

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO**

DANIELA FANTINI VALE

**ENZIMA GSK3 NA CARDIOPROTEÇÃO EM COELHOS, SOB A
TÉCNICA DE PARADA CIRCULATÓRIA CARDÍACA**

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

ABRIL/2014

DANIELA FANTINI VALE

**ENZIMA GSK3 NA CARDIOPROTEÇÃO EM COELHOS, SOB A
TÉCNICA DE PARADA CIRCULATÓRIA CARDÍACA**

“Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do grau de Doutora em Ciência Animal.”

Área de Concentração: Sanidade Animal.

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

ABRIL/2014

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da minha vida. A Ti a honra, a glória e o louvor.

Aos meus pais e irmã, que sempre ao meu lado incentivaram meu crescimento profissional.

Ao Professor André Lacerda, pelos anos de orientação e que desde o mestrado sempre me apoiou dando liberdade de expor minhas ideias, sempre disponível pra conversar.

Ao Professor Carlos Logullo, pela grande oportunidade de poder trabalhar em seu grupo e pela confiança de poder desenvolver um projeto em um modelo diferente. Você não foi somente coorientador, foi também um grande amigo.

Aos companheiros da Unidade de Experimentação Animal (UEA) Adriana, Bárbara, Bete, Camila, Claudia, Cristiano, Evenilton, Jhenifer, Josias, Jorge, Leonardo, Luan, Mariana, Marcelle, Newton, Raquel, Renato, e Yolanda, pelos momentos de descontração e principalmente discussão de resultados durante os seminários. Sem a ajuda de vocês este trabalho não teria ficado tão bom.

Aos veterinários, Fernanda Antunes, Guilherme Monteiro, Monica Jorge Luz, Jussara Peters, André Gimenes, Renato Moran e aos técnicos do LCCA (Marília e Evaldo), que me auxiliaram em todos os experimentos.

Ao professor Cláudio pela orientação na análise estatística.

A FAPERJ/CAPES/UENF pelo incentivo financeiro ao desenvolvimento deste projeto.

À banca examinadora pela participação colaborando ainda mais com a finalização desse projeto.

RESUMO

O interesse em novos caminhos para o tratamento das doenças isquêmicas cardíacas tem alcançado grande destaque. A busca por métodos que minimizem as consequências deletérias das cirurgias de revascularização tão quanto da isquemia em pacientes pós infarto do miocárdio, já são uma realidade. Estudos têm comprovado que existem poucas intervenções terapêuticas totalmente eficazes na proteção do miocárdio. Em vista disso, a procura por alternativas terapêuticas adjuvantes que auxiliem ou substituam os tratamentos convencionais vem ganhando espaço. As pesquisas envolvendo as terapias moleculares têm avançado nos últimos anos com o emprego das proteínas kinases. Dentre elas um novo alvo na abordagem da cardioproteção vem ganhando destaque, a glicogênio sintase quinase (GSK3 β) uma proteína quinase que participa do metabolismo celular e está envolvida na cardioproteção. Neste trabalho avaliou-se a participação dessa enzima frente a injúria de isquemia e reperfusão provocada pela técnica de *Inflow Occlusion*. A técnica que pode ser empregada em cirurgias cardíacas quando se pretende manter o coração aberto apenas por alguns minutos, para correção de pequenos defeitos. É notório que a estase sanguínea prolongada desencadeia uma série de alterações ao organismo, devido à hipóxia tecidual e desequilíbrio ácido-básico. As informações sobre as alterações moleculares que ocorrem no tecido cardíaco em consequência da isquemia e reperfusão geradas no emprego desta técnica são escassas. Diante deste panorama, avaliou-se a atividade de GSK3 β e a sua resposta transcricional, assim como a participação dessa enzima no metabolismo de glicose durante o emprego da *Inflow Occlusion*. Foram também monitorados os parâmetros fisiológicos e cardiovasculares dos animais durante o transoperatório. No grupo isquêmico o pH diminuiu significativamente caracterizando um quadro de acidemia, o qual persistiu no grupo reperfusão. Os níveis de lactato aumentaram significativamente na isquemia e os valores permaneceram elevados na reperfusão. Surpreendentemente a análise transcricional da enzima apresentou um aumento aproximado de 50 vezes no grupo isquêmico, conseqüentemente, houve uma queda nas reservas de glicogênio. No entanto, a diminuição do glicogênio não seguiu as mesmas proporções apresentadas pelos dados transcricionais. No grupo reperfusão, houve queda na transcrição da GSK3 β e aumento das reservas de glicogênio. Com

relação à atividade de GSK3 β , na isquemia houve maior inibição da enzima comparada ao grupo reperfusão. No que diz respeito aos parâmetros cardiovasculares, a frequência cardíaca e a pressão arterial sofreram queda no grupo isquemia e aumento no grupo reperfusão, os parâmetros se comportaram de forma equivalente. Não houve variação significativa entre os parâmetros fisiológicos temperatura e capnografia. Desta forma, o trabalho contribuiu para o melhor entendimento do papel da GSK3 na técnica da parada circulatória cardíaca, já que a enzima demonstrou importante função na readaptação metabólica do tecido cardiovascular.

Palavras- chave: parada circulatória cardíaca, oclusão do fluxo, glicogênio sintase quinase 3 beta, expressão gênica, coelhos.

ABSTRACT

The interest in new ways to treat the ischemic heart disease has received considerable attention. The search for methods that minimize the deleterious consequences of ischemia as well as the revascularization surgeries in patients who have suffered myocardial infarction has increased over the years. Studies have shown that few therapeutic interventions are fully effective in protecting the myocardium. Thus, the search for alternative therapeutic adjuvants to assist or replace conventional treatments is progressing. Researches involving molecular therapies have advanced in recent years, using protein kinases inhibition, leading to cardioprotection. Among them, a particular protein is acquiring notoriety, the glycogen synthase kinase (GSK3 β), an enzyme that participates in numerous cellular processes, including cell metabolism and cardioprotection. In this paper we evaluate the involvement of GSK3 β in cardiac metabolism during ischemic and reperfusion injury caused by the technique of Inflow Occlusion. The technique used to obtain the circulatory arrest was Inflow Occlusion, usually employed in cardiac surgery when you want to keep the heart opened only for a few minutes to correct minor defects. It is well known that prolonged blood stasis triggers to several changes in the organism due to tissue hypoxia and acid-base imbalance. The information about the molecular changes that occur in cardiac tissue as a result of ischemia and reperfusion by employing of this technique is scarce. Therefore, we evaluated the activity of GSK3 β and its transcriptional response, as well as the participation of this enzyme in the glucose metabolism during employment of Inflow Occlusion. Were also monitored the physiological and cardiovascular parameters of animals during the intraoperative process. In the ischemic group the pH decreased significantly, characterizing a acidosis condition, which persisted in the reperfusion group. Lactate levels increased significantly in ischemia, remained elevated during reperfusion. Surprisingly, the GSK3 β transcriptional analysis showed an approximate increase of 50 times in the ischemic group, and consequently occurred a decrease in glycogen content at this same time. However, this glycogen decrease did not follow the same proportions displayed by the transcriptional data. In reperfusion group it was observed the opposite, an increase in the glycogen levels followed by a reduction in GSK3 β transcripts, showing an inverse correlation between the transcription of this enzyme and glycogen stores. Regarding the activity of GSK3 β , during ischemia the enzyme

inhibition was higher compared with the reperfusion group. As regards the cardiovascular parameters, both of them present an equivalent behavior. Heart rate and blood pressure were reduced in the ischemia group and increased after reperfusion. There was no significant variation between the physiological parameters (temperature and capnography). Thus, this work contribute to a better understanding of the role of GSK3 in the cardiac circulatory arrest technic once the enzyme has shown an important function in the metabolic cardiovascular tissue adaptation.

Keywords: cardiac circulatory arrest, Inflow occlusion, glycogen synthase kinase 3 beta, gene expression, rabbits.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática de GSK-3 em mamíferos demonstrando as isoformas α e β . GSK-3 α tem um peso molecular de 51 kDa e de GSK-3 β a de 47 kDa.....	23
Figura 2	Ativação da via de sinalização de insulina inibe a GSK3 e contribui para a estimulação da síntese de glicogênio e proteína.....	25
Figura 3	a- Ligadura de veia ázigos (seta branca) e oclusão de veia cava cranial (seta amarela), b- oclusão das veias cava cranial (seta branca) e caudal (seta amarela) com as pinças vasculares, momento da <i>Inflow occlusion</i> , c- pinçamento do ventrículo esquerdo para posterior biópsia cardíaca (seta branca).....	37
Figura 4	Sequência de nucleotídeos (A) e aminoácidos(B) da GSK3 β do <i>Oryctolagus cuniculus</i> (fonte NCBI). Em (A) sequência do mRNA (XM_002716661) com a região codificante sublinhada, <i>start</i> codon em verde e <i>stop</i> codon em vermelho, áreas em negrito referente ao alinhamento das sequências dos <i>primer Forward</i> e <i>Reverse</i> . Em (B) Sequência de aminoácidos deduzida da região codificante (XP_002716707.1), sublinhada região referente do domínio proteína quinase em amarelo Ser ⁹ e em verde resíduo Tir ²¹⁶ de GSK3 β	43
Figura 5	Alinhamento múltiplo de sequências de aminoácidos da enzima glicogênio sintase quinase 3 beta. O símbolo “#” destaca os resíduos de aminoácidos que fazem parte do sítio ativo. Código de acesso: <i>O. cuniculus</i> (XP_002716707.1), <i>H. sapiens</i> (NP_001139628.1), <i>C. familiaris</i> (XP_535751.2) e <i>M. musculus</i> (XP_006522488.1).....	45
Figura 6	Acidemia apresentada pelos coelhos submetidos a técnica de <i>Inflow Occlusion</i> . O método estatístico utilizado foi ANOVA, pós teste <i>t</i> ($P \leq 0,05$), (n=7).....	46
Figura 7	Lactemia apresentada pelos coelhos do grupo isquêmico e reperfundido submetidos à técnica de <i>Inflow Occlusion</i> . O método estatístico utilizado foi ANOVA, após teste de Tukey ($P \leq 0,05$). (n=8).....	48
Figura 8	Resposta gênica elevada de GSK3 β durante isquemia. A análise foi realizada através de PCR em tempo real nas três condições estudadas. O método estatístico utilizado foi ANOVA, pós teste de Tukey ($P \leq 0,05$), (n=18).....	49

Figura 9	Redução na quantidade de glicogênio no período isquêmico. A dosagem de glicogênio foi realizada utilizando-se o Kit Glucox [®] . O método estatístico utilizado foi ANOVA, pós teste de Tukey ($P \leq 0,05$), (n=18)	49
Figura 10	a- Maior grau de fosforilação de GSK3 β (ser 9) no grupo isquemia em relação ao grupo reperfusão. Imagens da membrana de nitrocelulose após revelação com solução DAB. Bandas representativas do grupo controle, isquemia e reperfusão. b- Inibição da GSK3 β no grupo isquemia, a enzima apresentou alta taxa de fosforilação em relação ao grupo reperfusão. A análise foi realizada através de Western Blotting nas três condições estudadas. O método estatístico utilizado foi ANOVA, pós teste de Tukey ($P \leq 0,05$), (n=12).....	50
Figura 11	Queda acentuada da frequência cardíaca durante a oclusão venosa, com diferença estatística entre os grupos controle e isquemia; e grupos isquemia e reperfusão. O método estatístico utilizado foi ANOVA, pós teste de Tukey ($P \leq 0,05$), (n=18).....	51
Figura 12	Expressiva diminuição da pressão arterial média durante a oclusão venosa, com diferença estatística tanto entre os grupos controle e isquemia quanto os grupos isquemia e reperfusão. O método estatístico utilizado foi ANOVA, pós teste de Tukey ($P \leq 0,05$), (n=18).....	52
Figura 13	A temperatura permanece estável entre os grupos. O método estatístico utilizado foi ANOVA, pós teste de Tukey ($P \leq 0,05$), (n=12).....	53
Figura 14	A capnografia permanece constante após os tratamentos. O método estatístico utilizado foi ANOVA, após teste de Tukey ($P \leq 0,05$), (n=12).....	53
Figura 15	Esquema representando o envolvimento da GSK3 β no metabolismo.....	62

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Percentual de identidade entre a GSK3 β de coelho (<i>O. cuniculus</i>), homem (<i>H. sapiens</i>), cão (<i>C. falimiaris</i>) e camundongo (<i>M. musculus</i>).....	42
Quadro 2	Sequência dos <i>primers</i> para o gene Ciclofilina A e Glicogênio Sintase Quinase 3 β	42
Quadro 3	Lista de anticorpos primários e secundário utilizados para a análise de expressão proteica por Western blotting.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Adenosina Trifosfato
GSK3 β	Glicogênio sintase quinase 3 beta
PaO ₂	Pressão parcial de oxigênio no sangue arterial
PAS	Pressão arterial sistólica
pH	Potencial hidrogeniônico
HCO ³⁻	Bicarbonato
SaO ₂	Saturação de oxihemoglobina no sangue arterial
PAD	Pressão arterial diastólica
PAM	Pressão arterial média
PaO ₂	Pressão parcial de oxigênio no sangue arterial
PAS	Pressão arterial sistólica
PaCO ₂	Pressão parcial de dióxido de carbono no sangue arterial
FC	Frequência cardíaca
CO ₂	Dióxido de carbono
DB	Déficit de base
DC	Débito cardíaco
ETCO ₂	Tensão de dióxido de carbono ao final da expiração
GSK3 β	Glicogênio Sintase Quinase 3 Beta
BSA	Soro Albumina Bovina
PTC	Parada circulatória total cardíaca
T°C	Temperatura em graus Celsius
CAP	Capnografia
SERCA-2a	Bomba de cálcio ATPase
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
RISK	<i>salvage kinases</i>
DAB	Diaminobenzidina
bat/min	Batimentos por minuto

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 HIPÓTESE.....	17
1.2.JUSTIFICATIVA.....	17
1.3.OBJETIVOS.....	18
2. REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 ISQUEMIA MIOCÁRDICA.....	19
2.1.1 Metabolismo Energético Cardíaco	20
2.1.2 Cardioproteção	21
2.2 GLICOGÊNIO SINTASE QUINASE 3 (GSK3).....	22
2.2.1 Regulação	23
2.2.2 Funções	25
2.2.2.1 No sistema cardiovascular.....	27
2.3 A TÉCNICA INFLOW OCCLUSION.....	28
2.3.1 Alterações metabólicas durante a aplicação da técnica <i>Inflow Occlusion</i>	29
2.4 MODELO EXPERIMENTAL.....	30
3. MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 ANIMAIS.....	32
3.2. PARÂMETROS AVALIADOS.....	32
3.2.1 Hemogasometria e lactato	33
3.2.2 Frequência cardíaca	33
3.2.3 Pressão arterial média invasiva	34
3.2.4 Temperatura corporal	34
3.2.5 Capnografia	34
3.3 PROTOCOLO ANESTÉSICO.....	34
3.4 ENSAIO DE PARADA CIRCULATÓRIA CARDÍACA.....	35
3.5 ANALISE MOLECULAR.....	38
3.5.1 Transcrição relativa do gene de glicogênio sintase quinase 3β	38
3.5.2 Quantificação glicogênio	43
3.5.3 Dosagem de proteínas – Método Bradford	43
3.5.4 Análise da Expressão Proteica - Western Blotting	43
3.6 ABATE DOS ANIMAIS.....	45
3.7 ESTATÍSTICA.....	45
4. RESULTADOS	46

4.1 HEMOGASOMETRIA.....	46
4.2 DOSAGEM DE LACTATO.....	47
4.3 TRANSCRIÇÃO RELATIVA DO GENE DE GLICOGÊNIO SINTASE QUINASE 3B (GSK3 β).....	48
4.4 QUANTIFICAÇÃO GLICOGÊNIO.....	49
4.5 ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTEICA DE (GSK3 β) – WESTERN BLOTTING.....	50
4.6 FREQUÊNCIA CARDÍACA.....	51
4.7 PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA.....	51
4.8 TEMPERATURA	52
4.9 CAPNOGRAFIA.....	53
5. DISCUSSÃO.....	54
6. CONCLUSÃO.....	63
REFERÊNCIAS.....	64
ANEXOS.....	80

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do **CCTA / UENF** 079/2014

Vale, Daniela Fantini

Enzima GSK3 na cardioproteção em coelhos, sob a técnica de parada circulatória cardíaca / Daniela Fantini Vale. – 2014.

84 f. : il.

Orientador: André Lacerda de Abreu Oliveira.

Tese (Doutorado - Ciência Animal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 2014.

Bibliografia: f. 64 – 79.

1. Parada circulatória cardíaca 2. Oclusão do fluxo 3. Glicogênio sintase quinase 3 beta 4. Expressão gênica 5. Coelho I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. II. Título.

CDD – 636.9322

1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares são a principal causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS; Genebra), as doenças cardiovasculares causam mais de 17 milhões de mortes no mundo (MACKAY & MENSAH, 2006). Composto o grupo das doenças cardíacas estão as cardiomiopatias, as doenças isquêmicas do coração e a insuficiência cardíaca congestiva (KUMAR *et al.*, 2007). Na América do Norte aproximadamente um milhão de pessoas por ano sofre de infarto do miocárdio. Além dessas, 700 mil pacientes são submetidos à parada cardioplégica para realização de diferentes cirurgias cardíacas. Apesar das diferentes etiologias que levam à parada parcial ou total da circulação cardíaca, ambos os grupos de pacientes compartilham dos efeitos da lesão de isquemia e reperfusão no miocárdio (TURER & HILL, 2010).

Durante a última década, estudos envolvendo a fisiopatologia e tratamento de doenças cardiovasculares (DCVs) têm obtido substancial progresso, principalmente no que diz respeito aos mecanismos moleculares e às vias de sinalização ativadas durante os processos de lesão. Várias cascatas de sinalização celular são descritas, sendo algumas compensatórias e outras deletérias. Algumas vias ativadas durante a isquemia e reperfusão convergem para a regulação de proteínas quinase, dentre elas, a glicogênio sintase quinase-3 β (GSK3 β), apontada como um importante alvo nos mecanismos de cardioproteção (GAO *et al.*, 2008; MIURA & MIKI, 2009; JUHASZOVA *et al.*, 2009).

A GSK3 β se destaca como alvo terapêutico na busca de métodos que minimizem as consequências da isquemia no coração (TONG *et al.*, 2002; MIURA *et al.*, 2009). Estudos sugerem que esse efeito protetor no tecido cardíaco ocorre em função da inibição da GSK3 β (GOMEZ *et al.*, 2008). A avaliação de sua atividade enzimática é um importante fator, com possibilidade de aplicação clínica, e prognóstica, em relação à preservação da integridade e funcionalidade do tecido cardíaco (MEDINA & CASTRO, 2008). No entanto, poucos trabalhos descrevem as alterações gênicas da GSK3 β durante a isquemia e reperfusão. No sistema cardiovascular, a enzima GSK3 β participa da regulação do metabolismo de glicogênio, na hipertrofia de cardiomiócitos e morte celular (SUGDEN *et al.*, 2008). Além disso, esta enzima minimiza as lesões causadas pela isquemia e reperfusão

no tecido cardíaco, melhorando significativamente a recuperação da função do órgão (STEENBERGEN *et al.*, 2009). A fim de se estudar o comportamento desta enzima num modelo de isquemia que mimetiza as alterações metabólicas que ocorrem na isquemia cardíaca pós infarto agudo do miocárdio (IAM), a técnica de parada circulatória cardíaca foi aplicada.

A técnica de *Inflow Occlusion* consiste na interrupção do retorno venoso ao coração, após oclusão das veias cava cranial e caudal, e veia ázigos, possibilitando intervenções cirúrgicas intra ou extra-cardíacas rápidas com um risco reduzido de hemorragias (JONAS *et al.* 1985, ODEGARD *et al.* 2004). Sua aplicação representa um avanço para o tratamento de doenças cardiovasculares em animais, por conta da sua aplicabilidade na correção da estenose pulmonar e subaórtica, comunicações interatriais, retirada de trombos intracavitários e até mesmo ressecção de pequenos tumores (WARE *et al.*, 1994; TOKMAKOGLU *et al.*, 2002; FREITAS *et al.*, 2005; BROCKMAN *et al.*, 2009).

A parada circulatória cardíaca, no entanto, pode causar graves consequências metabólicas ao paciente. Durante a *Inflow occlusion* ocorrem dois distúrbios metabólicos importantes: a hipóxia, decorrente da inadequada perfusão sanguínea aos tecidos, e a acidose metabólica que advém da interrupção das trocas gasosas e do fluxo sanguíneo pulmonar (MINGRONE, 2006). Ambos os distúrbios podem levar a outras adaptações metabólicas importantes para garantir a integridade do tecido cardíaco mesmo sob a condição de isquemia. Desse modo, estudou-se algumas dessas mudanças metabólicas correlacionadas à enzima GSK3 β .

Diante deste panorama, o trabalho presente teve como objetivo determinar a resposta gênica da GSK3 β e avaliar sua participação na regulação do metabolismo de glicogênio, assim como, sua atividade enzimática, no tecido cardíaco de coelhos durante o período de isquemia e reperfusão, quando submetidos à técnica de *Inflow Occlusion*.

1.1 HIPÓTESE

Nesta tese é levantada a hipótese de que diante do estresse promovido na técnica *Inflow Occlusion*, esta enzima tenha uma contribuição direta no controle do metabolismo durante este período operatório, de modo a conferir cardioproteção ou minimizando os efeitos deletérios dos processos de isquemia e reperfusão.

1.2 JUSTIFICATIVA

A inibição de GSK3 β desempenha um papel decisivo na proteção contra os danos isquêmicos ao nível de funcionamento mitocondrial cardíaco (JUHASZOVA *et al.*, 2004). Portanto a compreensão do papel da GSK3 β nas alterações metabólicas do tecido cardíaco isquêmico, assim como sua regulação gênica após a isquemia e reperfusão, pode representar um dos principais passos para a obtenção de novos métodos terapêuticos. Além disso, doenças como o diabetes, o Alzheimer e algumas perturbações cardiovasculares, estão associadas com anormalidades na fosforilação de proteínas envolvidas na regulação das vias de sinalização (NOBLE *et al.*, 2005; MARTINEZ *et al.*, 2002). Por conseguinte, as empresas farmacêuticas estão mais interessadas no desenvolvimento de inibidores farmacológicos de quinases e fosfatases (MARTINEZ *et al.*, 2006). Uma dessas quinases, que têm despertado o interesse no desenvolvimento de novas gerações de inibidores com implicações clínicas específicas, é a GSK3 β (MARTINEZ *et al.*, 2006; EL-DAR-FINKELMAN & MARTINEZ, 2011). Dessa forma, espera-se contribuir para um melhor entendimento das adaptações metabólicas e da proteção miocárdica na isquemia, e poder-se-á oferecer a compreensão necessária com objetivos de minimizar os efeitos da lesão de reperfusão em pacientes submetidos à circulação extracorpórea, a *Inflow Occlusion* e a cirurgia de revascularização pós Infarto agudo do miocárdio (IAM).

1.3 OBJETIVO

Comprovar a participação de GSK3 β na isquemia e na reperfusão do coração, assim como sua participação na adaptação metabólica do tecido frente às lesões supracitadas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ISQUEMIA MIOCÁRDICA

Nos últimos 50 anos as pesquisas com animais produziram uma notável quantidade de dados sobre as características moleculares e celulares relacionadas ao processo isquêmico (HEARSE, 2001). A isquemia tem papel fundamental em diversas situações clínicas perioperatórias. Apesar da revascularização sanguínea em um órgão isquêmico ser essencial para prevenir a irreversibilidade da lesão celular, a reperfusão pode agravar as lesões produzidas na fase isquêmica isolada. Assim, o dano celular induzido após a reperfusão de um órgão isquêmico é denominado de lesão de isquemia-reperfusão (I/R) (SILVA JR *et al.*, 2002). Após o início da isquemia grave, o miócito sofre uma série de alterações que são inicialmente reversíveis (até 15-20 minutos). À medida que a duração da isquemia aumenta para além deste limite crítico, é atingido um ponto em que os miócitos ficam destinados a morte apesar do restabelecimento do fluxo de sangue arterial. No entanto, apesar de mais de 40 anos de investigação científica intensa, a sequência exata dos eventos que ocorrem entre a transição das lesões celulares reversíveis e irreversíveis não foi estabelecida (HEIDE, 2011).

A isquemia miocárdica é definida como um aporte insuficiente de oxigênio arterial para responder às demandas metabólicas do tecido cardíaco. A origem deste fenômeno é observada na anatomia da grande maioria dos indivíduos, caracterizada por uma limitação do fluxo coronariano que leva a uma deficiência na perfusão miocárdica (GARCÍA- DORADO & FERNÁNDEZ, 1988). A Isquemia miocárdica e a lesão da isquemia e reperfusão foi descrita pela primeira vez em 1960 por Jennings e colaboradores, utilizando um coração canino como um modelo de ligação coronária. Os autores do estudo observaram que a reperfusão parecia acelerar o desenvolvimento de necroses (JENNINGS *et al.*, 1960). A isquemia induz o acúmulo intracelular de sódio, íons hidrogênio e íons cálcio, culminando na acidose tecidual. A reperfusão, por sua vez, provoca alterações rápidas no fluxo de íons, e algumas evidências sugerem que a renormalização rápida de pH, paradoxalmente, leva a um aumento da citotoxicidade (BOND *et al.*, 1991; LEMASTERS *et al.*, 1996). É sabido que a reperfusão está associada a alguns efeitos adversos como: lesão miocárdica,

destruição das células miocárdicas ainda viáveis ao final da isquemia induzida pela reperfusão, lesão vascular, dano à microvasculatura com redução da reserva coronariana, “miocárdio atordoado”, disfunção contrátil do coração a despeito da restauração do fluxo sanguíneo, e arritmias de reperfusão. Após a reperfusão do miocárdio a disfunção mecânica pode trazer significativas complicações para a hemodinâmica dos pacientes, já que podem ocorrer distúrbios nas funções sistólica e diastólica. A depressão miocárdica é maior após a isquemia prolongada, uma vez que o grau de “atordoamento” do miocárdio é proporcional ao tempo de duração da isquemia. Ele pode ocorrer de forma leve após isquemias transitórias de demanda, ou severa com sinais de falência cardíaca após reperfusão do infarto agudo do miocárdio, ou cirurgia com parada cardíaca induzida (GIRALDEZ & RAMIRES, 2000). Com o enfoque de melhorar a proteção miocárdica durante procedimentos que envolviam a lesão de reperfusão, recentemente as atenções voltaram-se para a pesquisa de drogas citoprotetoras com ação em segmentos do metabolismo celular, utilizadas isoladamente ou em associação para reduzir ou prevenir o dano sobre a célula cardíaca. (PARANG *et al.*, 2005; WOLFF *et al.*, 2002).

2.1.1 Metabolismo energético cardíaco

Logo após o início da isquemia, o comprometimento metabólico seguido de alterações da atividade elétrica e da função contrátil da célula cardíaca pode se agravar progressivamente até a morte do tecido (GARCÍA-DORADO & FERNÁNDEZ, 1988). O dano isquêmico pode ser determinado pela sua gravidade, duração e sequência temporal da isquemia. Outros fatores relevantes como o seu estado físico e metabólico (hipotermia ou normotermia), conteúdo de glicogênio miocárdico e oscilações nas concentrações de ácidos graxos livres também são importantes (TAEGTMEYER *et al.*, 1998). A interrupção do aporte sanguíneo, mesmo por curtos períodos, como no caso da *Inflow Occlusion*, provoca alteração de vários processos celulares e desencadeia uma série de mecanismos homeostáticos que mantêm as funções metabólicas e reduzem ao mínimo as lesões resultantes (WOLF *et al.*, 2002).

O metabolismo miocárdico é essencialmente oxidativo, exigindo assim grande aporte de oxigênio para as reações mitocondriais, necessárias para produção de trifosfato de adenosina (ATP) (OPIE *et al.*, 2002). Os carboidratos, como glicose e glicogênio, são de principal importância para o metabolismo energético cardíaco (TAEGTMEYER *et al.*, 1994). A ausência de oxigênio e substratos oxidáveis durante a isquemia provoca diminuição da fosforilação oxidativa, reduzindo assim a síntese de ATP. A interrupção do fluxo coronariano causa redução do aporte de oxigênio em nível celular, o que conduz a uma depressão da via aeróbica do metabolismo, iniciando assim o metabolismo anaeróbio. Contudo, a glicólise anaeróbia tem utilidade limitada para produzir fosfatos de alta energia e não é suficiente para manter a função cardíaca. Por cada mol de glicose metabolizada em condições aeróbicas se obtém 36 mols de ATP ao invés de apenas dois mols produzidos no metabolismo anaeróbio (TAEGTMEYER *et al.*, 1994). Para compensar, o fluxo através da glicólise é aumentado em mais de vinte vezes durante o primeiro minuto de estado anaeróbio, resultando em grande aumento de piruvato e lactato (LOPASCHUK *et al.*, 1999). A aceleração da glicólise anaeróbica por si libera H⁺ em seus passos intermediários, tendo como produto final o lactato. Em decorrência disso, o pH citosólico sofre uma redução (SCHWARTZ *et al.*, 1990).

2.1.2 Cardioproteção

A proteção miocárdica durante a cirurgia cardíaca envolve um conjunto de estratégias que têm como objetivo reduzir o consumo miocárdico de oxigênio, adequando-o à oferta tecidual momentânea, e/ou tornando as células cardíacas mais resistentes a episódios isquêmicos. O propósito é atenuar a magnitude da lesão induzida por episódios de isquemia e reperfusão, além de suas consequências deletérias imediatas e tardias, tais como infarto do miocárdio, disritmias, disfunção ventricular e choque cardiogênico, com consequente aumento da mortalidade perioperatória (MALBOUISSON *et al.*, 2005).

As pesquisas envolvendo cardioproteção frente às lesões da isquemia e reperfusão surgiram há cerca de 40 anos (HEUSCH *et al.*, 2008), e as principais melhorias nas estratégias de preservação do miocárdio nos últimos 10 há 20 anos

reduziram o risco operatório de cirurgia de revascularização em humanos (HAUSENLOY *et al.*, 2012). Existem vários mecanismos descritos de cardioproteção: a hipotermia, que foi muito empregada em cirurgias cardíacas como sustentáculo da preservação de órgãos e do próprio coração (TISSIER *et al.*, 2010); o condicionamento, que consiste em uma serie de episódios alternativos de breve isquemia (hipóxia) e reperfusão (reoxigenação) no contexto da isquemia prolongada; o condicionamento farmacológico, onde se faz uso de “drogas citoprotetoras”; e o condicionamento remoto, consistindo no condicionamento em um local distante do miocárdio ambos dentro do mesmo contexto de isquemia prolongada (VINTEN-JOHANSEN 2011; HAUSENLOY *et al.*, 2012; VASSALLI *et al.*, 2012). Além disso, investigações sobre o mecanismo do pré-condicionamento mostraram que o pré-condicionamento isquêmico e o pré-condicionamento farmacológico convergem para vias de transdução de sinal ordinárias ou para mediadores comuns de proteção.

Existem evidências de que *salvage kinases* ou RISK (incluindo PI3K/AKT, PKC, PKB) e a família das MAPKs (*Mitogen Activated Protein Kinase*) composta por p38 e ERK1/2, desempenham um papel fundamental como mediadores finais do pré-condicionamento para a maioria dos ligantes envolvidos nessa condição (HAUSENLOY *et al.*, 2006; COHEN *et al.*, 2007). Estas vias induzem a fosforilação da GSK3 β , inibindo desse modo a abertura do poro de permeabilidade mitocondrial (MPTP) (JUHASZOVA *et al.*, 2004; HAUSENLOY & YELLON, 2007; MIURA *et al.*, 2010). Sendo assim, estas vias moleculares convergem para a GSK3 β , que por sua vez pode afetar inúmeros processos celulares, como o metabolismo de glicogênio, a montagem dos poros mitocondriais, apoptose, entre outros (BEUREL & JOPE, 2006; MIURA *et al.*, 2010).

2.2 GLICOGÊNIO SINTASE QUINASE 3 (GSK3)

A GSK3 é uma serina-treonina quinase multifuncional, que está presente em vários sistemas biológicos (GOULD & MANJI, 2005; FORDE & DALE, 2007). Foi originalmente descoberta como uma das proteínas responsáveis pela fosforilação da glicogênio sintase, fato que deu origem ao seu nome (KURET *et al.*, 1985). A partir de sua purificação do músculo esquelético de coelho (EMBI *et al.*, 1980) e posterior

clonagem molecular, descobriu-se que a GSK3 possui duas isoformas descritas em mamíferos, a GSK3 α (51 kDa) e GSK3 β (47 kDa), ambas presentes em cardiomiócitos (HARDT & SADOSHIMA *et al.*, 2002; FORCE & KOLOJA, 2011). No entanto, somente a isoforma beta está envolvida no processo de cardioproteção (JUHASZOVA *et al.*, 2004). As isoformas possuem uma homologia de sequência de 98% no interior do domínio catalítico, mas diferem significativamente uma da outra região fora deste domínio (Figura 1) (DOBLE & WOODGETT, 2003). Cada isoforma tem sua especificidade de função e não pode ser compensada pela síntese e/ou atividade da outra (HOEFLICH *et al.*, 2000).

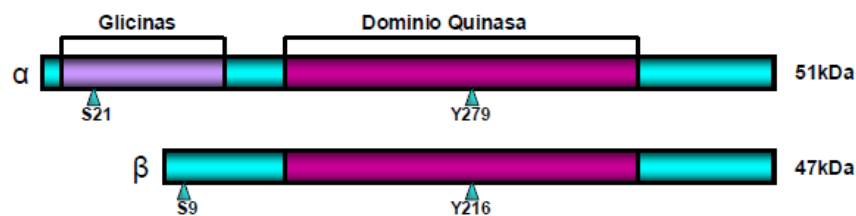


Figura 1: Representação esquemática de GSK-3 em mamíferos demonstrando as isoformas α e β . GSK-3 α tem um peso molecular de 51 kDa e de GSK-3 β a de 47 kDa. Ambas as isoformas possuem um domínio de quinase com homologia de seqüência de 98%. A isoforma α apresenta na extremidade N-terminal um domínio rico em glicina, ausente na isoforma β . O diagrama mostra também os locais de fosforilação de GSK-3: serina 21 e tirosina 279 na GSK- 3 α , e serina 9 e tirosina 216 na GSK-3 β . Adaptado de (DOBLE & WOODGETT, 2003).

2.2.1 Regulação

A GSK3, diferentemente de outras proteínas quinases, é ativada no estado de repouso e desativada quando a célula sofre um estímulo (STAMBOLIC & WOODGETT 1994; HIROTANI *et al.*, 2007). Devido à ampla distribuição tecidual da GSK3 e o envolvimento desta quinase em diferentes vias de sinalização celular, a GSK3 tem sido objeto de estudos em doenças sistêmicas (diabetes, câncer, inflamação) e cerebrais, incluindo transtornos neurodegenerativos e psiquiátricos (DUGO *et al.*, 2007; GAO *et al.*, 2008).

A atividade da GSK3 β é estritamente regulada e o principal mecanismo conhecido, até hoje, para esta regulação é a fosforilação da enzima (KAYTOR &

ORR, 2002; LI *et al.*, 2004; JOPE & ROH, 2006). A fosforilação do sítio tirosina 216 (Tir 216) é necessária para a atividade normal da enzima e altos níveis de fosforilação resultam em ativação nas células em repouso. Quando a fosforilação ocorre no sítio serina 9 (Ser 9), inativa a GSK3 β , mesmo que a porção Tir 216 esteja também fosforilada; e caso haja uma desfosforilação do sítio ser 9 a enzima será ativada (PEINEAU *et al.*, 2008). Ou seja, é uma quinase que pode ser ativada ou inibida por fosforilação. Diferentes sistemas de sinalização convergem para controlar a atividade da isoforma β , contribuindo para a regulação de suas funções celulares específicas (LI *et al.*, 2006). Quatro mecanismos principais identificados contribuem para tal controle (JOPE & JOHNSON, 2004), estes incluem a regulação por auto fosforilação, pelo estado de fosforilação de seus substratos, por sua localização subcelular e pela formação de complexos proteicos contendo a GSK3 (JOPE *et al.*, 2007). A atividade de ambas as isoformas é regulada fundamentalmente pela fosforilação, num processo dependente do balanço entre diversas quinases e fosfatases protéicas.

A ativação da via de sinalização de insulina conduz a inibição da GSK3 β através da fosforilação no resíduo serina 9 (Figura 2). Esta inibição promove o estímulo da síntese de glicogênio, ácidos graxos e proteínas (COHEN, 1999). Nessa via, a insulina se liga ao seu receptor ativando uma cascata de fosforilação resultando na inativação de GSK3 dependente de fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K). PI3K induz ativação de Akt resultando na fosforilação de ambas as isoformas de GSK3 inibindo sua atividade. Isto facilita a desfosforilação de substratos desta enzima, dentre eles a glicogênio sintase (GS) e do fator iniciador de síntese de proteína eucariótica 2B (eIF2B), conduzindo à ativação dos mesmos e consequentemente promovendo a síntese de glicogênio e proteína (COHEN, 1999; CROSS *et al.*, 1995).

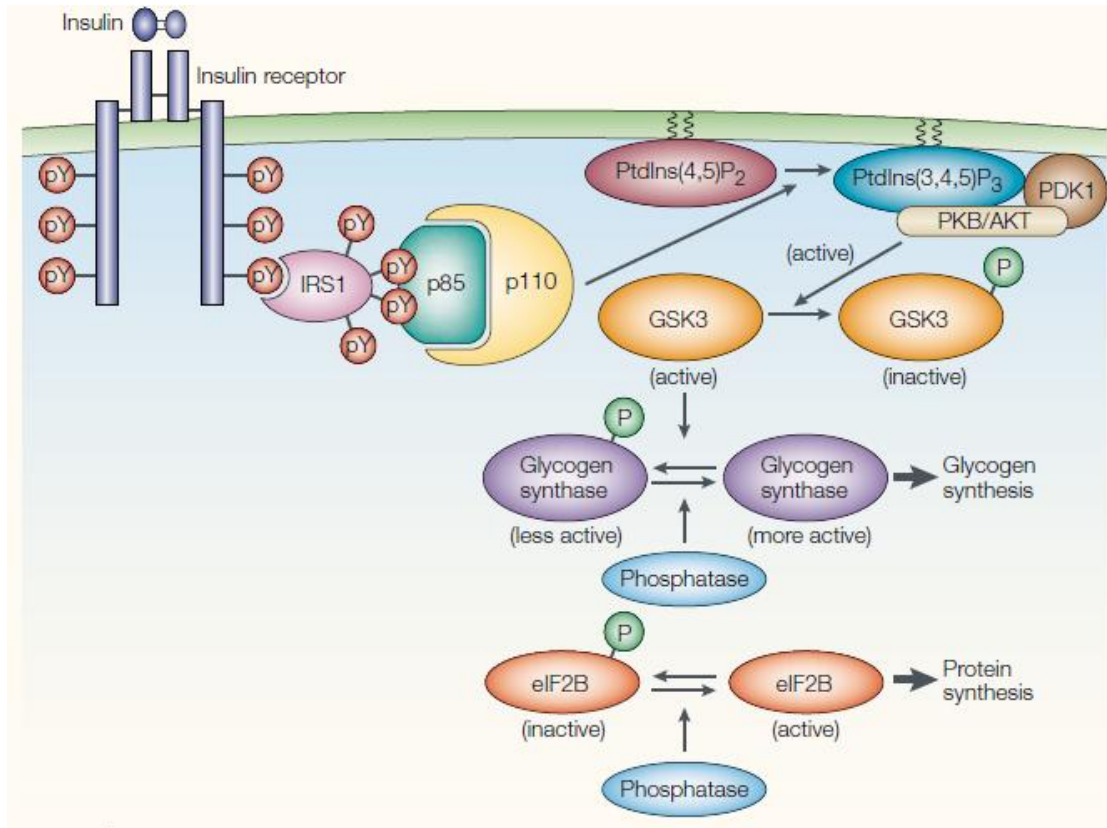


Figura 2: Ativação da via de sinalização de insulina inibe a GSK3 e contribui para a estimulação da síntese de glicogênio e proteína. A insulina inicia uma cascata de sinalização que envolve a ativação de quinases, entre elas PI3K e Akt ou PKB, culminando na fosforilação de GSK3 em serina 21/9 e subsequente inativação. Adaptado de (COHEN & FRAME, 2001).

2.2.2 Funções

A GSK3 β influencia mecanismos de sinalização celular, controle metabólico, embriogênese, morte celular, oncogênese, organização do citoesqueleto e controle transcricional (BALARAMAN *et al.*, 2006; JOPE *et al.*, 2007; MUYLLAERT *et al.*, 2008; YANAGA, 2013). Na célula, atua na arquitetura e na plasticidade, sendo fundamental em mecanismos como: divisão, proliferação, diferenciação e adesão celulares (GRIMES & JOPE, 2001; JOPE & ROH, 2007; PEINEAU *et al.*, 2008).

O primeiro trabalho que relata a GSK3 β traz a enzima como um componente da via de sinalização da insulina, controlando a síntese de glicogênio pela inibição da glicogênio sintase (EMBI *et al.*, 1980). Esta enzima também está envolvida na via *Wnt/Wingless*, essencial para o desenvolvimento embrionário, e que regula a

formação do eixo dorso-ventral em vertebrados, sendo importante em inúmeros processos críticos no desenvolvimento e homeostasia dos tecidos (HE *et al.*, 1995). A via do *Wnt* também está relacionada à hipertrofia cardíaca e a GSK3 β possui grande participação nesse processo. São muitos os estudos que têm mostrado o envolvimento da enzima neste contexto: a sua forma ativa previne o crescimento hipertrófico pela inibição de fatores transcripcionais, como NFAT, Gata 4 e eIF2B. Quando a enzima está super-expressa, o desenvolvimento da hipertrofia é atenuado (MICHAEL *et al.*, 2004, KERKELA *et al.*, 2007).

Existem muitos grupos de substratos nos quais a GSK3 β atua, esta ampla gama de substratos incluem proteínas envolvidas no metabolismo e estruturais, além de fatores de transcrição, sinalização e sobrevivência celular (JOPE & JONSHSON, 2004; GRIMES & JOPE, 2001; PLANEL *et al.*, 2002; LI *et al.*, 2004). Ela também pode inibir a síntese de proteínas por fosforilação e inativação do fator de iniciação eucariótico 2B (eIF2B) (Figura 2), necessário para iniciação da síntese de proteínas, desempenhando um papel fundamental no controle da morte celular programada (PAP & COOPER, 2002). O papel da isoforma GSK3 β na viabilidade e sobrevivência celular está bem consolidado (PAP & COOPER, 2002; FRAME & COHEN, 2001; JACOBS *et al.*, 2012). No entanto, a sua função no metabolismo do glicogênio cardíaco, na hipertrofia ventricular e no processo de morte celular ainda não foi completamente caracterizada (MORA *et al.*, 2005; SUGDEN *et al.*, 2008; (MIURA & MIKI, 2009).

Descobertas de que a enzima GSK3 promove a inflamação através do fator nuclear kappa B (NF κ B) revelaram novas funções na regulação de processos inflamatórios (DUGO *et al.*, 2007; GAO *et al.*, 2008). Além disso, a inibição de GSK3 fornece proteção contra condições inflamatórias em modelos animais diferentes (JOPE & BEUREL, 2007), o que sugere que os inibidores de GSK3 podem ter vários efeitos que influenciam estas condições.

A GSK3 β também impulsiona a progressão oncogênica, quer pela sua inibição ou a sua ativação, dependendo do tipo de célula. As diferenças nas funções de GSK3 β , dependendo do tipo de câncer, são bastante interessantes, considerando que a enzima tem um papel de promover o crescimento em alguns tipos de câncer, em outros ela atua na supressão do crescimento (MISHRA, 2010; YANAGA, 2013).

2.2.2.1 No sistema cardiovascular

Em cardiomiócitos, a GSK3 β está presente no núcleo e citoplasma em condições normais, não estimuladas (MURPHY & STEENBERGEN, 2005). A enzima presente no núcleo desempenha um importante papel durante a apoptose e contribui para a regulação do metabolismo energético mitocondrial (CHIARA & RASOLA, 2013). Os primeiros trabalhos envolvendo esta enzima na regulação de processos patológicos do coração foram publicados há uma década e a identificaram como um regulador negativo da resposta hipertrófica em cultura de cardiomiócitos (HAQ *et al.*, 2000). Desde então, diversos autores que utilizam uma variedade de modelos apoiaram esta conclusão, e sugeriram funções adicionais para a isoforma β no coração, sobretudo no pré-condicionamento isquêmico e na lesão isquêmica (HAQ *et al.*, 2000; VINTEN-JOHANSEN *et al.*, 2007 NISHINO *et al.*, 2008).

Existe uma gama de sistemas de transdução de sinais que medeiam a hipertrofia cardíaca, a hiperplasia da camada íntima, o dano oxidativo, a contratilidade, a insuficiência cardíaca e a proteção cardiovascular. Muitos componentes dessas vias de sinalização são alvos em potencial para o desenvolvimento de novas terapias no tratamento de desordens cardiovasculares (SRIVASTAVA *et al.*, 2008), sendo a GSK3 uma potencial enzima envolvida nesse contexto (YANAGA, 2013). Com relação à cardiomiopatia hipertrófica, estudos recentes têm mostrado que GSK3 α inibe o crescimento cardíaco pós-natal e reduz a hipertrofia induzida por sobrecarga de pressão. No entanto, a ativação desta isoforma está relacionada com o aumento da fibrose intersticial, da apoptose e a uma disfunção cardíaca mais grave em resposta à sobrecarga de pressão (ZHAI *et al.*, 2007). Curiosamente, as isoformas GSK3 α e GSK3 β parecem ter papéis distintos em um cenário de sobrecarga de pressão. A fosforilação da GSK3 β foi considerada essencial para o desenvolvimento de hipertrofia patológica, enquanto a fosforilação de GSK3 α desempenha um papel compensatório à sobrecarga de pressão (MATSUDA *et al.*, 2008). Assim, a modulação seletiva do estado de fosforilação das duas isoformas é necessária para maximizar o potencial terapêutico de modulação desta quinase (BERNARDO *et al.*, 2010).

A GSK3 também desempenha um importante papel na regulação da homeostase do cálcio no coração (MICHAEL *et al.*, 2004; OMAR *et al.*, 2010), já que a enzima controla a expressão da proteína SERCA-2a, fator determinante da função diastólica (MICHAEL *et al.*, 2004; PAN *et al.*, 2010). A desregulação da GSK3 leva a grave disfunção sistólica e diastólica com conseqüente insuficiência cardíaca progressiva (MICHAEL *et al.*, 2004; MENON *et al.*, 2007). Sendo assim, a enzima tem implicações potenciais para a terapia desta doença.

Como já relatado, a enzima é fundamental em muitas vias de sinalização celular e pode desempenhar uma função importante na proliferação de células do músculo liso e na apoptose após a angioplastia (PARK *et al.*, 2003). Autores sugerem que a regulação positiva (*upregulation*) do metabolismo de glicose no momento de lesão da camada íntima esteja associada à inibição da apoptose nas células do músculo liso vascular. Essa mudança no metabolismo de glicose parece estar acoplada à regulação das vias de sinalização antiapoptóticas, em parte através da inativação de GSK3 β (HALL *et al.*, 2001). As vias apoptóticas são amplamente induzidas em cardiomiócitos no contexto de isquemia e reperfusão durante um limitado período de tempo (FLISS & GATTINGER, 1996; GOTTLIEB, 1994). Pesquisas sugerem que a GSK3 β está intimamente envolvida no destino de células submetidas ao estresse extracelular, como as lesões de isquemia e reperfusão (JUHASZOVA *et al.*, 2004; MIURA *et al.*, 2009). Na isquemia e hipóxia tecidual a enzima promove a apoptose através da ativação da via de morte mitocondrial (TONG *et al.*, 2002).

Tem sido relatado que, no coração, a inibição de GSK3 β desempenha um papel importante na proteção contra os danos isquêmicos no nível de funcionamento mitocondrial, uma vez que mantém os poros de permeabilidade mitocondrial em uma conformação fechada (JUHASZOVA *et al.*, 2004; NISHIHARA *et al.*, 2007), já que a abertura deste poro leva à morte celular (JUHASZOVA *et al.*, 2004; MIURA & MIKI, 2009; MIURA & TANNO, 2012).

2.3 A TÉCNICA INFLOW OCCLUSION

A técnica de *Inflow Occlusion*, ou *Inflow Stasis*, consiste em obstruir temporariamente o fluxo do sangue venoso ao coração por clameamento das veia cava cranial, veia cava caudal e veia ázigos (STOPIGLIA *et al.*, 2001). Este procedimento pode ser realizado por toracotomia lateral direita, esquerda ou esternotomia, sendo a primeira a que apresenta maior facilidade de execução (STOPIGLIA *et al.*, 2001). Esta técnica é empregada em cirurgias cardíacas quando se pretende manter o coração aberto apenas por alguns minutos, para realização de pequenos reparos.

A *Inflow Occlusion* tem sido empregada com sucesso na correção de comunicação interatrial com dois períodos curtos e consecutivos de parada circulatória total (FREITAS *et al.*, 2005), na realização de valvuloplastia, durante um período de dois minutos (RAMAN *et al.*, 2002). Além disso, Brockman *et al.*, (2009) corrigiram uma anomalia congênita rara denominada dupla câmara de ventrículo direito, em um gato, dispondo da oclusão total do fluxo venoso durante dois minutos de oclusão. Em outro caso, um gato de 13 anos, foi submetido à atriectomia direita para retirada cirúrgica de parasitas no coração (IIZUKA *et al.*, 2009). Verbeke *et al.*, (2012) também utilizaram a técnica para ressecção de um hemangiossarcoma no átrio direito de um cão. Esta realidade faz da técnica de oclusão do influxo venoso cardíaco um artifício de grande importância, tornando aplicáveis as intervenções intra e extra cavitárias, que sem a mesma gerariam um sangramento muito intenso, tanto no campo da experimentação como nas intervenções clínicas (ORTON, 1995; KWASNICKA *et al.*, 2000; ODEGARD *et al.*, 2004; FREITAS *et al.*, 2005; GARCIA *et al.*, 2009).

2.3.1 Alterações metabólicas durante a aplicação da técnica *Inflow Occlusion*

Os quadros de desequilíbrio ácido-básico são frequentemente observados durante cirurgias cardíacas, principalmente quando se tem a interrupção da oferta de sangue a regiões do organismo determinando hipoxia tecidual (RAIA & ZERBINI, 1998). Portanto, nas cirurgias em que se aplica a técnica da *Inflow Occlusion*, que priva os tecidos de adequada perfusão sanguínea, observa-se como consequência

um estado de hipóxia, dessa forma uma análise hemogasométrica pode ser essencial para o sucesso da intervenção cirúrgica, garantindo a manutenção da vida do paciente (HASKINS & ALDRICH, 1994).

A análise dos gases do sangue arterial é um recurso fundamental para a avaliação da oxigenação do sangue, ventilação pulmonar e equilíbrio ácido-básico do organismo. O diagnóstico das desordens ácido-básicas está baseado na interpretação das alterações do pH, pressão parcial de gás carbônico (PaCO_2) e concentração de bicarbonato (HCO_3^-) no sangue. A análise em conjunto das alterações de dióxido de carbono (CO_2) e concentração de HCO_3^- ajuda a determinar a causa precisa da diferença de pH (KWASNICKA *et al.*, 2000). O ácido láctico também tem importância na identificação da acidose metabólica (FORTUNA, 2002).

Durante a parada circulatória é instalado um quadro de anaerbiose metabólica, decorrente da redução da perfusão tissular e da menor oferta de O_2 , que desencadeia a glicólise anaeróbica, culminando na acidose láctica (MINGRONE, 2006).

Na eventualidade de não ocorrer uma melhora na perfusão periférica e persistir ou se agravar o estado de hipóxia tecidual, a glicose produzida no fígado pela gliconeogênese volta aos tecidos e sofre novamente o processo de glicólise fermentativa, elevando os níveis de ácido láctico. Nestas condições, os níveis elevados de ácido láctico circulante não conseguem ser neutralizados pelo bicarbonato plasmático, resultando em acidose láctica. Em condições de isquemia miocárdica prolongada e que há dano irreversível as células cardíacas, ocorre a necrose ou infarto do coração (GIRALDEZ & RAMIRES, 2000).

2.4 MODELO EXPERIMENTAL

Em resposta a um aumento das doenças isquêmicas do coração nos últimos 50 anos os objetivos das pesquisas têm sido a compreensão da isquemia e o desenvolvimento de métodos para seu controle. Muitas destas pesquisas se utilizam de modelos animais (HEARSE, 2001). Muitos são os estudos envolvendo a isquemia cardíaca regional ou global em animais e seus resultados têm colaborado para o entendimento e tratamento da doença no ser humano (HEARSE, 2001).

O coelho é um modelo adequado e viável para estudos experimentais em vários ramos das ciências médicas e odontológica (CALANSANS-MAIA *et al.*, 2009). O propósito dos centros de pesquisa é ter um modelo que proporcione um custo baixo de manutenção, que permita uma viabilidade técnica do procedimento e que apresentem semelhanças fisiológicas com o ser humano. O miocárdio dos coelhos é similar a dos humanos no que tange a eliminação do cálcio e permuta de sódio pelo retículo sarcoplasmático (HASENFUSS, 1998), na relação positiva entre força e frequência miocárdica e nos processos de acoplamento excitação-contração (DEKKER *et al.*, 1998; EZZAHER *et al.*, 1992).

De maneira geral, os animais maiores, como os coelhos e mini *pigs*, têm batimentos cardíacos mais lentos que os pequenos roedores, além de uma fisiologia cardíaca semelhante com a dos humanos, dentro deste contexto os coelhos oferecem um equilíbrio coerente entre a fisiologia aproximada e o baixo custo nas pesquisas (HASENFUSS, 1998).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Os procedimentos foram realizados na Unidade de Experimentação Animal (UEA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). Todas as etapas deste ensaio encontram-se de acordo com as normas e princípios éticos de experimentação animal, estabelecidos pela lei nº 11794/08 após aprovação da Comissão de Ética de Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, sob o protocolo de número: 171/2012. Foram utilizados 18 coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), machos, pesando entre 2,5 e 3,5 quilogramas (kg), provenientes do setor de cunicultura da Universidade Federal de Viçosa (UFV), estado de Minas Gerais. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos com seis animais cada. O primeiro grupo foi denominado controle, o segundo grupo isquemia e o terceiro grupo reperfusão. No grupo controle, os animais passaram pelo procedimento cirúrgico, sem a realização da parada circulatória cardíaca ou *Inflow Occlusion*. Cronometrou-se os cinco minutos mimetizando o período de oclusão e ao final deste tempo foram realizadas as biopsias do ventrículo esquerdo. No grupo isquemia foi aplicada a técnica de *Inflow Occlusion* por cinco minutos, e realizou-se também as biopsias do ventrículo esquerdo. O grupo reperfusão foi submetido à técnica de *Inflow Occlusion* pelo mesmo período de tempo. No entanto, as biópsias do ventrículo esquerdo foram realizadas após o quinto minuto de recirculação sanguínea. Padronizou-se para biópsia 100 mg de ventrículo esquerdo por animal.

3.2 PARÂMETROS

Os parâmetros avaliados foram: hemogasometria; lactato; frequência cardíaca; pressão arterial média; temperatura corporal e capnografia conforme descrito abaixo.

3.2.1 Hemogasometria e lactato

Para avaliação hemogasométrica analisou-se a variação do pH, bicarbonato plasmático e dos gases sanguíneos de coelhos submetidos a parada circulatória cardíaca. A medição do lactato é realizada para detecção e monitoramento sistêmico da hipoperfusão tecidual e como indicador de prognóstico em pacientes criticamente enfermos. A artéria auricular central da orelha esquerda foi cateterizada com um catéter de polietileno de calibre 22G (Nipro medical LTDA). O volume de sangue de cada amostra era de 0,5 ml, coletados em seringa plástica heparinizada, sendo volume suficiente para ser processado. Amostras sanguíneas arteriais foram coletadas nos tempos de avaliação estipulados, para a verificação dos seguintes parâmetros: pH, PaCO₂, TCO₂, HCO₃⁻, EB, PaO₂, SO₂ e Lactato. Para tal, utilizou-se tiras de teste CG4+ que eram inseridas em aparelho portátil (i-STAT[®] System) para leitura dos gases sanguíneos.

3.2.2 Frequência Cardíaca

O traçado eletrocardiográfico foi obtido através de um dispositivo metálico, introduzido na região subcutânea do abdômen dos coelhos de acordo com as especificações do aparelho LabChart[®] TEB- ADInstruments.

O traçado eletrocardiográfico de cada animal foi avaliado observando-se a ocorrência de batimentos cardíacos de origem não sinusal. A frequência cardíaca foi obtida através da mensuração da quantidade das ondas R em 1 minuto. Para tanto, a leitura foi feita utilizando-se a derivação DII.

3.2.3 Pressão arterial média invasiva

Para obtenção dos valores de pressão arterial média (PAM), a artéria auricular central foi cateterizada com um catéter intravenoso de polietileno, calibre 22G (Nipro medical LTDA) sendo em seguida acoplado a um transdutor de pressão do LabChart® ADInstruments.

3.2.4 Temperatura corporal

A manutenção da temperatura durante o procedimento anestésico- cirúrgico é de grande importância para uma rápida e adequada recuperação do paciente no pós- operatório. Durante o ensaio experimental o animal permaneceu sobre um colchão (Modelo TP-500 T/Pump, Gaymar industries, Inc, Orchard, NY, EUA) térmico, para manutenção da temperatura ao longo do experimento. A temperatura corporal dos animais foi aferida pela termometria esofágica com uso do Monitor Multiparamétrico.

3.2.5 Capnografia

Na anestesia a capnografia é comumente usada como ferramenta de monitoramento. Mensurou-se a pressão parcial de dióxido de carbono no ar expirado (ETCO₂) por meio do capnógrafo e analisador de gases anestésicos, sendo o transdutor do aparelho Multiparamétrico Advisor® (Smith Medical PM) conectado à porção expiratória da traqueia do aparelho de anestesia.

3.3 PROTOCOLO ANESTÉSICO

Os coelhos foram pré-medicados com maleato de acepromazina (Acepran[®] 1%, Univet S.A., São Paulo - SP, frasco-ampola contendo 20 mL), na dose de 0,3 mg.kg⁻¹, associado à petidina (Dolosal[®], Cristália, São Paulo - SP, ampola contendo 2 mL com 1 mg/mL), na dose de 10 mg.kg⁻¹ pela via intramuscular. Vinte minutos após administração da medicação pré-anestésica foi realizada a tricotomia da região lateral do tórax direito, assim como das faces externas das orelhas, para cateterização da veia marginal e artéria auricular central, assim como da região ventral do pescoço para posterior traqueostomia. Utilizou-se anestesia infiltrativa na linha de incisão e adjacências para o acesso cirúrgico da traqueia com cloridrato de lidocaína com vasoconstritor (Xilocaína[®], Cristália, São Paulo - SP, ampola contendo 20 mL a 2%), na dose de 9 mg.kg⁻¹. Durante os procedimentos anestésicos e cirúrgicos, os animais receberam infusão de solução de Ringer com lactato (Ringer com Lactato[®], São Paulo-SP, frasco de 250 mL) em uma velocidade de 7 mL/kg/h. A indução ocorreu pela aplicação endovenosa de propofol (Propovan[®] Cristália, Itapira -SP, frasco de 10 mL) a 10 mg. kg⁻¹ e a manutenção anestésica foi realizada com isoflurano (Isoforine[®], Cristália, São Paulo - SP, frasco com 100 mL) e oxigênio a 100% em circuito semiaberto. Os animais permaneceram em ventilação controlada manual durante todo experimento, com exceção dos períodos de parada circulatória cardíaca em que se cessava a ventilação.

3.4 PARADA CIRCULATÓRIA CARDÍACA

Os coelhos foram colocados em decúbito lateral esquerdo para realização da toracotomia unilateral direita, no quarto espaço intercostal. Uma vez no interior da cavidade torácica as veias cavas cranial e caudal, bem como a veia ázigos, foram dissecadas em segmentos de dois centímetros para melhor posicionamento das pinças. Adaptou-se a técnica original e a ligadura da veia ázigos foi executada utilizando fio de náilon 3-0 (Figura 3a seta branca). Antes do fechamento das pinças vasculares Satinsky sob as veias cavas (setas branca e amarela), foi realizada uma hiperventilação por 30 segundos, os pulmões foram expandidos por uma última vez, com o objetivo de se esvaziar as câmaras cardíacas, em seguida, as pinças foram fechadas (Figura 3b), a parada circulatória total foi estabelecida por um período de

cinco minutos. O tempo de *Inflow occlusion* foi cronometrado assim que a veia cava caudal foi ocluída, sendo sequencialmente ocluída a cava cranial. As referidas veias foram liberadas ao término do período de oclusão de cinco minutos, em sequência inversa à de oclusão. Após a abertura das pinças, estabeleceu-se um período de cinco minutos de recirculação sanguínea. As biópsias foram realizadas após luxação do coração na cavidade torácica (Figura 3c seta branca).

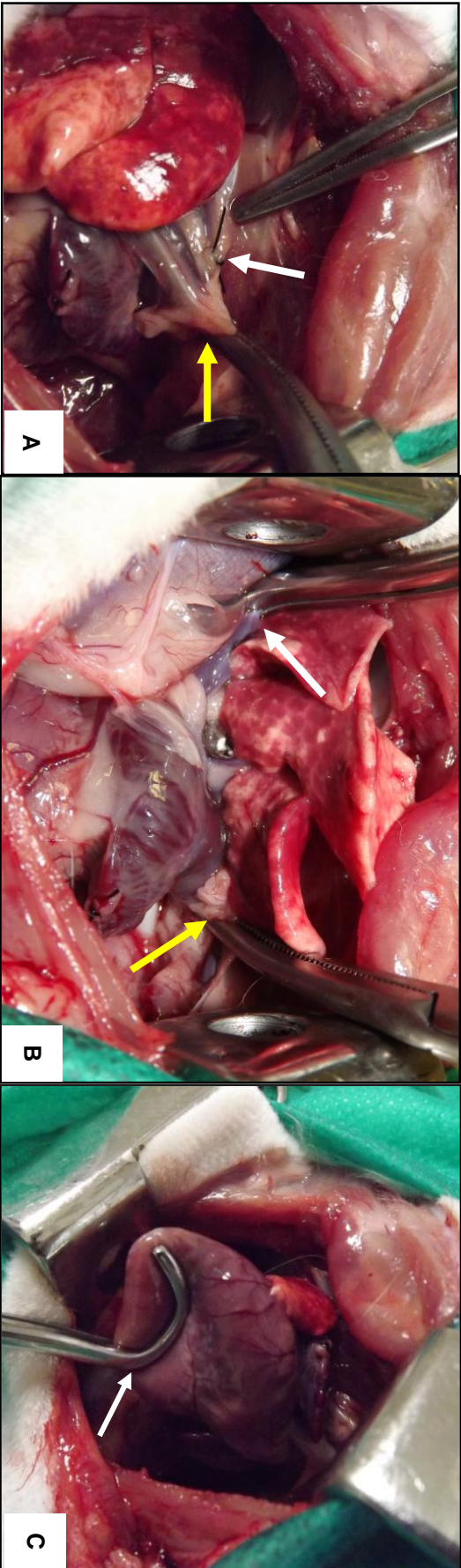


Figura 3: a - Ligadura de veia ázigos (seta branca) e oclusão de veia cava cranial (seta amarela), b - oclusão das veias cava cranial (seta branca) e caudal (seta amarela) com as pinças vasculares, momento da *Inflow occlusion*, c - pinçamento do ventrículo esquerdo para posterior biópsia cardíaca (seta branca).

3.5 ANÁLISE MOLECULAR

Após a realização da biópsia de 100 mg do miocárdio (ventrículo esquerdo), as amostras foram fracionadas e pesadas para posterior acondicionamento. Parte foi acondicionada no reagente estabilizador de RNA, RNA *later*TM (Quiagen) e congelada a -20°C para posterior análise da reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR) e parte foi armazenada a -80°C para posterior Western Blotting.

3.5.1 Transcrição relativa do gene de glicogênio sintase quinase 3β (GSK3 β)

O tecido armazenado em RNA *later*TM (50 miligramas de amostra) foi macerado em Trizol e nitrogênio líquido (N₂) utilizando-se um cadinho de porcelana estéril. A extração foi realizada segundo o protocolo recomendado pelo fabricante do reagente Trizol (Invitrogen Life Technologies, Inc., Carlsbad, CA, USA). A quantificação do RNA foi realizada por espectrofotometria a um comprimento de onda de 260/280 nanômetros a fim de verificar sua integridade. O cDNA correspondente foi sintetizado a partir de 1µg de RNA com o kit para síntese de cDNA da Applied Biosystems (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits), como recomendado pelo fabricante.

A quantificação do transcrito referente à GSK3β foi realizada por PCR quantitativo (modelo StepOne PlusTM Real Time PCR, Applied Biosciences) através da utilização do kit reagente *Power SYBR Green PCR Master Mix*, no sistema de placa de 96 poços. A análise da transcrição relativa do gene da enzima foi feita com relação ao gene de referência Ciclofilina A (BLAAUW *et al.*, 2013). A expressão relativa foi determinada através de análise das Ct's no programa computacional Relative Expression Software Tool-REST (PFAFFL, 2001).

Foi realizada uma busca no site do *National Institute of Health* (Search database)-(NCBI) onde foi identificada a sequência da enzima GSK3 β do *O. cuniculus* (XP. 002716707.1). A partir desta sequência foram desenhados primers para a confirmação e análise desta enzima em coelhos. Os primers específicos foram desenhados fora da região conservada (Figura 4a) utilizando o programa Primer 3 versão 4.0. Dois aminoácidos foram marcados, sendo um a serina 9 e o outro a tirosina 216, presentes apenas na GSK3 β (Figura 4b). Além disso, um alinhamento foi realizado entre a GSK3 β de coelho (*O. cuniculus*), homem (*H. sapiens*), cão (*C. falimiaris*) e camundongo (*M. musculus*) onde observou-se a conservação dos sítios quinases e os aminoácidos serina 9 e tirosina 216 que auxiliaram na validação da sequência selecionada (Figura 5). Finalmente foi observado um grau de homologia que varia de 96 até 99,7%, ratificando que a sequência que foi selecionada é a GSK3 de *O. cuniculus*.

Figura 4: Sequência de nucleotídeos (A) e aminoácidos(B) da GSK3 β do *Oryctolagus cuniculus* (fonte NCBI). Em (A) sequência do mRNA (XM_002716661) com a região codificante sublinhada, *start* codon em verde e *stop* codon em vermelho, áreas em negrito referente ao alinhamento das sequências dos *primer Forward* e *Reverse*. Em (B) Sequência de aminoácidos deduzida da região codificante (XP_002716707.1), sublinhada região referente do domínio proteína quinase em amarelo Ser⁹ e em verde resíduo Tir²¹⁶ de GSK3 β .

A-

GGAGGAAGGAAG**GAAAAGGTGATTCGGGAAG**AGAGTGATCATGTCAGGGCGGCCAG
AACCACCTCCTTTGCGGAGAGCTGCAAGCCAGTGCAAGCAGCCTTCAGCTTTTGGCAGC
ATGAAAGTTAGCAGAGACA**AAGGATGGCAGCAAGGTA**ACTACAGTGGTGGCAACTCCTG
GGCAGGGTCCAGACAGGCCACAAGAAGTCAGTTATACAGACACTAAAGTGATTGGAAT
GGGTCATTTGGTGTAGTATATCAAGCAAACTTTGTGATTCAGGAGAATTGGTTGCCATC
AAGAAAGTATTACAGGACAAGAGATTTA**GA**ACCGAGAGCTCCAGATTATGAGAAAGCT
AGATCATTGTAACATAGTCCGTTTGC GTTATTTCTTCTACTCGAGTGGTGAGAAGAAAGA
TGAGGTCTATCTTAATCTGGTGTGCTGGACTATGTTCCGGAAACAGTATACAGAGTTGCCA
GACACTATAGTCGAGCCAAACAGACACTCCCTGTCTATCTATGTCAAGTTGTATATGTATC
AGCTGTTTTCGAAGTTTAGCCTATATCCATTCTTTGGAATCTGCCATCGGGATATTAAC
CACAGAACCTCTTGTTGGATCCTGATACAGCTGTTTTAAACTCTGTGACTTTGGAAGTG

CAAAGCAGCTGGTCCGAGGAGAACCCAATGTTTCGTATATCTGTTCTCGGTACTATAGG
GCACCAGAGTTGATCTTTGGAGCCACTGATTATACCTCCAGTATAGATGTATGGTCTGC
AGGCTGTGTATTGGCTGAGCTGTTGCTAGGACAGCCAATATTTCCAGGAGACAGTGGTG
TGGATCAGTTGGTGAAATAATCAAGGTCCTGGGAACACCAACAAGGGAGCAAATTAGA
GAAATGAACCCAAATTACACAGAATTCAAATTTCTCAAATTAAGGCACATCCTTGGACT
AAGGTCTTCCGACCCCGAACTCCACCAGAGGCAATTGCACTGTGTAGCCGTCTGCTGG
AGTACACACCAACTGCCCGACTGACACCACTGGAAGCTTGTGCACATTCATTTTTTGT
GAATTACGGGACCCAAATGTCAAACCTACCAAATGGGCGAGACACACCTGCACTCTTCAA
CTTCACCACTCAAGAAGTGTCAAGTAATCCACCTTTGGCTACCATCCTTATTCCTCCTCA
TGCTAGGATTCAAGCAGCTGCTTCAACCCCTACAAATGCCACAGCAGCCTCAGATGCTA
ATGCTGGAGACCGTGGACAGACCAATAATGCCGCTTCTGCATCAGCTTCCAACCTCCACC
TGAACAGTCGCAAGCAGCCAGCTGCACAGGAAGAACCACCAGTTACTTGAGTGTCACT
 CAGCA AACTGGTCACGTTTGGAAAGAAAATT

B-

MSGRPRTTSFAESCKPVQQPSAFGSMKVSRDKDGSKVTTVVATPGQGPDRPQEVSYTDT
KVINGNSFGVVYQAKLCDSGELVAIKKVLQDKRFKNRELQIMRKLDHCNIVRLRYFFYSSGE
KKDEVYLNLVLDYVPETVYRVARHYSRAKQTLPVIYVKLYMYQLFRSLAYIHSFGICHRDIK
QNLLLDPDTAVLKLCDFGSAKQLVRGEPNVSYICSRYYRAPELIFGATDYTSSIDVWSAGCV
LAELLLGQPIFPDSGVDQLVEIIKVLGTPTREQUIREMNPNYTEFKFPQIKHPWTKVFRPRT
PPEAIALCSRLLEYTPTARLTPLEACAHSFFDELRDPNVKLPNGRDTPALFNFTTQELSSNPP
 LATILIPPHARIQAAASTPTNATAASDANAGDRGQTNNAASASASNST

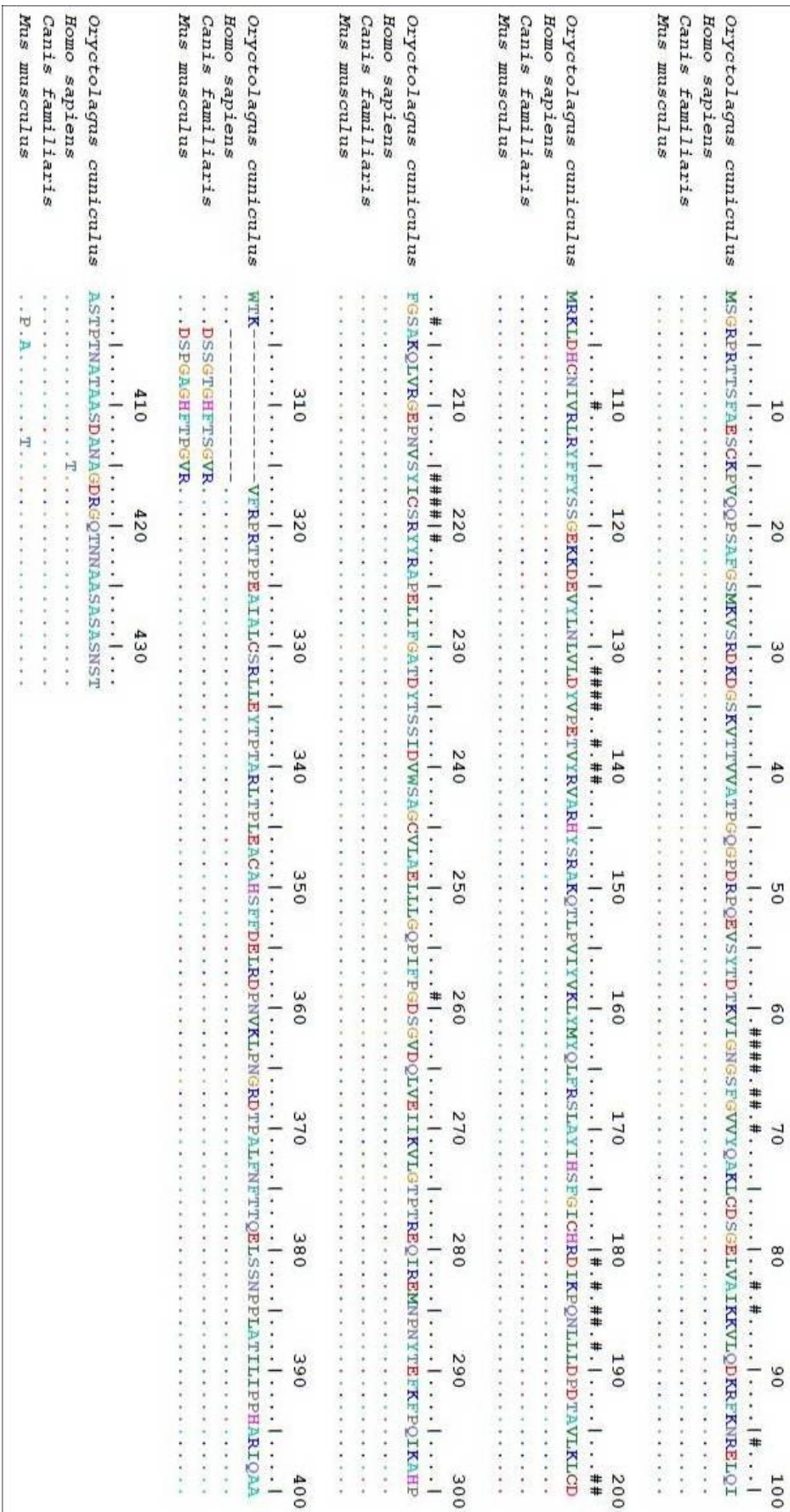


Figura 5: Alinhamento múltiplo de sequências de aminoácidos da enzima glicogênio sintase quinase 3 beta. O símbolo “#” destaca os resíduos de aminoácidos que fazem parte do sítio ativo. Código de acesso: *O. cuniculus* (XP_002716707.1), *H. sapiens* (NP_001139628.1), *C. familiaris* (XP_535751.2) e *M. musculus* (XP_006522488.1).

Um BLAST foi realizado para demonstrar o grau de homologia da GSK3 β do *O. cuniculus* com outras espécies de mamíferos e o grau de homologia foi determinado utilizando-se o Bioedit. Após esta análise construiu-se uma tabela comparativa contra os graus de homologia das sequências de GSK3 de *O. cuniculus* com *H. sapiens*, *C. familiaris* e *M. musculus* (Quadro 1).

Quadro 1: Percentual de identidade entre a GSK3 β de coelho (*O. cuniculus*), homem (*H. sapiens*), cão (*C. familiaris*) e camundongo (*M. musculus*).

Organismos	<i>O. cuniculus</i>	<i>H. sapiens</i>	<i>C. familiaris</i>	<i>M. musculus</i>
<i>O. cuniculus</i>	ID	99,7	96,9	96,3
<i>H. sapiens</i>	99,7	ID	96,7	96,0
<i>C. familiaris</i>	96,9	96,7	ID	98,6
<i>M. musculus</i>	96,3	96,0	98,6	ID

A sequência do gene para glicogênio sintase quinase 3 β (GSK3 β) de coelhos (*O. cuniculus*) foi obtida do GenBank. *Primers* específicos para os genes foram desenhados (Quadro 2). Os *primers* foram desenhados de forma que não anelassem dentro da região correspondente ao domínio quinase.

Quadro 2: Sequência dos *primers* para o gene Ciclofilina A e Glicogênio Sintase Quinase 3 β .

Gene	Abreviação	<i>Primers</i>	Tamanho do fragmento (bp)
Ciclofilina A	Cyclo	5'AAGAAGATCACCATTGCCAAC	78
		3'GAGCTAGAGGAATGGTCAGGTG	
<u>Glicogênio sintase quinase 3β</u>	GSK3 β	5'GAAAAGGTGATTCGGGAAGA	141
		3' AAGGATGGCAGCAAGGTAAC	

3.5.2 Quantificação glicogênio

O glicogênio é a maior reserva de carboidratos em mamíferos, e sob uma condição de isquemia, estas reservas podem ser mobilizadas para sustentar o metabolismo cardíaco. Foram homogeneizados 20mg de tecido cardíaco (ventrículo esquerdo) do grupo controle, isquemia e reperfusão, em 500 μ L de tampão acetato de sódio 200 mM, pH 4,8. Foram adicionados 40 μ L da enzima α -amiloglucosidase (1 mg/mL), incubando este meio de reação à 40°C por quatro horas. Foram pipetados 300 μ l de PBS pH 7,4 1X e 500 μ L de Glucox[®] (15,2 mg/mL) à 37°C por 15 minutos. A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro (Shimadzu UV-visível-1240) a 510 nm. Calculou-se o conteúdo de glicogênio nas amostras de tecido cardíaco com base em uma curva padrão de glicogênio submetido às mesmas condições do ensaio.

3.5.3 Dosagem de proteínas – Método Bradford

A dosagem de proteína foi feita pelo método colorimétrico descrito por Bradford (1976), baseado na formação de complexos entre o corante Coomassie Blue com a cadeia polipeptídica. Um volume de 10 μ L dos extratos protéicos, obtidos dos tecidos foram utilizados para a quantificação. Amostras em triplicata foram colocadas em tubos de ensaio onde foi adicionado 90 μ L de água destilada e 1mL do reagente de Bradford em cada amostra. A mistura foi agitada vigorosamente, incubada por dois minutos a temperatura ambiente (TA) e procedeu-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro (Shimadzu UV-visível-1240) no comprimento de onda de 595nm. A concentração de proteína foi calculada através de uma curva de diluição padrão de soro de albumina bovina 1mg/mL (BSA).

3.5.4 Análise da Expressão Proteica - Western Blotting

Utilizou-se 30 mg de tecido (macerado em nitrogênio), para avaliar a expressão proteica da GSK3 β extraiu-se a proteína total do tecido, utilizando um tampão de lise (20mM TRIS-HCl pH 7.5, Triton X-100 a 10%, ortovanadato de sódio (2mM), 100mM Pirofosfato de sódio (2mM), Molibdato de amônio (2,3mM), Fluoreto de sódio (10mM), pepstatina A (0,02mM) e *Protease Inhibitor Cocktail* (Sigma-Aldarich), num volume final de 500 uL. A concentração proteica das amostras foi obtida pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

Em seguida, 30 μ g de proteína total foram submetidos à eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) (3 % stacking e 10 % gel de resolução) e transferidas para membrana de nitrocelulose (PROTEAN[®] Nitrocellulose Transfer Membrane). Esta foi corada com solução Ponceau para avaliar se a concentração de proteína era similar entre as amostras. Em seguida a membrana foi incubada com solução de TBST (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.5 e Tween-20 2 %) por 10 min. Posteriormente, a membrana foi incubada com um dos anticorpos primários, descritos no quadro 2, em agitação, por cerca de 14 horas, a 4 °C. Pela manhã, após lavagens seguidas com TTBS 1x procedeu-se novamente ao bloqueio de reações inespecíficas com solução de leite em pó desnatado 3%, diluído em TTBS, durante 10 minutos e em seguida as membranas foram incubadas com anticorpos secundário (anti-coelho, obtido de cabra), conjugados com peroxidase durante duas horas, sob agitação suave e em temperatura ambiente (quadro 3). A ligação foi revelada com uma solução preparada em frasco âmbar, contendo diaminobenzidina (DAB) e peróxido de hidrogênio. A solução reveladora foi composta de 800 uL de TRIS-HCL 1M pH 7,5; 2400uL de imidazole 0,1 M; 40mg DAB e 40 uL de peróxido de hidrogênio a 8,8 mM. A proteína de interesse é revelada graças a anticorpos primários específicos, que foram eles mesmos, reconhecidos por anticorpos secundários conjugados a uma peroxidase, metabolizando o DAB. Esta enzima permite a catálise de uma reação gerando complexos coloridos que podem ser diretamente reconhecidos. As membranas secaram sobre uma folha de papel A4 e em seguida foram fotodocumentadas e escaneadas, juntamente com os géis. O experimento foi realizado em triplicata para cada grupo avaliado e repetido duas vezes. As imagens das membranas foram digitalizadas e a intensidade de marcação foi determinada no *software* Image J (Image Processing and Analysis in Java) pela análise de *pixels*.

Quadro 3: Lista de anticorpos primários e secundário utilizados para a análise de expressão protéica por Western blotting.

Proteínas Analisadas	Origem	Peso Molecular	Titulação
GSK3 β total	Sigma (G7914)	47 kDa	1:10000
p- GSK3 β (Ser9)	Santa Cruz (SC-11757-R)	47 kDa	1:10000
Anti Rabbits IgG (Whole molecule) peroxidase anticorpo produced goat	Sigma	47kDa	1:2000

3.6 ABATE DOS ANIMAIS

Ao final do Experimento os animais foram abatidos recebendo altas frações inspiradas do anestésico inalatório (isoflurano) seguidas pela administração de cloreto de potássio a 19,1% (cloreto de potássio a 19,1%[®], São Paulo-SP, ampola de 10 mL) pela via intravenosa.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para analisar a estatística das variáveis fisiológicas, transcrição e atividade de GSK3 β e quantificação do glicogênio utilizou-se a análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas, seguida do teste de Tukey. A análise entre as variáveis hemogasométricas e análise do lactato foi realizada através do teste *t* Student. O grau de significância (α) estabelecido para os testes estatísticos realizados foi de 5% ($p < 0,05$). O programa estatístico empregado para esta análise foi o GraphPad Prisma[®] versão 5.0.

4. RESULTADOS

4.1 HEMOGASOMETRIA

Os valores de pH diminuíram consideravelmente no grupo isquemia e reperfusão (ANEXO A). Após a reperfusão não houve alteração nos valores de pH com relação ao grupo isquêmico (Figura 6).

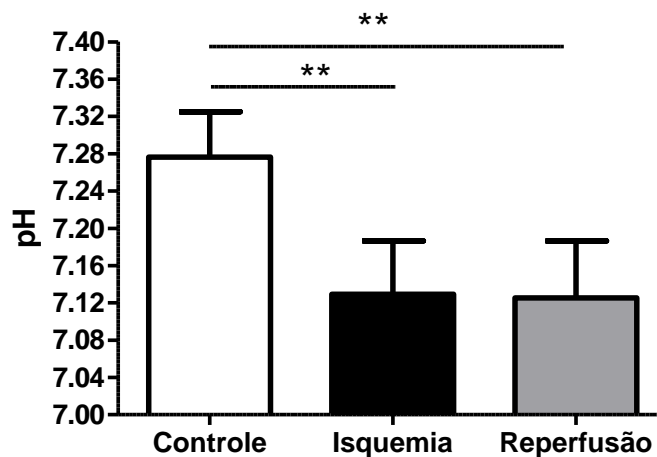


Figura 6: Acidemia apresentada pelos coelhos submetidos a técnica de *Inflow Occlusion*. O método estatístico utilizado foi ANOVA, pós teste *t* ($P \leq 0,05$), ($n=7$).

Com relação ao íon bicarbonato e o excesso de base (BE), ambos não apresentaram alteração nos grupos avaliados (Tabela 1). No grupo isquemia, a pressão arterial de CO_2 sofreu um aumento significativo, em consequência da não ventilação dos animais durante a *Inflow Occlusion*. Tal efeito persistiu também no grupo reperfusão mesmo após 5 minutos de recirculação e retomada da ventilação (Tabela 1). A TCO_2 não sofreu variação entre os grupos. Com relação à saturação de oxigênio $\text{SO}_2\%$, esta apresentou queda significativa no grupo isquemia com recuperação dos seus valores acima de 80% no grupo reperfusão. Já a pressão arterial de oxigênio (PaO_2), estatisticamente, não revelou diferenças significativas

entre os grupos, sendo os perfis similares e iguais (Tabela 1) valores absolutos das variáveis hemogasométricas (ANEXO B ao G).

Tabela 1. Médias e desvio-padrão (\pm DP) das variáveis hemogasométricas observadas em coelhos submetidos à técnica *Inflow occlusion* durante os grupos: controle, isquemia e reperfusão.

Variáveis de Hemogasometria		Tratamentos		
		Controle	Isquemia	Reperfusão
pH	Média	7,27	7,12***	7,12***
	DP	\pm 0,04	\pm 0,05	\pm 0,06
HCO ₃ (mmol L ⁻¹)	Média	24,97	24,87	24,35
	DP	\pm 5,18	\pm 5,70	\pm 3,22
PaCO ₂ (mmHg)	Média	52,81	76,47*	73,75*
	DP	\pm 8,47	\pm 25,87	\pm 12,23
BE (mmol L ⁻¹)	Média	-1,57	-4,42	-6,85
	DP	\pm 5,71	\pm 5,31	\pm 4,56
TCO ₂ (mmol L ⁻¹)	Média	26,57	27,28	26,27
	DP	\pm 5,41	\pm 6,36	\pm 3,93
PaO ₂ (mmol L ⁻¹)	Média	179,57	58,57	161,42
	DP	\pm 181,46	\pm 55,63	\pm 159,06
SO ₂ (%)	Média	91,85	76,85*	88,42
	DP	\pm 10,65	\pm 25,04	\pm 11,28

* Diferença estatística significativa entre as médias do grupo controle e isquemia; controle e reperfusão. (Teste *t*, $P \leq 0,05$.), (n=7).

4.2 DOSAGEM DE LACTATO

Os valores médios de lactato no grupo controle, isquemia e reperfusão foram de 3,72 (mmol/L); 6,69 (mmol/L); 6,86 (mmol/L) respectivamente (ANEXO H). Houve aumento significativo do lactato no sangue dos coelhos do grupo isquêmico, que se manteve no grupo reperfusão (Figura 7).

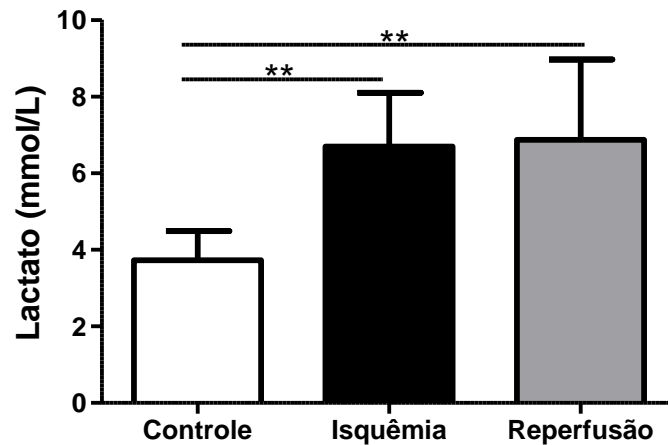


Figura 7: Lactemia apresentada no grupo isquêmico e reperfusão submetidos à técnica de *Inflow Occlusion*. O método estatístico utilizado foi ANOVA, pós teste de Tukey ($P \leq 0,05$). (n=8).

4.3 TRANSCRIÇÃO RELATIVA DO GENE DE GLICOGÊNIO SINTASE QUINASE 3β (GSK3 β)

Para se avaliar a resposta transcricional da enzima GSK3, a intervenção cirúrgica *Inflow Occlusion* foi feita uma avaliação dos níveis transcricionais da enzima antes, na isquemia e na reperfusão do coração. Para isso utilizou-se *primers* específicos capazes de amplificar um fragmento de aproximadamente 141 pb utilizando PCR em tempo real. Durante a aplicação da técnica *Inflow Occlusion* foi observado um aumento de aproximadamente de 50 vezes na resposta transcricional da GSK3 β . A análise transcricional da GSK3 β mostrou um aumento significativo no grupo isquêmico. Após a reperfusão, os níveis de transcritos retornam aos valores observados para a condição controle (Figura 8).

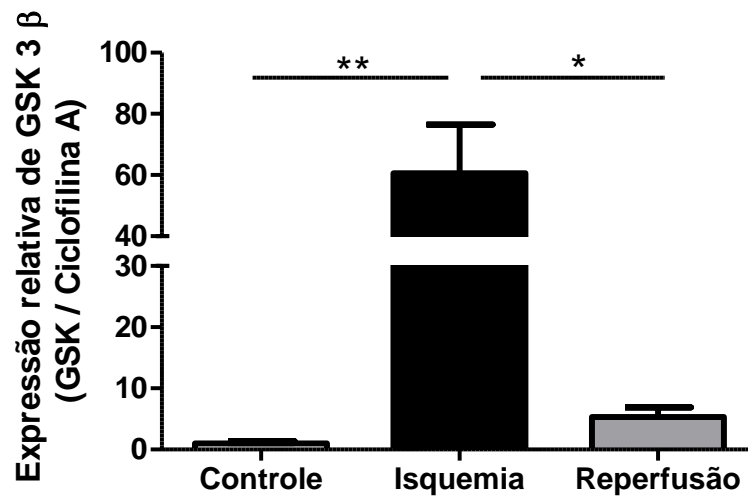


Figura 8: Resposta gênica elevada de GSK3 β durante isquemia. A análise foi realizada através de PCR em tempo real nas três condições estudadas. O método estatístico utilizado foi ANOVA, pós teste de Tukey ($P \leq 0,05$), ($n=18$).

4.4 QUANTIFICAÇÃO GLICOGÊNIO

O gráfico abaixo representa a quantidade de glicogênio por proteína nos grupos controle, isquemia e reperusão. Com relação ao glicogênio, observou-se uma redução deste metabólito após indução isquemia, já na reperusão esses valores não foram alterados quando comparados aos demais grupos (Figura 9). Nota-se que a queda de glicogênio não segue a mesma proporção que o aumento transcricional da enzima GSK3 β .

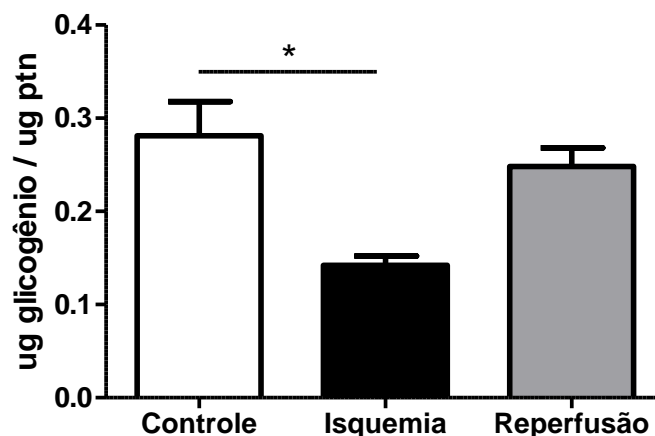


Figura 9: Redução na quantidade de glicogênio no período isquêmico. A dosagem de glicogênio foi realizada utilizando-se o Kit Glucox[®]. O método estatístico utilizado foi ANOVA, pós teste de Tukey ($P \leq 0,05$), ($n=18$).

4.5 ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTEICA DE (GSK3 B) – WESTERN BLOTTING

Na Figura 10a, imagens representativas de bandas de GSK3 β analisadas por western blotting, reveladas em membrana de nitrocelulose. Em C na parte superior representação do grupo controle, em I representação do grupo isquemia e em R representação do grupo reperfusão, bandas de GSK3 β fosforilada em sitio serina 9. Na região inferior (Figura 10a), bandas de GSK3 β total seguindo os mesmos parâmetros de indicação de grupos acima. No grupo isquemia foi observado um maior grau de fosforilação da GSK3 β , conseqüente inibição da enzima quando comparado ao grupo reperfusão (Figura10a). A razão fGSK3 β /GSK3 β total foi investigada e na isquemia não sofre mudança significativa em relação à condição controle. Entretanto esta razão é reduzida após a reperfusão (Figura 10b).

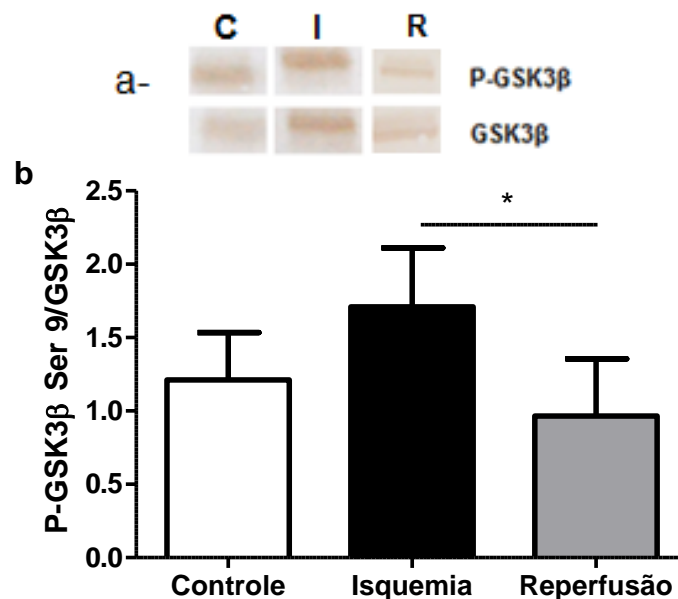


Figura 10: Em **a**- bandas representativas do grupo controle (**C**), isquemia (**I**) e reperfusão (**R**). Maior grau de fosforilação de GSK3 β (ser 9) no grupo isquemia (**I**) em relação ao grupo reperfusão (**R**). Imagens da membrana de nitrocelulose após revelação com solução DAB. **b**- Inibição da GSK3 β no grupo isquemia, a enzima apresentou alta taxa de fosforilação em

relação ao grupo reperfusão. A análise foi realizada através de Western Blotting nas três condições estudadas. O método estatístico utilizado foi ANOVA, pós teste de Tukey ($P \leq 0,05$), ($n=12$).

4.6 FREQUÊNCIA CARDÍACA

Na análise eletrocardiográfica, não foram constatadas a ocorrência de traçados anormais, como arritmias ou extra-sístoles. Por outro lado, observou-se uma queda acentuada da frequência cardíaca no momento da *Inflow Occlusion* com valores médios de 177,82 bat/min. Assim que a circulação é restabelecida os valores voltam a subir 283,16 bat/min vide (ANEXO I). Diferença significativa tanto entre os grupos controle com isquemia quanto os grupos isquemia com reperfusão (Figura 11).

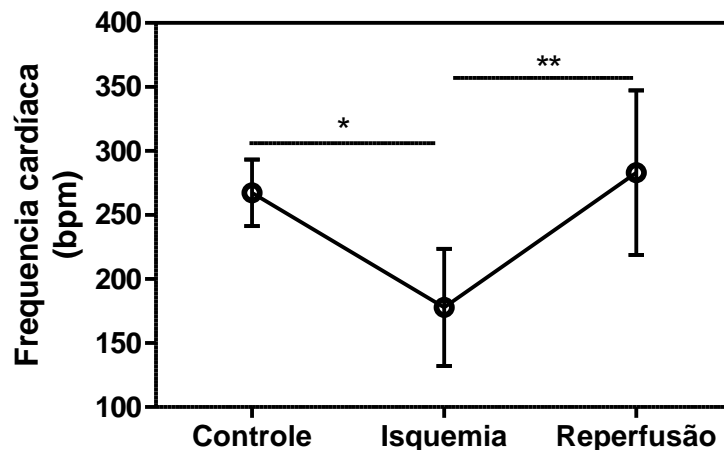


Figura 11: Queda acentuada da frequência cardíaca durante a oclusão venosa, com diferença estatística entre os grupos controle e isquemia; e grupos isquemia e reperfusão. O método estatístico utilizado foi ANOVA, pós teste de Tukey ($P \leq 0,05$), ($n=18$).

4.7 PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA

Os valores médios da PAM para os grupos controle, isquemia e reperfusão foram 59,35 (mmHg), 8,05 (mmHg), 51,72 (mmHg), respectivamente (ANEXO J). Na análise da pressão arterial média dos grupos, observou-se diminuição significativa

durante a isquemia com rápido aumento na reperfusão. Houve diferença estatística significativa entre o grupo controle com isquemia e grupos isquemia com reperfusão (Figura 12).

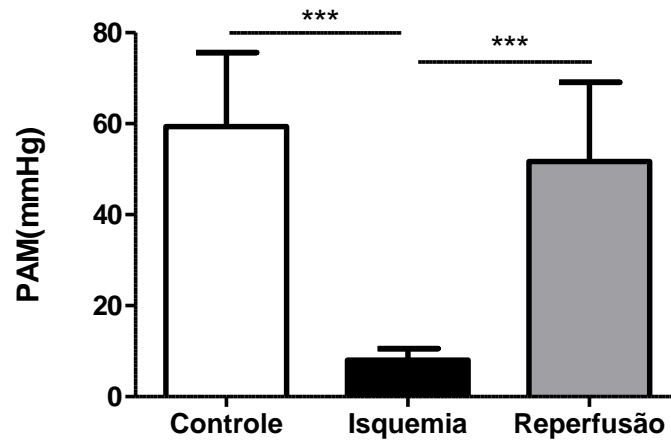


Figura 12: Expressiva diminuição da pressão arterial média durante a oclusão venosa, com diferença estatística tanto entre os grupos controle e isquemia quanto os grupos isquemia e reperfusão. O método estatístico utilizado foi ANOVA, pós teste de Tukey ($P \leq 0,05$). (n=18).

4.8 TEMPERATURA

As médias da temperatura para o grupo controle, isquemia e reperfusão foram 38,3(°C), 37,85(°C), 37,12(°C), respectivamente (ANEXOL). É possível observar a manutenção da temperatura durante o procedimento nos três grupos avaliados. Nota-se que não houve diferença estatística na temperatura corporal dos grupos estudados (Figura 13).

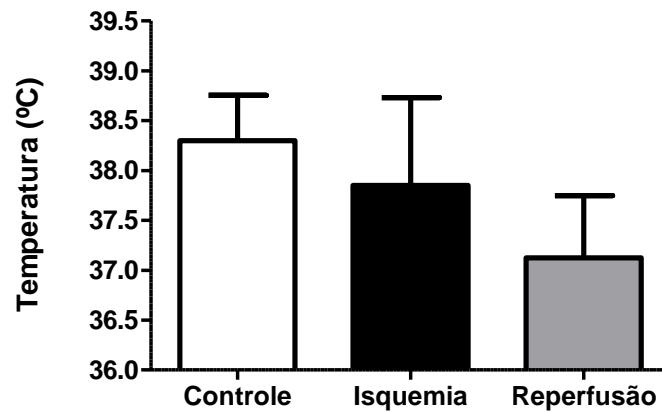


Figura 13: A temperatura permanece estável entre os grupos. O método estatístico utilizado foi ANOVA, pós teste de Tukey ($P \leq 0,05$). (n=12).

4.9 CAPNOGRAFIA

Na análise da Tensão de CO_2 ao final da Expiração (ETCO_2), houve similaridade e igualdade de perfis neste parâmetro dentro dos grupos avaliados (Figura 14). Os valores médios para capnografia no grupo controle, isquemia e reperfusão foram de 34,15 (mmHg), 40,65 (mmHg), 34,07 (mmHg), respectivamente (ANEXO M).

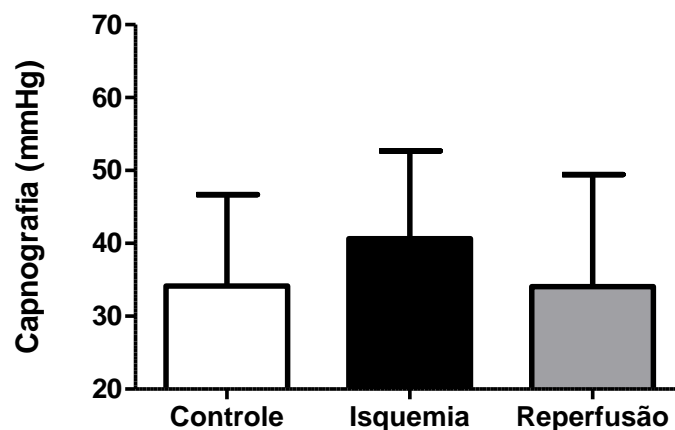


Figura 14: A capnografia permanece constante entre os grupos. O método estatístico utilizado foi ANOVA, pós teste de Tukey ($P \leq 0,05$), (n=12).

5. DISCUSSÃO

As alterações metabólicas que vigoram durante a isquemia cardíaca são compartilhadas entre os mamíferos, sendo um dos principais efeitos a diminuição na disponibilidade de glicose e oxigênio para o tecido cardíaco, uma vez que a irrigação sanguínea está comprometida durante esta desordem (KWASNICKA *et al.*, 2000; GARCIA 2006). Como consequência a fosforilação oxidativa e a síntese de ATP na mitocôndria são reduzidas, embora a demanda energética cardíaca permaneça elevada (TAEGTMEYER *et al.*, 1985). Dessa forma, o coração precisa sofrer adaptações metabólicas para assegurar a produção de energia e garantir sua sobrevivência.

Com a aplicação da técnica de *inflow occlusion* em coelhos, o fluxo sanguíneo para o coração foi bloqueado pelo pinçamento das veias cavas e a ligadura da veia ázigos, o que limitou o fornecimento de oxigênio e glicose para o coração desses animais (Figura 3). Sempre que o fornecimento de oxigênio é comprometido, a produção de lactato é potencializada devido à ativação da oxidação anaeróbica de glicose, convertendo a maior parte do piruvato intracelular em lactato, reação catalisada pela enzima lactato desidrogenase (PIACENTINI *et al.*, 1999), podendo progredir para um estado de acidose metabólica (LUFT, 2001). Após a indução da isquemia nos coelhos podemos observar um aumento nos níveis de lactato quando comparados ao grupo controle não isquêmico (Figura 7), evidenciando a mudança do metabolismo aeróbico para anaeróbico, característico do estado isquêmico. Contudo, esse elevado nível de lactato se perpetuou também no grupo reperfusão (Figura 7). Apesar do grupo reperfusão não estar sob a oclusão venosa, o período de 5 minutos de reperfusão sanguínea não se mostrou eficaz para retomada dos valores de lactato. APSTEIN *et al.*, (1977) demonstraram que foram necessários 15-60 minutos após a isquemia para que o lactato em corações de coelho reduzisse de 40 a 50%. A homeostasia do lactato é garantida pelas várias vias metabólicas, em animais saudáveis, no entanto, em condições anômalas, tal homeostasia já não pode ser garantida uma vez que a perfusão, oxigenação e o próprio pH interferem no processamento do lactato, condicionando a sua metabolização (CHRUSCH *et al.*, 2000; GLADDEN, 2004; PANG & BOYSEN, 2007; ALLEN & HOLM, 2008;

KOVACIC, 2009). Dessa forma, os 5 minutos de reperfusão podem não ser suficientes para reestabelecer o nível normal de lactato no sangue, uma vez que a reciclagem do excesso de lactato no tecido hepático pelo ciclo de Cori demanda uma janela de tempo superior à utilizada nesse estudo. Estudos anteriores também relataram uma alta concentração de lactato após 8 minutos de parada circulatória, seguido de acidose e redução na contratilidade cardíaca (HUNT *et al.*, 1992; ROSANO *et al.*, 2008; ABOZGUIA *et al.*, 2009). O baixo pH e aumento de lactato intracelular estão associadas à redução da função contrátil de segmentos do miocárdio (HEUSCH, 1998).

Conforme Aubert *et al.* (2003) e Rajendra *et al.* (2006), os batimentos cardíacos não possuem a regularidade de um relógio, portanto, alterações na FC, são normais e esperadas e indicam a habilidade do coração em responder aos múltiplos estímulos fisiológicos e ambientais, dentre eles, respiração, exercício físico, estresse mental, alterações hemodinâmicas e metabólicas. Durante a isquemia foi observada uma diminuição na frequência cardíaca, sugerindo uma possível redução na contratilidade desse órgão (Figura 11). Após a reperfusão, a frequência cardíaca retorna aos valores observados no grupo controle. De acordo com Garcia (2006), passados 5 minutos da liberação das veias e consequente retorno circulatório, os valores de frequência cardíaca retornam aos níveis correspondentes, corroborando com este estudo (Figura 11).

A lactemia pode existir sem a acidose, contudo a acidose láctica é sempre acompanhada por hiperlactemia (ACIERNO *et al.*, 2008; PANG & BOYSEN, 2007). Conforme Pang & Boysen (2007) e Allen & Holm (2008) a hiperlactemia define-se por uma elevada concentração de lactato a nível sanguíneo, ao passo que a acidose láctica é caracterizada por um aumento dos níveis de lactato acompanhado pela diminuição do pH sanguíneo. O diagnóstico das desordens ácido-básicas está baseado na interpretação das alterações do pH, PCO_2 e concentração de HCO_3^- no sangue. Durante a oclusão venosa representada pelo grupo isquêmico, um quadro de acidose foi instalado (Tabela 1). Os valores de pH do sangue sofreram uma queda quando comparados aos coelhos controle. E da mesma forma como observado para o lactato, a acidez do sangue não é revertida após a reperfusão (Figura 6), pois esta depende da redução dos níveis de ácido láctico.

O íon bicarbonato (HCO_3^-) é considerado uma base, podendo ser filtrado e reabsorvido pelos rins, alcalinizando o sangue (SMITH & TAYLOR, 2008). Não foi

possível observar diferença na concentração de bicarbonato sanguíneo entre os grupos estudados, assim como no excesso de bases (BE) (Tabela 1). Kwasnicka *et al.*, (2000) também verificou acidose metabólica em cães submetidos a 5 minutos de parada circulatória, no entanto, com alterações nos níveis de bicarbonato no sangue arterial. Para avaliação do distúrbio metabólico recomenda-se, ainda, a determinação do déficit ou excesso de base (*base excess* [BE]). Segundo Di Bartola (2007), o aumento do valor do BE é sugestivo de um componente metabólico (não respiratório) importante para alcalose e sua diminuição é sugestiva de um componente metabólico para acidose.

Essas alterações metabólicas só foram possíveis de serem avaliadas sob uma condição de normotermia, uma vez que os processos metabólicos e celulares nos tecidos e órgãos podem ser alterados se a temperatura corporal não estiver dentro da faixa de variação aceitável. De acordo com Slatter (2007), a hipotermia deve ser evitada, uma vez que diminuirá a taxa metabólica, retardando a biotransformação de medicamentos anestésicos, prolongando seus efeitos. Segundo Orton *et al.* (1990) o nível da temperatura do paciente no período transoperatório e o tempo da parada circulatória estão intimamente relacionadas quando da aplicação da técnica do *Inflow Occlusion*. No entanto, ao avaliar a temperatura corporal, não houve alteração significativa entre os grupos estudados (Figura 13). Trabalhos anteriores realizados em cães também mostraram que não houve alteração na temperatura corpórea após os mesmos procedimentos (Garcia *et al.*, 2009; Stopiglia *et al.*, 2001). Tal fato pode ser justificado pela utilização da termometria esofágica como método de aferição dessa variável e ao sistema eficiente de manutenção da temperatura dos coelhos com o emprego do colchão térmico desde a indução anestésica.

Com relação a PaCO_2 , esta aumentou no grupo isquemia quando comparados ao controle (Tabela 1). De acordo com Bateman (2008) e Irizarry & Reiss (2009), os distúrbios metabólicos que acompanham o aumento de PaCO_2 são denominados de acidose respiratória. O CO_2 é um composto volátil produzido pelo metabolismo celular e é exalado nos pulmões. A hipoventilação leva à acumulação de CO_2 no sangue (um aumento de PCO_2) e uma diminuição no valor do pH. Durante a parada circulatória cardíaca os animais permaneceram sem ventilação o que justifica o aumento da variável no grupo isquemia (Tabela 1). No entanto, após liberação das pinças e retomada da circulação, os coelhos voltaram a ser ventilados

e os valores de PaCO_2 continuaram elevados. Kwasnicka *et al.* (2000) demonstrou que após a *inflow occlusion* em cães a PaCO_2 somente retornou aos valores basais 24 horas após o término da cirurgia, momento não avaliado em nosso estudo.

O valor total de dióxido de carbono no sangue depende do balanço entre a produção metabólica e a eliminação ventilatória do mesmo. A tensão expirada de dióxido de carbono (ETCO_2) pode ser utilizada para avaliar ou corroborar os dados de PaCO_2 , entretanto, a ETCO_2 não sofreu alterações entre os grupos (Figura 14). Inúmeros fatores podem afetar a ETCO_2 , como agentes anestésicos, posição cirúrgica, mudanças na temperatura corpórea, mudanças no fluxo pulmonar e a ventilação mecânica, sem necessariamente afetar a PaCO_2 (Raimer *et al.*, 1983).

Segundo Elias *et al.* (2008) os parâmetros da gasometria capazes de avaliar a oxigenação são a PaO_2 e a SO_2 . A SO_2 mede a proporção em que o O_2 está ligado à hemoglobina e é expressa em percentual. Comparada com a PaO_2 , ela é um melhor indicador da disponibilidade total de oxigênio para as células do organismo, embora haja um paralelismo entre ambos os parâmetros. Ainda de acordo com os mesmos autores a saturação de oxigênio normal do sangue que alcança o átrio esquerdo é de 98%. Uma diminuição da SO_2 ocorre quando há hipoventilação e/ou prejuízo na troca gasosa. Orton (1995) afirma que o objetivo terapêutico deve ser de manter a SO_2 a partir de 80%. Podemos observar uma redução acentuada dos valores de SO_2 durante a isquemia comparados ao grupo controle. Resultado semelhante foi relatado em cães por Garcia (2006) e Kwasnicka *et al.*, (2000), no momento da parada circulatória, já que neste instante ocorre a parada da ventilação e conseqüentemente diminuindo a oferta de O_2 .

O suprimento de oxigênio aos tecidos depende do bom funcionamento e da integração de diferentes órgãos e sistemas (ELIAS *et al.*, 2008). O processo é iniciado pela ventilação, que renova o gás alveolar com o ar atmosférico e remove o dióxido de carbono produzido pelos tecidos. O oxigênio chegando aos alvéolos difunde-se por gradiente de concentração ao capilar. Todo o trabalho realizado pelo aparelho respiratório pode ser comprometido se o oxigênio não puder ser levado aos tecidos, onde será metabolizado. Para que a PaO_2 em nível tecidual seja mantida acima de seu nível crítico é necessário que o transporte ocorra de maneira adequada, ou seja, que dois outros processos estejam coordenados: a ligação do oxigênio à hemoglobina e que o fluxo de oxigênio aos tecidos seja suficiente. Então, a eficácia das trocas de oxigênio entre os alvéolos e os capilares pulmonares são

expressas pela PaO_2 , que depende diretamente da fração inspirada de oxigênio (FiO_2), da modalidade ventilatória empregada e da relação ventilação-perfusão pulmonar (MASSA & KOH, 2011). Contudo, a PaO_2 não sofreu mudanças significativas, demonstrando que a técnica *Inflow Occlusion* não comprometeu a capacidade de oxigenação dos animais avaliados (Tabela 1). Esses resultados corroboram com os trabalhos de Mingrone (2006) e Kwascicka *et al.*, (2000) em cães. Além disso, a PaO_2 apresentou valores maiores que 90 mmHg para os grupos controle e reperfusão (Tabela 1), podendo ser atribuído a $FiO_2 = 1,0$ empregada. Barzago *et al.*, 1992 relatam que para coelhos hígidos, respirando ar ambiente, a PaO_2 é estimada em 90 mmHg. Porém os animais estavam sob efeito de ventilação controlada atingindo, portanto valores superiores ao descrito pelos autores, com exceção do grupo isquemia. De acordo com David (2011), caso se obtenha valor superior ao supracitado, em ventilação controlada ou espontânea, pode ser em decorrência da alta FiO_2 empregada.

A ventilação alveolar, oxigenação arterial e desempenho hemodinâmico apresentam correlação direta com a pressão arterial média (PAM). A PAM depende do débito cardíaco e em maior grau, da resistência vascular periférica. A resistência vascular periférica é controlada por diversos fatores, tais como a estimulação simpática e o sistema renina- angiotensina- aldosterona. Nos casos de queda de pressão arterial, sistemas compensatórios são ativados para elevá-la, culminando com o aumento da frequência cardíaca e da vasoconstrição (LAFORCADE & LOZANSKI, 2001). Como foi demonstrado anteriormente, no grupo isquemia tanto a oxigenação no sangue arterial, a ventilação alveolar e o desempenho hemodinâmico dos animais estavam comprometidos (tabela 1) haja vista que com a aplicação da técnica instalou-se um bloqueio na circulação gerando a estase venosa. Em vista de tal bloqueio a PAM sofreu alterações. A PAM dos coelhos controle mantiveram valores bem próximos de 60 mmHg, sendo similares aos descritos por Maarek *et al.*, (2005) com o mesmo agente anestésico. Assim que foi instituída a *Inflow Occlusion*, observou-se uma queda abrupta dos valores médios da pressão no grupo isquemia comparados ao controle (Figura12). Kwasnicka *et al.*, (2000), Stopiglia *et al.*, (2001) e Mingrone (2006) relataram um perfil de PAM similar em cães com acentuado declínio da pressão na isquemia. Após a liberação das pinças vasculares, os autores relatam uma elevação da pressão arterial aos valores considerados normais. Da

mesma forma, foi observada uma retomada dos valores de PAM na reperfusão, chegando a níveis próximos do grupo controle (Figura 12).

Todas essas alterações conduzem a uma resposta fisiológica específica levando à ativação de proteínas cardioprotetoras, assegurando a integridade do tecido cardíaco (RUBIN & ROSEN, 1975). Essa cardioproteção na isquemia envolve a ativação de quinases, proteínas anti-apoptóticas, enzimas antioxidantes, reguladores de cálcio e proteínas relacionadas à perda de permeabilidade membranar (LAMERS & RUIGROK, 1983; GOTTLIEB *et al.*, 1996; HALESTRAP *et al.*, 2007). Foi demonstrado que a inibição farmacológica de uma enzima em particular, a glicogênio sintase quinase 3 β (GSK3 β), reduziu o tamanho do infarto e melhorou a função cardíaca pós-isquemia (TONG *et al.*, 2002). Esta quinase está associada com uma ampla variedade de distúrbios humanos, incluindo doenças neurodegenerativas, cardiomiopatias, transtorno bipolar, diabetes e câncer. Outros estudos mostraram que a via de sinalização de proteção opera via GSK3 em cardiomiócitos (MAGDALENA *et al.*, 2004; CHINMAY *et al.*, 2007). Portanto, numerosos agentes responsáveis pela cardioproteção convergem para a GSK3, tornando essa enzima um alvo terapêutico para minimizar as consequências da isquemia cardíaca (TONG *et al.*, 2002; JUHASZOVA *et al.*, 2004; MIURA *et al.*, 2009).

A GSK3 β participa em diversos processos celulares, dentre eles vias que levam à proteção do sistema cardíaco contra as lesões da isquemia como citado anteriormente (MEDINA & WANDOSELL, 2011; JOPE & JOHNSON, 2004; MIURA *et al.*, 2009). Entretanto, a maioria dos estudos se baseia na superexpressão e inibição não seletiva da GSK3, descrevendo os eventos moleculares e fisiológicos resultantes da mutação e/ou a redução na atividade dessa enzima (SUGDEN *et al.*, 2008; MARKOU *et al.*, 2008; MATSUDA *et al.*, 2008). Por outro lado, a resposta transcricional da GSK3 β à isquemia e reperfusão, assim como seu papel no metabolismo geral após essas lesões cardíacas são negligenciados.

Durante a isquemia os níveis de transcritos de GSK3 β aumentaram significativamente (Figura 8). Como discutido anteriormente, a GSK3 β regula a GS negativamente por fosforilação, bloqueando a síntese de glicogênio (EMBI *et al.*, 1980; GREKINIS *et al.*, 1995). No período de isquemia, quando a pressão de oxigênio é baixa e o metabolismo mitocondrial é severamente reduzido, os cardiomiócitos podem mobilizar glicogênio para manter a homeostase energética,

sustentando uma glicólise anaeróbica (OFIR *et al.*, 2008). Os mesmos autores demonstraram que elevados níveis de glicogênio reduzem o dano isquêmico. Do mesmo modo visto por Scheuer & Stexotki (1970) o aumento de glicogênio miocárdico também protege contra injúria de isquemia e reperfusão. Tal aumento na transcrição de GSK3 β observado nos coelhos isquêmicos poderia refletir a necessidade de manter a GS inibida, garantindo uma apropriada mobilização de glicogênio. O conteúdo de glicogênio foi avaliado em nossos tratamentos, observando-se uma queda do mesmo nos animais isquêmicos comparados ao controle (Figura 9), sugerindo um importante papel da GSK3 β e das reservas de glicogênio na manutenção da integridade metabólica nesse momento crítico da isquemia cardíaca. No entanto, a atividade de GSK3 β apresenta um perfil diferente do observado na transcrição, sem alteração na atividade no período de isquemia quando comparados ao controle (Figura 10b). Outros trabalhos, por outro lado, têm mostrado alteração na atividade de GSK3 após uma isquemia de 30 minutos (GAO *et al.*, 2008). Sendo assim, a lesão cardíaca ativa uma resposta transcricional da GSK3 β , mas o intervalo de tempo da isquemia (5 minutos) não é suficiente para alterar a atividade dessa enzima. Esses resultados sugerem que durante o momento crítico da isquemia a função da GSK3 β é necessária, já que uma resposta transcricional frente essa lesão foi observada. Existem várias cascatas de sinalização celular, muitas das quais convergem para a GSK3 (TONG *et al.*, 2002; NISHIHARA *et al.*, 2006; VINTEN-JOHANSEN *et al.*, 2007; COLLINO *et al.*, 2008). O equilíbrio entre estas vias, ao qual em grande parte é ditado pelo meio ambiente celular, determina o resultado de um estado de doença ou não. Uma variedade de proteínas quinases são ativadas e interagem em diferentes níveis e em diferentes pontos durante a isquemia e reperfusão (HEUSCH *et al.*, 2008; MIURA *et al.*, 2010).

A GSK3 participa dessas cascatas e pode levar à ativação de um programa de cardioproteção envolvendo componentes da MAPK, RISK ou via da insulina durante a isquemia cardíaca (MIURA *et al.*, 2009) o que explicaria sua elevada transcrição nesse momento (Figura 8). Ao contrário a maioria das proteínas quinases, a GSK-3 permanece ativa no estado de repouso e é inativada quando as células são estimuladas por mitógenos ou por outras quinases como a AKT, ERK, PKC (HIROTANI *et al.*, 2007). Já na reperfusão essa regulação gênica e metabólica parecem ser reversíveis.

A reperfusão é caracterizada pelo restabelecimento da circulação sanguínea, levando oxigênio e nutrientes presentes no sangue a um órgão (CASTRO *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2009). Alterações metabólicas adicionais são associadas a esta lesão neste estudo. Após a reperfusão o nível de transcritos de GSK3 retorna a valores similares observados no grupo controle (Figura 8). O retorno da circulação sanguínea restaura a glicólise aeróbica e reativa o metabolismo mitocondrial oxidativo no cardiomiócito (MICHIELS, 2004). O conteúdo de glicogênio aumenta, chegando a níveis similares do observado para o grupo controle, e a transcrição GSK3 é reduzida (Figura 9 e Figura 8). Já a atividade da GSK3 apresentou-se elevada na reperfusão em relação ao grupo isquêmico, exibindo uma correlação inversa à transcrição de GSK3 (Figura 10b e figura 8). Segundo MIURA *et al.* (2010), avaliando a resposta da atividade da enzima em coração de ratos (TONG *et al.*, 2002; NISHIHARA *et al.*, 2006) concluiu-se que a atividade de GSK-3b é determinante na indução de necrose no miocárdio durante a reperfusão. Entretanto, YANG *et al.*, (2010) observou que em ratos transgênicos a fosforilação de GSK3 no resíduo de serina 9 não é necessária para indução da cardioproteção. A diminuição na sua transcrição pode representar uma redução no fluxo através de uma via em particular que durante a reperfusão não é mais necessária ao cardiomiócito, sem alterar sua participação em outros processos biológicos nos quais a GSK3 está envolvida (NISHIHARA *et al.*, 2006; VINTEN-JOHANSEN *et al.*, 2007), o que explicaria a atividade elevada (Figura 10b). O perfil metabólico, com os dados obtidos neste trabalho, durante a aplicação da técnica *Inflow Occlusion*, pôde ser resumido no esquema representado na figura 15.

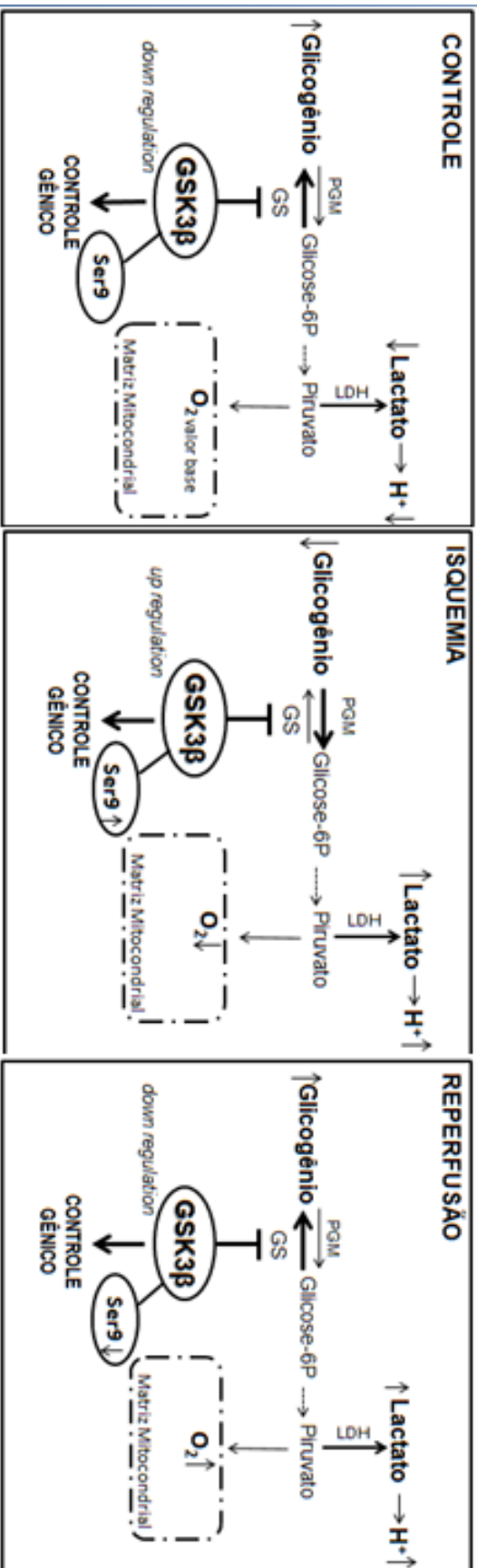


Figura 15: Esquema representando o envolvimento da GSK3β no metabolismo

6. CONCLUSÃO

Em conjunto, esses dados demonstram que o envolvimento da GSK3 nas adaptações metabólicas cardíacas após isquemia e reperfusão está diretamente relacionado com o processo. Suportando esta afirmação identificou-se que:

- O pH e o lactato mostraram perfis contrários mesmo após reperfusão.
- O glicogênio diminui na isquemia e aumenta na reperfusão.
- A frequência cardíaca sofre queda na isquemia se recuperando na reperfusão.
- A PAM cai na isquemia retornando a valores fisiológicos na reperfusão.
- A transcrição da enzima aumentou em 50 vezes na isquemia retornando a valores próximos ao basal na reperfusão.
- A GSK3 β se encontra inibida na isquemia e ativa na reperfusão.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOZGUIA, K.; SHIVU G. N.; I. AHMED, I. *et al.* The Heart Metabolism: Pathophysiological Aspects in Ischaemia and Heart Failure. **Current Pharmaceutical Design**, v. 15, p.827- 835, 2009.

ACIERNO, M. J.; JOHNSON, M. E.; EDDLEMAN, L. A. *et al.* Measuring statistical agreement between four point of care (POC) lactate meters and a laboratory analyzer in cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 10, p. 110-114, 2008.

ALLEN, S. E.; HOLM, J. L. Lactate: physiology and clinical utility. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 18, n. 2, 123-132, 2008.

APSTEIN, C. S.; DECKELBAUM, L.; MUELLER, M. *et al.* Graded global ischemia and reperfusion. Cardiac function and lactate metabolism. **Circulation**, v. 55, p. 864-872, 1977.

AUBERT, A. E.; SEPS, B.; BECKERS, F. Heart rate variability in athletes. **Sports Medicine**, v. 33, n. 12, p. 889-919, 2003.

BALARAMAN, Y.; LIMAYE, E. R.; LEVEY, A. I. *et al.* Glycogen synthase kinase 3B and Alzheimer's disease: pathophysiological and therapeutic significance. **Cellular and Molecular Life of Sciences**, v. 63, p. 1226 – 1235, 2006.

BARZAGO, M. M.; BORTOLOTTI, A.; OMARINI, D. *et al.* Monitoring of blood gas parameters and acid-base balance of pregnant and non-pregnant rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in routine experimental conditions. **Laboratory Animals**, v. 26, n. 2, p. 73-79, 1992.

BATEMAN, S. W. Making sense of blood gas results. **The Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, v. 38, p. 543–557, 2008.

BERNARDO, B. C.; WEEKS, K. L.; PRETORIUS, L. *et al.* Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: Experimental findings and therapeutic strategies. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 128, 191–227, 2010.

BEUREL, E.; JOPE, R. S. The paradoxical pro- and anti-apoptotic actions of GSK3 in the intrinsic and extrinsic apoptosis signaling pathways. **Progress in Neurobiology**, v. 79, p. 173-189, 2006.

BLAAUW, E.; LORENZEN-SCHMIDT, I.; BABIKER, F. A. *et al.* Stretch-Induced Upregulation of Connective Tissue Growth Factor in Rabbit Cardiomyocytes **Journal of Cardiovascular Translational Research**, 2013, DOI 10.1007/s12265-013-9489-5.

BOND, J. M.; HERMAN, B.; LEMASTERS, J. J. Protection by acidotic pH against anoxia/ reoxygenation injury to rat neonatal cardiac myocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 179, p. 798-803, 1991.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p.248-254, 1976.

BROCKMAN, D. J.; BORER, K. E.; BAINES, S. J. *et al.* Partial Right Ventriculectomy Using the Incised Patch Technique to Treat Double Chambered Right Ventricle and Chylothorax in a Cat. **Veterinary Surgery**, v.38, p. 631–635, 2009.

CALASANS-MAIA, M. D.; MONTEIRO, M. L.; ÁSCOLI, F. O. *et al.* The rabbit as an animal model for experimental surgery. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 24, n. 4, p. 325-328, 2009.

CHIARA, F.; RASOLA, A. GSK-3 and mitochondria in cancer cells. **Frontiers in Oncology**, v. 3, p. 16, 2013.

CHRUSCH, C.; BANDS, C.; BOSE, D. *et al.* Impaired hepatic extraction and increased splanchnic production contribute to lactic acidosis in canine sepsis, **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 161, p. 517-526, 2000.

COHEN, M. V.; YANG, X. M.; DOWNEY, J. M. The pH hypothesis of postconditioning: staccato reperfusion reintroduces oxygen and perpetuates myocardial acidosis. **Circulation**, v. 115, v. 14, p. 1895–1903, 2007.

COHEN, P. The development and therapeutic potential of protein kinase inhibitors. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 3, p. 459-465, 1999.

COLLINO, M.; THIEMERMANN, C.; MASTROCOLA, R. *et al.* Treatment with the glycogen synthase kinase-3 β inhibitor, TDZD-8, affects transient cerebral ischemia/reperfusion injury in the rat hippocampus. **Shock**, v. 30, p. 299–307, 2008.

CROSS, D. A.; ALESSI, D. R.; COHEN, P. *et al.* Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. **Nature**, v. 378, p. 785-789, 1995.

DAVID, C. M. Ventilação mecânica- repercussões hemodinâmicas. In: DAVID, C. M. **Ventilação mecânica**. Rio de Janeiro: Revinter, 2011, cap. 22, p.215-224.

DEKKER, R.; DROST, E. A.; GROOTHOFF, J. W. *et al.* Effects of day-hospital rehabilitation in stroke patients: a review of randomized clinical trials. *Scandinavian Journal of Rehabilitation Medicine*, v. 30, n. 2, p. 87-94, 1998.

DI BARTOLA, S. P. **Anormalidades de Fluidos, Eletrólitos e Equilíbrio Ácido-Básico na clínica de Pequenos Animais**. São Paulo: Editora Roca, 2007, 664p.

DOBLE, B. W.; WOODGETT, J. R. GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. **Journal of Cell Science**, v. 116, p. 1175 – 1186, 2003.

DUGO, L.; COLLIN, M.; THIEMERMANN, C. Glycogen synthase kinase 3 β as a target for the therapy of shock and inflammation. **Shock**, v. 27, n. 2, p. 113-123, 2007.

ELDAR-FINKELMAN, H.; MARTINEZ, A. GSK3 inhibitors: preclinical and clinical focus on CNS. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 4, p. 32, 2011.

ELIAS, D. O.; FAGUNDES, F.; SOUZA, M. H. Curso: Fundamentos do Equilíbrio Ácido-Base. Disponível em: <<http://perflin.com/cursos/cursos/acbas/acbas07.htm>> Acesso em 14 fev. 2008, 14:32:00.

EMBI, N.; RYLATT, D. B.; COHEN, P. Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase. **European Journal of Biochemistry**, v. 107, p. 519-527, 1980.

EZZAHER, A.; BOUDANANI, N. E. H.; CROZATIER, B. Force-frequency relations and response to ryanodine in failing rabbit hearts. **The American Journal of Physiology**, v. 263, p. H1710–H1715, 1992.

FLISS, H.; GATTINGER, D. Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium. **Circulation Research**, v. 79, p. 949–956, 1996.

FORCE, T.; KOLAJA, K. L. Cardiotoxicity of kinase inhibitors: the prediction and translation of preclinical models to clinical outcomes. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 10, n. 2, p. 111-126, 2011.

FORDE, J. E.; DALE, T. C. Glycogen synthase kinase 3: a key regulator of cell fate. **Cellular and Molecular Life of Sciences**, v. 64, p. 1930-1944, 2007.

FORTUNA, P. Setor acidobásico. In: FORTUNA, P. **Pós operatório imediato em cirurgia cardíaca**, 4. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2002, p.93-98.

FRAME, S.; COHEN, P. GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. **The Biochemical Journal**, v. 359, p. 1 – 16, 2001.

FREITAS, R. R.; STOPIGLIA, A. J.; FANTONI, D. T *et al.* Diagnosis and surgical correction of atrial septal defect by inflow occlusion technique. **Brazilian Journal of veterinary Animal Science**, v. 42, n. 3, p.193-195, 2005.

GAO, H-K.; YIN, Z.; ZHOU, N. *et al.* Glycogen Synthase Kinase 3 Inhibition Protects the Heart From Acute Ischemia-Reperfusion Injury Via Inhibition of Inflammation and Apoptosis. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 52, p. 286-292, 2008.

GARCIA, D. C. **Parada circulatória total em cães por diferentes períodos de tempo através da técnica de “Inflow Occlusion”**. Avaliação clínica e hemogasométrica. Universidade de São Paulo (USP), 2006, 93p.

GARCIA, D. C.; STOPIGLIA, A. J.; MINGRONE, L. E. *et al.* Avaliação clínica de cães submetidos à parada circulatória total por diferentes períodos de tempo através da técnica de “Inflow Occlusion”. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n.2, p.125-130, 2009.

GARCÍA-DORADO, D.; FERNÁNDEZ, F. Mecanismos fisiopatológicos de la isquemia y la reperfusión miocárdica. **Revista Española de Cardiología**, v. 4, p. 109-118, 1988.

GIRALDEZ, R. R. C.; RAMIRES, J. F. Fisiopatologia da isquemia miocárdica: da isquemia às novas síndromes isquêmicas e lesão de reperfusão. In: ROCHA E SILVA, M. **Fisiopatologia cardiovascular**. São Paulo: Editora Atheneu, 2000. p.91-100.

GLADDEN, L. B. Lactate metabolism: a new paradigm for the third millennium. **The Journal of Physiology**, v. 558, p. 5-30, 2004.

GOMEZ L, PAILLARD M, THIBAUT H. *et al.* Inhibition of GSK3beta by postconditioning is required to prevent opening of the mitochondrial permeability transition pore during reperfusion. **Circulation**, v. 117, p. 2761- 2768, 2008.

GOTTLIEB, R. A.; BURLESON, K. O.; KLONER, R. A. *et al.* Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 94, p. 1621–1628, 1994.

GOULD, T. D.; MANJI, H. K. Glycogen synthase kinase-3: a putative molecular target for lithium mimetic drugs. **Neuropsychopharmacology**, v. 30, p. 1223 – 1237, 2005.

GREKINIS, D.; REIMANN, E. M.; SCHLENDER, K. K. Phosphorylation and inactivation of rat heart glycogen synthase by cAMP-dependent and cAMP-independent protein kinases. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 27, n. 6, p. 565-573, 1995.

GRIMES, C. A.; JOPE, R. S. The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3 β in cellular signaling. **Progress in Neurobiology**, v. 65, n. 4, p. 391- 426, 2001.

HALESTRAP, A. P.; CLARKE, S. J.; KHALIULIN, I. The role of mitochondria in protection of the heart by preconditioning, **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1767, n. 8, p.1007–1031, 2007.

HALL, J. L.; CHATHAM, J. C.; ELDAR-FINKELMAN, H. *et al.* Upregulation of glucose metabolism during intimal lesion formation is coupled to the inhibition of vascular smooth muscle cell apoptosis: role of GSK3beta. **Diabetes**, v. 50, p. 1171–1179, 2001.

HAQ, S. CHOUKROUN, G.; KANG, Z. B. *et al.* Glycogen synthase kinase-3beta is a negative regulator of cardiomyocyte hypertrophy. **The Journal of Cell Biology**, v. 151, n. 1, p. 117-130, 2000.

HARDT, S. E.; SADOSHIMA, J. Glycogen synthase kinase-3beta: a novel regulator of cardiac hypertrophy and development. **Circulation Research**, v. 90, n. 10, p. 1055-1063, 2002.

HASENFUSS, G. Animal models of human cardiovascular disease, heart failure and hypertrophy. **Cardiovascular Research**, v. 39, n. 1, p. 60–76, 1998.

HASKINS, S.; ALDRICH, J. Monitoring the critically ill patient. In: **Proceedings from a series of Intensive Care Seminars, held in Auckland and Christchurch**, Publication Veterinary Continuing Education. California, USA, n.156, p.1- 27, 1994.

HAUSENLOY, D. J.; BOSTON-GRIFFITHS, E.; YELLON, D. M. Cardioprotection during cardiac surgery. **Cardiovascular Research**, v. 94, p. 253–265, 2012.

HAUSENLOY, D. J.; YELLON, D. M. Preconditioning and postconditioning: United at reperfusion. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 116, p. 173-191, 2007.

HAUSENLOY, D. J.; YELLON, D. M. Survival kinases in ischemic preconditioning and postconditioning. **Cardiovascular Research**, v. 70, p. 240-253, 2006.

HE, X.; SAINT-JEANNET, J. P.; WOODGETT, J. R. *et al.* Glycogen synthase kinase-3 and dorsoventral patterning in *Xenopus* embryos. **Nature**, v. 374, p. 617-622, 1995.

HEARSE, D. J. Ischaemia, reperfusion and cardioprotection: successes and failures in the journey from molecule to man **European Heart Journal Supplements**, v. 3, n. *Supplement C*, C11–C21, 2001.

HEIDE, V. R. Clinically Useful Cardioprotection: Ischemic Preconditioning Then and Now. **Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics**, v.16, p. 251-254, 2011.

HEUSCH, G. Hibernating myocardium. **Physiological Reviews**, v. 78, p. 1055-1085, 1998.

HEUSCH, G.; BOENGLER, K.; SCHULZ, R. Cardioprotection : Nitric Oxide, Protein Kinases, and Mitochondria. **Circulation**, v.118, p.1915-1919, 2008.

HIROTANI, S.; ZHAI, P.; TOMITA, H. *et al.* Inhibition of glycogen synthase kinase 3b during heart failure is protective. **Circulation Research**, v. 101, p. 1164-1174, 2007.

HOEFLICH, K. P.; LUO, J.; RUBIE, E. A. *et al.* Requirement for glycogen synthase kinase-3beta in cell survival and NF-kappaB activation. **Nature**, v. 406, p. 86-90, 2000.

HUNT, G. B.; MALIK, R.; BELLENGER, C. R. *et al.* Total Venous Inflow Occlusion in the normothermic dog: a study of haemodynamic, metabolic and neurological consequences. **Research in Veterinary Science**. Austrália, v. 52, n. 3, p.371-377, 1992.

ROSANO, M. C. G.; FINI, M.; CAMINITI, G. *et al.* Cardiac Metabolism in Myocardial Ischemia. **Current Pharmaceutical Design**, v. 14, p. 2551-2562, 2008.

IIZUKA, T.; HOSHI, K.; ISHIDA Y. *et al.* Right atriotomy using total venous inflow occlusion for removal of heartworms in a cat. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 71, n. 4, p. 489–491, 2009.

IMAGEJ, (National Institutes of health, Rockville Pike, Bethesda, Maryland, EUA). Disponível em <<http://rsb.info.nih.gov/ij/>> acesso em: 12/07/2013.

IRIZARRY, R.; REISS, A. Arterial and venous blood gases: indications, interpretations and clinical applications. **Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarian**, v. 31, n. 10, p.1–7, 2009.

JACOBS, K. M.; BHAVE, S. R.; FERRARO, D. J. *et al.* GSK-3 β : a bifunctional role in cell death pathways. **International Journal of Cell Biology**, p.1-11, 2012.

JENNINGS, R. B.; SOMMERS, H. M.; SMYTH, G. A. *et al.* Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. **Archives Pathology**, v. 70, p. 68-78, 1960.

JONAS, R. A.; CASTANEDA, A. R.; FREED M. D. Normothermic caval inflow occlusion: application to operations for congenital heart disease. **Journal Thoracic Cardiovascular Surgery**, v. 89, n. 5, p. 780-786, 1985.

JOPE, R. S.; JOHNSON, G. V. The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 29, p. 95-102, 2004.

JOPE, R. S.; ROH, M-S. Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK3) in Psychiatric Diseases and Therapeutic Interventions. **Current Drug Targets**, v. 7, n. 11, p. 1421–1434, 2006.

JOPE, R. S.; YUSKAITIS, C. J.; BEUREL, E. Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK3): Inflammation, Diseases, and Therapeutics. **Neurochemical Research**, v. 32, p. 577 -595, 2007.

JUHASZOVA, M.; ZOROV, D. B.; KIM, S-H. *et al.* Glycogen synthase kinase-3 β mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 113, n. 11, p. 1535–1549, 2004.

JUHASZOVA, M.; ZOROV, D. B.; YANIV, Y. *et al.* Role of Glycogen Synthase Kinase-3 in Cardioprotection. **Circulation Research**, v. 104, p. 1240-1252, 2009.

KAYTOR, M. D., ORR H. T. The GSK3 β signaling cascade and neurodegenerative disease. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 12, p. 275 – 278, 2002.

KERKELA, R.; WOULFE, K.; FORCE, T. Glycogen synthase kinase-3 beta – actively inhibiting hypertrophy. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 17, p. 91–96, 2007.

KOVACIC, J. P. Lactic acidosis. In: SILVERSTEIN, D.C.; HOPPER, K. **Small animal critical care medicine**. Canada: Saunders Elsevier, 2009, cap. 60, p. 254-257.

KUMAR, R.; SINGH, V. P.; BAKER, K. M. Kinase inhibitors for cardiovascular disease. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 42, p. 1–11, 2007.

KURET, J.; WOODGETT, J. R.; COHEN, P. Multisite phosphorylation of glycogen synthase from rabbit skeletal muscle: identification of the sites phosphorylated by casein kinase-I. **European Journal of Biochemistry**, v. 151, p. 39-48, 1985.

KWASNICKA, K. L.; STOPIGLIA, A. J.; FREITAS, R. R. *et al.* Avaliação hemogasométrica durante a parada circulatória total - Inflow Occlusion - aplicada por diferentes períodos de tempo em cães saudáveis. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 37, n. 3, p. 234-242, 2000.

LEMASTERS, J. J.; BOND, J. M.; CHACON, E. *et al.* The pH paradox in ischemia reperfusion injury to cardiac myocytes. **EXS**, v. 76, p. 99-114, 1996.

LI, X.; LU, F.; TIAN, Q. *et al.* Activation of glycogen synthase kinase-3 induces Alzheimer-like tau hyperphosphorylation in rat hippocampus slices in culture. **Journal of Neural Transmission**, v. 113, n. 1, p. 93-102, 2006.

LI, X.; ZHU, W.; ROH, M-S. *et al.* In vivo Regulation by Glycogen Synthase Kinase-3B (GSK3B) by Serotonergic Activity in Mouse Brain. **Neuropsychopharmacology**, v. 29, p. 1426-1431, 2004.

LOPASCHUK, G. D. Optimizing cardiac energy metabolism: a new approach to treating ischaemic heart disease. **European Heart Journal**, v. 1, p. 32-9, 1999.

LUFT, F. C. Lactic acidosis update for critical care clinicians. **Journal of the American Society Nephrology**, v. 12, p. S15–S19, 2001.

MAAREK, J.-M. I.; HOLSCHNEIDER, D. P.; YANG, J. *et al.* Transcutaneous fluorescence dilution cardiac output and circulating blood volume during hemorrhagic hypovolemia. **Anesthesiology**, 102, p. 774–782, 2005.

MACKAY, J.; MENSAH, G. A. **The atlas of heart disease and stroke**. Geneva: World Health Organization, 2006.

MALBOUISSON, S. M. L.; SANTOS, M. L.; AULER, C. O. *et al.* Proteção miocárdica em cirurgia cardíaca. **Revista Brasil Anestesiologia**, v. 55, n. 5, p. 558-574, 2005.

MARKOU, T.; CULLINGFORD, T. E.; GIRALDO, A. *et al.* Glycogen synthase kinase 3alpha and 3beta in cardiac myocytes: regulation and consequences of their inhibition. **Cellular Signalling**, v. 20, p. 206-218, 2008.

MARTINEZ, A.; CASTRO, A.; DORRONSORO, I. *et al.* Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK-3) Inhibitors as new promising drugs for diabetes, neurodegeneration, cancer, and inflammation. **Medicinal Research Reviews**, v. 22, n. 4, p. 373-384, 2002.

MARTINEZ, A.; CASTRO, A.; MEDINA, M. **Glycogen synthase kinase 3 (GSK-3) and its inhibitors: drug discovery and development**. New York, Wiley Series, Drug Discovery and Development, John Wiley & Sons, 2006, 379p.

MASSA, E. C. D.; KOH, I. H. J. Monitoração da perfusão/oxigenação tecidual. In: POTÉRIO, G. M. B.; PIRES, O. C.; CALLEGARI, D. C. *et al.* **Monitorização em anestesia**. São Paulo: Manole, 2011, cap. 20, p. 293-312.

MATSUDA, T.; ZHAI, P.; MAEJIMA, Y. *et al.* Distinct roles of GSK-3alpha and GSK-3beta phosphorylation in the heart under pressure overload. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American**, v. 105, n. 52, p. 20900–20905, 2008.

MEDINA, M.; CASTRO, A. Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) inhibitors reach the clinic. **Current Opinion in Drug Discovery & Development**, v. 11, n. 4, p. 533-543, 2008.

MEDINA, M.; WANDOSELL, F. Deconstructing GSK-3: the fine regulation of its activity. **International Journal of Alzheimer's Disease**, doi: 10.4061/2011/479249, 2011.

MENON, B.; JOHNSON, J. N.; ROSS, R. S. *et al.* Glycogen synthase kinase-3beta plays a pro-apoptotic role in beta-adrenergic receptor- stimulated apoptosis in adult rat ventricular myocytes: role of beta1 integrins. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 42, p. 653-661, 2007.

MICHAEL, A.; HAQ, S.; CHEN, X. *et al.* Diastolic function in the heart growth, calcium homeostasis, and glycogen synthase kinase-3b regulates. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 20, p. 21383-21393, 2004.

MICHIELS, C. Physiological and Pathological Responses to Hypoxia. **American Journal of Pathology**, v. 164, n. 6, p. 1875-1882, 2004.

MINGRONE, L. E. **Avaliação hemodinâmica de cães submetidos à parada circulatória total através da técnica do “Inflow Occlusion” por diferentes períodos de tempo**. Universidade de São Paulo (USP), 2006, 122p.

MISHRA, R. Glycogen synthase kinase 3 beta: can it be a target for oral cancer. **Molecular Cancer**, v. 9, n. 144, p. 1-15, 2010.

MIURA, T.; MIKI, T. GSK-3 β , a therapeutic target for cardiomyocyte protection. **Circulation Journal**; v.73, p.1184-1192, 2009.

MIURA, T.; NISHIHARA, M.; MIKI, T. Drug development targeting the glycogen synthase kinase-3beta (gsk-3beta) mediated signal transduction pathway: role of gsk-3beta in myocardial protection against ischemia/reperfusion injury. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 109, p. 162-167, 2009.

MIURA, T.; TANNO, M.; SATO, T. Mitochondrial kinase signalling pathways in myocardial protection from ischaemia/ reperfusion-induced necrosis. **Cardiovascular Research**, v. 88, p. 7–15, 2010.

MORA, A.; SAKAMOTO, K.; MCMANUS, E. J. *et al.* Role of the PDK1-PKB-GSK3 pathway in regulating glycogen synthase and glucose uptake in the heart. **FEBS Letters**, v. 579, p. 3632–3638, 2005.

MURPHY, E.; STEENBERGEN, C. Inhibition of GSK-3beta as a target for cardioprotection: the importance of timing, location, duration and degree of inhibition. **Expert Opinion in Therapeutic Targets**, v. 9, n. 3, p. 447–456, 2005.

MUYLLAERT, D.; KREMER, A.; JAWORSKI, T. *et al.* Glycogen synthase kinase-3 β , or a link between amyloid and tau pathology? **Genes, Brain and Behavior**, v. 7, n. 1, p. 57 – 66, 2008.

NISHIHARA, M.; MIURA, T.; MIKI, T. *et al.* Erythropoietin affords additional cardioprotection to preconditioned hearts by enhanced phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 beta. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 291, p. H748–H755, 2006.

NISHIHARA, M.; MIURA, T.; MIKI, T. *et al.* Modulation of the mitochondrial permeability transition pore complex in GSK-3 β -mediated myocardial protection. **Journal of Molecular Cellular Cardiology**, v. 43, p. 564-570, 2007.

NISHINO, Y.; WEBB, I. G.; DAVIDSON, S. M. *et al.* Glycogen synthase kinase-3 inactivation is not required for ischemic preconditioning or postconditioning in the Mouse. **Circulation Research**, v. 103, p. 307-314, 2008.

NOBLE, W.; PLANEL, E.; ZEHR, C. *et al.* (2005). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by lithium correlates with reduced tauopathy and degeneration in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American**, v. 102, p. 6990–6995.

ODEGARD, K. C.; SCHURE, A.; SAIKI, Y. *et al.* Anesthetic considerations during caval inflow occlusion in children with congenital heart disease. **Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia**, v. 18, n. 2, p. 144-147, 2004.

OFIR, M.; ARAD, M.; PORAT, E. *et al.* Increased glycogen stores due to gamma-AMPK overexpression protects against ischemia and reperfusion damage. **Biochemical pharmacology**, v. 75, n. 7, 1482–1491, 2008.

OMAR, M. A.; WANG, L.; CLANACHAN, A. S. Cardioprotection by GSK-3 inhibition: role of enhanced glycogen synthesis and attenuation of calcium overload. **Cardiovascular Research**, v. 86, p. 478–486, 2010.

OPIE, L. H., SACK, M. Metabolic plasticity and the promotion of cardiac protection in ischemia and ischemic preconditioning. **Journal of Molecular Cellular Cardiology**, v. 34, p.1077-89, 2002.

ORTON, E. C. **Small Animal Thoracic Surgery**. Malvern: Williams & Wilkins, 1995, 256p.

PAN, N-H.; CHEN, Y-C.; KAO, Y-H. *et al.* Role of glycogen synthase kinase3/gata-4 in tumor necrosis factor-regulated sarcoplasmic reticulum ca²⁺-atpase expressions in cardiomyocytes expression. **Acta Cardiologica**, v. 26, p. 179-183, 2010.

PANG, D. S.; BOYSEN, S. Lactate in veterinary critical care: Pathophysiology and management, **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 43, p. 270-279, 2007.

PAP, M.; COOPER, G. M. Role of translation initiation factor 2B in control of cell survival by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/glycogen synthase kinase 3b signaling pathway. **Molecular and Cellular Biology**, v. 22, p. 578–586, 2002.

PARANG, P., SINGH, B., ARORA, R. Metabolic modulators for chronic cardiac ischemia. **Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics**, v. 10, n. 3, p. 217-223, 2005.

PARK, K-W.; YANG, H-M.; YOUN, S-W. *et al.* Constitutively active glycogen synthase kinase-3_β gene transfer sustains apoptosis, inhibits proliferation of vascular smooth muscle cells, and reduces neointima formation after balloon injury in rats. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 23, p. 1364-1369, 2003.

PEINEAU, S.; BRADLEY, C.; TAGHIBIGLOU, C. *et al.* The role of GSK-3 in synaptic plasticity. **British Journal of Pharmacology**, v. 153, p. 428 – 437, 2008.

PIACENTINI, L.; KARLINER, J. S. Altered gene expression during hypoxia and reoxygenation of the heart. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 83, p. 21–37, 1999.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v.29, n.9, p.1-45, 2001.

PLANEL, E.; SUN, X.; TAKASHIMA, A. Role of GSK-3 β in Alzheimer's disease pathology. **Drug development research**, v. 56, p. 491-510, 2002.

RAIA, A. A.; ZERBINI, E. J. **Clínica cirúrgica Alípio Correa Netto**. São Paulo: Sarvier, 1998, p. 502-515.

RAJENDRA, A. U.; PAUL, J. K.; KANNATHAL, N. *et al.* Heart rate variability: a review. **Medical & Biological Engineering & Computing**, v. 44, n. 12, p. 1031-1051, 2006.

RAMAN, J.; BELLOMO, R.; SHAH, P. Avoiding the pump in Tricuspid Valve Endocarditis – Vegetectomy under Inflow Occlusion. **Annals Thoracic Cardiovascular Surgery**, v.8, n. 6, p. 350-353, 2002.

RUBIN, C. S.; ROSEN, O. M. Protein phosphorylation. **Annual Review of Biochemistry**, v. 44, p. 831-887, 1975.

SCHEUER, J.; STEZOSKI, S. W. Protective role of increased myocardial glycogen stores in cardiac anoxia in the rat. **Circulation Research**, v. 27, p. 835–849, 1970.

SCHWARTZ, G. G.; SCHAEFER, S.; MEYERHOFF, D. J. *et al.* Dynamic relation between myocardial contractility and energy metabolism during and following brief coronary occlusion in the pig. **Circulation Research**, v. 67, p. 490-500, 1990.

SILVA JR., O. C.; CENTURION, S.; PACHECO, E. G. *et al.* Basics aspects of the ischemia reperfusion injury and of the ischemic preconditioning. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 17, n. Suplemento 3, 2002, doi: 10.1590/S0102-86502000900020.

SLATTER, D. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**. 3. Ed., São Paulo: Manole, v.1 e 2, 2007, 2806 p.

SMITH, A.; TAYLOR, C. Analysis of blood gases and acid-base balance. **Surgery**, v. 26, n. 3, p. 86-90, 2008.

SRIVASTAVA, A. K.; ANAND-SRIVASTAVA, M. B. **Signal Transduction in the Cardiovascular System in Health and Disease**, Spring Science: New York, 2008, p.413.

STAMBOLIC, V.; WOODGETT, J. R. Mitogen inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta in intact cells via serine 9 phosphorylation. **The Biochemical Journal**, v. 303, n. Pt 3, p. 701-704, 1994.

STEENBERGEN, C.; DAS, S.; SU, J. *et al.* Cardioprotection and altered mitochondrial adenine nucleotide transport. **Basic Research Cardiology**, v. 104, n. 2, p. 149-156, 2009.

STOPIGLIA, A. J.; FREITAS, R. R.; IRINO, E. T. *et al.* Avaliação clínica da parada circulatória total em cães (*Canis familiaris*). **Acta Cirurgica Brasileira**, São Paulo, v. 16, n. 4, 2001.

SUGDEN, P. H.; FULLER, S. J.; WEISS, S. C. *et al.* Glycogen synthase kinase 3 (GSK3) in the heart: a point of integration in hypertrophic signalling and a therapeutic target? A critical analysis. **British Journal of Pharmacology**, v. 153, n. 1, p.137–153, 2008.

TAEGTMEYER, H.; ROBERTS, A. F. C.; RAINE, A. E.G. Energy Metabolism in Reperfused Heart Muscle: Metabolic Correlates to Return of Function. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 6, n.4, p. 864-70,1985.

TAEGTMEYER, H. Metabolismo energético del corazón: de los conceptos básicos a las aplicaciones químicas. **Current Problems in Cardiology**, v. 19, p. 61-66, 1994.

TAEGTMEYER, H.; KING, L.; JONES, B. Energy substrate metabolism, myocardial ischemia, and targets for pharmacotherapy. **The American Journal of Cardiology**, v. 82, p. 54k-60k, 1998.

TAKAHASHI-YANAGA, F. Activator or inhibitor? GSK-3 as a new drug target. **Biochemical Pharmacology**, v. 86, p. 191–199, 2013.

TISSIER, R.; CHENOUNE, M.; GHALEH, B. *etal.* The small chill: mild hypothermia for cardioprotection? **Cardiovascular Research**, v. 88, n. 3, p. 406-414, 2010.

TOKMAKOGLU, H.; KANDEMIR, O.; GUNAYDIN, S. *et al.* Extraction of right atrial thrombus with inflow-occlusion technique in a patient with gastric cancer. **Journal Cardiovascular Surgery**, v. 43, p. 899, 2002.

TONG, H.; IMAHASHI, K.; STEENBERGEN, C. *et al.* Phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 β during preconditioning through a phosphatidylinositol-3-kinase--dependent pathway is cardioprotective. **Circulation Research**, v. 90, p. 377-379, 2002.

TURER, A. T.; HILL, J. A. Pathogenesis of Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury and Rationale for Therapy. **The American Journal of Cardiology**, v. 106, n. 3, p. 360-368, 2010.

VANDER, H. R. Clinically useful cardioprotection: ischemic preconditioning then and now. **Journal of Cardiovascular Pharmacology Therapeutics**, v. 16, p. 251-254, 2011.

VASSALLI, G.; MILANO, G.; MOCCHETTI, T. Role of Mitogen-Activated Protein Kinases in Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury during Heart Transplantation. **Journal of Transplantation**, p.1-16, 2012.

VERBEKE, F.; BINST, D.; STEGEN, L. *et al.* Total venous inflow occlusion and pericardial auto-graft reconstruction for right atrial hemangiosarcoma resection in a dog. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 53, p. 1114–1118, 2012.

VINTEN-JOHANSEN, J.; SHI, W. Preconditioning and postconditioning: current knowledge, knowledge gaps, barriers to adoption and future directions. **Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics**, v. 16, p. 260-266, 2011.

VINTEN-JOHANSEN, J.; ZHAO, Z-Q.; JIANG, R. *et al.* Preconditioning and postconditioning: innate cardioprotection from ischemia-reperfusion injury. **Journal of Applied Physiology**, v. 103, p. 1441–1448, 2007.

WARE, W. A.; MERKLEY, D. F.; RIEDESEL, D. H. Intracardiac thyroid tumor in a dog: diagnosis and surgical removal. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 30, n. 1, p. 20-23, 1994.

WOLFF, A. A.; ROTMENSCH, H. H.; FERRARI, R. *et al.* Metabolic approaches to the treatment of ischemic heart disease: the clinician's perspective. **Heart Failure Reviews**, v. 7, p. 187-203, 2002.

YANG, J.; TAKAHASHI, Y.; CHENG, E. *et al.* GSK 3b promotes cell survival by modulating Bif-1- dependent autophagy and cell death. **Journal of Cell Science**, v. 123, n. 6, p. 861-870, 2010.

ZHAI, P.; GAO, S.; HOLLE, E. *et al.* Glycogen synthase kinase-3alpha reduces cardiac growth and pressure overload-induced cardiac hypertrophy by inhibition of extracellular signal-regulated kinases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 45, p. 33181–33191, 2007.

ANEXOS

ANEXO A - Valores médios e desvios-padrão (\pm DP) do pH observado em coelhos submetidos à técnica *inflow occlusion* no grupo controle, grupo isquêmico e grupo reperfusão.

Paramêtro/grupo	n	Controle	Isquemia	Reperfusão	
pH		7,33	7,21	7,03	
		7,32	7,03	7,09	
		7,25	7,17	7,22	
		7,30	7,15	7,10	
		7,23	7,14	7,09	
		7,28	7,09	7,17	
		7,21	7,11	7,16	
		Média	7,27	7,12***	7,12***
		DP	0,04	0,05	0,06

*Diferença estatística significativa entre as médias do grupo controle e isquemia; controle e reperfusão. (Teste *t*, $P \leq 0,05$), (n=7).

ANEXO B - Valores médios e desvios-padrão (\pm DP) do íon bicarbonato (HCO_3^-) observado em coelhos submetidos à técnica *inflow occlusion* no grupo controle, grupo isquêmico e grupo reperfusão.

Paramêtro/grupo	n	Controle	Isquemia	Reperfusão	
HCO_3^-(mmol L⁻¹)		34,8	19,1	23,9	
		24,6	33,1	25,5	
		26,3	25,3	27	
		24,9	30,3	26,9	
		17,5	17,2	17,9	
		22,5	22,9	23	
		24,2	26,2	26,3	
		Média	24,97	24,87	24,35
		DP	5,18	5,70	3,22

Não houve diferença estatística entre as médias dos grupos controle, isquemia e reperfusão. O método estatístico utilizado foi teste *t* ($P \leq 0,05$), (n=7).

ANEXO C - Valores médios e desvios-padrão (\pm DP) do Excesso de base (BE) observado em coelhos submetidos à técnica *inflow occlusion* no grupo controle, grupo isquêmico e grupo reperfusão.

Paramêtro/grupo	n	Controle	Isquemia	Reperfusão
Excesso de base		9	2	-14
BE(mmolL⁻¹)		-1	-9	-4
		-10	-12	-12
		-5	-7	-6
		-2	-4	-2
		-1	2	-7
		-1	-3	-3
	Média	-1,57	-4,42	-6,85
	DP	5,71	5,31	4,56

Não houve diferença estatística entre as médias dos grupos controle, isquemia e reperfusão. O método estatístico utilizado foi teste *t* ($P \leq 0,05$). (n=7).

ANEXO D - Valores médios e desvios-padrão (\pm DP) da pressão arterial de (PaCO₂) observado em coelhos submetidos à técnica *inflow occlusion* no grupo controle, grupo isquêmico e grupo reperfusão.

Paramêtro/grupo	n	Controle	Isquemia	Reperfusão
PaCO₂(mmHg)		66,6	47,8	88,7
		45,6	124	82,5
		59,2	50,5	63,1
		50,2	72	72,1
		41,6	68,9	65,5
		56	87	86,5
		50,5	85,1	57,9
	Média	52,81	76,47*	73,75*
	DP	8,47	25,87	12,23

* Diferença estatística significativa entre as médias do grupo controle e isquemia; controle e reperfusão. (Teste *t*, $P \leq 0,05$.), (n=7).

ANEXO E - Valores médios e desvios-padrão (\pm DP) de pressão arterial de oxigênio (PaO₂) observado em coelhos submetidos à técnica *inflow occlusion* no grupo controle, grupo isquêmico e grupo reperfusão.

Paramêtro/grupo	n	Controle	Isquemia	Reperfusão
PaO ₂ (mmHg)		66	29,2	371
		498	180	47
		355	21,8	125
		195	35	57
		44	32	70
		44	43	50
		55	69	410
	Média	179,57	58,57	161,42
	DP	181,46	55,63	159,06

Não houve diferença estatística entre as médias dos grupos controle, isquemia e reperfusão. O método estatístico utilizado foi teste *t* ($P \leq 0,05$). (n=7).

ANEXO F - Valores médios e desvios-padrão (\pm DP) de pressão arterial de oxigênio (TCO₂) observado em coelhos submetidos à técnica *inflow occlusion* no grupo controle, grupo isquêmico e grupo reperfusão.

Paramêtro/grupo	n	Controle	Isquemia	Reperfusão
TCO ₂ (mmol L ⁻¹)		26	21	27
		37	37	28
		28	27	29
		26	33	29
		19	19	17,9
		26	29	28
		24	25	25
	Média	26,57	27,28	26,27
	DP	5,41	6,36	3,93

Não houve diferença estatística entre as médias dos grupos controle, isquemia e reperfusão. O método estatístico utilizado foi teste *t* ($P \leq 0,05$). (n=7).

ANEXO G - Valores médios e desvios-padrão (\pm DP) da saturação de oxigênio pressão arterial de oxigênio SO₂ (%) observado em coelhos submetidos à técnica *inflow occlusion* no grupo controle, grupo isquêmico e grupo reperfusão

Parâmetro/grupo	n	Controle	Isquemia	Reperfusão
SO ₂ (%)		100	100	100
		100	100	86
		99	100	98
		74	49	76
		82	44	86
		100	84	100
		88	61	73
	Média	91,85	76,85*	88,42
	DP	10,65	25,04	11,28

* Diferença estatística significativa entre as médias do grupo controle e isquemia; controle e reperfusão. (Teste *t*, $P \leq 0,05$), (n=7).

ANEXO H - Valores médios e desvios-padrão (\pm DP) do lactato observadas em coelhos (n=8) submetidos à técnica *inflow occlusion* no grupo controle, grupo isquêmico e grupo reperfusão.

Parâmetro/grupos	n	Controle	Isquemia	Reperfusão
Lactato (mmol/L)		3,75	6,63	10,5
		3,29	8,83	6,76
		3,8	6,55	7,25
		4,99	7,2	8,85
		3,01	6,57	5,52
		4,52	8,03	6,73
		3,77	5,38	5,69
		2,68	4,34	3,64
	Média	3,72**	6,69	6,86
	DP	$\pm 0,75$	$\pm 1,40$	$\pm 2,10$

**Diferença estatística significativa entre as médias do grupo controle e isquemia e grupo controle e reperfusão. O método estatístico utilizado foi ANOVA, pós teste de Tukey ($P \leq 0,05$), (n=8).

ANEXO I - Valores médios e desvios-padrão (\pm DP) da frequência cardíaca (FC) observadas em coelhos (n=6) submetidos à técnica *inflow occlusion* no grupo controle, grupo isquêmico e grupo reperfusão:

Parâmetro/grupos	n	Controle	Isquemia	Reperfusão
Frequência		243,33	190,29	254,91
Cardíaca		250,80	220,75	293,98
		259,80	202,32	199,68
		300,11	94,63	274,08
		249,53	157,95	395,90
		300,30	201,03	280,43
	Média	267,31	177,82*	283,16**
	DP	\pm 26,01	\pm 45,72	\pm 64,31

* Diferença estatística significativa entre as médias do grupo controle e isquemia.

** Diferença estatística significativa entre as médias do grupo isquemia e reperfusão. O método estatístico utilizado foi ANOVA, pós teste de Tukey ($P \leq 0,05$), (n=6).

ANEXO J- Valores médios e desvios-padrão (\pm DP) da pressão arterial média (PAM) observadas em coelhos (n=5) submetidos à técnica *inflow occlusion* no grupo controle, grupo isquêmico e grupo reperfusão:

Parâmetro/grupos	n	Controle	Isquemia	Reperfusão
Pressão Arterial		75,62	4,55	45,45
Média (mmHg)		45,24	10,92	62,86
		62,41	9,58	27,39
		39,85	8,69	73,00
		73,65	6,55	49,93
	Média	59,35	8,05***	51,72##
	DP	\pm 16,26	\pm 2,52	\pm 17,40

*** Diferença estatística significativa entre as médias do grupo controle e isquemia.

Diferença estatística significativa entre as médias do grupo isquemia e reperfusão. O método estatístico utilizado foi ANOVA, pós teste de Tukey ($P \leq 0,05$), (n=5).

ANEXO L - Valores médios e desvios-padrão (\pm DP) da temperatura ($^{\circ}$ C) observados em coelhos submetidos à técnica *inflow occlusion* no grupo controle, grupo isquêmico e grupo reperfusão:

Paramêtro/grupos	n	Controle	Isquemia	Reperfusão
Temperatura ($^{\circ}$C)		37,8	36,9	37,7
		38,3	38,2	37,0
		38,9	38,9	36,3
		38,2	37,4	37,5
	Média	38,3	37,85	37,12
	DP	\pm 0,45	\pm 0,88	\pm 0,62

*Não houve diferença estatística significativa entre as medias dos grupos segundo o teste de Tukey ($P \leq 0,05$), (n=4).

ANEXO M - Valores médios e desvios-padrão (\pm DP) da capnografia (mmHg) observados em coelhos submetidos à técnica *inflow occlusion* no grupo controle, grupo isquêmico e grupo reperfusão:

Paramêtro/grupos	n	Controle	Isquemia	Reperfusão
Capnografia (mmHg)		48,1	36,4	26,5
		41,3	48,8	30,0
		22,4	51,8	23,1
		24,8	25,6	56,7
	Média	34,15	40,65	34,07
	DP	\pm 12,16	\pm 12,04	\pm 2,15

* Não houve diferença estatística significativa entre as medias dos grupos segundo o teste de Tukey ($P \leq 0,05$), (n=4).