína, e não do gene, sugerindo uma ação rápida do estradiol por vias não genômicas, demonstrando que a interação do estradiol com seu receptor na célula endotelial causa rápida estimulação da produção de NO.⁷¹ Considerando os efeitos do NO sobre o tônus da musculatura lisa vascular, seu aumento pode ter relevância adicional para a manutenção da homeostasia hepática. 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 17 β -estradiol sobre a microcirculação.

Rocha e Sousa et al., 2018, descrevem que a P-selectina nas células faz a mediação da captura e rolagem de neutrófilos sob condições inflamatórias e que a ativação das células endoteliais, por sua vez, aumenta a expressão de ICAM-1, levando à adesão de neutrófilos e migração para o tecido perivascular.⁸ Os dados aqui apresentados mostram que houve um aumento do número de leucócitos migrados, não acompanhados pelo aumento da expressão da molécula de adesão, demonstrando discordância em relação a estudos anteriores, nos quais se observou que, após a isquemia visceral pela oclusão aórtica, houve ativação de neutrófilos, expressão aumentada de moléculas de adesão e aumento da mortalidade.²⁶ Ainda neste estudo, pouco se observou de diferença na expressão das moléculas de adesão no tecido hepático (ICAM-1, VCAM e P-selectina) entre grupos, nem com a agressão isquêmica, nem após a infusão do hormônio, exceção feita à P-selectina, que teve sua expressão elevada após a lesão por I/R.

Os dados disponíveis demonstram que os hormônios sexuais femininos modulam a susceptibilidade do sistema imune e a resposta dos órgãos à lesão I/R.^{29,72} Dentre as ações protetoras do estradiol, está a inibição da apoptose nas células endoteliais humanas induzidas por citocinas.⁷³ Além disso, o estradiol também foi capaz de reduzir a apoptose de células cardíacas, reduzindo a caspase-1 e a caspase-3.⁷⁴ A I/R induz dano às células do fígado através da observação de apoptose e necrose. Apesar da necrose ser uma das principais características do dano hepático após lesão por I/R, há evidências de que a apoptose celular é o mecanismo primário da lesão.⁷⁵ Em estudo experimental com ratos, Yang et al., 2012, observaram o efeito protetor do estradiol, inibindo a apoptose de células hepáticas em modelo de I/R.⁷⁶ Nossos dados estão alinhados com a literatura pertinente, uma vez que apontaram aumento de BCL-2 (proteína inibidora da apoptose) no grupo tratado com o hormônio.

Como perspectivas futuras, esperamos que o 17 β -estradiol possa ser uma estratégia suplementar na prevenção das lesões causadas pela I/R em procedimentos cirúrgicos que envolvam o arco aórtico, em que a circulação sistêmica fica temporariamente comprometida. Claro que inúmeras questões ainda precisam ser respondidas, como por exemplo, qual seria a dose ideal do 17 β -estradiol a ser infundida? Qual seria o melhor momento para a infusão? Teriam as mulheres o mesmo benefício que se espera que os homens possam ter? Haveria impacto na redução do sangramento secundário a coagulopatia nessas operações?

7 Conclusão

O estradiol foi eficaz na prevenção de alterações da coagulação e da inflamação sistêmica por isquemia e reperfusão. O modelo experimental não causou lesão hepática significativa, mas foi observado o efeito protetor do estradiol na resposta vascular e apoptose.

8 Referências

1. Danyi P, Elefteriades JA, Jovin IS. Medical therapy of thoracic aortic aneurysms: Are we there yet? *Circulation*. 2011;124(13):1469–76.
2. Dias RR, Mejia OAV, Fernandes F, Ramires FJA, Mady C, Stolf NAG, et al. Impacto da mortalidade da doença da aorta torácica no estado de São Paulo no período de 1998 a 2007. *Arq Bras Cardiol*. 2013;101(6):528–35.
3. Tian DH, Croce B, Hardikar A. Aortic arch surgery. *Ann Cardiothorac Surg*. 2013;2(2):245.
4. Gontijo Filho B, Fantini FA, Colluci F, Vrandecic MO. Tratamento cirúrgico dos aneurismas e dissecções do arco aórtico. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 1999;14(4):285–9.
5. Yadav SS, Howell DN, Gao W, Steeber DA, Harland RC, Clavien PA. L-selectin and ICAM-1 mediate reperfusion injury and neutrophil adhesion in the warm ischemic mouse liver. *Am J Physiol*. 1998;275(6):G1341-52.
6. Khandoga A, Biberthaler P, Enders G, Teupser D, Axmann S, Luchting B, et al. P-selectin mediates platelet-endothelial cell interactions and reperfusion injury in the mouse liver in vivo. *Shock*. 2002;18(6):529–35.
7. Cooper D, Chitman KD, Williams MC, Granger DN. Time-dependent platelet-vessel wall interactions induced by intestinal ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2003;284(6):G1027–33.
8. Rocha de Sousa PT, Breithaupt-Faloppa AC, de Jesus Correia C, Simão RR, Ferreira SG, Fiorelli AI, et al. 17 β -Estradiol prevents mesenteric injury induced by occlusion of the proximal descending aorta in male rats. *J Vasc Surg*.

- 2018;67(2):597–606.
9. Yang SS, Park KM, Roh YN, Park YJ, Kim DI, Kim YW. Renal and abdominal visceral complications after open aortic surgery requiring supra-renal aortic cross clamping. *J Korean Surg Soc.* 2012;83(3):162–70.
 10. Massberg S, Enders G, Leiderer R, Eisenmenger S, Vestweber D, Krombach F, et al. Platelet-endothelial cell interactions during ischemia/reperfusion: The role of P-selectin. *Blood.* 1998;92(2):507–15.
 11. Crochemore T, Piza FM de T, Rodrigues R dos R, Guerra JC de C, Ferraz LJR, Corrêa TD. A new era of thromboelastometry. *Einstein (São Paulo)* 2017;15(0):380–5.
 12. Clemetson KJ. Platelets and primary haemostasis. *Thromb Res.* 2012;129(3):220–4.
 13. Evora PRB, Baldo CF, Celotto AC, Capellini VK. Endothelium dysfunction classification: Why is it still an open discussion? *Int J Cardiol.* 2009;137(2):175–6.
 14. Greven J, Pfeifer R, Zhi Q, Pape HC. Update on the role of endothelial cells in trauma. *Eur J Trauma Emerg Surg.* 2018;44(5):667–77.
 15. Evora PRB, Pearson PJ, Seccombe JF, Schaff HV. Lesão de isquemia-reperfusão. Aspectos fisiopatológicos e a importância da função endotelial. *Arq Bras Cardiol.* 1996;66(4):239–45.
 16. Miranda LEC, Tirapelli LF, Ramos SG, Capellini VK, Celotto AC, Carlotti CG, et al. Nitric oxide synthase in heart and thoracic aorta after liver ischemia and

- reperfusion injury: an experimental study in rats. *Exp Clin Transplant*. 2012;10(1):43–8.
17. Ogawa K, Kondo T, Tamura T, Matsumura H, Fukunaga K, Murata S, et al. Interaction of kupffer cells and platelets determines the severity of ischemia-reperfusion injury in steatosis. *Tohoku J Exp Med*. 2014;232(2):105–13.
 18. Ito Y, Bethea NW, Abril ER, McCuskey RS. Early hepatic microvascular injury in response to acetaminophen toxicity. *Microcirculation*. 2003;10(5):391–400.
 19. Ito Y, Sørensen KK, Bethea NW, Svistounov D, McCuskey MK, Smedsrød BH, et al. Age-related changes in the hepatic microcirculation in mice. *Exp Gerontol*. 2007;42(8):789–97.
 20. Katagiri H, Ito Y, Ito S, Murata T, Sugimoto Y, Narumiya S, et al. TNF- α induces thromboxane receptor signaling-dependent microcirculatory dysfunction in mouse liver. *Shock*. 2008;30(4):463–7.
 21. McDonald B, Pittman K, Menezes GB, Hirota SA, Slaba I, Waterhouse CCM, et al. Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. *Science*. 2010;330(6002):362–6.
 22. Lee S, Vinegoni C, Sebas M, Weissleder R. Automated motion artifact removal for intravital microscopy, without a priori information. *Sci Rep*. 2014;4:1–9.
 23. Marques PE. Intravital microscopy: taking a close look inside the living organisms. *African J Microbiol Res*. 2012;6(7):1603–14.
 24. Masedunskas A, Milberg O, Porat-Shliom N, Sramkova M, Wigand T, Amornphimoltham P, et al. Intravital microscopy: a practical guide on imaging

- intracellular structures in live animals. *Bioarchitecture*. 2012;2(5):143–57.
25. Adam ANI. Some mechanisms of the protective effect of ischemic preconditioning on rat liver ischemia-reperfusion injury. *Int J Gen Med*. 2014;7:483–9.
 26. Erling N, Nakagawa NK, Costa Cruz JWM, Zanoni FL, Costa Baptista-Silva JC, Sannomiya P, et al. Microcirculatory effects of local and remote ischemic preconditioning in supraceliac aortic clamping. *J Vasc Surg*. 2010;52(5):1321–9.
 27. Biberthaler P, Luchting B, Massberg S, Teupser D, Langer S, Leiderer R, et al. Ischemia at 4°C: a novel mouse model to investigate the effect of hypothermia on postischemic hepatic microcirculatory injury. *Res Exp Med*. 2001;200(2):93–105.
 28. Cure E, Cure MC, Tumkaya L, Kalkan Y, Aydin I, Kirbas A, et al. Topiramate ameliorates abdominal aorta cross-clamping induced liver injury in rats. *Saudi J Gastroenterol*. 2014;20(5):297–303.
 29. Breithaupt-Faloppa AC, Thais Fantozzi E, Romero DC, Rodrigues A da S, de Sousa PTR, Lino dos Santos Franco A, et al. Acute effects of estradiol on lung inflammation due to intestinal ischemic insult in male rats. *Shock*. 2014;41(3):208–13.
 30. Hou X, Pei F. Estradiol inhibits cytokine-induced expression of VCAM-1 and ICAM-1 in cultured human endothelial cells via AMPK/PPAR α activation. *Cell Biochem Biophys*. 2015;72(3):709–17.
 31. Rennó ME, Santos C. Terapia de reposição hormonal e trombose Hormonal replacement therapy and thrombosis. *J Vasc Br*. 2003;2(1):17-22.

32. Raju R, Bland KI, Chaudry IH. Estrogen: A novel therapeutic adjunct for the treatment of trauma-hemorrhage-induced immunological alterations. *Mol Med.* 2008;14:213–21.
33. Kietadisorn R, Juni RP, Moens AL. Tackling endothelial dysfunction by modulating NOS uncoupling: new insights into its pathogenesis and therapeutic possibilities. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2012;302:E481–95.
34. Iorga A, Cunningham CM, Moazeni S, Ruffenach G, Umar S, Eghbali M. The protective role of estrogen and estrogen receptors in cardiovascular disease and the controversial use of estrogen therapy. *Biol Sex Differ.* 2017;8:33.
35. Xiao X, Liu D, Zheng S, Fu J, Zhang H, Chen L. Protective effect of estrogen on intestinal ischemia-reperfusion injury in pubertal rats. *J Pediatr Surg.* 2004;39(12):1828–31.
36. Hogg ME, Vavra AK, Banerjee MN, Martinez J, Jiang Q, Keefer LK, et al. The role of estrogen receptor α and β in regulating vascular smooth muscle cell proliferation is based on sex. *J Surg Res.* 2012;173(1):1–14.
37. Guedes F de L, Alves GMC, dos Santos FLA, de Lima LF, Rolim LA, Rolim-Neto PJ. Ciclodextrinas: como adjuvante tecnológico para melhorar a biodisponibilidade de fármacos. *Rev Bras Farm.* 2008;89(3):220–5.
38. Castro HC, Ferreira BLA, Nagashima T, Schueler A, Rueff C, Camisasca D, et al. Plaquetas: ainda um alvo terapêutico. *J Bras Patol Med Lab.* 2006;42(5):321–32.
39. Cruz MV, Luker JN, Carney BC, Brummel-Ziedins KE, Bravo MC, Orfeo T, et

- al. Reference ranges for rotational thromboelastometry in male Sprague Dawley rats. *Thromb J*. 2017;15(31).
40. Zamper RPC, Amorim TC, Costa LGV da, Takaoka F, Serpa A. The role of thromboelastometry in the assessment and treatment of coagulopathy in liver transplant patients. *Einstein* (Sao Paulo). 2017;15(2):243–6.
41. Velik-Salchner C, Schnürer C, Fries D, Müssigang PR, Moser PL, Streif W, et al. Normal values for thrombelastography (ROTEM®) and selected coagulation parameters in porcine blood. *Thromb Res*. 2006;117(5):597–602.
42. Paltrinieri S, Meazza C, Giordano A, Tunesi C. Validation of thromboelastometry in horses. *Vet Clin Pathol*. 2008;37(3):277–85.
43. Nakazato PCG, Victorino JP, Fina CF, Mendes KDS, Gomes MCJ, Evora PRB, et al. Liver ischemia and reperfusion injury. Pathophysiology and new horizons in preconditioning and therapy. *Acta Cir Bras*. 2018;33(8):723–35.
44. Schanze N, Bode C, Duerschmied D. Platelet contributions to myocardial ischemia/reperfusion injury. *Front Immunol*. 2019;10:1–9.
45. Mikkola TS, Savolainen-Peltonen H, Venetkoski M, Ylikorkala O. New evidence for cardiac benefit of postmenopausal hormone therapy. *Climacteric*. 2017;20(1):5–10.
46. Khetawat G, Faraday N, Nealen ML, Vijayan K V, Bolton E, Noga SJ, et al. Human megakaryocytes and platelets contain the estrogen receptor beta and androgen receptor (AR): testosterone regulates AR expression. *Blood*. 2000;95(7):2289–96.

47. Coleman JR, Moore EE, Kelher MR, Samuels JM, Cohen MJ, Sauaia A, et al. Female platelets have distinct functional activity compared with male platelets: implications in transfusion practice and treatment of trauma-induced coagulopathy. *J Trauma Acute Care Surg.* 2019;87(5):1052–60.
48. Nakano Y, Oshima T, Matsuura H, Kajiyama G, Kambe M. Effect of 17beta-estradiol on inhibition of platelet aggregation in vitro is mediated by an increase in NO synthesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18(6):961–7.
49. Bar J, Lahav J, Hod M, Ben-Rafael Z, Weinberger I, Brosens J. Regulation of platelet aggregation and adenosine triphosphate release in vitro by 17beta-estradiol and medroxyprogesterone acetate in postmenopausal women. *Thromb Haemost.* 2000;84(4):695–700.
50. Jayachandran M, Karnicki K, Miller RS, Owen WG, Korach KS, Miller VM. Platelet characteristics change with aging: role of estrogen receptor beta. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2005;60(7):815–9.
51. Wu C-C, Wu S-Y, Liao C-Y, Teng C-M, Wu Y-C, Kuo S-C. The roles and mechanisms of PAR4 and P2Y12/phosphatidylinositol 3-kinase pathway in maintaining thrombin-induced platelet aggregation. *Br J Pharmacol.* 2010;161(3):643–58.
52. Moser M, Nieswandt B, Ussar S, Pozgajova M, Fässler R. Kindlin-3 is essential for integrin activation and platelet aggregation. *Nat Med.* 2008;14(3):325–30.
53. Müller F, Mutch NJ, Schenk WA, Smith SA, Esterl L, Spronk HM, et al. Platelet polyphosphates are proinflammatory and procoagulant mediators in vivo. *Cell.* 2009;139(6):1143–56.

-
54. Xu J, Lupu F, Esmon CT. Inflammation, innate immunity and blood coagulation. *Hamostaseologie*. 2010;30(1):5–6, 8–9.
 55. Janicek MJ, Van den Abbeele AD, Hollenberg NK, Kassis AI, Holman BL, Tumeh SS. Platelet activation and aggregation after endothelial injury. Assessment with indium-111-labeled platelets and angiography. *Invest Radiol*. 1990;25(9):988–93.
 56. Maiocchi S, Alwis I, Wu MCL, Yuan Y, Jackson SP. Thromboinflammatory functions of platelets in ischemia-reperfusion injury and its dysregulation in diabetes. *Semin Thromb Hemost*. 2018;44(2):102–13.
 57. Bester J, Pretorius E. Effects of IL-1 β , IL-6 and IL-8 on erythrocytes, platelets and clot viscoelasticity. *Sci Rep*. 2016;6:32188.
 58. Niessen RW, Lamping RJ, Jansen PM, Prins MH, Peters M, Taylor FB, et al. Antithrombin acts as a negative acute phase protein as established with studies on HepG2 cells and in baboons. *Thromb Haemost*. 1997;78(3):1088–92.
 59. Dong J, Fujii S, Imagawa S, Matsumoto S, Matsushita M, Todo S, et al. IL-1 and IL-6 induce hepatocyte plasminogen activator inhibitor-1 expression through independent signaling pathways converging on C/EBP δ . *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007;292(1):C209–15.
 60. Massberg S, Enders G, Leiderer R, Eisenmenger S, Vestweber D, Krombach F, et al. Platelet-endothelial cell interactions during ischemia/reperfusion: the role of P-selectin. *Blood*. 1998;92(2):507–15.
 61. Cushman M. Effects of hormone replacement therapy and estrogen receptor

- modulators on markers of inflammation and coagulation. *Am J Cardiol.* 2002;90(1):F7–10.
62. Kojima T, Doi K, Kish M, Horiguchi Y. Sex-related differences in plasminogen activator and plasminogen activator inhibiting activities in young and aged rats. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol.* 1999;104(1):81–91.
63. Robinson MW, Harmon C, O’Farrelly C. Liver immunology and its role in inflammation and homeostasis. *Cell Mol Immunol.* 2016;13(3):267–76.
64. Hattori R, Hamilton KK, Fugate RD, McEver RP, Sims PJ. Stimulated secretion of endothelial von Willebrand factor is accompanied by rapid redistribution to the cell surface of the intracellular granule membrane protein GMP-140. *J Biol Chem.* 1989;264(14):7768–71.
65. Everds NE. Evaluation of clinical pathology data: correlating changes with other study data. *Toxicol Pathol.* 2015;43(1):90–7.
66. Drent M, Cobben NA, Henderson RF, Wouters EF, van Dieijen-Visser M. Usefulness of lactate dehydrogenase and its isoenzymes as indicators of lung damage or inflammation. *Eur Respir J.* 1996;9(8):1736–42.
67. Khandoga A, Biberthaler P, Messmer K, Krombach F. Platelet–endothelial cell interactions during hepatic ischemia–reperfusion in vivo: a systematic analysis. *Microvasc Res.* 2003;65(2):71–7.
68. Miranda LEC, Capellini VK, Reis GS, Celotto AC, Carlotti CG, Evora PRB. Effects of partial liver ischemia followed by global liver reperfusion on the remote tissue expression of nitric oxide synthase: lungs and kidneys. *Transplant*

- Proc.* 2010;42(5):1557–62.
69. Chambliss KL, Shaul PW. Estrogen modulation of endothelial nitric oxide synthase. *Endocr Rev.* 2002;23(5):665–86.
70. Zhang Y-Q, Ding N, Zeng Y-F, Xiang Y-Y, Yang M-W, Hong F-F, et al. New progress in roles of nitric oxide during hepatic ischemia reperfusion injury. *World J Gastroenterol.* 2017;23(14):2505–10.
71. Caulin-Glaser T, García-Cardena G, Sarrel P, Sessa WC, Bender JR. 17β -Estradiol regulation of human endothelial cell basal nitric oxide release, independent of cytosolic Ca^{2+} mobilization. *Circ Res.* 1997;81(5):885–92.
72. Tavares-De-Lima W, Breithaupt-Faloppa AC, Fantozzi ET, Assis-Ramos MM, Vitoretti LB, Couto GK, et al. Protective effect of estradiol on acute lung inflammation induced by an intestinal ischemic insult is dependent on nitric oxide. *Shock.* 2013;40(3):203–9.
73. Spyridopoulos I, Sullivan AB, Kearney M, Isner JM, Losordo DW. Estrogen-receptor-mediated inhibition of human endothelial cell apoptosis. *Circulation.* 1997;95(6):1505–14.
74. Vieira RF, Breithaupt-Faloppa AC, Matsubara BC, Rodrigues G, Sanches MP, Armstrong-Jr. R, et al. 17β -Estradiol protects against lung injuries after brain death in male rats. *J Hear Lung Transplant.* 2018;37(11):1381–7.
75. Cheng MX, Cao D, Chen Y, Li JZ, Tu B, Gong JP. A-Ketoglutarate attenuates ischemia-reperfusion injury of liver graft in rats. *Biomed Pharmacother.* 2019;111:1141–6.

76. Yang X, Qin L, Liu J, Tian L, Qian H. 17β -Estradiol protects the liver against cold ischemia/reperfusion injury through the Akt kinase pathway. *J Surg Res.* 2012;178(2):996–1002.

Apêndice

Journal of Vascular Surgery

17 β -ESTRADIOL PROTECTIVE EFFECTS ON COAGULATION AND SYSTEMIC INFLAMMATION AFTER TOTAL OCCLUSION OF THE DESCENDING AORTA IN MALE RATS

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	17 β -ESTRADIOL PROTECTIVE EFFECTS ON COAGULATION AND SYSTEMIC INFLAMMATION AFTER TOTAL OCCLUSION OF THE DESCENDING AORTA IN MALE RATS
Short Title:	PROTECTIVE EFFECTS OF 17 β -ESTRADIOL ON ISCHEMIA/REPERFUSION INJURY
Article Type:	Clinical Paper
Section/Category:	
Corresponding Author:	Luiz Felipe P. Moreira, M.D., Ph.D. Heart Institute (Incor), University of Sao Paulo Medical School São Paulo, São Paulo BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Heart Institute (Incor), University of Sao Paulo Medical School
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Marcelo Luiz Peixoto Sobral, MD
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Marcelo Luiz Peixoto Sobral, MD Ricardo Ribeiro Dias, MD, Ph.D Cristiano Jesus Correia, Ph.D Raphael Santos Coutinho e Silva, BS Lucas Ferreira Anunciação, BS Ana Cristina Breithaupt-Faloppa, Ph.D Luiz Felipe Pinho Moreira, MD, Ph.D
Order of Authors Secondary Information:	
Opposed Reviewers:	
Author Comments:	November 26th, 2020 Peter Gloviczki, MD Editor-in-Chief, Journal of Vascular Surgery Dear Dr. Gloviczki: Please, consider our manuscript entitled "PROTECTIVE EFFECTS OF 17 β -ESTRADIOL AFTER TOTAL OCCLUSION OF THE PROXIMAL PORTION OF DESCENDING AORTA IN MALE RATS" for publication in Journal of Vascular Surgery as an original research. Our study describes the protective effects of 17 β -estradiol in preventing coagulation alterations and systemic inflammation due to aortic occlusion induced I/R in rats. Our data add important information through thromboelastometry analysis and corroborate with previous findings showing that estradiol prevent mortality and preserve intestinal integrity. We believe that the findings of this study are relevant to the scope of your

	<p>journal and could be of interest to the readers of this journal. This manuscript has not been published and is not under consideration by another journal. The study design was approved by the appropriate ethics review boards. All the authors are in agreement with the content of the manuscript and agree with submission to your esteemed journal. All funding sources and acknowledgements have been written into the main body of the manuscript. There are no conflicts of interest to declare.</p> <p>Thank you for your consideration. I look forward to hearing from you.</p> <p>Sincerely,</p> <p>Luiz Felipe Pinho Moreira, MD, PhD Laboratório Cirúrgico de Pesquisa Cardiovascular (LIM/11), Instituto do Coração (INCOR), Hospital das Clinicas HC-FMUSP- Universidade de São Paulo, Av. Dr. Arnaldo, 455 2° andar, sala 2146, São Paulo 01246-903, Brasil. Tel.: +551126615656; fax: +551130617178. E-mail address: luiz.moreira@incor.usp.br (L.F.P. Moreira).</p>	
Additional Information:		
Question	Response	
<p>Clinical Practice Guidelines (Recent, relevant guidelines from any society or group)</p> <p>I have included a short paragraph in the discussion (or in the introduction) placing this study into appropriate perspective with the most recent clinical practice guidelines, where a relevant guideline exists.</p>	<p>True</p>	
Funding Information:	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (2016/14025-3)	Ricardo Ribeiro Dias

Original article

17 β -ESTRADIOL PROTECTIVE EFFECTS ON COAGULATION AND SYSTEMIC INFLAMMATION AFTER TOTAL OCCLUSION OF THE DESCENDING AORTA IN MALE RATS

Marcelo Luiz Peixoto Sobral MD¹, Ricardo Ribeiro Dias MD, Ph.D², Cristiano de Jesus Correia Ph.D¹, Raphael dos Santos Coutinho e Silva BS¹, Lucas Ferreira da Anunciação BS¹, Ana Cristina Breithaupt-Faloppa Ph.D¹, Luiz Felipe Pinho Moreira MD Ph.D¹.

¹Laboratorio de Cirurgia Cardiovascular e Fisiopatologia da Circulação (LIM-11), Instituto do Coração (InCor), Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

²Instituto do Coração (InCor), Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

Corresponding author and post publication corresponding author:

Luiz Felipe Pinho Moreira, MD, PhD

Laboratório de Cirurgia Cardiovascular e Fisiopatologia da Circulação (LIM/11) - HC-FMUSP
University of São Paulo

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

E-mail: luiz.moreira@incor.usp.br

Poster presentation: 57th Annual Meeting of the eastern Cardiothoracic Surgical Society

Keywords: Ischemia and Reperfusion, 17 β -estradiol, Coagulation, Inflammation, Thromboelastometry, Rat.

TABLE OF CONTENTS SUMMARY

The prophylactic therapeutic approach with 17 β -estradiol after occlusion of the descending proximal aorta in male rats presented benefits on coagulation profile and systemic inflammatory process.

17 β -estradiol could be considered as a potential therapeutic tool to prevent deleterious effects due to surgical aortic occlusion.

ARTICLE HIGHLIGHTS

Type of Research: Basic science

Key Findings: Aortic I/R induced higher platelet aggregation, and 17 β -estradiol treatment prevented this effect ($p=0.0206$). Systemic release of IL-1- β , IL-6, and IL-10 was increased in the IR group and was reduced in treated animals ($p\leq 0.05$).

Take home Message: 17 β -estradiol may be a potential therapeutic tool to prevent deleterious effects of surgical aortic occlusion.

ABSTRACT

Objective: The surgical treatment for descending aorta pathologies is related to a high mortality rate as a consequence of the activation of a systemic inflammatory process due to ischemia and reperfusion (I/R) injury. Activation of coagulation can contribute to the inflammatory process, resulting in microcirculatory damage and multiple organ failure. Here, we aimed to evaluate the benefits of prophylactic intravenous 17β -estradiol in coagulation, inflammatory response, and hepatic injury after the occlusion of the descendent proximal aorta in male rats.

Methods: Wistar male rats were randomized and allocated to three groups: Sham, surgically manipulated; IR, animals subjected to I/R; and E2, animals treated with 17β -estradiol (E2, 280 mg/kg, intravenous) before I/R. Serological markers, platelet aggregation, hepatic microcirculatory parameters, vascular and inflammatory response, and apoptosis were analyzed. The coagulation process was evaluated by thromboelastometry.

Results: The aortic occlusion led to a reduction in plasma fibrinogen concentration in parallel with increased clotting time, higher clot firmness, and reduced lysis. E2 treatment was able to increase fibrinogen, prevent the increase in clotting time, and normalize clot firmness, but it exerted only a mild effect on clot lysis. Platelet aggregation was increased by IR and E2 treatment was able to reduce it. There was a reduction in flow percentage in the IR group, which was not prevented by E2. In parallel, higher aggregate formation was observed in the vessels of IR-group animals. Regarding the systemic inflammatory markers, there was increased systemic release of interleukin-1- β , interleukin-6, and interleukin-10 in the IR group, which was reduced in treated animals.

Conclusions: The current results suggest that pre-treatment with 17β -estradiol before an ischemic period induced by occlusion of the proximal descending aorta is effective in preventing coagulation alterations and systemic inflammation due to I/R injury.

Clinical relevance: Our data corroborate the findings of previous studies showing that 17β -estradiol could be considered as a potential therapeutic tool to prevent deleterious effects due to surgical aortic occlusion.

INTRODUCTION

Despite continuous advancements in the treatment of aortic diseases, the open surgical approach to descending aorta treatment carries a high mortality rate¹, which is related to the activation of systemic inflammatory processes due to ischemia and reperfusion (I/R) injury². The I/R process is associated with vascular alterations, including increased vascular permeability, endothelial cell activation, an imbalance between vasodilating and vasoconstricting factors, and activation of coagulation and the complement system³. Coagulation activation in concert with inflammatory processes can cause microcirculatory damage and contribute to multiple organ failure. The main blood coagulation factors are produced by the liver and secreted in blood in active forms⁴. The effects of I/R-induced liver injury include microcirculatory dysfunction, reactive oxygen species (ROS) generation, Kupffer cell activation, and calcium overload, resulting in liver dysfunction, which can affect the coagulation process⁵.

Some studies have examined possible therapeutic approaches to decrease the impact of I/R injury. In experimental studies, female sex hormones affected vascular and immune responses and reduced the overall repercussions of I/R processes^{6,7}. Experimental data also show cardioprotective and hepatic effects of estradiol and progesterone⁸. In mesenteric ischemia and intestinal bowel injury induced by aortic clamping, 17 β -estradiol prevented compromised blood flow and perfusion and reduced intestinal injury². Here, we evaluate the benefits of prophylactic intravenous 17 β -estradiol in coagulation, the inflammatory response, and hepatic injury after occlusion of the descendent proximal aorta in male rats.

MATERIALS AND METHODS

Animals

In total, 48 male 8-week-old Wistar rats weighing 250–350 g from our institutional animal facilities were used in experiments. Rats were housed (12:12-h light-dark cycle, 21±2°C) with free access to food and water. All animals received humane care under the ethical principles for animal research adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation and the Principles of Laboratory Animal Care (National Society of Medical Research). The Animal Subject Committee of Sao Paulo University Medical School approved the experimental protocol under number SDC 4444/16/110.

Study groups

Animals were randomized into three groups: 1) Sham (n=8): submitted to surgery without inducing I/R injury; 2) I/R (n=8): induced ischemia of the left descending aorta for 20 min with 120 min of reperfusion; 3) E2 (n=8): induced ischemia of the descending aorta for 20 min, with 120 min of reperfusion and treated with 17β-estradiol (280 µg/kg, intravenous) 30 min prior to aortic occlusion.

Anesthesia and ischemia and reperfusion Model

Anesthesia was induced with 5% isoflurane in a closed chamber, and rats were intubated; mechanically ventilated with a volume control ventilator (Harvard Apparatus, Inc., Holliston, MA, USA) with a tidal volume of 10 mL/kg, frequency of 70 breaths/min, and oxygen fraction of 60%; and then maintained with 2% isoflurane. During reperfusion, animals received a 0.9% saline solution as a volume replacement at 20 mL/kg/h. A catheter for proximal arterial pressure (PAP) was inserted in the left common carotid toward the skull and maintained throughout the procedure. A second Fogarty 2F catheter was inserted in the left common carotid to reach the

descending aorta (11 ± 1 mm in caudal direction), and then was dragged into position at the left common artery ostium while partially inflated, allowing for the occlusion of the important collateral circulation vessel, the subclavian left artery. When in position, the catheter was fully inflated (saline solution at 90 ± 10 μ L), thus occluding the aorta. Ischemia was confirmed by observing distal pressure arterial mean at approximately 10 mmHg. After 120 min of reperfusion, animals were euthanized by exsanguination via the abdominal aorta, and blood and hepatic tissue samples were collected.

White blood cell (WBC) and platelet counts

Blood samples (20 μ L) were collected, and WBC and platelet numbers were obtained at baseline (Initial; 0 min) and following the experiment (Final; 120 min) by an automatic hematology analyzer (Mindray BC 2800 Vet, Shenzhen, China).

Platelet aggregation assay

For platelet aggregation analysis, blood samples were collected in 3.2% sodium citrate and centrifuged to obtain platelet-rich plasma (PRP). The aggregation agent Adenosine diphosphate (ADP) as added, and the assay was performed using AggRAM equipment (Helena Laboratories, Beaumont, TX, USA). Results are presented as the maximum aggregation amplitude.

Fibrinogen

Blood samples were collected 120 min after reperfusion to determine the fibrinogen dosage and activation time using the modified Clauss method on the Start 4/Stago equipment (Diagnosis Stago SAS, Asnières-sur-Seine, France). Clauss' method measured the conversion rate of fibrinogen to fibrin in diluted plasma in the presence of excess thrombin. The clotting time is inversely proportional to the fibrinogen concentration (mg/dL).

Whole-blood coagulation by rotational thromboelastometry

Whole-blood coagulation profile was analyzed by rotational thromboelastometry (ROTEM; Pentapharm, Munich, Germany). Blood samples were placed in a tube containing 3.2% sodium citrate and were prewarmed (37°C) in plastic cups connected to ROTEM equipment. The following profiles were analyzed: extrinsic screening test (EXTEM), intrinsic screening test (INTEM), and fibrinogen screening test (FIBTEM) following the manufacturer's instructions. The analyses were processed for 30 min.

Inflammatory response

Inflammatory mediators in serum and liver homogenates (interleukin [IL]-1, IL-6, IL-10) were quantified by multiplex using commercial kits (Milliplex, Millipore, Billerica, MA, USA). The concentration values in serum are expressed as pg/mL, and in liver homogenates, as total protein levels (pg/mg).

Serological markers

Aspartatoaminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), and lactate dehydrogenase (LDH) were measured by an automated ultraviolet kinetic method using COBAS C111 equipment (ROCHE, Indianapolis, IN, USA) according to the recommendations of the International Federation of Clinical Chemistry. At 120 min after reperfusion, coagulation test samples were collected in sodium citrate tubes and centrifuged for 15 min at 4°C and 4,500 rpm.

Liver flow and intravital-microscopic evaluation of leukocyte infiltrate and aggregate formation

Following the reperfusion period, while maintaining anesthesia, an incision was made at the linea alba to expose the liver. Liver blood flow was analyzed at five surface areas per animal

using an MSP310XP miniature surface probe (12 mm diameter, 5 mm thickness; AD Instruments, Colorado Springs, CO, USA) attached to a laser flowmeter (IN191 Laser Doppler flowmetry; AD Instruments). The blood flow represents the flow of a microcirculatory area comprising vessels of various diameters (1st- to 3rd-order vessels).

The leukocyte count in liver tissues was determined after infusing rhodamine 6G in an epifluorescence intravital microscopy system (Carl Zeiss, Germany). The amount of platelet aggregate formation was evaluated using an anti-CD49B fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated antibody (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) infused via the jugular vein. The degree of platelet aggregation inside microvessels with a diameter <30 µm in areas of 0.2 mm² was scored (0, no aggregation; 1, mild aggregation with normal flow; 2, mild aggregation with impaired flow; 3, severe aggregation with impaired flow). All videos were recorded in 20× magnification.

Endothelial adhesion molecules, endothelial nitric oxide synthase (eNOS), and endothelin-1 (ET) expression

After 120 min of reperfusion, the left liver lobe was removed, immersed in hexane under liquid nitrogen, and stored at -80°C. Serial sections of 8 µm were placed on organosilane-coated glass slides (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) and fixed in cold acetone for 10 min. To evaluate protein expression, immunohistochemical analyses were conducted. Slides were washed with TRIS-saline-tween buffer solution (TBS-T), followed by blocking of nonspecific sites with blocking buffer (Superblock, Thermo Scientific, Chicago, IL, USA) and blocking of endogenous peroxidase (2% H₂O₂ solution). For the immunodetection of adhesion molecules (ICAM-1, P-selectin), sections were incubated with primary anti-mouse ICAM-1 antibody (CD54, Abcam, Cambridge, USA) and human anti-P-selectin (CD62P, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) diluted in TBST solution containing 1% bovine serum albumin (BSA)

at 1:100 and 1:40, respectively. For eNOS and endothelin-1 immunodetection, primary antibodies (Abcam) diluted at 1:100 in TBST solution containing 1% BSA were used. Analyses were performed using an image acquisition system with a DS-Ri1 digital camera (Nikon, Tokyo, Japan) coupled with a fluorescence microscope (Nikon) and using NIS-Elements-BR (Nikon) software.

To evaluate gene expression, real-time PCR was performed using a Step One Plus device (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Liver tissue RNA was extracted using a commercial kit (Mirvana, Ambion, Waltham, MA, USA), following the manufacturer's protocol. The cDNA was transcribed (High-capacity reverse-transcriptase kit, Applied Biosystems), and real-time PCR was performed. The cycling conditions were: 2 min at 50°C, 10 min at 95°C, and 40 cycles of 15 s at 95°C and 1 min at 60°C. The following TaqMan primers (Applied Biosystems) were used: GAPDH (Rn01775763_g1), β -actin (Rn00667869_m1 *), eNOS (Rn02132634_s1 *), endothelin 1 (Rn00561129_m1*).

Caspase-3 and BCL-2 expression

Serial liver sections (8 μ m) fixed in acetone were blocked using 2% BSA in TBS-T. Endogenous peroxidase was blocked (2% H₂O₂ solution) for 15 min at room temperature, and the sections were incubated for 1 h at 37°C with primary antibodies: anti-Caspase3 (1:200; Abcam) and anti-BCL-2 (1:100; Abcam). After rinsing in TBS-T, the sections were incubated with secondary horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit antibodies (1:200; Millipore) for 2 h at 37°C. After washing with TBST, the slides were incubated with 3-amino-9-ethylcarbazole substrate solution for 5–10 min and counterstained with Mayer's hematoxylin. Negative control samples were incubated in absence of primary antibodies. Images were acquired with a digital camera (DSRi1, Nikon, Tokyo, Japan) connected to a microscope

(Nikon) and analyzed using computer-image software (NIS-Elements BR, Nikon). The results are presented as the stained area/total area.

Statistical Analysis

All data are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM). Data were analyzed by analysis of variance followed by Tukey's multiple comparison tests. Abnormally distributed data were analyzed using the Kruskal-Wallis test followed by a post-hoc Dunn multiple comparison test. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism Software v.8.3.1.

RESULTS

Treatment with 17 β -estradiol (E2, 280 μ g/kg) was able to increase E2 serum concentration following the experiments. Treated animals had higher 17 β -estradiol levels compared to other groups (Sham: 68.8 \pm 24.96 pg/mL; IR 112.4 \pm 42.1 pg/mL; E2: 2257 \pm 229.8 pg/mL (p >0.0001).

Total WBC counts

Table 1 shows the WBC counts before and after aortic I/R induction. The results indicated that surgical manipulation with or without I/R led to a mobilization of leukocytes, especially granulocytes and monocytes. Estradiol treatment did not influence this cell influx to the blood.

Platelet blood counts and aggregation

Platelet numbers in blood were not altered between groups or over time (Figure 1a). However, the platelet aggregation assay indicated that aortic I/R induced higher platelet aggregation, and 17 β -estradiol treatment prevented this effect (Figure 1b).

Fibrinogen analysis

To evaluate the elements involved in aggregate formation, fibrinogen levels and activity were quantified (Table 2). The IR group showed a lower fibrinogen concentration leading to a longer time for fibrin thread formation. Moreover, 17 β -estradiol increased the fibrinogen concentration, thus decreasing the fibrin thread formation time.

Evaluation of coagulation process and the effects of E2 treatment

Table 3 presents the results of ROTEM analysis. The EXTEM clotting time was increased in the IR group, which was reduced by 17 β -estradiol E2 treatment. INTEM evaluation indicated aortic I/R increased the clot firmness; this parameter was maintained similarly in sham and

treated groups. The IR group also showed increased maximum clot firmness and reduced maximum lysis, but treatment had mild effects.

Systemic inflammatory markers

Figure 2 presents the serum concentrations of inflammatory mediators after aortic I/R. Systemic release of IL-1- β , IL-6, and IL-10 was increased in the IR group and was reduced in treated animals.

Effects of estradiol on liver injury markers

Figure 3 shows increases in liver injury markers AST, ALT, and LDH induced by aortic I/R. Estradiol treatment was unable to prevent these increases.

Effects of estradiol on liver microcirculation

The analysis of hepatic flow 2 h after reperfusion indicated a reduced flow percentage, which was not prevented in the E2 group. Similarly, higher aggregate formation was observed in the vessels of IR animals. The treatment did not alter vascular aggregate formation (Figure 4).

E2 effects on endothelial adhesion molecules and leukocyte infiltration to the liver

Figure 5 shows the protein expression of P-selectin (a) and ICAM-1 (b) in liver tissues of rats with or without aortic I/R injury. P-Selectin expression increased in the IR group and was reduced by 17 β -estradiol treatment. ICAM-1 expression was not altered by I/R or E2. Similarly, we observed no differences in leukocyte infiltration among the groups (c).

Effects of aortic I/R on liver eNOS and ET expression

To evaluate the endothelial repercussions of aortic I/R in the liver, we analyzed the gene and protein expression of eNOS and ET (Figure 6). The data indicated that I/R had no effects on

eNOS and ET gene expression. However, the eNOS protein level was reduced in the livers of IR group animals, and 17 β -estradiol was able to prevent this reduction.

Inflammatory mediators and liver cell apoptosis markers

Inflammatory mediators showed no differences in liver tissues (Table 4). To evaluate liver cell apoptosis, we quantified the expression of caspase-3 and BCL-2, which are markers of cell-programmed death processes. The results revealed a reduction in caspase-3 after I/R, with no effects observed in the E2 group. Moreover, expression of the antiapoptotic protein BCL-2 was decreased by I/R and increased by 17 β -estradiol (Figure 7).

DISCUSSION

After I/R events, systemic response occurs involving endothelial activation, inflammatory mediator synthesis, and immune cell mobilization. Among the changes induced by the I/R process, systemically released factors interact with platelets and leukocytes, activated platelets increase their interaction with the endothelium, and coagulation factors are triggered⁹. We found higher *in vitro* platelet aggregation following I/R injury, excessively firm clots, and reduced clot lysis. Similarly, systemic concentrations of inflammatory mediators were increased. Preventive treatment with 17 β -estradiol was able to reduce platelet aggregation, restore clotting lysis, and reduce cytokine serum concentrations. The use of 17 β -estradiol treatment was based on previous study using the same model with aortic occlusion, in which the beneficial effects of estradiol on mesenteric and bowel injury were observed with the preservation of mesenteric blood flow, improvement in intestinal mucosal integrity, and reduction in inflammation².

Administration of 17 β -estradiol can promote vasodilation, regulate platelet function, and reduce the proliferation of vascular smooth muscle¹⁰. Since platelets express estrogen

receptors¹¹, estrogens may affect their function. Following severe injury, females present a survival benefit and differential platelet performance, which may be related to distinct responses to ADP, PAF, and P2Y receptor signaling¹². Estrogen was shown to inhibit platelet function *in vitro* and *in vivo*¹³⁻¹⁶. Wu et al. (2010) showed that 17 β -estradiol inhibits platelet activation via cyclic AMP-eNOS/NO-cyclic GMP and inhibition of PLC γ 2 and p38 MAPK phosphorylation in washed platelets *in vitro*¹⁶. It is possible that exposure of circulating platelets to high levels of 17 β -estradiol *in vivo* may have the same effect as supra-physiological levels of 17 β -estradiol *in vitro*, thus reducing platelet activation.

The reestablishment of blood flow by reperfusion enhances ischemia-induced injury, thereby aggravating cellular-level damage. I/R triggers clotting by inflammatory mediators and platelet activation in several pathways¹⁷⁻¹⁹. Endothelial injury decreases anticoagulant levels and increase those of pro-coagulants, which trigger platelet aggregation and thrombosis²⁰. Moreover, platelets also contribute to increased inflammation during reperfusion and are released in a milieu optimal for activation²¹. Bester & Pretorius showed that adding IL-1 β , IL-6, and IL-8 to whole blood causes platelet hyper-activation with pronounced spreading and clumping. IL-1 β acts as a procoagulant by impairing protein C activity²². Release of IL-1 β supports IL-6 synthesis, which influences the production of fibrinogen and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), among other procoagulant factors, while downregulating anti-thrombin production, leading to a hypofibrinolytic state^{23,24}. The reperfusion process leads to increased inflammation, resulting in the release of acute-phase reactant proteins including fibrinogen, prothrombin, factor VIII, and von Willebrand factor. Fibrinogen affects clotting time; therefore, its accumulation might directly contribute to platelet recruitment during post-ischemic reperfusion. Fibrinogen forms the fibrin network via thrombin action, in which leukocytes, erythrocytes and platelets are included to form thrombi. Increased microthrombi in the post-ischemic microvasculature might significantly contribute to the manifestation of I/R

injury once platelets release proinflammatory mediators and modulate leukocyte function²⁵. Our intravital microscopy results showed increased microthrombi formation in I/R-group livers, although no significant effect of 17β -estradiol treatment was observed.

The results suggest that 17β -estradiol increases the fibrinogen activity and concentration. Acute estrogen administration causes a slight but insignificant increase in fibrinogen clotting time (or decreases plasma fibrinogen levels) in rabbits²⁶. Here, 17β -estradiol treatment increased clot firmness during FIBTEM analysis. Studies indicated that 17β -estradiol acts as a regulator for blood coagulation factor genes, inducing transcription of factors, such as FXII (Hageman factor), involved in fibrinolysis, kinin production, and the inflammatory process, thereby playing an essential role in the activation of proteolytic pathways of the coagulation cascade²⁷. The results here also indicate that 17β -estradiol maintaining lysis levels, which were reduced in INTEM analysis after IR. Estradiol therapy enhances fibrinolysis in ovariectomized female rats by increasing plasminogen activator activity²⁸.

Previous study showed reduced microcirculatory mesenteric blood flow after induction of aortic I/R. As liver functions are an important buffer between gut contents and systemic circulation, we evaluated liver microvascular perfusion along with coagulation analysis. In the liver, the low-pressure blood flow, fenestrated endothelium, and lack of a basement membrane enable close interactions between resident immune cells and non-hematopoietic hepatic cells²⁹. In addition to decreased venous blood flow, oxygen tension from ischemia also results in the upregulation of multiple stress-response genes, including hypoxia-inducible factor, P-selectin, and other genes responsible for pro-coagulant proteins. P-selectin is stored in intracellular granules of endothelial cells, and platelets and can be rapidly mobilized to the cell surface in response to various stimuli independent of de novo mRNA or protein synthesis³⁰. Our results showed increased P-selectin expression in the livers of I/R-group rats associated with reduced hepatic blood flow and increased microthrombi formation. These events could be related to

aortic I/R-induced alterations in coagulation. The liver presents a particular anatomical structure with a vascular system with two inflows, a diverse resident immune cell population, and a state of constant stimulation. These characteristics determine the balance between tolerance and inflammation in healthy livers. The inflammatory mediator concentrations found in the liver tissue homogenates suggest that the liver is not in an inflammatory state after aortic I/R, as the measured cytokines were not altered. In contrast, our results indicated an increase in hepatic enzymes in the I/R group, but changes in transaminase levels due to handling and diagnostic procedures conducted on animals may represent a response to general physical perturbations and do not directly correlate to specific hepatic injury³¹. For instance, LDH is a highly sensitive tissue damage marker³², but it cannot be considered tissue-specific, and its elevation could be related to gut injury².

The protective cardiovascular role of 17β -estradiol is based on nitrogen oxide (NO) signaling through estradiol receptor activation³³. NO is the most important local vasodilator, and reduced NO synthesis during early liver damage due to reperfusion causes a decrease in blood flow and enhances the resulting changes³⁴. Importantly, estradiol mediates NO generation via eNOS³³. Liver eNOS expression was reduced in the I/R group, and 17β -estradiol treatment prevented this decrease. These effects were observed at the level of proteins, not genes, suggesting the rapid action of estradiol via non-genomic pathways. Another important protective action of 17β -estradiol observed here was the increase in liver BCL-2 expression in the treated group, which avoided the reduction in BCL-2 after I/R.

This study has some limitations. Although this model induces a similar situation to that observed in humans treated to correct descending aorta aneurysms, it does not fully simulate the surgical procedure, limiting the studied mechanisms to those specifically related to the I/R injury. Furthermore, the I/R periods used here were insufficient to induce relevant hepatic injury, making it difficult to define the effects of 17β -estradiol on changes in liver.

The current investigation suggests that pre-treatment with 17β -estradiol before an ischemic period induced by occlusion of the proximal descending aorta seems to be effective in preventing coagulation alterations and systemic inflammation due to I/R injury. Thus, our data corroborate previous findings showing that 17β -estradiol may be a potential therapeutic tool to prevent deleterious effects of surgical aortic occlusion.

Authorship: MLPS and CJC: designed and performed the study, analyzed the data, and wrote the manuscript. RSCS and LFA: contributed to the collection and analysis of data. RRD, ACBF and LFPM: designed the study, analyzed data, and wrote the manuscript.

Disclosure: The authors declare no conflicts of interest.

Funding: *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo* (FAPESP 2016/14025-3).

REFERENCES

1. Tian DH, Wan B, Di Eusanio M, Black D, Yan TD. A systematic review and meta-analysis on the safety and efficacy of the frozen elephant trunk technique in aortic arch surgery. *Ann Cardiothorac Surg.* 2013;2(5):581–91
2. Rocha de Sousa PT, Breithaupt-Faloppa AC, Correia C de J, Simao RR, Ferreira SG, Fiorelli AI, et al. 17β -Estradiol prevents mesenteric injury induced by occlusion of the proximal descending aorta in male rats. *J Vasc Surg.* 2017;(1):1–10
3. Eltzschig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation. *Nat Med [Internet].* 2011 Nov 7;17(11):1391–401
4. Levi M. Infection and inflammation and the coagulation system. *Cardiovasc Res.* 2003 Oct 15;60(1):26–39. doi/10.1016/S0008-6363(02)00857-X
5. Ogawa K, Kondo T, Tamura T, Matsumura H, Fukunaga K, Murata S, et al. Interaction of Kupffer Cells and Platelets Determines the Severity of Ischemia-Reperfusion Injury in Steatosis. *Tohoku J Exp Med.* 2014;232(2):105–13
6. Li W, Li D, Sun L, Li Z, Yu L, Wu S. The protective effects of estrogen on hepatic ischemia-reperfusion injury in rats by downregulating the Ang II/AT1R pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018 Sep;503(4):2543–8.
7. Breithaupt-Faloppa AC, Thais Fantozzi E, Romero DC, Rodrigues ADS, De Sousa PTR, Lino Dos Santos Franco A, et al. Acute effects of estradiol on lung inflammation due to intestinal ischemic insult in male rats. *Shock.* 2014;41(3):208–13.
8. Jarrar D, Wang P, Knöferl MW, Kuebler JF, Cioffi WG, Bland KI, et al. Insight into the mechanism by which estradiol improves organ functions after trauma-hemorrhage.

- Surgery. 2000 Aug;128(2):246–52.
9. Schanze N, Bode C, Duerschmied D. Platelet Contributions to Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury. *Front Immunol.* 2019 Jun 6;10.
 10. Mikkola TS, Savolainen-Peltonen H, Venetkoski M, Ylikorkala O. New evidence for cardiac benefit of postmenopausal hormone therapy. *Climacteric.* 2017 Jan 2;20(1):5–10
 11. G Khetawat , N Faraday, M L Nealen, K V Vijayan, E Bolton, S J Noga PFB. Human megakaryocytes and platelets contain the estrogen receptor beta and androgen receptor (AR): testosterone regulates AR expression. *Blood.* 2000;95(7):2289–96.
 12. Dyall J, Coleman CM, Hart BJ, Venkataraman T, Holbrook MR, Kindrachuk J, et al. Repurposing of clinically developed drugs for treatment of Middle East respiratory syndrome coronavirus infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(8):4885–93.
 13. Nakano Y, Oshima T, Matsuura H, Kajiyama G, Kambe M. Effect of 17 β -Estradiol on Inhibition of Platelet Aggregation In Vitro Is Mediated by an Increase in NO Synthesis . *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998 Jun;18(6):961-7. doi: 10.1161/01.atv.18.6.961. PMID: 9633938.
 14. J Bar , J Lahav, M Hod, Z Ben-Rafael, I Weinberger JB. Regulation of platelet aggregation and adenosine triphosphate release in vitro by 17beta-estradiol and medroxyprogesterone acetate in postmenopausal women. *Thromb Haemost.* 2000;84(4):695–700
 15. Jayachandran M, Karnicki K, Miller RS, Owen WG, Korach KS, Miller VM. Platelet Characteristics Change With Aging: Role of Estrogen Receptor. *Journals Gerontol Ser A Biol Sci Med Sci.* 2005 Jul 1;60(7):815–9

16. Wu C-C, Wu S-Y, Liao C-Y, Teng C-M, Wu Y-C, Kuo S-C. The roles and mechanisms of PAR4 and P2Y₁₂/phosphatidylinositol 3-kinase pathway in maintaining thrombin-induced platelet aggregation. *Br J Pharmacol*. 2010 Oct;161(3):643–58. doi 10.1111/j.1476-5381.2010.00921.x
17. Moser M, Nieswandt B, Ussar S, Pozgajova M, Fässler R. Kindlin-3 is essential for integrin activation and platelet aggregation. *Nat Med*. 2008 Mar 17;14(3):325–30.
18. Müller F, Mutch NJ, Schenk WA, Smith SA, Esterl L, Spronk HM, et al. Platelet Polyphosphates Are Proinflammatory and Procoagulant Mediators In Vivo. *Cell*. 2009 Dec;139(6):1143–56.
19. Xu J, Lupu F, Esmon CT. Inflammation, innate immunity and blood coagulation. *Hamostaseologie*. 2010;30:5–6. 8–9.
20. Janicek Mj, Van Den Abbeele Ad, Hollenberg Nk, Kassis Ai, Holman Bl, Tumeh Ss. Platelet Activation and Aggregation After Endothelial Injury; Assessment with Indium-111-Labeled Platelets and Angiography. *Invest Radiol*. 1990 Sep;25(9):988–93.
21. Maiocchi S, Alwis I, Wu M, Yuan Y, Jackson S. Thromboinflammatory Functions of Platelets in Ischemia–Reperfusion Injury and Its Dysregulation in Diabetes. *Semin Thromb Hemost* [Internet]. 2018 Mar 2;44(02):102–13. doi10.1055/s-0037-1613694
22. Bester J, Pretorius E. Effects of IL-1 β , IL-6 and IL-8 on erythrocytes, platelets and clot viscoelasticity. Vol. 6, *Scientific Reports*. 2016.
23. R W Niessen , R J Lamping, P M Jansen, M H Prins, M Peters, F B Taylor Jr, J J de Vijlder, J W ten Cate, C E Hack AS. Antithrombin acts as a negative acute phase protein as established with studies on HepG2 cells and in baboons. *Thromb Haemost*. 1997;78(3):1088–92.

24. Dong J, Fujii S, Imagawa S, Matsumoto S, Matsushita M, Todo S, et al. IL-1 and IL-6 induce hepatocyte plasminogen activator inhibitor-1 expression through independent signaling pathways converging on C/EBP δ . *Am J Physiol - Cell Physiol*. 2007;292(1):209–15.
25. S Massberg , G Enders, R Leiderer, S Eisenmenger, D Vestweber, F Krombach KM. Platelet-endothelial cell interactions during ischemia/reperfusion: the role of P-selectin. *Blood*. 1998;92(2):507–15.
26. Ercan M, Yeğln E, Akdenlz H, Irmak H, Bayirođlu F, Tuncer I. Effect of estrogen on fibrinogen clotting time in rabbits. *Turkish J Vet Anim Sci*. 1998;22(2):137–40.
27. Cushman M. Effects of hormone replacement therapy and estrogen receptor modulators on markers of inflammation and coagulation. *Am J Cardiol*. 2002;90(1 SUPPL. 1):F7–10.
28. T Kojima , K Doi, M Kish YH. Sex-related differences in plasminogen activator and plasminogen activator inhibiting activities in young and aged rats. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* . 1999;104(1):81–91.
29. Robinson MW, Harmon C, O’Farrelly C. Liver immunology and its role in inflammation and homeostasis. *Cell Mol Immunol [Internet]*. 2016 May 11;13(3):267–76.
30. Hattori R, Hamilton KK, Fugate RD, McEver RP, Sims PJ. Stimulated secretion of endothelial von Willebrand factor is accompanied by rapid redistribution to the cell surface of the intracellular granule membrane protein GMP-140. *J Biol Chem*. 1989;264(14):7768–71.
31. Everds NE. Evaluation of Clinical Pathology Data:Correlating Changes with Other Study Data. *Toxicol Pathol*. 2015;43(1):90–7.

32. Drent M, Cobben NAM, Henderson RF, Wouters EFM, Van Dieijen-Visser M. Usefulness of lactate dehydrogenase and its isoenzymes as indicators of lung damage or inflammation. *Eur Respir J.* 1996;9(8):1736–42.
33. Chambliss KL, Shaul PW. Estrogen modulation of endothelial nitric oxide synthase. *Endocr Rev.* 2002;23(5):665–86.
34. Zhang Y-Q, Ding N, Zeng Y-F, Xiang Y-Y, Yang M-W, Hong F-F, et al. New progress in roles of nitric oxide during hepatic ischemia reperfusion injury. *World J Gastroenterol.* 2017;23(14):2505.

Journal of Vascular Surgery® Journals Application for Publication

By submitting this manuscript, each author certifies that they have participated to a sufficient degree to take public responsibility for the work and believes that the manuscript describes truthful facts. Each author also allows the **corresponding author**, who is responsible for ensuring that all authors have viewed and approved the final manuscript files and forms and is also responsible for communicating with the Editorial Office and the Publisher regarding the submission, peer-review, revision, and publication of this manuscript, to make decisions regarding the submission of the manuscript to the Journal, changes to galley proofs, and prepublication release of information in the manuscript to the media, federal agencies, or both.

Corresponding Author Name: Luiz Felipe Pinho Moreira, MD, PhD

Manuscript Title: 17β-ESTRADIOL PROTECTIVE EFFECTS ON COAGULATION AND SYSTEMIC INFLAMMATION AFTER TOTAL OCCLUSION OF THE DESCENDING AORTA IN MALE RATS

Author to Correspond with Readers (name/address to be published with final manuscript)

Name: Luiz Felipe Pinho Moreira, MD, PhD

Email Address: luiz.moreira@incor.usp.br

Mailing Address: Av. Dr. Arnaldo, 455 2º andar - sala 2146 - 01246-903 São Paulo, Brazil

Originality of Research

Please select **one** option:

1. The authors certify that this manuscript is original, has been written by the stated authors, has not been published previously, and is not under consideration for publication by another journal.
2. Parts of the work or patient data included in this manuscript have been previously published. The authors have disclosed this information explicitly in the manuscript. In addition, the authors have received approval to submit previously published data from the Editor-in-Chief. **If you select this option, you must answer 2A.**

2A. Please give a detailed description of the previously published information below:

Sponsorship

Each author must disclose any sponsor that provided financial support for this work. Such a statement should indicate the details of funding, as well as any involvement by a sponsor of this study in the study design; collection, analysis, and interpretation of data; manuscript writing; or the decision to submit the manuscript for publication. This information must be declared below.

Example: "This work was funded by corporation XYZ. Corporation XYZ had no involvement in the study design; collection, analysis, and interpretation of data; manuscript writing; or the decision to submit the manuscript for publication."

This work was funded by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2016/14025-3)

Off Label Drugs and Devices

The authors must make a meaningful disclosure regarding their discussions of off label or unapproved drugs or devices.

This study does include off label drugs and/or devices. The specific names of the products discussed are:

This study does not include off label drugs and/or devices.

Conflict of Interest Disclosure

The Journal of Vascular Surgery Journals requires that EACH author disclose any personal financial arrangements that might be perceived as a conflict of interest with respect to this study. Conflicts of interest include, but are not limited to:

1. A financial contribution from a company or organization that might benefit (or lose) financially from the results, conclusions or discussion presented in the paper/letter. Examples include, but are not limited to:
Royalties, Patents (or patents pending), fees for consulting, fees for speaking when organized by a corporate sponsored speakers' bureau, funds for a member of the author's staff or family²
2. Stocks, shares or options in a company or organization that might benefit (or lose) financially from the results, conclusion or discussion presented in the paper/letter
3. Commercial interests in the form of any entity producing, marketing, re-selling, or distributing health care goods or services consumed by, or used on, patients
4. Other potential conflicts which could include an academic association or antagonism with someone whose interest might be affected by the publication, membership in a special interest group whose interests might be affected by the paper, or other strong convictions that might have affected what was written.

List conflicts of interest for EACH author below. If there are no conflicts of interest, please state "The authors have no competing interests" in the space below. **Example: "KR has been paid a consulting fee by XYZ Company and is on their speakers' bureau, PW has shares in LMN company, RC received funding for a research assistant from the XYZ Company, JB has no conflicts of interest."**

The authors have no competing interests.

Clinical Trial Registration

The International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) requires that clinical trials be registered in a public trials registry at or before the time of first patient enrollment as a condition of consideration for publication. The ICMJE accepts registration in any registry that is a primary register of the WHO International Clinical Trials Registry Platform (ICTRP) or in ClinicalTrials.gov. Please review the following information and select the option that describes your submission.

A **CLINICAL TRIAL** is defined by the ICMJE as any research project that prospectively assigns people or a group of people to an intervention, with or without concurrent comparison or control groups, to study the cause-and-effect relationship between a health-related intervention *and* a health outcome.

- A. **HEALTH-RELATED INTERVENTIONS** are those used to modify a biomedical or health-related outcome; examples include drugs, surgical procedures, devices, behavioral treatments, educational programs, dietary interventions, quality improvement interventions, and process-of-care changes.
- B. **HEALTH OUTCOMES** are any biomedical or health-related measures obtained in patients or participants, including pharmacokinetic measures and adverse events.

1. This submission meets the criteria for a clinical trial, and the study has been registered in a public trials registry as required by the Journal of Vascular Surgery Publications.
The registration number is:
2. This submission is not a clinical trial. It has not been registered in a public trials registry.
3. This submission meets the criterial for a clinical trial, but it has not been registered in a public trials database. **If you select this option, you must answer 3A.**
3A. Please provide a detailed explanation for why this study has not been registered in a public trials registry.

Certification

As corresponding author, I certify that the information provided on this form is correct, and has been reviewed by each author. Each author has also read the Instructions for Authors, and agrees to follow the policies of the Journal of Vascular Surgery Publications: (Please "sign" electronically by typing your name below)

Electronic Signature:

Date:

IMPORTANT: Mac users must save this form as a PDF. Otherwise the file will be saved automatically as a Preview file. This file type is incompatible and your form will appear blank to the Editorial Office.

Table 1 – Total white blood cell (WBC) counts

	Sham	IR	E2	<i>p</i>
Total WBC				
<i>Initial</i>	14066±1421	11760±1004	12936±1214	
<i>Final</i>	31266±4641 ^α	25479±3401 ^α	26020±3019 ^α	<0.0001

Groups: Sham (no I/R injury), IR (I/R injury), and E2 (I/R injury treated with 17β-estradiol), n=8 per group. Data are presented as the mean ± SEM. ^α in comparison to IR.

Table 2 – Fibrinogen analysis

	Sham	IR	E2	<i>p</i>
<i>Seconds</i>	31.74 ± 1.56	35.88 ± 2.29	28.69 ± 1.67 ^φ	0.046
<i>Concentration (mg/dL)</i>	154.70 ± 8.07	138.50 ± 7.88	171.80 ± 9.82 ^φ	0.040

Groups: Sham (no I/R injury), IR (I/R injury), and E2 (I/R injury treated with 17β-estradiol),

n=8 per group. Data are presented as the mean ± SEM. ^φ in comparison to IR.

Table 3 – Coagulation activation and clot polymerization parameters

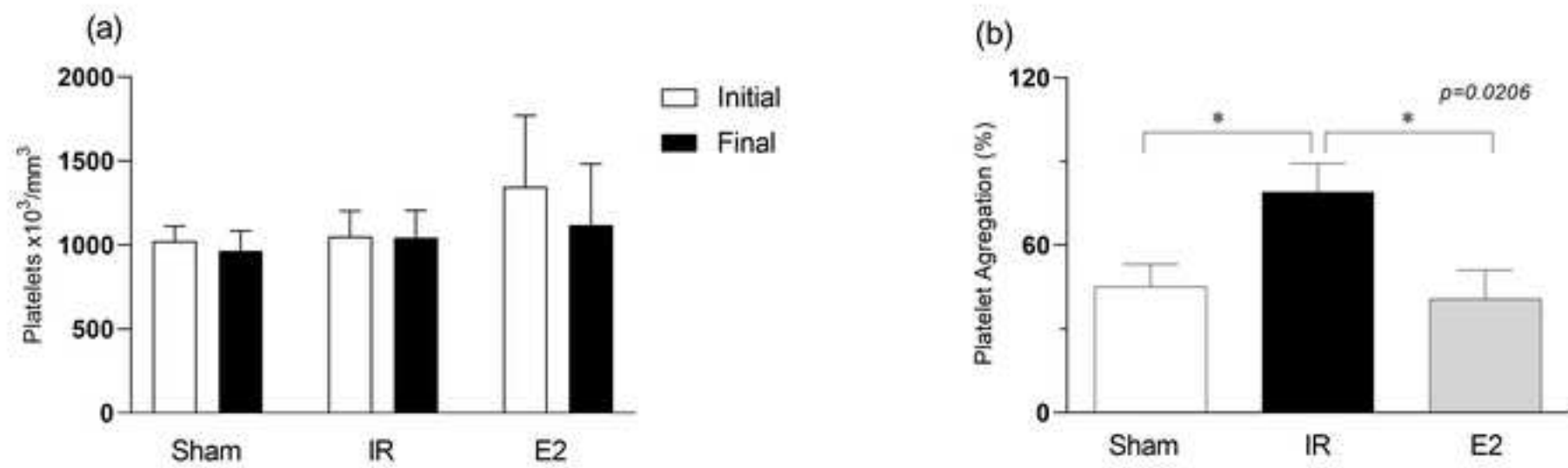
	Sham	I/R	E2	<i>p</i>
EXTEM				
<i>CT (s)</i>	48.88 ± 2.03	56.56 ± 3.90	41.57 ± 3.94 ^φ	0.020
<i>MCF (mm)</i>	71.38 ± 2.19	73.56 ± 2.94	73.86 ± 2.72	0.780
<i>ACF (mm)</i>	66.00 ± 2.03	69.83 ± 3.16	71.90 ± 2.72	0.323
<i>ML (%)</i>	9.38 ± 2.33	6.44 ± 2.56	4.43 ± 1.67	0.352
INTEM				
<i>CT (s)</i>	125.40 ± 16.31	136.1 ± 13.18	136.1 ± 31.78	0.922
<i>MCF (mm)</i>	70.75 ± 2.27	81.13 ± 2.84*	73.86 ± 2.45	0.024
<i>ACF (mm)</i>	65.75 ± 3.02	80.38 ± 3.40*	68.86 ± 3.57 ^φ	0.012
<i>ML (%)</i>	8.50 ± 1.82	2.38 ± 1.13*	7.14 ± 1.81	0.031
FIBTEM				
<i>CT (s)</i>	44.38±2.46	49.44±2.33	41.86±3.56	0.158
<i>MCF (mm)</i>	13.60±0.86	15.11±1.12	18.00±1.45	0.049
<i>ACF (mm)</i>	18.13±2.57	22.33±2.49	19.57±2.38	0.473
<i>ML (%)</i>	5.25±1.29	6.56±2.21	6.14±2.52	0.896

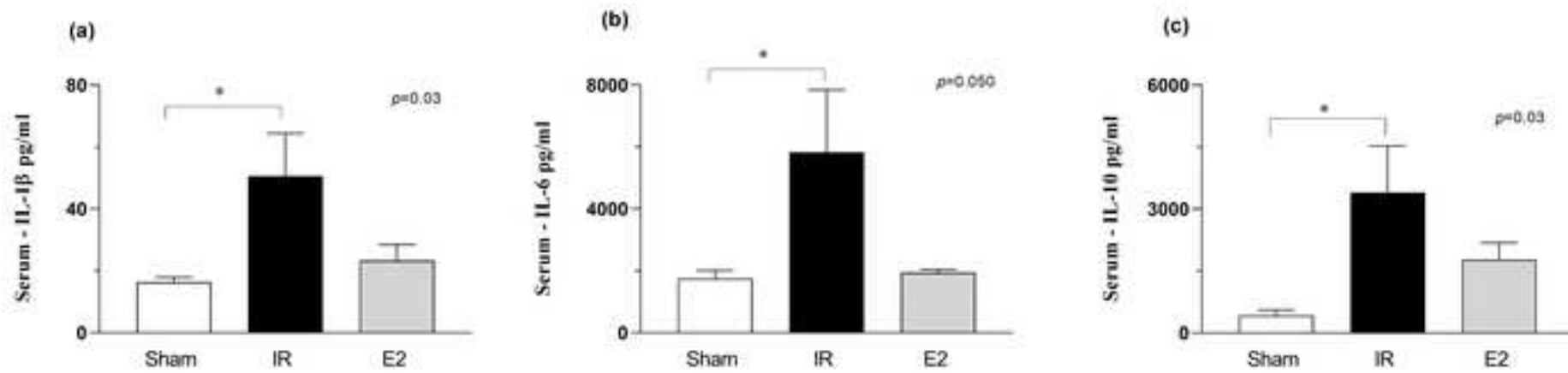
EXTEM: extrinsic screening test; INTEM: intrinsic screening test; FIBTEM: fibrinogen screening test; CT: coagulation time (seconds); MCF: maximum clot firmness (millimeter); ACF: actual clot firmness (millimeter); ML: maximum lysis (percentage). Groups: Sham (no I/R injury), IR (I/R injury), and E2 (I/R injury treated with 17β-estradiol), n=8 per group. Data are presented as the mean ± SEM. * in comparison to Sham, ^φ in comparison to IR.

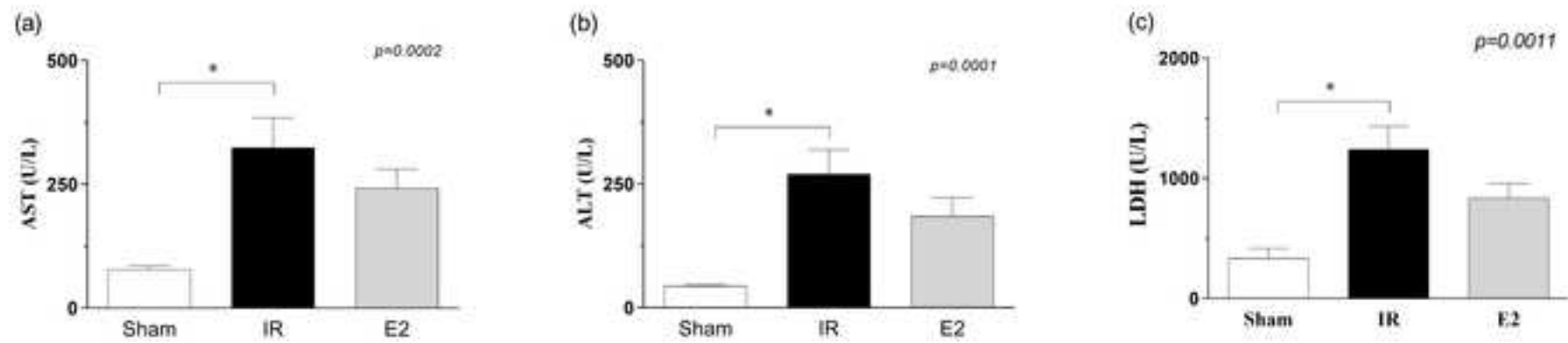
Table 4 – Liver inflammatory mediators

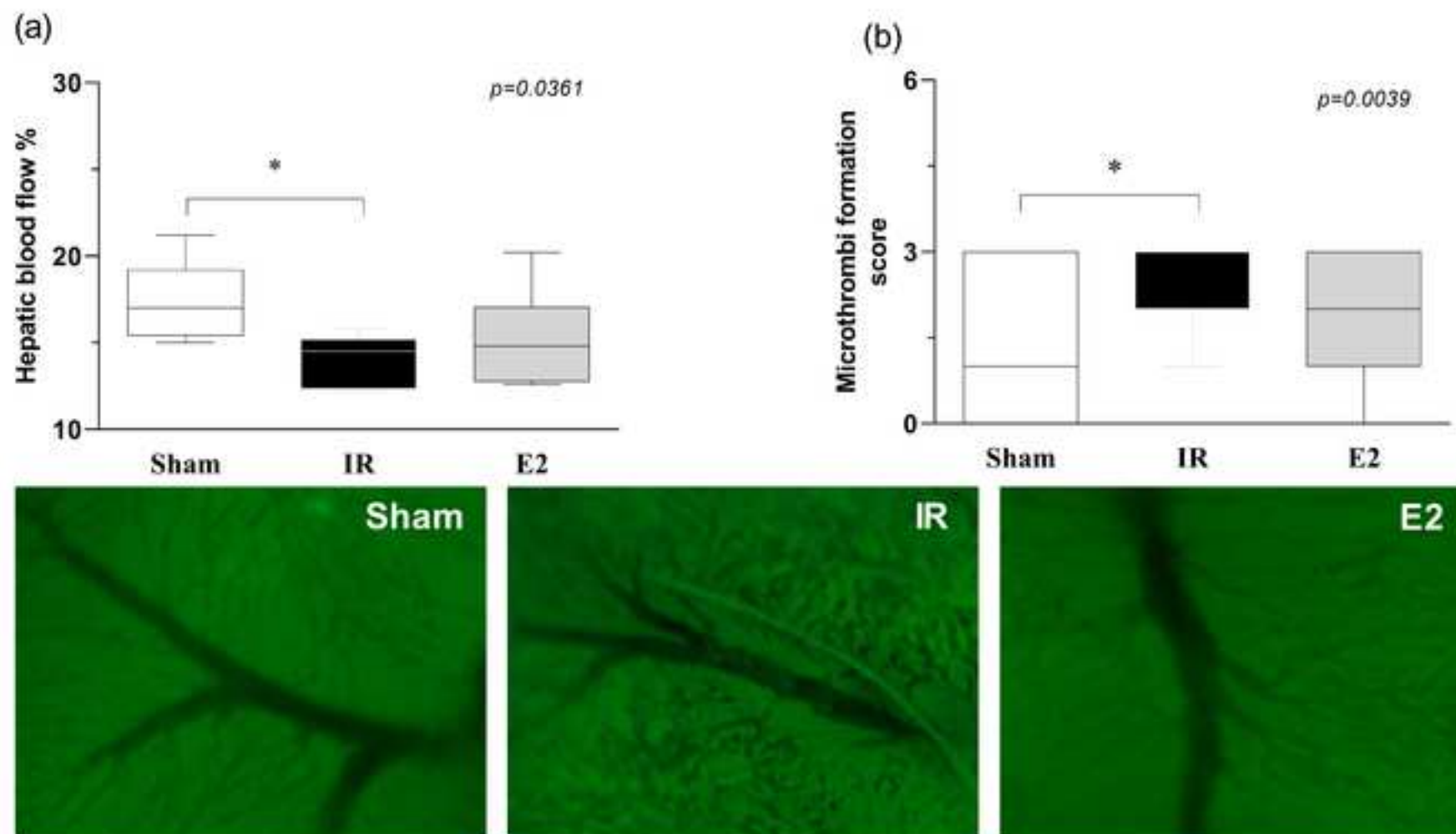
	Sham	IR	E2	<i>p</i>
IL-1	19.31±9.2	13.07±2.30	11.69±2.18	0.05
IL-6	46.32±10.5	39.82±9.19	33+16±10.2	0.56
IL-10	14.28±1.12	12.48±1.72	11.86±2.86	0.49

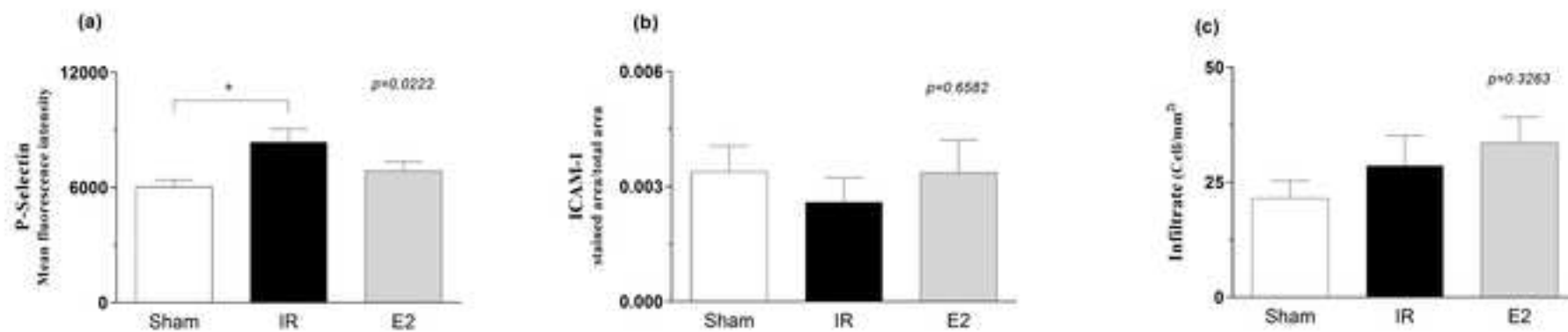
Levels determined in liver homogenate; interleukin (IL) concentrations (pg/mL) were quantified by Multiplex. Groups: Sham (no I/R injury), IR (I/R injury) and E2 (I/R injury treated with 17β-estradiol). Data are expressed as mean ± SEM (8 rats per group).

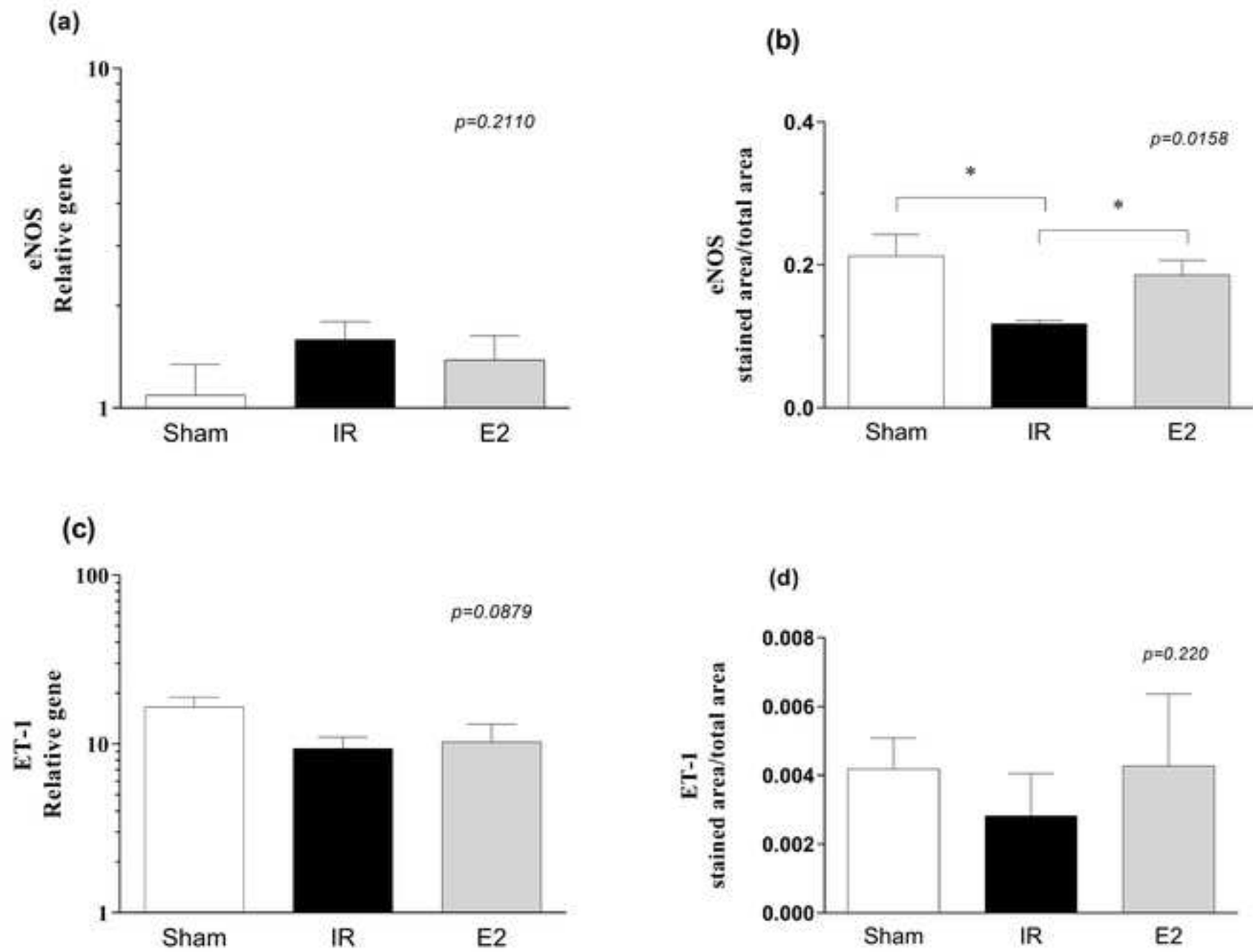


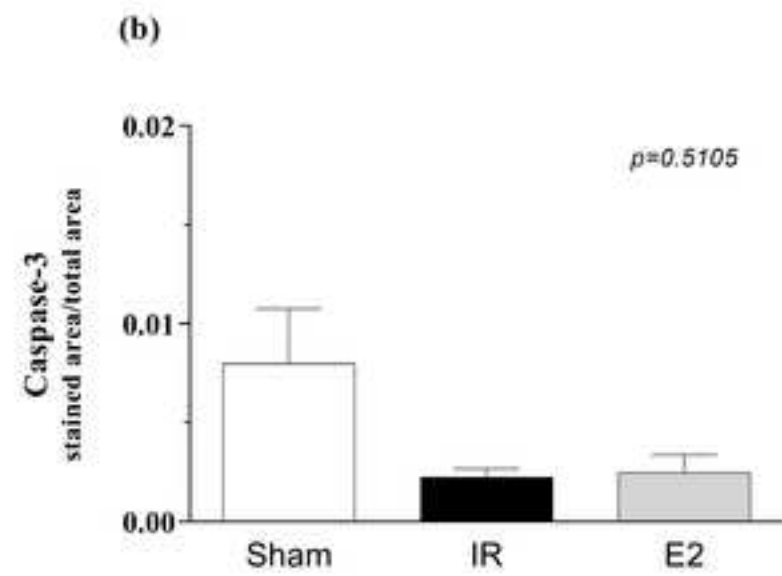
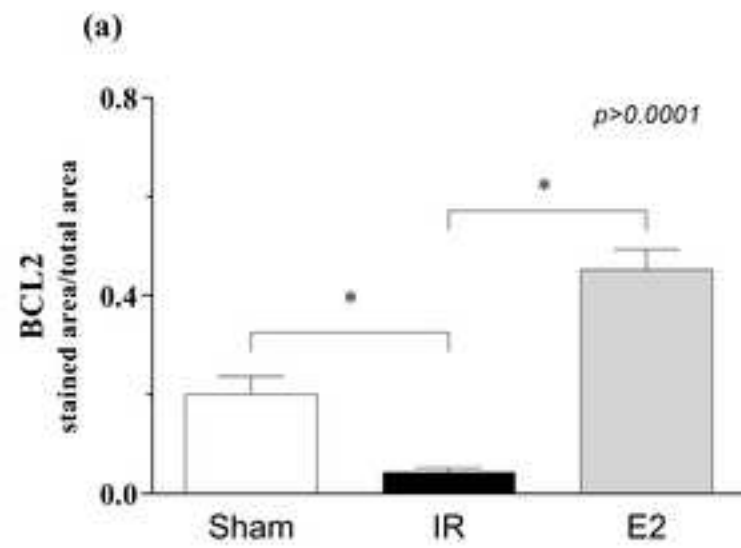












Figures legends:

Figure 1 - Platelet blood counts and aggregation. Platelet blood counts at baseline and 2 h after I/R (a), and platelet aggregation percentage at 2 h after I/R (b). Groups: sham (no I/R injury), IR (I/R injury), and E2 (I/R injury treated with 17 β -estradiol) (n=8 per group). Data are presented as mean \pm SEM. *p<0.05.

Figure 2 – Quantification of systemic inflammatory markers. Measurement of serum concentrations of interleukin (IL)-1 (a), IL-6 (b), and IL-10 (c). Groups: sham (no I/R injury), IR (I/R injury), and E2 (I/R injury treated with 17 β -estradiol) (n=8 per group). Data are presented as mean \pm SEM. *p<0.05.

Figure 3 – Hepatic enzymes. Measurement of serum concentrations of AST (a), ALT (b), and LDH (c). Groups: sham (no I/R injury), IR (I/R injury), and E2 (I/R injury treated with 17 β -estradiol) (n=8 per group). Data are expressed as the mean \pm SEM. *p<0.05.

Figure 4 – Liver microcirculation. Liver flow (a), liver microthrombi formation (b), and liver photomicrographs (\times 400) obtained after staining platelets with FITC-conjugated antibodies. Groups: sham (no I/R injury), IR (I/R injury), and E2 (I/R injury treated with 17 β -estradiol) (n=8 per group). Data are expressed as the median and 95% percentile interval. *p<0.05.

Figure 5 – Liver adhesion molecules and leukocyte infiltration. P-selectin (a), intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 (b), and cellular infiltrate (c). Groups: sham (no I/R injury), IR (I/R injury), and E2 (I/R injury treated with 17 β -estradiol) (n=8 per group). Data are expressed as the mean \pm SEM. *p<0.05.

Figure 6 – Liver endothelium oxide nitrite synthase (eNOS) and endothelin (ET)-1. eNOS gene (a) and protein (b) expression; ET-1 gene (c) and protein (d) expression. Groups: sham (no I/R injury), IR (I/R injury), and E2 (I/R injury treated with 17 β -estradiol) (n=8 per group). Data are expressed as the median and 95% percentile interval (a and c) or as the mean \pm SEM (b and d). *p<0.05.

Figure 7 – Liver apoptosis-related protein expression. B-cell lymphoma (Bcl)-2 (a) and caspase-3 (b) protein expression. Groups: sham (no I/R injury), IR (I/R injury), and E2 (I/R injury treated with 17 β -estradiol) (n=8 per group). Data are expressed as the mean \pm SEM. *p<0.05.