

University of Groningen

The role of estradiol in the maintenance of brain-dead organ donors

Armstrong Junior, Roberto

DOI:
[10.33612/diss.183298445](https://doi.org/10.33612/diss.183298445)

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version
Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:
2021

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Armstrong Junior, R. (2021). *The role of estradiol in the maintenance of brain-dead organ donors: from pathophysiology to treatment*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen. <https://doi.org/10.33612/diss.183298445>

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

CHAPTER

8

SAMENVATTING EN DISCUSSIE

Uit studies is gebleken dat het geslacht van de donor het succes van orgaantransplantatie beïnvloedt waarbij bij nier-, hart- en longtransplantatie afkomstig van vrouwelijke donoren een slechtere prognose te zien is(1-3). Vrouwelijke geslachtshormonen spelen een rol bij het moduleren van de omvang van de ontstekingsreactie (4,5) en het reguleren van hemodynamische parameters na hemorrhagische shock (6,7). Experimenteel onderzoek suggereert dat de gevolgen van trauma bij vrouwen minder intens zijn dan bij mannen, en dat estradiol behandeling een effectieve therapie kan zijn (8-11).

Gebaseerd op het idee dat er seksueel dimorfisme is in de reactie van het immuunsysteem, was het doel van dit proefschrift om de mechanismen van geslachtsafhankelijke verschillen in hersendood (Brain Death=BD) te bespreken. Als mogelijke therapie om de beschikbaarheid van organen voor transplantatie te vergroten, werd 17 β -estradiol besproken als een strategie om de kwaliteit van BD-vrouwelijke donororganen te verbeteren. Het onderzoek is uitgevoerd in gevalideerde hersendoodmodellen in ratten.

Hoofdstuk 1 geeft een korte introductie van BD en geslachtsinvloeden op de ontstekingsprocessen die erop volgen. Eerdere studies geven aan dat vrouwelijke longen over het algemeen van mindere kwaliteit zijn in vergelijking met mannelijke longen, vanwege een hoger ontstekingsgevoeligheid bij BD-vrouwelijke donoren, wat geassocieerd is met acute estradiol-reductie na BD (12). In **Hoofdstuk 2** wordt beschreven dat mannelijke en vrouwelijke dieren verschillen in microvasculaire perfusie na BD. BD leidde tot hypoperfusie bij mannelijke dieren maar niet bij vrouwelijke. Dit ging gepaard met een grotere expressie van endotheliale stikstofoxidesynthase (eNOS) bij vrouwen met een hoge estradiolconcentratie BD (13). eNOS oefent zijn beschermende rol uit door de vasculaire tonus en integriteit te behouden, wat het

behoud van microvasculaire perfusie/flow bij vrouwelijke ratten bevordert ten opzichte van mannelijke ratten.

Echter, zodra hersendood is geïnduceerd, wat resulteert in de acute uitputting van vrouwelijke geslachtshormonen en hogere ICAM-1-expressie en leukocytinfiltratie, bevordert dit een pro-inflammatoire orgaanstatus.

Op basis van eerdere onderzoeken die een verergerde ontstekingsreactie bij vrouwelijke ratten associeerden met acute verlaging van de vrouwelijke geslachtshormoonconcentratie na BD, werd therapie met 17 β -estradiol (E2) voorgesteld om orgaanbeschadiging bij de BD-vrouwelijke donor onder controle te houden. De volgende hoofdstukken waren bedoeld om te onderzoeken of behandeling met E2 gunstig kan zijn bij vrouwelijke orgaandonoren.

Als gevolg van hersenletsel en BD leiden verhoogde niveaus van circulerende cytokinen tot een lokale ontstekingsreactie (14). De systemische en lokale ontstekingsreactie bestaat uit complement- en endotheliale activering, cytokine- en chemokine-afgifte - zoals IL-6, CINC-1, IL-10 en monocyot chemoattractant protein (MCP-1) - en de influx van leukocyten in de organen. In **Hoofdstuk 3** wordt beschreven dat ratten behandeld met E2 geen leukocytose ontwikkelden na 6 uur BD-inductie. Niettemin veroorzaakte E2-behandeling geen significante verandering in de niveaus van systemische cytokines.

Endotheel beschadiging na BD wordt gekenmerkt door verminderde vasodilatatie en pro-inflammatoire status (15,16). Op de plaats van een endotheel beschadiging bevorderen en vergroten de instroom van ontstekingscellen en de synthese van pro-inflammatoire mediators zowel een lokale als systemische ontsteking (17). Het centrale mechanisme dat ten grondslag ligt aan de activering/disfunctie van het endotheel is de uitputting van de biologische beschikbaarheid van eNOS (17). In vivo en in vitro onderzoeken hebben aangetoond dat behandeling met E2 leidt tot een snelle toename van vasculaire NO-afgifte door inductie van eNOS (18,19). In **hoofdstuk 3** lieten we zien dat behandeling met E2 de verminderde eNOS-

expressie in hartweefsel na BD ongedaan maakte, mogelijk via een non-genomic route, waardoor de fosfatidylinositol 3-kinase/Akt-route werd geactiveerd (20).

Een andere route die wordt gemoduleerd door oestrogeen is de fosfoinositide-3 kinase/Akt route. Deze route is geassocieerd met een breed scala aan fysiologische reacties, gen transcriptie en cel overleving (21). Wang et al. (21) toonde aan dat ER- β verhoogde activering van de Akt-signaleringscascade medieert, resulterend in myocardiale bescherming door het verminderen van pro-apoptotisch eiwitten en caspase-3 en het verhogen van het anti-apoptotische eiwit BCL-2 in vrouwelijke harten na acute ischemie. Vergelijkbare resultaten werden waargenomen in onze studie, waarin E2-behandeling de BCL-2-expressie verhoogde en de caspase-3-expressie in vrouwelijk hartweefsel na BD verminderde. Overeenkomstig met de bevindingen celdood was serum troponine-I, een gevoelige en specifieke marker van beschadiging van het hart, significant verhoogd bij BD-vrouwelijke ratten. Daarentegen verlaagde de E2-behandeling de serumtroponine-I-spiegels 6 uur na BD-inductie, wat het cardioprotectieve effect van E2 bij vrouwen bevestigt.

Ook longen worden ook negatief beïnvloed door BD (22). Breithaupt-Faloppa et al. (12) toonde aan dat longen van vrouwelijke hersendode ratten een grotere ontstekingsreactie vertoonden die gepaard ging met de acute vermindering van oestrogeen, een aangetoond beschermerde therapie bij longontsteking (23). In **Hoofdstuk 4** beschrijven we dat E2 de BD gerelateerde ontsteking veroorzaakt kan verminderen. Bij klassieke longontsteking synthetiseren alveolaire macrofagen cytokinen, zoals TNF- α en IL-1, die endotheelcellen induceren om adhesiemoleculen tot expressie te brengen en chemokinen af te geven (24). Tegelijkertijd wordt tijdens ontstekingsreacties, wanneer de rekrutering van leukocyten wordt versneld door chemokinen (bijv. MIP-1 α , MIP-2 en CINC-1), een aanvullend enzym geïnduceerd dat in staat is NO te synthetiseren genaamd induceerbaar stikstofoxidesynthase (iNOS)(25-27). iNOS vertoont pro-inflammatoire eigenschappen, die de synthese van cytokinen, endotheliale expressie van P-

selectine en ICAM-1 en bijgevolg neutrofiële infiltratie beïnvloeden (28). In onze studie veroorzaakte BD een ontstekingsreactie, zoals blijkt uit de expressie van MIP-1 α , MIP-2, CINC-1, IL-1 β , iNOS en VCAM, en opmerkelijk hoge leukocytinfiltratie.

Naast cytokinen en chemokinen die vrijkomen tijdens ontsteking in de long, verstoort metalloproteïnase (MMP), een proteïnase dat verantwoordelijk is voor het afbreken van de extracellulaire matrix, ook residente cellen en versterkt daardoor het ontstekingsproces (29). In onze studie waren, na BD-inductie, de MMP-9-gen- en eiwitexpressie en MMP-activiteit verhoogd. Net als andere ontstekingsmediatoren wordt MMP-9 ook vrijgemaakt onder invloed van TNF- α , IL-1 β en IL-8 door ontstekingscellen, zoals monocyten, macrofagen, neutrofielen maar ook endotheelcellen (30-32). In deze studie was de long-MMP-activiteit verminderd door E2-behandeling. Eerdere studies hebben de rol van E2 bij het down reguleren van MMP-9-genexpressie benadrukt en gecorreleerd aan een vermindering van bloeding, permeabiliteit en leukocytinfiltratie (33,34).

Cellulaire schade en de gerelateerde moleculaire producten zijn cruciale triggers van ontsteking na acuut weefsletsel (35). Acuut nierfalen (Acute Kidney Injury = AKI) is gecorreleerd met systemische en nierontsteking (36). In **Hoofdstuk 5** hebben we het effect van E2 op nierschade in BD-vrouwelijke ratten getest. Bij BD-orgaandonoren wordt het complementsysteem op systemisch en lokaal niveau geactiveerd en is het een relevante mediator van ontsteking en nierbeschadiging (37,38). Complementactivering resulteert in het genereren van mediators, zoals opsoninen (C3b, iC3b, C3dg, C3d, C4b en C4d) en anafylatoxinen (C3a en C5a), die interactie aangaan met hun respectieve receptoren (C3aR, C5aR1 en C5aR2) en rekruteren leukocyten naar nierweefsel (38,39). Geactiveerde parenchym en dendritische cellen synthetiseren chemokinen die neutrofielen en monocyten/macrofaag-afhankelijke pro-inflammatoire reacties ontwikkelen bij AKI (40,41). Hoewel er geen vermindering van C3-vorming was, reguleerde E2-behandeling de C3aR- en C5aR-expressie in BD-vrouwelijke nieren,

wat mogelijk gerelateerd is met verminderde expressie van IL-6, MMP2 en MMP9 in nierweefsel. Tegelijkertijd werd de vermindering van het complementsysteem door E2-behandeling waargenomen door een verminderde vorming van het membrane attack complex (MAC/C5b-9) (39).

In overeenstemming met ontstekingsmediatoren die verband houden met weefselbeschadiging, vertoonden BD-vrouwelijke ratten een hogere expressie van KIM-1, een transmembraanglycoproteïne dat een rol speelt bij de eliminatie van apoptotische cellen en necrotische fragmenten (42-44). Bovendien is hoge KIM-1-expressie gecorreleerd met een vermindering van de glomerulaire functie (45). Vergelijkbaar met de resultaten van El-Lateef et al. (46), die een beschermend effect van E2 suggereren bij door gentamicine geïnduceerde AKI, verminderden BD-vrouwelijke ratten die met E2 werden behandeld de eiwitexpressie van KIM-1 en hadden ze een verbeterde nierfunctie.

Het handhaven van de serum oestradiolspiegels, als gevolg van E2 toediening onmiddellijk na BD-inductie, resulteerde in vermindering van het ontstekingsproces in het hart, de longen en de nieren. Late behandeling (3 uur na hersenood inductie) bleek tevens effectief in het verminderen van ontsteking en weefselbeschadiging veroorzaakt door BD in de onderzochte organen.

Ten slotte hebben we ons in hoofdstuk 6 gericht op een procedure die steeds belangrijker wordt in onderzoek naar niertransplantatie. De zogenaamde geïsoleerde perfused nier (IPK) is gebruikt om de functie vóór transplantatie te beoordelen, wat mogelijk kan helpen bij het nemen van klinische beslissingen over twijfelachtige nieren. Naast de beoordeling is het ook platform om behandeling en reparatie van beschadigde nieren mogelijk te maken (47,48). Uit de eerdere hoofdstukken blijkt dat ontsteking in de nieren van mannelijke en vrouwelijke dieren wordt veroorzaakt door BD. We ontwierpen een studie om nierontsteking te vergelijken bij mannelijke

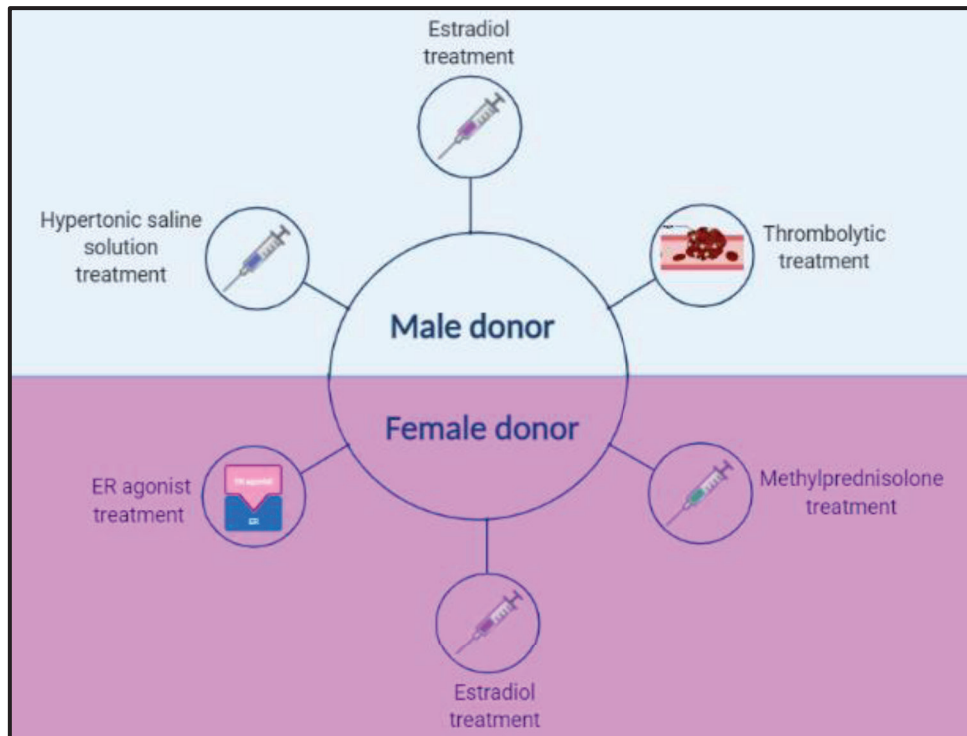
en vrouwelijke hersendode ratten gevolgd door evaluatie in de IPK. In onze studie vertoonden nieren van BD-mannetjes echter een verminderde doorstroming in de IPK.

Mogelijk is de vermindering van de nierperfusie bij BD-mannetjes gecorreleerd is met de vorming van intravasculaire microtrombi. Experimenteel bewijs heeft aangetoond dat BD de vorming van bloedstolsels stimuleert en hypercoagulatie veroorzaakt bij BD-mannetjes varkens (49). Dergelijke veranderingen bevonden zich in de vroege fase van het BD-experiment en de normale waarden werden 180 minuten na BD hersteld. Correia et al. (50) beschreven verminderde stolsel afbraak en hypercoagulatie bij BD-mannetjesratten, zoals aangetoond door de verminderde tijd die nodig is voor stolselvorming na BD. Deze vermindering kan zorgen voor de intravasculaire concentratie van microtrombi bij BD-mannetjesratten, waardoor de microcirculatie perfusie in gevaar komt.

Concluderend, vrouwelijke geslachtshormonen, vooral estradiol, spelen een belangrijke rol bij de gevolgen van BD bij vrouwelijke donoren. Acute verlaging van estradiol leidt tot een verergerde ontstekingsreactie. Behandeling met E2 was echter effectief bij het voorkomen en verminderen van orgaanschade veroorzaakt door BD bij vrouwelijke ratten. Zo kan behandeling met estradiol mogelijk bijdragen aan het in stand houden of verbeteren van de kwaliteit van transplantatieorganen.

Toekomstperspectieven

Zoals eerder vermeld, is het behoud van de levensvatbaarheid van het transplantaat en het optimaliseren van de behandeling van donoren op de IC van groot belang. In de huidige studie vonden we sekseverschillen in de respons op hersendood. Voor optimaal behoud van organen en een grotere pool van levensvatbare transplantaten voor transplantatie, moet geslachtsspecifieke zorg worden overwogen (Figuur 1).



Figuur 1. Schematische weergave van genderspecifieke zorg.

➤ Hersendode vrouwelijke donoren

Er was een grotere ontstekingsreactie bij hersendode vrouwelijke donoren dan bij hersendode mannelijke donoren, gekenmerkt door activering van de complementsysteemcascade, meer uitgesproken leukocytinfiltratie in het weefsel, verhoogde permeabiliteit, lokale afgifte van ontstekingsmediatoren (zoals cytokinen en chemokinen) en activering van celdood. We kunnen daarom stellen dat er mogelijk een gunstig effect van ontstekingsremmende behandeling bij hersendode vrouwelijke orgaandonoren zou kunnen zijn.

Toediening van estradiol en/of oestrogeenreceptoragonist

In eerdere hoofdstukken hebben we laten zien dat therapie met 17β -estradiol op efficiënte wijze hart-, long- en nierschade veroorzaakt door hersendood verminderde. Een beter begrip van de moleculaire en cellulaire reacties op oestrogeen kan verdere inzichten bieden in de bevindingen van experimentele en klinische onderzoeken. Verschillen in expressie en cellulaire/intracellulaire distributie van oestrogeenreceptor- α (ER- α) en oestrogeenreceptor- β

(ER- β) worden verantwoordelijk geacht voor de specificiteit en verschillen in de effecten van oestrogeen.

Bovendien vertoonde het gebruik van ER- α - en ER- β -agonisten gunstige effecten in verschillende modellen (51-53). Brinckmann et al. (54) toonde aan dat ER- α -stimulatie door een ER- α -selectieve agonist, apoptose verminderde en de overleving van myocyten verhoogde die samen waren gekweekt met post-infarct cardiale c-kit+-cellen.

Toediening van methylprednisolone

In de context van hersendood bij vrouwen is het belangrijk om te bedenken dat de verlaging van de glucocorticoïde en vrouwelijke geslachtshormoonconcentraties een belangrijke invloed hebben op het systemische ontstekingsproces en de functionele toestand van verschillende organen.

Zowel oestrogeen als corticoïde receptoren worden in op verschillende cellen aangetroffen. In immuun cellen werken deze hormonen door de cellulaire ontwikkeling en functie te moduleren (55). Studies met verschillende andere celtypen hebben laten zien dat de echter een interactie tussen oestrogeen en corticoïde receptoren bestaat (56-59). Genen die betrokken zijn bij het ontstekingsproces zijn doelwit van zowel oestradiol- als glucocorticoïde acties (60,61). Estradiol en corticosteroïden interacteren met transcriptiefactoren die verband houden met het ontstekingsproces, zoals AP-1, Sp1, Stat1 en NF-KB (62-65). Edgar et al. (66) toonden aan dat er synergie is tussen hormonen bij de modulatie van ontstekingsreacties binnen de microvasculatuur, die een complex vormen dat bindt aan NF-KB en de transcriptie van verschillende ontstekingsmediatoren remt.

➤ Hersendode mannelijke donoren

In hersendode mannelijke donoren, gecompromiteerde microcirculatie gerelateerd aan hemodynamische instabiliteit beïnvloedt de perfusie en daarmee levensvatbaarheid voor transplantatie (50,67-69). Daarom moet de implementatie van therapeutische strategieën ter verbetering van de hemodynamische prestaties worden overwogen.

Toediening van hypertone zoutoplossing

Hypertone zoutoplossing is uitgebreid bestudeerd als een vloeistofvervanging bij patiënten met septische en hemorragische shock waarbij aangetoond is dat het de hemodynamische prestaties verbetert door snelle intravasculaire volume-expansie te veroorzaken. De werkingsmechanismen omvatten vermindering van oedeem en bloedviscositeit en verbetering van hartcontractiliteit (70-72). Correia et al. (69) toonden aan dat de infusie van hypertone zoutoplossing aan BD-mannetjesratten de microvasculaire perfusie verbetert vanwege de effecten op eNOS en de expressie van het endotheline-1-eiwit. Het gebruik van hypertone zoutoplossing bij hersendode donoren kan dus de levensvatbaarheid van organen en de transplantatieresultaten verbeteren.

Trombolytische therapie

Trombolytische therapie omvat het gebruik van geneesmiddelen om trombi op te lossen. Voorbeelden zijn streptokinase, heparine en alteplase. Bij longtransplantaties van DCD donoren is trombolytische therapie gebruikt (74) om trombi te verminderen tijdens ex vivo modellen (75). Bij de behandeling van longembolie heeft het gebruik van trombolytica de longperfusie en de rechterventrikelfunctie effectief verbeterd (76). In een klinische studie met

meer dan 100 DCD donoren zorgde trombolytische therapie voor een verbeterde orgaanfunctie (77).

Alteplase verbetert angiografische en hemodynamische veranderingen sneller dan heparine (78) en vergeleken met streptokinase verbetert alteplase effectief en snel hemodynamische veranderingen bij patiënten met longembolie (79).

Toediening van estradiol bij mannen

Hoewel minder uitgesproken dan bij hersendode vrouwelijke donoren, is de ontstekingsreactie ook aanwezig bij mannelijke ratten (12,16,73,81). Experimenteel bewijs toont aan dat 17 β -estradiol long- en darmletsel bij hersendode mannelijke ratten effectief vermindert, voornamelijk vanwege het vermogen om stikstofoxidesynthases te moduleren (16,73).

REFERENTIES

1. Khush KK, Kubo JT, Desai M. Influence of donor and recipient sex mismatch on heart transplant outcomes: Analysis of the International Society for Heart and Lung Transplantation Registry. *J Hear Lung Transplant* [Internet]. 2012 May 1 [cited 2019 May 24];31(5):459–66. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1053249812009187?via%3Dihub>
2. Kaczmarek I, Meiser B, Beiras-Fernandez A, Guethoff S, Überfuhr P, Angele M, et al. Gender does matter: gender-specific outcome analysis of 67,855 heart transplants. *Thorac Cardiovasc Surg* [Internet]. 2013 Jan 20 [cited 2018 Nov 2];61(1):29–36. Available from: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0032-1331467>
3. Sato M, Gutierrez C, Kaneda H, Liu M, Waddell TK, Keshavjee S. The Effect of Gender Combinations on Outcome in Human Lung Transplantation: The International Society of Heart and Lung Transplantation Registry Experience. 2006;
4. Prossnitz ER, Barton M. The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease [Internet]. Vol. 7, *Nature Reviews Endocrinology*. *Nat Rev Endocrinol*; 2011 [cited 2020 Nov 24]. p. 715–26. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21844907/>
5. Pasqualini JR, Gelly C, Nguyen B-L, Vella C. IMPORTANCE OF ESTROGEN

- SULFATES IN BREAST CANCER. Vol. 34, J. steroid Biochem. 1989.
6. Deitch EA, Chu H, Xu DZ. Organ blood flow and the central hemodynamic response are better preserved in female, as opposed to the male rats, after trauma-hemorrhagic shock. *J Trauma - Inj Infect Crit Care* [Internet]. 2008 Sep [cited 2020 Nov 24];65(3):566–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18784569/>
 7. Deitch EA, Feketeova E, Lu Q, Zaets S, Berezina TL, MacHiedo GW, et al. Resistance of the female, as opposed to the male, intestine to I/R-mediated injury is associated with increased resistance to gut-induced distant organ injury. *Shock* [Internet]. 2008 Jan [cited 2021 Mar 8];29(1):78–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17666951/>
 8. Choudhry MA, Bland KI, Chaudry IH. Insight into the mechanism of gender-specific response to trauma-hemorrhage. In: *Intensive Care Medicine: Annual Update 2007* [Internet]. Springer New York; 2007 [cited 2021 May 6]. p. 869–79. Available from: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-0-387-49518-7_78
 9. Bösch F, Angele MK, Chaudry IH. Gender differences in trauma, shock and sepsis [Internet]. Vol. 5, *Military Medical Research*. BioMed Central Ltd.; 2018 [cited 2021 May 6]. Available from: </pmc/articles/PMC6203206/>
 10. Yang X, Qin L, Liu J, Tian L, Qian H. 17 β -Estradiol protects the liver against cold ischemia/reperfusion injury through the Akt kinase pathway. *J Surg Res* [Internet]. 2012 Dec [cited 2021 Feb 27];178(2):996–1002. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22835949/>
 11. Takaoka M, Yuba M, Fujii T, Ohkita M, Matsumura Y. Oestrogen protects against ischaemic acute renal failure in rats by suppressing renal endothelin-1 overproduction. In: *Clinical Science* [Internet]. Portland Press Ltd; 2002 [cited 2021 May 6]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12193139/>
 12. Breithaupt-Faloppa AC, Ferreira SG, Kudo GK, Armstrong R, Tavares-de-Lima W, da Silva LFF, et al. Sex-related differences in lung inflammation after brain death. *J Surg Res* [Internet]. 2016 Feb [cited 2019 May 24];200(2):714–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26547667>
 13. Wu KK. Regulation of endothelial Nitric Oxide Synthase activity and gene expression. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* [Internet]. New York Academy of Sciences; 2002 [cited 2020 Nov 24]. p. 122–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12076969/>
 14. Watts RP, Thom O, Fraser JF. Inflammatory Signalling Associated with Brain Dead Organ Donation: From Brain Injury to Brain Stem Death and Posttransplant Ischaemia Reperfusion Injury. *J Transplant*. 2013;2013:1–19.
 15. Vergoulas G, Boura P, Efstratiadis G. Brain dead donor kidneys are immunologically active: Is intervention justified? [Internet]. Vol. 13, *Hippokratia*. Hippokratia General Hospital of Thessaloniki; 2009 [cited 2020 Sep 24]. p. 205–10. Available from: </pmc/articles/PMC2776332/?report=abstract>
 16. Vieira RF, Breithaupt-Faloppa AC, Matsubara BC, Rodrigues G, Sanches MP, Armstrong-Jr. R, et al. 17 β -Estradiol protects against lung injuries after brain death in male rats. *J Hear Lung Transplant* [Internet]. 2018 Nov 1 [cited 2018 Nov 7];37(11):1381–7. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1053249818315183?via%3Dihub>

17. Trepels T, Zeiher AM, Fichtlscherer S. The endothelium and inflammation. *Endothel J Endothel Cell Res*. 2006;13(6):423–9.
18. Chen Z, Yuhanna IS, Galcheva-Gargova Z, Karas RH, Mendelsohn ME, Shaul PW. Estrogen receptor mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. *J Clin Invest* [Internet]. 1999 [cited 2021 Mar 10];103(3):401–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9927501/>
19. Darblade B, Pendaries C, Krust A, Dupont S, Fouque MJ, Rami J, et al. Estradiol alters nitric oxide production in the mouse aorta through the α -, but not β -, estrogen receptor. *Circ Res* [Internet]. 2002 Mar 8 [cited 2021 Mar 10];90(4):413–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11884370/>
20. Haynes MP, Li L, Sinha D, Russell KS, Hisamoto K, Baron R, et al. Src kinase mediates phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent rapid endothelial nitric-oxide synthase activation by estrogen. *J Biol Chem*. 2003 Jan 24;278(4):2118–23.
21. Wang M, Wang Y, Weil B, Abarbanell A, Herrmann J, Tan J, et al. Estrogen receptor mediates increased activation of PI3K/Akt signaling and improved myocardial function in female hearts following acute ischemia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* [Internet]. 2009;296:972–8. Available from: www.ajpregu.org
22. Simão RR, Ferreira SG, Kudo GK, Armstrong Junior R, da Silva LFF, Sannomiya P, et al. Sex differences on solid organ histological characteristics after brain death. *Acta Cir Bras*. 2016 Apr 1;31(4):278–85.
23. Nilsson BO. Modulation of the inflammatory response by estrogens with focus on the endothelium and its interactions with leukocytes. Vol. 56, *Inflammation Research*. 2007. p. 269–73.
24. Ward PA. Recruitment of inflammatory cells into lung: Roles of cytokines, adhesion molecules, and complement. In: *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* [Internet]. Mosby Inc.; 1997 [cited 2021 Mar 10]. p. 400–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9104882/>
25. Wolpe SD, Cerami A. Macrophage inflammatory proteins 1 and 2: members of a novel superfamily of cytokines. *FASEB J* [Internet]. 1989 Dec [cited 2021 Mar 10];3(14):2565–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2687068/>
26. Suzuki H, Suematsu M, Miura S, Liu YY, Watanabe K, Miyasaka M, et al. Rat CINC/gro: A novel mediator for locomotive and secretagogue activation of neutrophils in vivo. *J Leukoc Biol* [Internet]. 1994 [cited 2021 Mar 10];55(5):652–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8182343/>
27. Hickey MJ. Role of inducible nitric oxide synthase in the regulation of leucocyte recruitment [Internet]. Vol. 100, *Clinical Science*. 2001 [cited 2021 Mar 10]. p. 1–12. Available from: <http://cs.portlandpress.com/cs/100/cs1000001.htm>
28. Cuzzocrea S, Chatterjee PK, Mazzon E, Dugo L, De Sarro A, Van De Loo FAJ, et al. Role of induced nitric oxide in the initiation of the inflammatory response after postischemic injury. *Shock* [Internet]. 2002 [cited 2021 Mar 10];18(2):169–76. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12166782/>
29. Tetley TD. Proteinase imbalance: Its role in lung disease [Internet]. Vol. 48, *Thorax*. BMJ Publishing Group; 1993 [cited 2021 Mar 10]. p. 560–5. Available from: [/pmc/articles/PMC464518/?report=abs](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12166782/)

- tract
30. Partridge CA, Jeffrey JJ, Malik AB. A 96-kDa gelatinase induced by TNF- α contributes to increased microvascular endothelial permeability. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol* [Internet]. 1993 [cited 2021 Mar 10];265(5 9-5). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8238531/>
 31. MASURE S, PROOST P, VAN DAMME J, OPDENAKKER G. Purification and identification of 91-kDa neutrophil gelatinase: Release by the activating peptide interleukin-8. *Eur J Biochem* [Internet]. 1991 [cited 2021 Mar 10];198(2):391–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1645657/>
 32. Shapiro SD, Senior RM. Matrix metalloproteinases: Matrix degradation and more [Internet]. Vol. 20, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. American Lung Association; 1999 [cited 2021 Mar 10]. p. 1100–2. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10340927/>
 33. Lee JY, Choi HY, Na WH, Ju BG, Yune TY. 17 β -estradiol inhibits MMP-9 and SUR1/TrpM4 expression and activation and thereby attenuates BSCB disruption/hemorrhage after spinal cord injury in male rats. *Endocrinology* [Internet]. 2015 May 1 [cited 2021 Mar 10];156(5):1838–50. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25763638/>
 34. Na W, Lee JY, Kim WS, Yune TY, Ju BG. 17 β -estradiol ameliorates tight junction disruption via repression of MMP transcription. *Mol Endocrinol* [Internet]. 2015 Sep 1 [cited 2021 Mar 10];29(9):1347–61. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26168035/>
 35. Chen GY, Nuñez G. Sterile inflammation: Sensing and reacting to damage [Internet]. Vol. 10, *Nature Reviews Immunology*. NIH Public Access; 2010 [cited 2021 Mar 10]. p. 826–37. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/201014424/>
 36. Rabb H, Griffin MD, McKay DiB, Swaminathan S, Pickkers P, Rosner MH, et al. Inflammation in AKI: Current understanding, key questions, and knowledge gaps. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2016 Feb 1 [cited 2021 Mar 10];27(2):371–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/271128/>
 37. Poppelaars F, Seelen MA. Complement-mediated inflammation and injury in brain dead organ donors. *Mol Immunol* [Internet]. 2017 Apr 1 [cited 2020 Jul 17];84:77–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27989433/>
 38. Jager NM, Poppelaars F, Daha MR, Seelen MA. Complement in renal transplantation: The road to translation. Vol. 89, *Molecular Immunology*. Elsevier Ltd; 2017. p. 22–35.
 39. McCullough JW, Renner B, Thurman JM. The Role of the Complement System in Acute Kidney Injury. 2013;
 40. Bolisetty S, Agarwal A. Neutrophils in acute kidney injury: Not neutral any more [Internet]. Vol. 75, *Kidney International*. Nature Publishing Group; 2009 [cited 2021 Mar 10]. p. 674–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19282858/>
 41. Kurts C, Panzer U, Anders HJ, Rees AJ. The immune system and kidney disease: Basic concepts and clinical implications [Internet]. Vol. 13, *Nature Reviews Immunology*. Nat Rev Immunol; 2013 [cited 2021 Mar 10]. p. 738–53. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24037418/>
 42. Yin C, Wang N. Kidney injury molecule-1 in kidney disease [Internet]. Vol. 38, *Renal Failure*. Taylor and Francis Ltd; 2016 [cited 2021 Feb 14]. p. 1567–73.

- Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27758121/>
43. Tian L, Shao X, Xie Y, Wang Q, Che X, Zhang M, et al. Kidney Injury Molecule-1 is Elevated in Nephropathy and Mediates Macrophage Activation via the Mapk Signalling Pathway. *Cell Physiol Biochem*. 2017 May 1;41(2):769–83.
 44. Schrezenmeier E V., Barasch J, Budde K, Westhoff T, Schmidt-Ott KM. Biomarkers in acute kidney injury - pathophysiological basis and clinical performance. *Acta Physiol* [Internet]. 2017 Mar 1 [cited 2021 Mar 10];219(3):556–74. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/apha.12764>
 45. Sabbisetti VS, Waikar SS, Antoine DJ, Smiles A, Wang C, Ravisankar A, et al. Blood kidney injury molecule-1 is a biomarker of acute and chronic kidney injury and predicts progression to ESRD in type I diabetes. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2014 Oct 1 [cited 2020 Oct 19];25(10):2177–86. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24904085/>
 46. Abd El-Lateef SM, El-Sayed ESM, Mansour AM, Salama SA. The protective role of estrogen and its receptors in gentamicin-induced acute kidney injury in rats. *Life Sci* [Internet]. 2019 Dec 15 [cited 2020 Oct 16];239. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.117082>
 47. Nizet A. The isolated perfused kidney: Possibilities, limitations and results. Vol. 7, *Kidney International*. Elsevier; 1975. p. 1–11.
 48. Hosgood SA, van Heurn E, Nicholson ML. Normothermic machine perfusion of the kidney: better conditioning and repair? *Transpl Int* [Internet]. 2015 Jun 1 [cited 2020 Dec 22];28(6):657–64. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/tri.12319>
 49. Hvas CL, Fenger-Eriksen C, Høyer S, Sørensen B, Tønnesen E. Hypercoagulation following brain death cannot be reversed by the neutralization of systemic tissue factor. *Thromb Res* [Internet]. 2013 Aug [cited 2021 Mar 10];132(2):300–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23910501/>
 50. Correia C de J, Ricardo da Silva FY, Armstrong R, Vidal dos Santos M, Anunciação LF, Sobral MLP, et al. Sex differences in the coagulation process and microvascular perfusion induced by brain death in rats. *Transpl Int* [Internet]. 2020 Nov 24 [cited 2021 Mar 10];33(11):1541–50. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/tri.13731>
 51. Chakrabarti M, Haque A, Banik NL, Nagarkatti P, Nagarkatti M, Ray SK. Estrogen receptor agonists for attenuation of neuroinflammation and neurodegeneration [Internet]. Vol. 109, *Brain Research Bulletin*. Elsevier Inc.; 2014 [cited 2021 May 8]. p. 22–31. Available from: </pmc/articles/PMC4378838/>
 52. Lindsey SH, Carver KA, Prossnitz ER, Chappell MC. Vasodilation in response to the GPR30 agonist G-1 is not different from estradiol in the mRen2.Lewis female rat. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2011 May;57(5):598–603.
 53. Nikolic I, Liu D, Bell JA, Collins J, Steenbergen C, Murphy E. Treatment with an estrogen receptor-beta-selective agonist is cardioprotective. *J Mol Cell Cardiol*. 2007 Apr 1;42(4):769–80.
 54. Brinckmann M, Kaschina E, Altarche-Xifró W, Curato C, Timm M, Grzesiak A, et al. Estrogen receptor α supports cardiomyocytes indirectly through post-infarct cardiac c-kit+ cells. *J Mol Cell Cardiol* [Internet]. 2009 Jul [cited 2021 May 8];47(1):66–75. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19341743/>
 55. Bereshchenko O, Bruscoli S, Riccardi C.

- Glucocorticoids, sex hormones, and immunity. *Front Immunol* [Internet]. 2018 Jun 12 [cited 2021 May 8];9(JUN). Available from: [/pmc/articles/PMC6006719/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3174650/)
56. Vamvakopoulos NC, Chrousos GP. Evidence of direct estrogenic regulation of human corticotropin-releasing hormone gene expression potential implications for the sexual dimorphism of the stress response and immune/inflammatory reaction. *J Clin Invest* [Internet]. 1993 [cited 2021 May 8];92(4):1896–902. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8408641/>
 57. Handa RJ, Burgess LH, Kerr JE, O'keefe JA. Gonadal steroid hormone receptors and sex differences in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Horm Behav* [Internet]. 1994 [cited 2021 May 8];28(4):464–76. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7729815/>
 58. Bolt MJ, Stossi F, Newberg JY, Orjalo A, Johansson HE, Mancini MA. Coactivators enable glucocorticoid receptor recruitment to fine-tune estrogen receptor transcriptional responses. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2013 Apr [cited 2021 May 8];41(7):4036–48. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23444138/>
 59. Ankenbauer W, Strahle U, Schutz G. Synergistic action of glucocorticoid and estradiol responsive elements. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1988 [cited 2021 May 8];85(20):7526–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3174650/>
 60. Quinn MA, Cidlowski JA. Endogenous hepatic glucocorticoid receptor signaling coordinates sex-biased inflammatory gene expression. *FASEB J* [Internet]. 2016 Feb 1 [cited 2021 May 8];30(2):971–82. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26581598/>
 61. Cvoro A, Yuan C, Paruthiyil S, Miller OH, Yamamoto KR, Leitman DC. Cross Talk between Glucocorticoid and Estrogen Receptors Occurs at a Subset of Proinflammatory Genes. *J Immunol* [Internet]. 2011 Apr 1 [cited 2021 May 8];186(7):4354–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21357268/>
 62. Kerppola TK, Luk D, Curran T. Fos is a preferential target of glucocorticoid receptor inhibition of AP-1 activity in vitro. *Mol Cell Biol* [Internet]. 1993 Jun [cited 2021 May 8];13(6):3782–91. Available from: [/pmc/articles/PMC359861/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11345900/)
 63. Safe S. Transcriptional activation of genes by 17 β -estradiol through estrogen receptor-Sp1 interactions [Internet]. Vol. 62, *Vitamins and Hormones*. Academic Press Inc.; 2001 [cited 2021 May 8]. p. 231–52. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11345900/>
 64. Biswas DK, Singh S, Shi Q, Pardee AB, Iglehart JD. Crossroads of estrogen receptor and NF-kappaB signaling. [Internet]. Vol. 2005, *Science's STKE : signal transduction knowledge environment*. Sci STKE; 2005 [cited 2021 May 8]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15956359/>
 65. Ou XM, Chen K, Shih JC. Glucocorticoid and androgen activation of monoamine oxidase a is regulated differently by R1 and Sp1. *J Biol Chem* [Internet]. 2006 Jul 28 [cited 2021 May 8];281(30):21512–25. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16728402/>
 66. Edgar AR, Judith PY, Elisa DSM, Rafael CR. Glucocorticoids and estrogens modulate the NF-kB pathway differently in the micro- and macrovasculature. *Med Hypotheses* [Internet]. 2013 Dec [cited 2021 May 8];81(6):1078–82. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24111111/>

- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24199951/>
67. Simas R, Sannomiya P, Cruz JWMC, Correia C de J, Zanoni FL, Kase M, et al. Paradoxical effects of brain death and associated trauma on rat mesenteric microcirculation: An intravital microscopic study. *Clinics*. 2012;67(1):69–75.
 68. Simas R, Kogiso DH, Correia C de J, da Silva LFF, Silva IA, Cruz JWMC, et al. Influência da morte encefálica e do trauma associado nas características histológicas de órgãos sólidos. *Acta Cir Bras* [Internet]. 2012 Jul [cited 2020 Jun 21];27(7):465–70. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-86502012000700006&lng=en&nrm=iso&tlng=en
 69. Correia CDJ, Armstrong R, Carvalho PO De, Simas R, Sanchez DCJ, Breithaupt-Faloppa AC, et al. Hypertonic Saline Solution Reduces Microcirculatory Dysfunction and Inflammation in a Rat Model of Brain Death. *Shock*. 2019 Apr 1;51(4):495–501.
 70. Rocha-e-Silva M, Poli de Figueiredo LF. Small volume hypertonic resuscitation of circulatory shock. [Internet]. Vol. 60, *Clinics (São Paulo, Brazil)*. Faculdade de Medicina / USP; 2005 [cited 2021 May 6]. p. 159–72. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1807-59322005000200013&lng=en&nrm=iso&tlng=en
 71. Strandvik GF. Hypertonic saline in critical care: A review of the literature and guidelines for use in hypotensive states and raised intracranial pressure [Internet]. Vol. 64, *Anaesthesia*. Anaesthesia; 2009 [cited 2021 May 6]. p. 990–1003. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19686485/>
 72. Magalhães DMS, Zanoni FL, Correia CJ, Simas R, Soares RGF, Sannomiya P, et al. Hypertonic Saline Modulates Heart Function and Myocardial Inflammatory Alterations in Brain-Dead Rats. *J Surg Res* [Internet]. 2019 Mar 1 [cited 2019 May 24];235:8–15. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022480418306942?via%3Dihub>
 73. Vieira RF, Breithaupt-Faloppa AC, Correia CJ, Armstrong R, Coutinho-e-Silva R dos S, Ferreira SG, et al. 17 β -Estradiol as a New Therapy to Preserve Microcirculatory Perfusion in Small Bowel Donors. *Transplantation* [Internet]. 2020 Sep 27 [cited 2021 Mar 17];104(9):1862–8. Available from: <https://journals.lww.com/10.1097/TP.0000000000003280>
 74. Sareyyupoglu B, Shigemura N, Toyoda Y. Utilizing donor lungs after thrombolytic therapy and thrombectomy for acute massive pulmonary embolus [Internet]. Vol. 30, *Journal of Heart and Lung Transplantation*. Elsevier USA; 2011 [cited 2021 May 8]. p. 358. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21144770/>
 75. Machuca TN, Hsin MK, Ott HC, Chen M, Hwang DM, Cypel M, et al. Injury-specific ex vivo treatment of the donor lung: Pulmonary thrombolysis followed by successful lung transplantation [Internet]. Vol. 188, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. Am J Respir Crit Care Med; 2013 [cited 2021 May 8]. p. 878–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24083866/>
 76. Wolfe MW, Skibo LK, Goldhaber SZ. Pulmonary embolic disease: Diagnosis, pathophysiologic aspects, and treatment with thrombolytic therapy. *Curr Probl Cardiol*. 1993 Oct 1;18(10):590–633.
 77. Bohorquez H, Seal JB, Cohen AJ, Kressel A, Bugeaud E, Bruce DS, et al. Safety and Outcomes in 100 Consecutive Donation After Circulatory Death Liver Transplants Using a Protocol That Includes Thrombolytic Therapy. *Am J*

- Transplant [Internet]. 2017 Aug 1 [cited 2021 May 8];17(8):2155–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28276658/>
78. Dalla-Volta S, Palla A, Santolicandro A, Giuntini C, Pengo V, Visioli O, et al. PAIMS 2: Alteplase combined with heparin versus heparin in the treatment of acute pulmonary embolism. Plasminogen activator Italian multicenter study 2. *J Am Coll Cardiol* [Internet]. 1992 [cited 2021 May 8];20(3):520–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1512328/>
79. Meneveau N, Schiele F, Vuilleminot A, Valette B, Grollier G, Bernard Y, et al. Streptokinase vs alteplase in massive pulmonary embolism. A randomized trial assessing right heart haemodynamics and pulmonary vascular obstruction. *Eur Heart J* [Internet]. 1997 [cited 2021 May 8];18(7):1141–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9243149/>
80. Deitch EA, Feketeova E, Lu Q, Zaets S, Berezina TL, Machiedo GW, et al. RESISTANCE OF THE FEMALE, AS OPPOSED TO THE MALE, INTESTINE TO I/R-MEDIATED INJURY IS ASSOCIATED WITH INCREASED RESISTANCE TO GUT-INDUCED DISTANT ORGAN INJURY. *Shock* [Internet]. 2007 Jul [cited 2020 Nov 24];PAP(1):78–83. Available from: <http://journals.lww.com/00024382-900000000-99892>
81. Simão RR, Ferreira SG, Kudo GK, Armstrong Junior R, da Silva LFF, Sannomiya P, et al. Sex differences on solid organ histological characteristics after brain death. *Acta Cir Bras*. 2016;31(4).