ANDRÉ LUÍS SOARES DOS SANTOS

**Avaliação da expressão da conexina 43 no miocárdio de cães
indenes submetidos ou não à técnica de
circulação extracorpórea**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Clínica Cirúrgica Veterinária

Orientador:

Prof. Dr. Angelo João Stopiglia

São Paulo
2008

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2086
FMVZ

Santos, André Luís Soares

Avaliação da expressão da conexina 43 no miocárdio de cães indenes submetidos ou não à técnica de circulação extracorpórea / André Luís Soares dos Santos. – São Paulo : A. L. S. Santos, 2008.

93 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, 2009

Programa de Pós-Graduação: Clínica Cirúrgica Veterinária.
Área de concentração: Clínica Cirúrgica Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Angelo João Stopiglia.

1. Cães. 2. Miocárdio. 3. Circulação extracorpórea. 4. Conexina 43. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação da conexina 43 no miocárdio de cães antes e após a aplicação da circulação extracorpórea", protocolado sob o nº1101/2007, utilizando 05 (cinco) cães, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Angelo João Stopiglia, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 23/05/2007.

(We certify that the Research "Evaluation of connexin 43 in myocardium before and after cardiopulmonary bypass in dogs", protocol number 1101/2007, utilizing 05 (five) dogs, under the responsibility Prof. Dr. Angelo João Stopiglia, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in the meeting of the day 05/23/2007).

São Paulo, 24 de maio de 2007

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SANTOS, André Luís Soares dos

Título: Avaliação da expressão da conexina 43 no miocárdio de cães indenes submetidos ou não à técnica de circulação extracorpórea

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

“A ciência humana de maneira nenhuma nega a existência de Deus. Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço claramente que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável.”

Galileu Galilei

À Deus, obrigado por estar sempre ao meu lado e por permitir mais essa vitória.

André Luís

“Não se deve ir atrás de objetivos fáceis, é preciso buscar o que só pode ser alcançado por meio dos maiores esforços.”

Albert Einstein

A meus queridos pais, **Inez** e **José**. Pelo amor, carinho, paciência, dedicação, incentivo, apoio incondicional... Vocês são fundamentais para minhas conquistas. Obrigado por tudo!

André Luís

“Não deixe de acreditar no amor, mas certifique-se de estar entregando seu coração para alguém que dê valor aos mesmos sentimentos que você dá, manifeste suas idéias e planos, para saber se vocês combinam, e certifique-se de que quando estão juntos aquele abraço vale mais do que qualquer palavra.”

Luis Fernando Veríssimo

Ao meu amor, **Alessandra**. Por compartilhar os momentos comigo, pela cumplicidade e paciência! Por ser meu porto seguro nas horas difíceis. Amo você!

André Luís

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Angelo João Stopiglia, pela orientação, amizade, paciência, e principalmente pelos ensinamentos, que foram decisivos para meu interesse na pesquisa científica.

A Prof^a Dr^a Maria Lúcia Zaidan Dagli, pela maneira afetuosa como me recebeu no Departamento de Patologia da FMVZ-USP, permitindo meu ingresso no Laboratório de Oncologia Experimental. Obrigado pela atenção e pela ajuda.

A Prof^a Dr^a Denise Tabbachi Fantoni e equipe pelos procedimentos anestésicos aplicados durante a circulação extracorpórea.

Ao Dr. Rodrigo Ramos de Freitas, pelos ensinamentos na área da cirurgia cardiotorácica e também pelas oportunidades.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Oncologia Experimental, Bruno, Daniel, Lucas, Heidge, Cynthia, Tereza, Ivone, pela colaboração no período em que estive processando as amostras da presente dissertação. Aprendi um pouco com cada um de vocês. Obrigado!

Aos colegas e amigos Gustavo Nogueira, Eduardo Irino, Paulo César, Huber Aristóteles, Karina Yasbek, pela amizade e pela companhia durante os projetos de pesquisa desenvolvidos junto ao LCCT.

Aos colegas e amigos Eduardo Lipparelli Fernandez e Fabio Celidonio Pogliani, pela amizade sincera e pela convivência durante todos esses anos.
“Semper fi!”

Aos funcionários do Departamento de Cirurgia (VCI) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), Belarmino Ney e Alessandra Sousa, pelo auxílio sempre que necessário.

Aos funcionários do Departamento de Patologia (VPT) da FMVZ-USP, principalmente Cláudio e Luciano.

Aos funcionários da biblioteca da FMVZ-USP, Rosa Zani, Alexandre, Helena, Rose, Solange, Milena, Fernanda, Fátima, Dirce, Paulo, Cleide, Maria Braz, Patrícia, Ana, Márcia. Agradeço também a Elza Faquim, pelo auxílio na revisão da dissertação para que estivesse de acordo com as normas exigidas pela pós-graduação. Muito obrigado a todos por toda a colaboração sempre que solicitada, pela atenção e principalmente pela amizade.

Às funcionárias do serviço de pós-graduação da FMVZ-USP, Joana, Dayse, Cláudia e Carlos, pela atenção e colaboração.

Aos animais que foram utilizados nessa pesquisa, pois sem eles, nada disso teria sido possível. Meus sinceros agradecimentos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro para viabilizar a realização dessa dissertação.

Agradeço também a todos aqueles que direta ou indiretamente, de alguma maneira ajudaram em mais esta conquista.

“Quando você não está feliz, é preciso ser forte para mudar, resistir à tentação do retorno. O fraco não vai a lugar algum.”

Ayrton Senna

“A ciência se compõe de erros que, por sua vez, são os passos até a verdade.”

Julio Verne

RESUMO

SANTOS, A. L. S. **Avaliação da expressão da conexina 43 no miocárdio de cães indenes submetidos ou não à técnica de circulação extracorpórea.** [Evaluation of connexin 43 expression in the miocardium in health dogs submitted or not to a cardiopulmonary baypass]. 2008. 93f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

A circulação extracorpórea (CEC) substitui as funções do coração e pulmões durante o tempo principal da cirurgia cardíaca, permitindo que o cirurgião acesse o interior do órgão por longo período de tempo e assegurando a oxigenação dos tecidos e eliminação dos seus produtos finais. Entretanto, tal técnica não é utilizada rotineiramente em medicina veterinária devido aos elevados custos e também em decorrência das alterações deletérias que promove no organismo dos animais. Visando uma melhor compreensão das complicações decorrentes da CEC, possibilitando amenizá-las, aventou-se o estudo da conexina 43 (Cx43), proteína presente no miocárdio e responsável pela formação das junções intercelulares do tipo *gap*. O presente estudo avaliou cinco cães indenes, SRD, não submetidos à CEC, procedendo-se a colheita de amostras correspondentes à região do septo interventricular, átrios direito e esquerdo, ventrículos direito e esquerdo e posterior análise da Cx43 através da imunofluorescência, *western blot* e *RT-PCR*. Avaliou também cinco cães indenes, SRD, submetidos à toracotomia intercostal direita convencional e posterior instituição da CEC. Amostras de miocárdio foram colhidas em três distintos momentos, quais sejam: T0 (antes da CEC), T1 (após duas horas de CEC) e T2 (após uma hora de desmame da CEC), para verificar as possíveis alterações na (Cx43) decorrentes da CEC, pela técnica de imunofluorescência. Ao final do procedimento experimental, os animais foram sacrificados. Os resultados mostraram que nos animais indenes não operados, a Cx43 apresenta localização em todas as regiões estudadas, não apresentando diferença significativa com relação à expressão nas diferentes regiões. Porém, nos animais submetidos à CEC, a referida conexina apresentou-se diminuída. Por fim, concluímos que em cães a CEC por duas horas com uma hora de circulação espontânea é técnica exeqüível, porém determina sérias alterações clínicas e induz a processos patológicos.

Palavras-chave: Cães. Miocárdio. Circulação extracorpórea. Conexina 43.

ABSTRACT

SANTOS, A. L. S. **Evaluation of connexin 43 expression in the miocardium in health dogs submitted or not to a cardiopulmonary baypass.** [Avaliação da expressão da conexina 43 no miocárdio de cães indenes submetidos ou não à técnica de circulação extracorpórea]. 2008. 93f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Cardiopulmonary bypass (CPB) replaces the heart and lung function during the main period of cardiac surgery, and it allows the access of the surgeon inside the organ for a long time, ensuring tissue oxygenation and the elimination of end products. However, this procedure isn't used as a routine in veterinary medicine because of the high costs, and besides it causes damage in the animal organism. In order to promote a better comprehension of the complications caused by CPB, and perhaps to assuage them, this work was designed to study the connexin 43 (Cx43), a protein present in myocardium which forms intercellular communications like gap junctions. To do so five health mongrel dogs not submitted to CPB were evaluated and tissue samples were taken from specific locals as ventricular septal, right and left atrium, right and left ventricle, to perform Cx43 analyses by immunofluorescence, western blot and RT-PCR. Were also studied others five health mongrel dogs submitted to a conventional right intercostal thoracotomy for CPB procedure. Samples of myocardium were taken in three different moments: T0 (before CPB), T1 (after two hours of CPB) and T2 (after one hour the end of CPB) to check possible alterations in Cx43 caused by CPB using immunofluorescence technique. The euthanasia of the animals was performed at the end of the experimental period. The results shown that in health animals not operated, the Cx43 is located in every studied local and there is no significant difference in the protein expression areas. Nevertheless, the CPB technique reduced the connexin expressions in the operated animals. Finally, we may conclude that the cardiopulmonary bypass for two hours and a spontaneous perfusion for one hour is a feasible procedure in dogs, but it determines serious clinical alterations and may induce pathophysiological process.

Key words: Dogs. Miocardium. Cardiopulmonary bypass. Connexin 43.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Modelo de organização da placa juncional desenvolvido a partir de estudos de microscopia eletrônica e de difração de raios-X de junções GAP de fígado de camundongos. Cada conexon (círculo vermelho) é composto por 6 subunidades de conexinas (representadas em amarelo/azul) que oligomerizadas formam um poro central hidrofílico com cerca de 2nm de diâmetro (em rosa) e que está associado a outro conexon na membrana adjacente (quadrado verde) (MAKOWWSKI et al., 1977).....27
- Figura 2 - Família multigênica das conexinas derivadas de um provável ancestral comum. As conexinas são divididas em 3 subclasses de acordo com a estrutura do gene que as codificam (MESNIL; YAMASAKI, 1990).28
- Figura 3 - Topologia membranal de uma conexina. As regiões referentes à porção amino terminal, os domínios transmembrana e as alças extracelulares representam as seqüências mais conservadas entre as diferentes conexinas. Cada alça extracelular contém três cisteínas (vermelho) que são conservadas em todas as conexinas. O domínio M3 (verde claro) tem uma característica anfipática que está diretamente relacionado com o movimento de fechamento do GAP. Já os domínios citoplasmáticos (azul) correspondem às porções única em cada conexina, sendo portanto, específicas (BEYER, 1993).29
- Figura 4 - Fotomicrografias referente à imunofluorescência de diferentes regiões do miocárdio de cão saudável (animal 1). (A) Ventrículo direito. (B) Átrio direito. (C) Ventrículo esquerdo. (D) Átrio esquerdo. (E) Septo interventricular. (F) Controle negativo da reação. As marcações em verde representam positividade para conexina 43. Os núcleos estão marcados em vermelho pelo iodeto de propídeo. Imagem obtida em microscópio Nikon E-800, equipado com sistema de fluorescência. Barra de escala=10 µm...47
- Figura 5 - Fotomicrografias referente à imunofluorescência de diferentes regiões do miocárdio de cão saudável (animal 2). (A) Ventrículo direito. (B) Átrio direito. (C) Ventrículo esquerdo. (D) Átrio esquerdo. (E) Septo interventricular. (F) Controle negativo da reação. As marcações em verde representam positividade para conexina 43. Os núcleos estão marcados em vermelho pelo iodeto de propídeo. Imagem obtida em microscópio Nikon E-800, equipado com sistema de fluorescência. Barra de escala=10 µm...48

Figura 6 - Fotomicrografias referente à imunofluorescência de diferentes regiões do miocárdio de cão saudável (animal 3). (A) Ventrículo direito. (B) Átrio direito. (C) Ventrículo esquerdo. (D) Átrio esquerdo. (E) Septo interventricular. (F) Controle negativo da reação. As marcações em verde representam positividade para conexina 43. Os núcleos estão marcados em vermelho pelo iodeto de propídeo. Imagem obtida em microscópio Nikon E-800, equipado com sistema de fluorescência. Barra de escala=10 µm...49

Figura 7 - Fotomicrografias referente à imunofluorescência de diferentes regiões do miocárdio de cão saudável (animal 4). (A) Ventrículo direito. (B) Átrio direito. (C) Ventrículo esquerdo. (D) Átrio esquerdo. (E) Septo interventricular. (F) Controle negativo da reação. As marcações em verde representam positividade para conexina 43. Os núcleos estão marcados em vermelho pelo iodeto de propídeo. Imagem obtida em microscópio Nikon E-800, equipado com sistema de fluorescência. Barra de escala=10 µm...50

Figura 8 - Fotomicrografias referente à imunofluorescência de diferentes regiões do miocárdio de cão saudável (animal 5). (A) Ventrículo direito. (B) Átrio direito. (C) Ventrículo esquerdo. (D) Átrio esquerdo. (E) Septo interventricular. (F) Controle negativo da reação. As marcações em verde representam positividade para conexina 43. Os núcleos estão marcados em vermelho pelo iodeto de propídeo. Imagem obtida em microscópio Nikon E-800, equipado com sistema de fluorescência. Barra de escala=10 µm...51

Figura 9 - Curva padrão de proteínas para *western blot* das amostras das diferentes regiões do miocárdio dos cinco cães saudáveis analisados52

Figura 10 - *Western blot* da expressão da proteína (conexina 43). Foi colocado 100 µg de proteína em cada *well*. (A) Membrana de PVDF. (B) Gel de poliacrilamida 13%. (K) marcador de peso molecular Kaleidoscope. (Se) septo interventricular. (AD) átrio direito. (VD) ventrículo direito. (AE) átrio esquerdo. (VE) ventrículo esquerdo. Amostras de miocárdio cão saudável (animal 1).....55

Figura 11 - *Western blot* da expressão da proteína (conexina 43). Foi colocado 100 µg de proteína em cada *well*. (A) Membrana de PVDF. (B) Gel de poliacrilamida 13%. (K) marcador de peso molecular Kaleidoscope. (Se) septo interventricular. (AD) átrio direito. (VD) ventrículo direito. (AE) átrio esquerdo. (VE) ventrículo esquerdo. Amostras de miocárdio cão saudável

(animal 2).....	56
Figura 12 - <i>Western blot</i> da expressão da proteína (conexina 43). Foi colocado 100 µg de proteína em cada <i>well</i> . (A) Membrana de PVDF. (B) Gel de poliacrilamida 13%. (K) marcador de peso molecular Kaleidoscope. (Se) septo interventricular. (AD) átrio direito. (VD) ventrículo direito. (AE) átrio esquerdo. (VE) ventrículo esquerdo. Amostras de miocárdio cão saudável (animal 3).....	57
Figura 13 - <i>Western blot</i> da expressão da proteína (conexina 43). Foi colocado 100 µg de proteína em cada <i>well</i> . (A) Membrana de PVDF. (B) Gel de poliacrilamida 13%. (K) marcador de peso molecular Kaleidoscope. (Se) septo interventricular. (AD) átrio direito. (VD) ventrículo direito. (AE) átrio esquerdo. (VE) ventrículo esquerdo. Amostras de miocárdio cão saudável (animal 4).....	58
Figura 14 - <i>Western blot</i> da expressão da proteína (conexina 43). Foi colocado 100 µg de proteína em cada <i>well</i> . (A) Membrana de PVDF. (B) Gel de poliacrilamida 13%. (K) marcador de peso molecular Kaleidoscope. (Se) septo interventricular. (AD) átrio direito. (VD) ventrículo direito. (AE) átrio esquerdo. (VE) ventrículo esquerdo. Amostras de miocárdio cão saudável (animal 5).....	59
Figura 15 - Comparação entre as médias das densidades relativas da expressão da conexina 43 entre as diferentes regiões analisadas pela técnica de <i>western blot</i> (Septo) septo interventricular. (AD) átrio direito. (VD) ventrículo direito. (AE) átrio esquerdo. (VE) ventrículo esquerdo. Amostras de miocárdio dos cães saudáveis.	60
Figura 16 - Gráfico relativo à amplificação das amostras de miocárdio dos cães indenes não submetidos à CEC. Genes 18S e Gja1 (gene da conexina 43).	61
Figura 17 - Gráfico relativo à expressão do <i>mRNA</i> correspondente a Gja1 (gene da conexina 43) das diferentes regiões do miocárdio de cães saudáveis. Em azul ilustra-se a média referente a cada região e em vermelho o desvio padrão. Utilizamos o septo para comparação entre as regiões	62

- Figura 18 - Fotomicrografias referente à imunofluorescência do miocárdio de cão saudável submetido à CEC (animal 1) . (A) Momento T0. (B) Momento T1. (C) Momento T2. (D) Controle negativo da reação. As marcações em verde representam positividade para conexina 43. Os núcleos estão marcados em vermelho pelo iodeto de propídeo. Imagem obtida em microscópio Nikon E-800, equipado com sistema de fluorescência. Barra de escala = 10 μ m.....65
- Figura 19 - Fotomicrografias referente à imunofluorescência do miocárdio de cão saudável submetido à CEC (animal 2) . (A) Momento T0. (B) Momento T1. (C) Momento T2. (D) Controle negativo da reação. As marcações em verde representam positividade para conexina 43. Os núcleos estão marcados em vermelho pelo iodeto de propídeo. Imagem obtida em microscópio Nikon E-800, equipado com sistema de fluorescência. Barra de escala = 10 μ m.....66
- Figura 20 - Fotomicrografias referente à imunofluorescência do miocárdio de cão saudável submetido à CEC (animal 3) . (A) Momento T0. (B) Momento T1. (C) Momento T2. (D) Controle negativo da reação. As marcações em verde representam positividade para conexina 43. Os núcleos estão marcados em vermelho pelo iodeto de propídeo. Imagem obtida em microscópio Nikon E-800, equipado com sistema de fluorescência. Barra de escala = 10 μ m.....67
- Figura 21 - Fotomicrografias referente à imunofluorescência do miocárdio de cão saudável submetido à CEC (animal 4) . (A) Momento T0. (B) Momento T1. (C) Momento T2. (D) Controle negativo da reação. As marcações em verde representam positividade para conexina 43. Os núcleos estão marcados em vermelho pelo iodeto de propídeo. Imagem obtida em microscópio Nikon E-800, equipado com sistema de fluorescência. Barra de escala = 10 μ m.....68
- Figura 22 - Fotomicrografias referente à imunofluorescência do miocárdio de cão saudável submetido à CEC (animal 5) . (A) Momento T0. (B) Momento T1. (C) Momento T2. (D) Controle negativo da reação. As marcações em verde representam positividade para conexina 43. Os núcleos estão marcados em vermelho pelo iodeto de propídeo. Imagem obtida em microscópio Nikon E-800, equipado com sistema de fluorescência. Barra de escala = 10 μ m.....69

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Valores obtidos na padronização da curva utilizando albumina e <i>Bradford</i>	52
Quadro 2 -	Valores referentes à quantificação de proteínas das amostras analisadas bem como sua concentração de acordo com a curva padrão de proteínas. (1,2,3,4,5) Animais analisados. (Se) Septo interventricular. (AD) Átrio direito. (AE) Átrio esquerdo. (VD) Ventrículo direito. (VE) Ventrículo esquerdo.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E TERMOS E INGLÊS

<i>Bradford</i>	Reagente utilizado na realização da curva padrão de proteínas
Ca^{2+}	Símbolo referente ao íon cálcio
CCZ	Centros de Controle de Zoonoses.
CFMV	Conselho Federal de Medicina Veterinária
cDNA	fita de ácido desoxirribonucléico complementar a ácido ribonucléico que contém a mensagem que codifica para determinada proteína
CEC	Circulação extracorpórea
Cx	Abreviatura para conexina
DAB	Diaminobenzidina
<i>Destain Solution</i>	Solução utilizada na técnica de <i>western blot</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
FAPESP	Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo.
G	Gaus
GAP	Fenda
Gja1	Gene da conexina 43.
GJIC	comunicação intercelular através de junções tipo gap.
IM	Intramuscular
<i>Inflow Occlusion</i>	Técnica cirúrgica correspondente à parada circulatória temporária
IV	Intravenoso
K^{+}	Símbolo referente ao íon potássio
<i>Knok-out</i>	Animal geneticamente modificado em que determinado(s) gene(s) é(são) anulado(s)
kDa	Quilodalton.
LCCT	Laboratório de Cirurgia Cardiotorácica.

<i>Loading Buffer</i>	Solução utilizada na técnica de <i>western blot</i>
mg/kg	Miligramas por quilo de peso
ml/kg/h	Mililitros por quilo de peso por hora
ml/kg/min	Mililitros por quilo de peso por minuto
mmHg	Milímetros de mercúrio
<i>mRNA</i>	Ácido ribonucléico cuja informação que codifica para uma determinada proteína estão contidos
Na ⁺	Símbolo referente ao íon sódio
nm	Nanômetros
pH	Concentração do íon hidrogênio
<i>Primer</i>	Seqüência de geralmente 20 pares de bases que é o ponto inicial de reconhecimento pela polimerase na duplicação do DNA senso
RNA	Ácido ribonucléico.
<i>RT-PCR</i>	Reação de polimerização em cadeia a partir de RNA, utilizando a enzima transcriptase reversa
<i>Skin milk</i>	Leite para o bloqueio de reações inespecíficas utilizado na técnica de <i>western blot</i>
<i>Taqman</i>	Nome dado ao conjunto de primers e probe fluorescente utilizados no <i>RT-PCR</i> em tempo real
<i>Transfer buffer</i>	Solução utilizada na técnica de <i>western blot</i>
<i>Western Blot</i>	Método utilizado para identificação de proteínas, baseado em extração, eletroforese, transferência e identificação através de anticorpos e sistema de revelação
<i>Working solution</i>	Solução utilizada na técnica de <i>western blot</i>
UI/kg	Unidade internacional por quilo de peso
µg/kg	Micrograma por quilo de peso
µm	Micrômetro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
2	REVISÃO DE LITERATURA	24
3	OBJETIVO GERAL	32
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
4	MATERIAL E MÉTODO	33
4.1	ANIMAIS INDENES NÃO SUBMETIDOS À CEC	33
4.2	ANIMAIS INDENES SUBMETIDOS À CEC	34
4.2.1	Preparo do animal	34
4.2.2	Procedimento anestésico	35
4.2.3	Procedimento cirúrgico	36
4.3	MOMENTOS DA AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS	38
4.4	AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS	39
4.4.1	Imunofluorescência para conexina 43	39
4.4.2	Western blot para conexina 43	40
4.4.3	Determinação da expressão do <i>mRNA</i> correspondente a Gja1 (gene da conexina 43) no miocárdio de cães utilizando a técnica de <i>RT-PCR</i> em tempo real	43
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
5	RESULTADOS	46
5.1	AVALIAÇÃO DOS ANIMAIS INDENES	46
5.1.1	Imuno-localização da conexina 43	46
5.1.2	Western blot da conexina 43	52
5.1.3	<i>RT-PCR</i> em tempo real - Expressão do <i>mRNA</i> da conexina 43	60
5.2	AVALIAÇÃO DOS ANIMAIS INDENES SUBMETIDOS À CEC	62

5.2.1	Avaliação das alterações ocasionadas pela CEC	62
5.2.2	Imuno-localização da conexina 43 no miocárdio de cães indenes submetidos à CEC	63
5.2.3	<i>Western blot</i> da conexina 43 e <i>RT-PCR</i> em tempo real - expressão do <i>mRNA</i> da conexina 43	70
6	DISCUSSÃO	71
7	CONCLUSÃO	80
	REFERÊNCIAS	81

1 INTRODUÇÃO

A cirurgia torácica em geral e a cardiovascular, mais especificamente, vem se tornando cada vez mais uma realidade em hospitais veterinários desde o final do século XX, principalmente devido aos avanços tecnológicos. No Brasil, o Laboratório de Cirurgia Cardiororácica (LCCT) do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo iniciou suas pesquisas nessa área em meados de 1996, data de sua criação.

Os projetos iniciais, financiados pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), foram direcionados ao estudo das técnicas de toracotomias e parada circulatória temporária (PINTO et al., 2000; KWASNICKA et al., 2000; STOPIGLIA et al., 2001, GARCIA et al., 2005; ANDRADE et al., 2006; GARCIA et al., 2006; MINGRONE et al., 2006).

Intervenções cirúrgicas visando à correção de bradiarritmias (FREITAS et al., 2002), correção cirúrgica paliativa da tetralogia de Fallot (FREITAS et al., 2003), correção da persistência do ducto arterioso, (STOPIGLIA et al., 2004) e correção da comunicação inter-atrial (FREITAS et al., 2005) foram realizadas em cães doentes com resultados satisfatórios. Posteriormente, estudos relacionados à viabilidade da pneumonectomia também foram desenvolvidos no referido laboratório (IRINO et al., 2004; SIMÕES et al., 2005; BINOKI et al., 2007; SIMÕES et al., 2007), entre outros assuntos pesquisados.

Porém, para que fosse possível a realização de cirurgias intracardíacas, com maior demanda de tempo, como por exemplo a correção cirúrgica da estenose pulmonar, correção cirúrgica da estenose sub-aórtica ou a substituição de valva atrioventricular esquerda, além de uma completa monitorização dos sistemas do animal, o cirurgião necessitaria intervir sem perda excessiva de sangue e por um período de tempo superior aos cinco minutos possíveis estabelecidos pela técnica do "*inflow occlusion*".

Assim, no LCCT, com a utilização da máquina de circulação extracorpórea, dois principais estudos foram desenvolvidos em cães com essa finalidade precípua: o primeiro demonstrou o funcionamento da máquina de extracorpórea e as variações das técnicas de perfusão (KWASNICKA, 2003) e o segundo avaliou as alterações

clínicas, laboratoriais e anátomo-histopatológicas ocasionadas pela circulação extracorpórea (FREITAS, 2004).

Atualmente, no Brasil, tal técnica ainda não é utilizada rotineiramente em cirurgias cardíacas veterinárias devido à alta mortalidade que ocasiona (FREITAS, 2004). Além disso, elevados custos estão envolvidos e se faz necessário uma equipe especialmente treinada para se garantir resultados satisfatórios. (HUNT, 2005).

A circulação extracorpórea (CEC) substitui as funções do coração e pulmões durante o tempo principal da cirurgia cardíaca, permitindo que o cirurgião acesse o interior do órgão por longo período de tempo e assegurando a oxigenação dos tecidos e eliminação dos seus produtos finais. Entretanto, as informações ainda são genéricas e esparsas sobre a aplicação da CEC em animais domésticos, especificamente nos cães. (KWASNICKA, 2003).

Existem muitos temas a serem pesquisados visando uma melhor compreensão das complicações decorrentes da técnica de circulação extracorpórea em cães, possibilitando resolvê-las ou amenizá-las. Dentro desse contexto, destaca-se o estudo da conexina 43 (Cx43), proteína presente no miocárdio e responsável pela formação das junções intercelulares do tipo *gap*. Tais junções permitem a comunicação entre as células cardíacas, sendo que a Cx43 está envolvida no controle da homeostasia tecidual, crescimento e proliferação celular.

Deste modo, aventou-se a hipótese do estudo da referida proteína no miocárdio de cães indenes e avaliando-se as possíveis intercorrências da CEC sobre a presença, localização e a expressão da conexina 43.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Na medicina veterinária, doenças cardíacas congênitas cujo tratamento cirúrgico é considerado rotina incluem a persistência do ducto arterioso e a anomalia do anel vascular, ou seja, a persistência do quarto arco aórtico direito (HUNT, 2005). No entanto, para a correção cirúrgica de outras doenças como defeitos do septo atrial e ventricular, estenoses pulmonar e aórtica, defeito no canal atrioventricular, tetralogia de Fallot e doenças valvulares se faz necessário a utilização da técnica de circulação extracorpórea (KLEMENT et al., 1987a).

Os primeiros questionamentos sobre a possibilidade de substituir o coração por alguma forma de bombeamento artificial durante o ato cirúrgico datam de meados do século XIX (LE GALLOIS, 1813), época em que se iniciaram os experimentos e as pesquisas para o desenvolvimento da técnica que, anos mais tarde, promoveria um grande avanço científico na cardiologia. A primeira cirurgia realizada com sucesso foi conduzida pelo Dr. John Gibbon e sua equipe em uma paciente de 18 anos que apresentava comunicação interatrial (BORDLEY; HARVEY, 1976).

Circulação extracorpórea (CEC) constitui-se em sistema artificial por meio do qual o sangue é, total ou parcialmente, transportado para fora do organismo temporariamente onde é oxigenado em máquina apropriada, filtrado retornando à circulação (SANT'ANA; LUCCHESI, 1994). Pode também ser denominado de sistema coração-pulmão artificial (KURUSZ, 2003).

O aparelho de CEC possui duas partes principais: a parte motora e a parte oxigenadora. A primeira, que possui a função do coração propriamente dita, para ser considerada ideal deve produzir mínimo trauma nos elementos sanguíneos, permitindo o controle de fluxo de acordo com a necessidade do paciente, sendo capaz de impulsionar o sangue (GOMES, 1985). Já a parte oxigenadora é constituída por um dispositivo mecânico que torna possível as trocas de oxigênio, dióxido de carbono, vapor de água e gases anestésicos entre o sangue do paciente e a atmosfera adjacente (SANT'ANA; LUCCHESI, 1994).

Inicialmente, a oxigenação foi obtida por meio da circulação cruzada (SOUTHWORTH, 1952). Em humanos, o sistema foi abandonado devido às sérias reações imunológicas. No entanto, existe estudo em cães indicando a viabilidade da

circulação cruzada como método de CEC, desde que o cão doador seja de porte grande e o cão receptor de porte médio (HUNT et al., 1995).

Estudos têm sido conduzidos na tentativa de viabilizar a técnica de CEC em medicina veterinária (KWASNICKA, 2003; FREITAS, 2004). Atualmente, em animais, tanto o equipamento (máquina) quanto o material utilizado na implantação da CEC é o mesmo utilizado na espécie humana, sem qualquer modificação (HOLMBERG, 1998).

Diversos trabalhos discorrem acerca das alterações ocasionadas pela CEC, entre as quais alterações hematológicas como hemólise e oclusão microvascular (SANT'ANA; LUCCHESI, 1994; MARQUES et al., 1995), agregações plaquetárias e trombocitopenia, além de alterações hidroeletrólíticas como a hipocalcemia (HOLMBERG, 1998) ou em estudos de microscopia eletrônica onde Kawai et al. (1992) observaram aumento das mitocôndrias, laceração das miofibrilas, edema intracelular ou no de Freitas (2004) que observou edema perinuclear, hemorragia, miocardite aguda, necrose, pericardite neutrofílica no miocárdio e enfisema, áreas focais com hemorragia, derrame de fibrina, infiltrado inflamatório misto e atelectasia pulmonar em cães.

Entre as principais causas de arritmias nos períodos trans e pós-operatório em cães submetidos à CEC, destacam-se hipotermia, hipóxia, hipoventilação e depressão cardiovascular (CAYWOOD, 1996). Já Yoshida et al. em 1984, afirmam que a CEC pode ser responsável por anormalidades nos movimentos do septo no período pós-operatório.

A hipotermia é a causa mais freqüente de bradicardia e pode promover a ocorrência de fibrilação atrial durante a anestesia (MAGILLIAN, 1985).

A acidose metabólica foi descrita como a alteração mais freqüente, uma vez que o desequilíbrio ácido-básico está intimamente correlacionado com a utilização da CEC. Tal alteração torna-se mais severa à medida que aumenta o tempo de perfusão extracorpórea (MOORE et al., 1963; AMARAL et al., 1967).

Em estudo conduzido em pacientes humanos, submetidos à cirurgia cardíaca, verificou-se que a manutenção dos níveis séricos de cálcio é fundamental para a obtenção de um ritmo cardíaco estável, possibilitando adequada contratilidade do miocárdio ao fim da CEC (CATINELA et al., 1983).

Apesar das intercorrências decorrentes da utilização da CEC, alguns estudos apontam a técnica de circulação extracorpórea como técnica viável de ser aplicada

em medicina veterinária (KLEMENT et al., 1987a; ORTON, 1994; ORTON et al., 2001, FREITAS, 2004). Estudo referente à utilização da CEC em seis felinos foi realizado com sucesso, indicando ser possível realizar uma perfusão nesta espécie durante 90 minutos (BROURMAN et al., 2003).

Dentre os trabalhos perqueridos na literatura compilada, nenhum deles avaliou a conexina 43, proteína presente no miocárdio e responsável pela formação das junções intercelulares do tipo *gap* e que está envolvida no controle da homeostasia tecidual, crescimento e proliferação celular.

Junções celulares são estruturas especializadas que se encontram na membrana plasmática das células que compõem os tecidos de um organismo vivo e são classificadas de acordo com a principal função que desempenham (ALBERTS et al., 1994). As junções de ancoramento promovem a adesão de uma célula à outra ou a elementos da matriz celular enquanto que as junções de oclusão restringem a passagem de substâncias pelo espaço entre as células. Já as junções comunicantes do tipo *gap* (GJIC), promovem a comunicação entre as células (YAMASAKI; NAUS, 1996).

As GJIC estão presentes nos tecidos multicelulares de diversas espécies animais, sendo que as células sanguíneas, as musculares esqueléticas e as nervosas são exceções. (YAMASAKI; NAUS, 1999; DAGLI, 2000; GUERRA, 2003). À observação por microscopia eletrônica, as junções GAP apresentam estrutura pentalaminar característica, constituindo verdadeiras placas juncionais nesta região (KOVAL, 2006).

Em 1977, Makowski et al. propuseram um modelo de organização da placa juncional desenvolvido a partir de estudos de microscopia eletrônica e de difração de raios-X de junções GAP de fígado de camundongos (Figura 1). De acordo com este modelo, ainda atual, cada placa é constituída por vários canais intercelulares formados pela associação, face a face, de estruturas hexaméricas de 7 nm de diâmetro (conexons). Cada conexon é composto por seis subunidades de proteínas transmembrânicas, conhecidas como conexinas (Cx) e que oligomerizadas formam um poro central hidrofílico com cerca de 2nm de diâmetro (MAKOWSKI et al., 1977; UNWIN; ZAMPIGHI, 1980). O tamanho e o número de placas juncionais variam de acordo com o tipo celular e dependem freqüentemente do estado de atividade dos tecidos (DERMIEZEL et al., 1990; BEYER, 1993).

As conexinas são filogeneticamente conservadas (GOODENOUGH et al., 1996), classificadas de acordo com seus pesos moleculares (YAMASAKI; NAUS, 1996; AVANZO, 2005) e estão inseridas na membrana plasmática de modo que formam verdadeiros “túneis” interligando diretamente o citoplasma de células adjacentes.

A seguir ilustra-se modelo de organização de placa juncional, em estudo de microscopia eletrônica e de difração de raios-X de junções *gap* de fígado de camundongos, segundo Makowski et al. (1977).

Fonte: (MAKOWWSKI et al., 1977).

Figura 1 - Modelo de organização da placa juncional desenvolvido a partir de estudos de microscopia eletrônica e de difração de raios-X de junções GAP de fígado de camundongos. Cada conexon (círculo vermelho) é composto por 6 subunidades de conexinas (representadas em amarelo/azul) que oligomerizadas formam um poro central hidrofílico com cerca de 2nm de diâmetro (em rosa) e que está associado a outro conexon na membrana adjacente (quadrado verde)

A nomenclatura correntemente utilizada faz referência ao tamanho da proteína predita a partir da sequência do cDNA considerado (em kDa) precedida do termo genérico Cx (BEYER et al., 1987; BEYER, 1993). Em 1991, Bennett et al. propuseram que os genes das conexinas originam-se de uma sequência original, ainda indeterminada, que poderiam ter sofrido ao menos uma duplicação no início ou imediatamente antes da evolução dos vertebrados, originando as subclasses α , β , γ (ou δ). As conexinas são divididas em três subclasses de acordo com a estrutura do gene que as codificam (Figura 2).

A seguir, apresenta-se esquema da família das conexinas derivadas de um provável ancestral comum, segundo Mesnil e Yamasaki (1990).

Fonte: (MESNIL; YAMASAKI, 1990).

Figura 2 - Família multigênica das conexinas derivadas de um provável ancestral comum. As conexinas são divididas em 3 subclasses de acordo com a estrutura do gene que as codificam

As conexinas são proteínas transmembranas não glicosiladas de massa molecular aparentemente variando de 21 a 70 kDa. Suas estruturas moleculares foram determinadas por técnicas bioquímicas realizadas a partir de frações

subcelulares em junções ricas em junções *gap*. A primeira conexina identificada e caracterizada foi a Cx32 de fígado de rato (GOODENOUGH; STOECKENIUS, 1972; NICHOLSON et al., 1981; BEYER et al., 1987). Até o momento, vinte e uma conexinas já foram identificadas em mamíferos.

As conexinas compartilham uma homologia comum, conforme pode ser observado no esquema da figura 3:

- quatro domínios hidrofóbicos muito conservados representando cada um, um segmento de membrana: M1, M2, M3 e M4;
- duas alças extracelulares E1 e E2 de cerca de 20-30 aminoácidos contendo cada uma três resíduos de cisteínas invariáveis em uma sequência conservada;
- as extremidades aminoterminal (cerca de 20 aminoácidos) e carboxiterminal bem como as hélices que ligam M1 a M3 (de 40 a 60 aminoácidos) são citoplasmáticas.

Fonte: (BEYER, 1993).

Figura 3 - Topologia membranar de uma conexina. As regiões referentes à porção amino terminal, os domínios transmembrana e as alças extracelulares representam as sequências mais conservadas entre as diferentes conexinas. Cada alça extracelular contém três cisteínas (vermelho) que são conservadas em todas as conexinas. O domínio M3 (verde claro) tem uma característica anfipática que está diretamente relacionado com o movimento de fechamento do GAP. Já os domínios citoplasmáticos (azul) correspondem às porções únicas em cada conexina, sendo portanto, específicas

A expressão dos genes que codificam para as conexinas, em um mesmo tecido, pode ser modificada dependendo da situação, de acordo como o curso do desenvolvimento, condição fisiológica ou fisiopatológica particulares. Um exemplo disso é o aumento significativo da expressão da Cx43 no miométrio no momento do parto. Tal regulação é tecido-específica, uma vez que no miocárdio, que também expressa a Cx43, a expressão da conexina não é alterada no referido período (OU et al., 1997).

As conexinas formam canais transmembrânicos que conectam o citoplasma de células adjacentes permitindo a translocação de íons, pequenos metabólitos e mensageiros secundários de uma célula a outra (GOODENOUGH et al., 1996). Este tipo de comunicação é conhecido por ser essencial em diversas funções fisiológicas e patofisiológicas, tais como crescimento celular, proliferação e diferenciação, homeostase do tecido, tumorigênese, restabelecimento de feridas, entre outros (EVANS; MARTIN, 2002).

Tais junções são responsáveis pelo fluxo direto de moléculas com peso molecular inferior a 1000-2000 daltons entre as células adjacentes (EVERT et al., 2002; GUERRA, 2003; RODRIGUES, 2004). A meia vida da conexina 43 varia entre duas a cinco horas e dessa forma a comunicação intercelular depende de muitos fatores de controle sobre a dinâmica de síntese e degradação destas proteínas (OLORIS, 2005).

Diferentes regiões do cardiomiócito expressam diferentes combinações e quantidades relativas de três conexinas (Cx43, Cx40 e Cx45). No coração sadio, a combinação dessas três diferentes conexinas forma uma comunicação célula-a-célula, ou seja, um modelo precisamente orquestrado para governar o ritmo cardíaco normal. O ponto fundamental consiste na idéia de que a organização das junções gap e a expressão das conexinas pode ser o centro da função eletromecânica do coração saudável ou doente (SEVERS et al., 2004).

No miocárdio, as conexinas estão envolvidas na propagação do potencial de ação para promover a contração de milhões de células em alguns décimos de segundo (GOLDBERG et al., 2004, LIN et al., 2007).

Novas oportunidades para o estudo e a investigação destas conexinas foram possíveis com a utilização de camundongos transgênicos, ou seja, animais *knock-out* para determinada conexina (SEVERS et al., 2004).

O estudo de animais *knok-out* para a Cx43 demonstrou que a ausência da conexina 43 era compatível com a vida, porém os animais morreram após o nascimento (REAUME et al., 1995). Posteriormente, em 1997, Gutstein et al. observaram uma redução na velocidade de condução ventricular bem como o desenvolvimento letal de arritmia ventricular aos dois meses de idade, indicando que esta conexina é essencial para a função de maturação do ventrículo.

Camundongos *knok-out* para a Cx45 resultaram na morte embrionária no décimo dia, demonstrando assim que a expressão dessa conexina é vital para o desenvolvimento (TAMADDON et al., 2000). Já os animais *knok-out* para a Cx40, entretanto, são compatíveis com a vida, uma vez que a habilidade residual do sistema His-Purkinje em suportar a condução na ausência da Cx40 é atribuída à presença da Cx45, cuja distribuição se dá do início ao fim do sistema (COOPEN et al., 1999).

Embora não existam estudos em animais da espécie canina que relacionam diretamente a circulação extracorpórea e a conexina 43, outros trabalhos realizados demonstram que a conexina 43 presente no miocárdio pode sofrer alterações significativas. Yeh et al., em 2002, investigou a influência de CEC nas conexinas de cardiomiócitos. Avaliando amostras do átrio direito de 21 pacientes humanos submetidos à CEC ele concluiu que a expressão das conexinas diminui durante a circulação extracorpórea.

Em estudo semelhante foram analisados 16 pacientes humanos submetidos à cirurgia cardíaca, no qual avaliou-se a expressão das conexinas 40 e 43 em amostras de átrio direito em dois momentos distintos, quais sejam após o início e imediatamente após o término da CEC. Os resultados indicaram que a CEC apresenta uma significativa influência sobre a expressão da conexina 43 (PAVLOVIC et al., 2006).

Apesar da importância atribuída à comunicação intercelular na modulação dos processos patológicos, inexistem trabalhos na literatura científica especificando se há ou não alterações nas conexinas 43 (importantes junções comunicantes do coração) quando da realização da circulação extracorpórea em cães.

Assim, a melhor compreensão da função destas proteínas durante a realização da circulação extracorpórea poderá auxiliar no esclarecimento das alterações no ritmo cardíaco em cães observadas após a aplicação da mesma.

3 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo verificar a viabilidade da circulação extracorpórea por um período de duas horas em cães (*Canis familiaris*), avaliar a expressão da conexina 43 no miocárdio de cães indenes e determinar as alterações da referida conexina no miocárdio de cães indenes submetidos à técnica de circulação extracorpórea.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a viabilidade da técnica de circulação extracorpórea por um período de duas horas seguida por circulação espontânea durante uma hora.
- Marcar a conexina 43 por imunofluorescência no miocárdio de cães indenes.
- Quantificar a expressão da conexina 43 por *western blot* no miocárdio de cães indenes.
- Quantificar a expressão de Gja1 (gene da conexina 43) por *RT-PCR* no miocárdio de cães indenes.
- Marcar a conexina 43 por imunofluorescência no miocárdio de cães indenes antes e após a CEC.
- Quantificar a expressão da conexina 43 por *western blot* no miocárdio de cães indenes antes e após a CEC.
- Quantificar a expressão de Gja1 (gene da conexina 43) por *RT-PCR* no miocárdio de cães indenes antes e após a CEC.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A seguir serão discutidos o material e métodos empregados no presente estudo, seguindo as etapas desenvolvidas.

4.1 ANIMAIS INDENES NÃO SUBMETIDOS À CEC

Foram utilizados cinco cães sem raça definida (*Canis familiaris*), adultos, sendo três machos e duas fêmeas, com idades variadas, pesando entre 15 e 20 quilos, provenientes de Centros de Controle de Zoonoses (CCZ) localizados em municípios próximos da Grande São Paulo.

Os animais foram submetidos à eutanásia nos referidos Centros de Controle de Zoonoses (anterior à Lei Estadual nº 12.916 que proíbe a eutanásia de animais saudáveis em CCZ). Posteriormente os cadáveres foram encaminhados ao Laboratório de Cirurgia Cardiorrástica (LCCT) do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para que fosse retirado o coração no intuito de se proceder à coleta de fragmentos correspondentes a diferentes áreas do órgão em questão, minimizando assim a possibilidade de degradação do material genético contido nos fragmentos do miocárdio. Foram coletados fragmentos correspondentes à região dos átrios esquerdo e direito, ventrículos esquerdo e direito e septo interventricular.

O material coletado foi devidamente identificado de acordo com a região do coração e o respectivo animal. Parte dos fragmentos coletados foi fixada em metacarn (fixador alcoólico composto por 60% de metanol, 30 % de clorofórmio e 10% de ácido acético) por 12 horas, sendo então transferidos para álcool 95% onde foram mantidos por 48 horas. Em seguida, os fragmentos foram incluídos em parafina para a realização de imunofluorescência.

Outra parte dos fragmentos foi protegida no interior de papel alumínio (identificação com papel interno, numerado à lápis) e foi imediatamente imersa em nitrogênio líquido e posteriormente mantidos em freezer a -80 graus Celsius até a análise (realização de *western blot* e *RT-PCR*).

4.2 ANIMAIS INDENES SUBMETIDOS À CEC

Foram utilizados neste experimento cinco cães sem raça definida (*Canis familiaris*), adultos, machos e fêmeas, com idades variadas, pesando entre 15 e 20 quilos, provenientes de Centros de Controle de Zoonoses localizados em municípios próximos da Grande São Paulo (anterior à resolução 877, artigo 7º do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV) e à lei estadual 11.977.

Os cães foram alojados no Canil do LCCT do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Os animais passaram por exames físicos e laboratoriais e uma vez considerados aptos foram utilizados por apresentarem-se hígidos e isentos de quaisquer alterações que porventura comprometessem a realização deste projeto.

Logo após à chegada ao canil os animais receberam banho para limpeza, foram pesados, tratados contra ectoparasitas e endoparasitas através da aplicação de ivermectina¹ a 1% (400 µg/kg), dipropionato de imidocarb² (5 mg/kg) e banhados com amitraz³. Os animais foram mantidos com ração comercial⁴, água *ad libitum* e estabelecidos em gaiolas individuais. Cada cão teve ficha clínica, anestésica e cirúrgica com as devidas identificações.

Os procedimentos de preparo pré-anestésico e cirúrgicos bem como as coletas dos fragmentos do miocárdio foram realizados no Centro Cirúrgico do referido Laboratório (LCCT).

4.2.1 Preparo do animal

No período que correspondeu a 24 horas antes do procedimento cirúrgico foi realizada raspagem dos pêlos da região torácica, membros torácicos, face medial de membros pélvicos e aplicação de antibioticoterapia profilática através da

¹ Ivomec® - Merck-Sharp S.A - Brasil

² Imizol - Coopers - Brasil

³ Triatox - Coopers - Brasil

⁴ Premier Pet

administração de benzilpenicilina benzatina⁵ na dose de 40.000 UI/kg. Antes da intervenção cirúrgica, os animais foram submetidos a jejum hídrico e alimentar de seis e 12 horas, respectivamente.

4.2.2 Procedimento anestésico

Inicialmente, durante a preparação do cão na sala de pré-operatório, foram puncionadas as duas veias cefálicas através de cateter⁶ jelco 22 para permitir a infusão de fluidos e fármacos.

A medicação pré-anestésica foi composta da administração de acepromazina⁷ 0,2% na dose 0,05 mg/kg associado a cloridrato de meperidina⁸ na dose de 2 mg/kg pela via intramuscular (IM). Decorridos 20 minutos, a indução anestésica foi realizada com a utilização de propofol⁹ na dose de 5 mg/kg por via intravenosa (IV) e quando atingido plano anestésico satisfatório, o animal foi intubado com sonda de diâmetro adequado à traquéia.

A manutenção anestésica foi feita com o agente inalatório isoflurano¹⁰ misturado em oxigênio em aparelho de anestesia com circuito fechado a fim de manter o animal no 2º plano de anestesia do 3º estágio de Guedel para a realização do procedimento cirúrgico e instalação da circulação extracorpórea. A analgesia complementar foi realizada no período transoperatório com administração intravenosa de citrato de fentanila¹¹, na dose de 0,05mg/kg.

A artéria femoral direita foi cateterizada por meio de punção direta com cateter intravenoso 22G¹² permitindo a coleta de sangue para mensuração de parâmetros de gases, eletrólitos e mensuração da pressão arterial.

O bloqueio neuromuscular foi obtido pela utilização de brometo de pancurônio¹³ (0,06mg/kg IV). A reversão do bloqueio ocorreu com a administração

⁵ Penicilina G Benzatina - EMS Indústrias Farmacêuticas - Brasil

⁶ Jelco - Johnson & Johnson - Brasil

⁷ Acepran 0,2% - Univet - Brasil

⁸ Dolosal - Cristália - Brasil

⁹ Propofol - Abbott - Brasil

¹⁰ Forane - Abbott - Brasil

¹¹ Fentanil - Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda.

¹² Jelco - Johnson&Johnson - USA

¹³ Pancuron - Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda.

de neostigmine¹⁴ na dose de 0,08 mg/kg (IV) associado a sulfato de atropina¹⁵ na dose de 0,04 mg/kg.

No decorrer da intervenção operatória foi realizada infusão de fluido do tipo ringer com lactato¹⁶ na dose de 5 ml/kg/hora e, no desmame da circulação extracorpórea, de acordo com a necessidade, de drogas vasoativas tais como dopamina¹⁷ (quando a pressão arterial média esteve abaixo de 60 mmHg), nitroprussiato¹⁸ e nitroglicerina¹⁹ (quando o animal apresentou hipertensão pulmonar).

Os parâmetros referentes à pressão arterial foram acompanhados por meio de um monitor computadorizado²⁰, bem como a temperatura, o número de movimentos respiratórios e o padrão eletrocardiográfico. Também foram realizados testes para se determinar os níveis séricos de eletrólitos (Na^{2+} , K^{+} e Ca^{+} ionizado) em aparelho I-Stat²¹, pH, bicarbonato e gases sanguíneos em aparelho de gasometria ABL-5²² e tempo de coagulação ativada em aparelho MCA 2000²³.

4.2.3 Procedimento cirúrgico

Primeiramente procedeu-se à antissepsia e o acesso cirúrgico à cavidade torácica foi realizado por meio de toracotomia intercostal direita convencional ao nível do 4º espaço intercostal, com a dissecação dos planos musculares até a exposição da pleura. Após a incisão desta, foi visibilizado o coração, procedendo-se, então, a abertura longitudinal do pericárdio, ventralmente ao nervo frênico, e posterior confecção de berço pericárdico com fio de algodão 2-0²⁴.

Em seguida, foi visibilizado e individualizado o átrio direito e sua respectiva aurícula, visando a prepará-la para receber cânula de drenagem de tamanho ¼ de

¹⁴ Prostigmine - Roche S.A.

¹⁵ Sulfato de Atropina - Ariston - Brasil

¹⁶ Solução Ringer com Lactato - Astra Química - Brasil

¹⁷ Dopamin - Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda.

¹⁸ Nipride - Biolab Farmacêutica Ltda.

¹⁹ Tridil - Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda.

²⁰ HP M1205A/A30 - Hewlett Packard (Processo Fapesp nº 00/00192-7)

²¹ I-Stat (Processo Fapesp nº 00/00192-7)

²² ABL-5 - Radiometer (Processo Fapesp nº 00/00192-7)

²³ MCA 2000 - Fundação Adib Jatene (Processo Fapesp nº 00/00192-7)

²⁴ Algofil 2-0 - Cirumédica Brasil

polegada²⁵ para a máquina de circulação extracorpórea²⁶, momento em que se procedeu à coleta de biópsia do músculo cardíaco, das regiões atrial e ventricular, correspondente ao momento T0, conforme será descrito no item 4.4 (KWASNICKA, 2003).

A artéria femoral esquerda foi dissecada com o objetivo de se ter um segmento livre de artéria de aproximadamente dois centímetros. Neste local, posteriormente foi implantada uma cânula arterial de tamanho 10 ou 12²⁷ com o auxílio de dois torniquetes realizados com fitas cardíacas²⁸, cânula esta que trouxe sangue oxigenado da máquina de circulação extracorpórea de volta ao sistema arterial do cão.

O anticoagulante utilizado foi a heparina sódica²⁹ na dose de 1mg/kg, sendo administrado diretamente em uma das veias cefálicas já previamente cateterizadas, de forma a se manter o tempo de coagulação ativado acima de 480 segundos. Após a heparinização do animal, foi feita a introdução da cânula arterial e venosa na artéria femoral esquerda e na aurícula direita, respectivamente, a fim de possibilitar a instalação da circulação extracorpórea, a qual foi realizada por meio de um aparelho do tipo “roller pump”³⁰ com oxigenador de membranas³¹, cujo circuito foi preenchido com fluido do tipo ringer com lactato⁸. O fluxo inicial da bomba foi de 150 a 180ml/kg/minuto, ajustado, a seguir, de modo a manter a pressão arterial média acima de 60mmHg, com os cães mantidos, sempre que possível, em normotermia (38 graus Celsius) (KWASNICKA, 2003).

Após 120 minutos de duração do procedimento de circulação extracorpórea, esta foi interrompida. O volume residual existente no reservatório venoso da bomba de circulação extracorpórea foi reinfundido no animal conforme observava-se hipotensão por baixa volemia, procedimento este possibilitado através de vasodilatação, que foi realizada por meio da infusão de nitroprussiato³² e nitroglicerina³³. Neste instante procedeu-se à coleta de biópsia do músculo cardíaco

²⁵ Braile Biomédica - Cânulas de drenagem

²⁶ Braile Biomédica - Aparelho de CEC do tipo roller pump (Processo Fapesp nº 00/00192-7)

²⁷ Braile Biomédica - Cânulas arteriais

²⁸ Ethicon - Johnson&Johnson - USA

²⁹ Heparin - Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda.

³⁰ Modelo ECO 01 - Braile Biomédica (Processo Fapesp nº 00/00192-7)

³¹ Braile Biomédica

³² Nipride - Biolab Farmacêutica Ltda.

³³ Tridil - Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda.

das regiões atrial e ventricular, correspondente ao momento T1, conforme será descrito no item 4.4.

Após 60 minutos do desmame da circulação extracorpórea, realizou-se a terceira e última biópsia do músculo cardíaco, das regiões atrial e ventricular, correspondente ao momento T2, conforme será descrito no item 4.4. Em seguida, a anestesia foi aprofundada e imediatamente foi administrado cloreto de potássio intravenoso para a eutanásia dos animais.

O material coletado foi devidamente identificado de acordo com a região do coração (atrial ou ventricular) e o seu respectivo animal. Parte dos fragmentos coletados foi fixada em metacarn (fixador alcoólico composto por 60% de metanol, 30 % de clorofórmio e 10% de ácido acético) por 12 horas, sendo então transferidos para álcool 95% onde foram mantidos por 48 horas. Em seguida, os fragmentos foram incluídos em parafina para a realização de imunofluorescência.

Outra parte dos fragmentos foi protegida no interior de papel alumínio (identificação com papel interno, numerando a lápis) e foi imediatamente imersa em nitrogênio líquido e posteriormente mantidos em freezer a -80 graus Celsius até a análise (realização de *Western blot* e *RT-PCR*).

4.3 MOMENTOS DA AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS

As avaliações propostas foram feitas em três diferentes momentos:

- Momento 0 (T0): controle - após a indução da anestesia e intubação do animal, imediatamente antes da instituição da circulação extracorpórea.
- Momento 1 (T1): Após duas horas de circulação extracorpórea, imediatamente após o desmame.
- Momento 2 (T2): Após o desmame da circulação extracorpórea com uma hora de restauração da circulação espontânea.

4.4 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS

As técnicas de biologia molecular (imunofluorescência, *Western blot* e *RT-PCR*) utilizadas para o estudo da conexina 43 no miocárdio de cães saudáveis e também no miocárdio de cães antes e após a CEC foram desenvolvidas junto ao Laboratório de Oncologia Experimental do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, sob responsabilidade da Prof^a Dr^a Maria Lúcia Zaidan Dagli.

4.4.1 Imunofluorescência para conexina 43

Os fragmentos de miocárdio foram fixados em metacarn, processados, incluídos em parafina e após o corte foram colocados em lâminas silanizadas³⁴. As seções foram desparafinizadas em xilol e hidratadas em diferentes concentrações de etanol, quais sejam absoluto, 95% e 70% e em seguida PBS.

O desmascaramento antigênico foi realizado em tampão Tris-EDTA (pH 9,0) durante 20 minutos em forno de microondas na potência máxima. Após o resfriamento em temperatura ambiente, procedeu-se ao bloqueio da peroxidase endógena através da incubação por 30 minutos, em solução contendo 80% de álcool metílico e 20% de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 30 volumes, em câmara escura. Em seguida, as lâminas foram lavadas em PBS 1X (acrescido de 500 µl de *tween* 20) durante cinco minutos, por três vezes.

Para o bloqueio de reações inespecíficas procedeu-se à incubação por 20 minutos com TNB (100 a 200 µl por lâmina) em câmara úmida e temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram novamente lavadas em PBS 1X (acrescido de 500 µl de *tween* 20) durante cinco minutos, por três vezes.

Para a marcação da Cx43 foi utilizado anticorpo primário *Rabbit anti-Connexin 43*³⁵ (concentração 1:500), sendo as lâminas incubadas em câmara úmida, durante

³⁴ Lâminas silanizadas - Star Frost®

³⁵ Zymed® Laboratories

uma noite, a quatro graus Célsius em solução de bloqueio do kit TSA³⁶. Pela manhã, as lâminas foram lavadas em PBS 1X (acrescido de 500 µl de *tween* 20) durante cinco minutos, por três vezes e em seguida incubadas com anticorpo secundário biotinilado *Goat anti-Rabbit*³⁷ (concentração 1:200), seguindo-se à conjugação com o complexo estreptavidina-FITC e tiramida do kit TSA.

Por fim, após lavagem das lâminas em PBS 1X (acrescido de 500 µl de *tween* 20) durante cinco minutos, por três vezes, seguiu-se à incubação com iodeto de propídeo³⁸, diluído em PBS (concentração 1:1000) durante dez minutos em câmara escura, para marcação nuclear (100 µl por lâmina). O excesso foi retirado e montou-se a lâmina com 20 µL de Vectashield³⁹ e lamínula para se evitar o esgotamento da fluorescência.

O material foi fotografado em microscópio⁴⁰, equipado com sistema de fluorescência e fotomicrografia.

4.4.2 Western blot para conexina 43

A técnica de *western blot* consiste da detecção da proteína de interesse em um homogenato celular com a ajuda de anticorpos específicos e sistema de revelação e foi processado como segue:

Inicialmente foi necessário realizar a extração de proteínas. Os fragmentos de miocárdio correspondentes às amostras dos 10 cães, previamente armazenados em freezer à -80 graus Celsius, foram separados em tubos de vidro estéreis e autoclavados, devidamente numerados. Adicionou-se 400 µL da solução 2x *Sample Buffer* em cada tubo e em seguida os tubos foram colocados no gelo.

Colocou-se uma amostra de 40 mg de tecido do miocárdio em cada tubo, não ultrapassando este peso. O tecido foi triturado com sonicador na pulsação máxima, evitando que ocorresse aquecimento. Em seguida, adicionou-se 400 µL de 1x *Working Solution* em cada amostra triturada, submetendo-as novamente ao

³⁶ Kit TSA (Tyramide Signal Amplification, Perkin Elmer, New Life Science Products®)

³⁷ Sigma®

³⁸ Sigma®

³⁹ Vector®

⁴⁰ Microscópio Nikon E-800

sonicador. Com o objetivo de se evitar contaminações, o aparelho foi devidamente higienizado entre uma amostra e outra.

Após a sonicação, os conteúdos referentes às amostras trituradas foram transferidos para eppendorfs de 1,5 ml e mantidos no gelo. As amostras foram centrifugadas durante 15 minutos, a 13.000 rpm e quatro graus Celsius. Por fim, os sobrenadantes foram transferidos para outros eppendorfs de 1,5 ml e armazenados no freezer à -80 graus Celsius.

Para a quantificação de proteínas, as amostras foram previamente descongeladas sobre o gelo. Em seguida, procedeu-se a padronização da curva de albumina, utilizando um eppendorf com 100 µl de albumina previamente diluída acrescido de 900 µl de água destilada em tudo eppendorf de 1,5 ml, sendo mantido no gelo. As proteínas foram diluídas em tubos eppendorf de 0,2 ml, sendo 5 µl da amostra acrescidos de 95 µl de água destilada (1:20), e mantidas no gelo. Foi realizada também a diluição de 1 ml de *Bradford* em 4 ml de água destilada (1:5), sendo mantido no gelo.

Em seguida, colocou-se 990 µl de *Bradford* diluído (1:5) em todos os tubos de vidro e acrescentou-se 10 µl de amostra de proteína diluída (1:20). As amostras foram homogeneizadas cuidadosamente, evitando-se a formação de bolhas.

A leitura (quantificação) foi realizada no espectrofotômetro⁴¹ a 595 nm, utilizando-se uma cubeta de quartzo. A primeira etapa constituiu na realização da curva de padronização com a albumina. Após lavagem da cubeta com álcool, procedeu-se à quantificação das amostras, anotando-se o valor da absorbância, respectivamente para cada amostra. Por fim, determinaram-se os valores da diluição de cada amostra, em µg/µl.

Antes de se proceder à corrida, foram preparados os géis de acrilamida, os tampões (tampão de corrida 1X, *transfer buffer* solução de uso e TTBS 1X). As proteínas foram inicialmente diluídas utilizando-se *loading buffer* (azul de bromofenol) e *working solution*. Posteriormente, foram submetidas à desnaturação protéica, durante 10 minutos à 95 graus Celsius, no termociclador⁴².

Após a desnaturação, as proteínas foram resolvidas em eletroforese num gel de poliacrilamida a 12% em dodecil sulfato de sódio (SDS). Enquanto ocorria a

⁴¹ BioPhotometer - Eppendorf®

⁴² Mastercycler gradient - Eppendorf®

corrida no gel, prepararam-se os papéis de filtro e as membranas difluoreto de polivinilideno (PDVF) para a transferência.

No momento próximo ao final da corrida, preparou-se quatro cubas, sendo a primeira com metanol (para estabilizar a membrana), a segunda com água destilada, a terceira com *transfer buffer* solução de uso (até a hora da transferência) e a quarta com *transfer buffer* solução de uso para molhar os papéis de filtro que foram utilizados na transferência. Em seguida montou-se a transferência (seis papéis de filtro, membrana de PDVF, gel, seis papéis de filtro). As proteínas foram transferidas durante 50 minutos, a 47mA, para as membranas.

Em seguida, o bloqueio de reações inespecíficas nas membranas foi realizado com solução de *skin milk* 5%, diluído em TTBS, durante duas horas em temperatura ambiente e sob leve agitação. Os géis foram corados em solução de *comassie blue* durante 10 minutos sob agitação suave e constante e em seguida descorados em *destain solution* por 50 minutos. Após a remoção desta solução, os géis foram deixados em uma cuba com água destilada durante uma noite.

Para a marcação da conexina 43 foi utilizado anticorpo primário⁴³ (policlonal anti-Cx43) diluído em solução de TTBS contendo 5% de *skin milk*, na proporção de 1:200. As membranas foram incubadas com o referido anticorpo durante uma noite, a quatro graus Celsius, sob agitação suave, em recipiente vedado e refrigerado.

Pela manhã, após lavagens seguidas com TTBS 1x procedeu-se novamente ao bloqueio de reações inespecíficas com solução de *skin milk* 10%, diluído em TTBS, durante 10 minutos e em seguida as membranas foram incubadas com anticorpos secundário⁴⁴ (cabra anti-coelho), conjugados com peroxidase (1:500) durante duas horas, sob agitação suave e em temperatura ambiente. A ligação foi revelada com uma solução preparada em frasco âmbar, contendo diaminobenzidina (DAB), sulfato de níquel e peróxido de hidrogênio. A intensidade de marcação foi quantificada em sistema Image Master⁴⁵.

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

⁴³ Zymed

⁴⁴ Zymed

⁴⁵ Amersham Pharmacia Biotech

membranas secaram sobre uma folha de papel sulfite e em seguida foram escaneadas, juntamente com os géis.

4.4.3 Determinação da expressão do *mRNA* correspondente a Gja1 (gene da conexina 43) no miocárdio de cães utilizando a técnica de *RT-PCR* em tempo real

A expressão do *mRNA* é determinada pelo método semi-quantitativo (LI; WANG, 2000). O RNA celular total foi isolado de amostras de coração utilizando o reagente Trizol.

As amostras foram retiradas do freezer -80 graus Celsius e mantidas em recipiente contendo nitrogênio líquido para que o RNA não fosse degradado. Foi colocado 40 mg de tecido de miocárdio de cada amostra analisada em eppendorfs *RNase free*, adicionou-se 500 µl de trizol e macerou-se o tecido.

As amostras foram incubadas durante cinco minutos em temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se 100 µl de clorofórmio, procedeu-se à suave homogeneização e depois à incubação durante dois minutos em temperatura ambiente. Centrifugou-se durante 20 minutos a 12.000 rpm a quatro graus Celsius. O sobrenadante foi transferido para um novo eppendorf *RNase free* contendo 500 µl de isopropanol gelado.

Após incubação por 15 minutos no gelo, procedeu-se à centrifugação durante 20 minutos a 12.000 rpm a quatro graus Celsius e posteriormente o sobrenadante foi desprezado. Adicionou-se um mililitro de etanol 70% tratado com DEPC gelado, centrifugou-se durante 10 minutos a 12.000 rpm a quatro graus Celsius e desprezou-se o sobrenadante.

Procedeu-se então à secagem do pelet, que em seguida foi ressuspendido em 100 µl de água milliQ tratada com DEPC. Cada eppendorf foi submetido ao vortex durante 10 minutos e em seguida as amostras foram mantidas em freezer -80 graus Celsius.

O primer para PCR e o TaqMan probe da conexina 43 foram elaborados utilizando o programa Software Primer Express 1.0 (Applied Biosystems), a partir do Genbank. O TaqMan probe é marcado com um corante fluorescente reporter, FAM

(6-carboxifluoresceína), na posição 5' final e um corante fluorescente quencher TAMRA (6-carboxi-tetrametil-rodamina) na posição 3' final. A especificidade do primer foi testada sobre condições de PCR normal no próprio termociclador do TaqMan PCR quantitativo.

As reações de transcrição reversa foram realizadas para cada amostra de RNA em tubos de reação MicroAmp utilizando o reagente TaqMan de transcrição reversa. Cada tubo de reação contém 3 µg de RNA total num volume de 40 µl contendo tampão TaqMan RT 1X, MgCl₂ 5,5 mM, 500 µM de cada dNTP, 2,5 µM de oligo-d(T)₁₆ primers, inibidor de RNase 0,4 U/µl e 1,25 U/µl de MultiScribe Reverse Transcriptase. A reação de RT foi realizada à 25°C por 10 minutos, 48°C por 30 minutos e 95°C por 5 minutos. A mistura de reação para a RT foi mantida à 4°C para uso imediato da amplificação do PCR, ou estocada à -20 graus Celsius para uso posterior.

O princípio da detecção do TaqMan em tempo real é baseado na análise da liberação do composto fluorogênico através da ação 5' nuclease (LIVAK et al., 1995; GIBSON et al., 1996; HELD et al., 1996). Uma DNA polimerase termoestável, a AmpliTaq Gold, é utilizada para a amplificação do PCR em tempo real numa placa com 96 poços. Cada poço contém 4µl de cada produto de PCR (300ng de RNA total), Tampão A TaqMan 1X, MgCl₂ 5,5 mM, 200 µM de dATP/dCTP/dGTP, 400 µM dUTP, 200 nM dos primers (senso e antisenso), 100 nM dos probes TaqMan, 0,01U/ml de AmpErase e 0,025 U/µl da DNA polimerase AmpliTaq Gold em um volume total de 50 µl.

Cada poço foi fechado com tampas MicroAmp Optical (Applied Biosystems), seguido da completa mistura dos reagentes. Neste estudo as condições de amplificação utilizadas são: 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C e corridos em 40 ciclos por 15 segundos a 95°C e 60°C por 1 minuto.

Todas as reações foram realizadas em um Gene Amp[®] 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) para as amostras analisadas, as quais foram corridas em duplicata, utilizando um programa de detecção Sequence Detector V 1.6. O ΔR_n e C_t são médias de valores obtidos em cada reação. A curva padrão foi construída plotando os C_t vs. a concentração de cDNA.

O número absoluto de cópias dos mRNA das conexinas em cada amostra, foi calculado com base nos seus valores de C_t . O número absoluto de cópias do mRNA

das conexinas foi normalizado ao do 18S para minimizar a variabilidade nos resultados devido a diferenças na eficiência do RT e na integridade do RNA entre as amostras testadas. Os resultados foram calculados de acordo com os cálculos de quantificação relativa utilizando o $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

O primer utilizado foi construído com software Primer express 2.0, utilizando as seqüências depositadas no Gene Bank. As seqüências utilizadas foram:

Cx43: sense-Cx43 (L10387): 5'GTGCCGGCTICACTTTCATTAAG3'; anti-sense - Cx43 (L10388): 3'CCAAGGCGCTCCAGTCA5'. A probe utilizada para esse gene é FAM-3'TCTGGGCACCTCTCTTT5'-NFQ e o tamanho do amplicon tem 65 pb.

Beta-actina: sense 5'AGATTACTGCCCTGGCTCCTA3' e o anti-sense 3'CAAGTACTCTGTGTGGATTGGTGG5'. A probe usada é: 5'ACCATGAAGATCAAGATCAT3'.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados com o programa Graphpad Prism 3.0 (GraphPad Software). As médias e as variâncias foram submetidas à ANOVA. Diferenças significativas foram consideradas a partir de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

A seguir, apresentamos os resultados referentes à avaliação dos animais indenados, às alterações relacionadas diretamente à instituição da circulação extracorpórea e por fim à avaliação dos animais indenados submetidos a técnica de CEC.

5.1 AVALIAÇÃO DOS ANIMAIS INDENADOS

Os animais indenados foram avaliados através das técnicas de imunofluorescência, *western blot* e *RT-PCR*.

5.1.1 Imuno-localização da conexina 43

Foi observado que no miocárdio dos animais saudáveis, a conexina 43 está presente principalmente na membrana citoplasmática, pois esta proteína é responsável principalmente pela composição das junções intercelulares do tipo GAP. A marcação em verde corresponde à positividade para a conexina 43 enquanto que os núcleos das células apresentam-se puntiformes e marcados em vermelho pelo iodeto de propídeo. As imagens foram obtidas em microscópio equipado com sistema de fluorescência.

A marcação da conexina 43 foi identificada em todas as regiões avaliadas do coração, quais sejam septo interventricular, átrios direito e esquerdo e ventrículos direito e esquerdo.

Aparentemente ocorre maior marcação da conexina 43 nas regiões correspondentes ao septo interventricular e aos ventrículos direito e esquerdo em relação às regiões correspondentes aos átrios direito e esquerdo.

O mesmo padrão de marcação foi observado nas amostras de miocárdio dos cinco cães analisados (Figuras 4 a 8)

Fonte: (SANTOS, A. L. S., 2008).

Figura 4 - Fotomicrografias referente à imunofluorescência de diferentes regiões do miocárdio de cão saudável (animal 1). (A) Ventrículo direito. (B) Átrio direito. (C) Ventrículo esquerdo. (D) Átrio esquerdo. (E) Septo interventricular. (F) Controle negativo da reação. As marcações em verde representam positividade para conexina 43. Os núcleos estão marcados em vermelho pelo iodeto de propídeo. Imagem obtida em microscópio Nikon E-800, equipado com sistema de fluorescência. Barra de escala = 10 μ m

Fonte: (SANTOS, A. L. S., 2008).

Figura 5 - Fotomicrografias referente à imunofluorescência de diferentes regiões do miocárdio de cão saudável (animal 2). (A) Ventrículo direito. (B) Átrio direito. (C) Ventrículo esquerdo. (D) Átrio esquerdo. (E) Septo interventricular. (F) Controle negativo da reação. As marcações em verde representam positividade para conexina 43. Os núcleos estão marcados em vermelho pelo iodeto de propídeo. Imagem obtida em microscópio Nikon E-800, equipado com sistema de fluorescência. Barra de escala = 10 μ m

Fonte: (SANTOS, A. L. S., 2008).

Figura 6 - Fotomicrografias referente à imunofluorescência de diferentes regiões do miocárdio de cão saudável (animal 3). (A) Ventrículo direito. (B) Átrio direito. (C) Ventrículo esquerdo. (D) Átrio esquerdo. (E) Septo interventricular. (F) Controle negativo da reação. As marcações em verde representam positividade para conexina 43. Os núcleos estão marcados em vermelho pelo iodeto de propídeo. Imagem obtida em microscópio Nikon E-800, equipado com sistema de fluorescência. Barra de escala = 10 µm

Fonte: (SANTOS, A. L. S., 2008).

Figura 7 - Fotomicrografias referente à imunofluorescência de diferentes regiões do miocárdio de cão saudável (animal 4). (A) Ventrículo direito. (B) Átrio direito. (C) Ventrículo esquerdo. (D) Átrio esquerdo. (E) Septo interventricular. (F) Controle negativo da reação. As marcações em verde representam positividade para conexina 43. Os núcleos estão marcados em vermelho pelo iodeto de propídeo. Imagem obtida em microscópio Nikon E-800, equipado com sistema de fluorescência. Barra de escala = 10 μ m

Fonte: (SANTOS, A. L. S., 2008).

Figura 8 - Fotomicrografias referente à imunofluorescência de diferentes regiões do miocárdio de cão saudável (animal 5). (A) Ventrículo direito. (B) Átrio direito. (C) Ventrículo esquerdo. (D) Átrio esquerdo. (E) Septo interventricular. (F) Controle negativo da reação. As marcações em verde representam positividade para conexina 43. Os núcleos estão marcados em vermelho pelo iodeto de propídeo. Imagem obtida em microscópio Nikon E-800, equipado com sistema de fluorescência. Barra de escala = 10 μ m

5.1.2 Western blot da conexina 43

Para avaliação da expressão da conexina 43, inicialmente procedeu-se à extração das proteínas e em seguida desenvolveu-se a curva padrão de proteínas para se estabelecer valores homogêneos de concentração das proteínas para todas as amostras que foram corridas no gel por eletroforese.

A seguir apresenta-se curva padrão de proteínas para *western blot* das amostras das diferentes regiões do miocárdio dos cinco cães saudáveis analisados (Figura 9) bem como os valores utilizados para o desenvolvimento da referida curva (Quadro 1).

Figura 9 - Curva padrão de proteínas para *western blot* das amostras das diferentes regiões do miocárdio dos cinco cães saudáveis analisados.

Quadro 1 - Valores obtidos na padronização da curva utilizando albumina e *Bradford*

µg/ µL	0	1	2	4	6	8	10
Absorbância	0	0,052	0,097	0,225	0,307	0,384	0,528

A seguir apresenta-se valores referentes à quantificação de proteínas das amostras analisadas bem como sua concentração de acordo com a curva padrão de proteínas. (Quadro 2).

Quadro 2 - Valores referentes à quantificação de proteínas das amostras analisadas bem como sua concentração de acordo com a curva padrão de proteínas. (1,2,3,4,5) Animais analisados. (Se) Septo interventricular. (AD) Átrio direito. (AE) Átrio esquerdo. (VD) Ventrículo direito. (VE) Ventrículo esquerdo.

Amostras	Absorbância	Concentração µg/ µL
1Se	0,530	10,33
1AD	0,526	10,26
1VD	0,537	10,47
1AE	0,533	10,39
1VE	0,568	11,08
2Se	0,570	11,12
2AD	0,559	10,90
2VD	0,573	11,17
2AE	0,566	11,04
2VE	0,572	11,15
3Se	0,579	11,29
3AD	0,560	10,92
3VD	0,576	11,23
3AE	0,570	11,12
3VE	0,562	10,96
4Se	0,586	11,43
4AD	0,566	11,04
4VD	0,577	11,25
4AE	0,560	10,92
4VE	0,565	11,02
5Se	0,508	9,90
5AD	0,567	11,06
5VD	0,581	11,33
5AE	0,568	11,08
5VE	0,576	11,23

Após realização do *western blot* procedeu-se à análise densitométrica da referida conexina e da banda correspondente à marcação no gel de poliacrilamida com o objetivo de se analisar a expressão relativa da conexina 43.

A conexina 43 apresentou marcação em todas as regiões avaliadas do coração, quais sejam septo interventricular, átrios direito e esquerdo e ventrículos direito e esquerdo. Identificamos tal marcação de acordo com a altura correspondente ao marcador de peso molecular Kaleidoscope⁴⁶ utilizado nas reações.

Foi observado que no miocárdio dos animais saudáveis, a conexina 43 apresenta uma marcação mais intensa nas regiões correspondentes ao septo interventricular e ventrículos direito e esquerdo em comparação à marcação das regiões correspondentes aos átrios direito e esquerdo.

O mesmo padrão de marcação foi observado nas amostras de miocárdio dos cinco cães analisados (Figuras 10 a 14).

⁴⁶ Kaleidoscope Prestained Standards - Bio-Rad

Fonte: (SANTOS, A. L. S., 2008).

Figura 10- *Western blot* da expressão da proteína (conexina 43). Foi colocado 100 µg de proteína em cada *well*. (A) Membrana de PVDF. (B) Gel de poliacrilamida 13%. (K) marcador de peso molecular Kaleidoscope. (Se) septo interventricular. (AD) átrio direito. (VD) ventrículo direito. (AE) átrio esquerdo. (VE) ventrículo esquerdo. Amostras de miocárdio cão saudável (animal 1).

Fonte: (SANTOS, A. L. S., 2008).

Figura 11 - *Western blot* da expressão da proteína (conexina 43). Foi colocado 100 μ g de proteína em cada *well*. (A) Membrana de PVDF. (B) Gel de poliacrilamida 13%. (K) marcador de peso molecular Kaleidoscope. (Se) septo interventricular. (AD) átrio direito. (VD) ventrículo direito. (AE) átrio esquerdo. (VE) ventrículo esquerdo. Amostras de miocárdio cão saudável (animal 2).

Fonte: (SANTOS, A. L. S., 2008).

Figura 12 - *Western blot* da expressão da proteína (conexina 43). Foi colocado 100 μ g de proteína em cada *well*. (A) Membrana de PVDF. (B) Gel de poliacrilamida 13%. (K) marcador de peso molecular Kaleidoscope. (Se) septo interventricular. (AD) átrio direito. (VD) ventrículo direito. (AE) átrio esquerdo. (VE) ventrículo esquerdo. Amostras de miocárdio cão saudável (animal 3).

Fonte: (SANTOS, A. L. S., 2008).

Figura 13 - *Western blot* da expressão da proteína (conexina 43). Foi colocado 100 μ g de proteína em cada *well*. (A) Membrana de PVDF. (B) Gel de poliacrilamida 13%. (K) marcador de peso molecular Kaleidoscope. (Se) septo interventricular. (AD) átrio direito. (VD) ventrículo direito. (AE) átrio esquerdo. (VE) ventrículo esquerdo. Amostras de miocárdio cão saudável (animal 4).

Fonte: (SANTOS, A. L. S., 2008).

Figura 14 - *Western blot* da expressão da proteína (conexina 43). Foi colocado 100 μ g de proteína em cada *well*. (A) Membrana de PVDF. (B) Gel de poliacrilamida 13%. (K) marcador de peso molecular Kaleidoscope. (Se) septo interventricular. (AD) átrio direito. (VD) ventrículo direito. (AE) átrio esquerdo. (VE) ventrículo esquerdo. Amostras de miocárdio cão saudável (animal 5).

A seguir apresenta-se gráfico referente à análise densitométrica da expressão relativa da Cx43 (Figura 15).

Fonte: (SANTOS, A. L. S., 2008).

Figura 15 - Comparação entre as médias das densidades relativas da expressão da conexina 43 entre as diferentes regiões analisadas pela técnica de *western blot* (Septo) septo interventricular. (AD) átrio direito. (VD) ventrículo direito. (AE) átrio esquerdo. (VE) ventrículo esquerdo. Amostras de miocárdio dos cães saudáveis.

Na análise de variâncias (ANOVA) os dados referentes à expressão da Cx43 nas diferentes regiões do miocárdio não diferiram entre si.

5.1.3 RT-PCR em tempo real - Expressão do *mRNA* da conexina 43

A determinação da expressão do *mRNA* correspondente a Gja1 (gene da conexina 43) no miocárdio de cães saudáveis foi obtida utilizando a técnica de *RT-PCR* em tempo real. A seguir ilustra-se gráfico relativo à amplificação das amostras

de miocárdio dos cães indenes não submetidos à CEC - genes 18S e Gja1 (gene da conexina 43) (Figura 16).

Fonte: (SANTOS, A. L. S., 2008).

Figura 16 - Gráfico relativo à amplificação das amostras de miocárdio dos cães indenes não submetidos à CEC. Genes 18S e Gja1 (gene da conexina 43)

Duas amostras não foram amplificadas, quais sejam a amostra referente à região do átrio direito do animal 4 e a amostra do septo do animal 5, provavelmente devido a uma degradação do RNA destas amostras. A seguir ilustra-se gráfico relativo à expressão do *mRNA* correspondente a Gja1 (gene da conexina 43) das diferentes regiões do miocárdio de cães saudáveis (Figura 17).

Fonte: (SANTOS, A. L. S., 2008).

Figura 17 - Gráfico relativo à expressão do *mRNA* correspondente a Gja1 (gene da conexina 43) das diferentes regiões do miocárdio de cães saudáveis. Em azul ilustra-se a média referente a cada região e em vermelho o desvio padrão. Utilizamos o septo para comparação entre as regiões.

Na análise de variâncias (ANOVA) os dados referentes à expressão do *mRNA* nas diferentes regiões do miocárdio não diferiram entre as regiões analisadas.

5.2 AVALIAÇÃO DOS ANIMAIS INDENES SUBMETIDOS À CEC

A intervenção cirúrgica foi realizada sem intercorrências. A seguir apresentam-se as alterações, relacionadas diretamente à instituição da CEC, em parâmetros avaliados que não constituíram diretamente o escopo da presente dissertação.

5.2.1 Avaliação das alterações ocasionadas pela CEC

Com relação à oxigenação, verificou-se queda tanto nos valores da pressão parcial de oxigênio no sangue arterial (PaO_2) quanto nos valores da pressão parcial

de oxigênio no sangue venoso (PvO_2), principalmente entre os momentos T1 e T2, em todos os animais.

Avaliando-se a ventilação, foi observado aumento tanto nos valores da pressão parcial de dióxido de carbono no sangue no sangue arterial ($PaCO_2$) quanto nos valores da pressão parcial de dióxido de carbono no sangue venoso ($PvCO_2$), principalmente entre os momentos T1 e T2, em todos os animais.

Houve diminuição dos valores do pH (concentração do íon hidrogênio) e aumento dos valores do íon bicarbonato (HCO_3^-) no sangue arterial entre os momentos T1 e T2, em todos os animais.

Com relação aos eletrólitos séricos, houve diminuição do potássio entre os momentos T1 e T2, em todos os animais. Já o sódio (Na) e o cálcio (Ca) ionizado apresentaram pequena variação entre os momentos analisados.

A frequência cardíaca (FC) aumentou entre os momentos T0 e T1 e diminuiu entre os momentos T1 e T2, em todos os animais. Já a frequência respiratória dos animais não apresentou alterações uma vez que os animais estavam em intubação oro-traqueal com ventilação controlada antes, durante e após a aplicação da CEC.

A pressão arterial média (PAM) permaneceu praticamente constante durante todo procedimento, devido ao uso da máquina de CEC e posteriormente devido à correta manutenção da volemia inicial dos animais.

Verificou-se trombocitopenia e diminuição do hematócrito e da dosagem de proteínas séricas totais entre os momentos T0 e T1.

As concentrações séricas de glicose estiveram aumentadas entre os momentos T0 e T1 e, em seguida, diminuíram entre os momentos T1 e T2.

5.2.2 Imuno-localização da conexina 43 no miocárdio de cães indenes submetidos à CEC

Foi observado que no miocárdio dos animais saudáveis submetidos à CEC, a conexina 43 está presente principalmente na membrana citoplasmática, pois esta proteína é responsável principalmente pela composição das junções intercelulares do tipo GAP. A marcação em verde corresponde à positividade para a conexina 43 enquanto que os núcleos das células apresentam-se puntiformes e marcados em

vermelho pelo iodeto de propídeo. As imagens foram obtidas em microscópio equipado com sistema de fluorescência.

A marcação da conexina 43 foi identificada em todos os momentos avaliados, porém aparentemente ocorre uma diminuição da marcação da conexina 43 principalmente entre os momentos T1 e T2.

O mesmo padrão de marcação foi observado nas amostras de miocárdio desses cães, com exceção do momento T2 no animal 1, que praticamente não apresentou marcação para a Cx43.

A seguir ilustra-se fotomicrografias referente à imunofluorescência do miocárdio de cães saudáveis submetidos à CEC (Figuras 18 a 22)

Figura 18 - Fotomicrografias referente à imunofluorescência do miocárdio de cão saudável submetido à CEC (animal 1). (A) Momento T0. (B) Momento T1. (C) Momento T2. (D) Controle negativo da reação. As marcações em verde representam positividade para conexina 43. Os núcleos estão marcados em vermelho pelo iodeto de propídeo. Imagem obtida em microscópio Nikon E-800, equipado com sistema de fluorescência. Barra de escala = 10 μ m

Figura 19 - Fotomicrografias referente à imunofluorescência do miocárdio de cão saudável submetido à CEC (animal 2). (A) Momento T0. (B) Momento T1. (C) Momento T2. (D) Controle negativo da reação. As marcações em verde representam positividade para conexina 43. Os núcleos estão marcados em vermelho pelo iodeto de propídeo. Imagem obtida em microscópio Nikon E-800, equipado com sistema de fluorescência. Barra de escala = 10 μ m

Figura 20 - Fotomicrografias referente à imunofluorescência do miocárdio de cão saudável submetido à CEC (animal 3). (A) Momento T0. (B) Momento T1. (C) Momento T2. (D) Controle negativo da reação. As marcações em verde representam positividade para conexina 43. Os núcleos estão marcados em vermelho pelo iodeto de propídeo. Imagem obtida em microscópio Nikon E-800, equipado com sistema de fluorescência. Barra de escala = 10 μ m

Figura 21 - Fotomicrografias referente à imunofluorescência do miocárdio de cão saudável submetido à CEC (animal 4). (A) Momento T0. (B) Momento T1. (C) Momento T2. (D) Controle negativo da reação. As marcações em verde representam positividade para conexina 43. Os núcleos estão marcados em vermelho pelo iodeto de propídeo. Imagem obtida em microscópio Nikon E-800, equipado com sistema de fluorescência. Barra de escala = 10 μ m

Figura 22 - Fotomicrografias referente à imunofluorescência do miocárdio de cão saudável submetido à CEC (animal 5). (A) Momento T0. (B) Momento T1. (C) Momento T2. (D) Controle negativo da reação. As marcações em verde representam positividade para conexina 43. Os núcleos estão marcados em vermelho pelo iodeto de propídeo. Imagem obtida em microscópio Nikon E-800, equipado com sistema de fluorescência. Barra de escala = 10 μ m

5.2.3 *Western blot* da conexina 43 e *RT-PCR* em tempo real - expressão do *mRNA* da conexina 43

Para avaliação da expressão da conexina 43, inicialmente procedeu-se à extração das proteínas e em seguida desenvolveu-se a curva padrão de proteínas para se estabelecer valores homogêneos de concentração das proteínas para todas as amostras que foram corridas no gel por eletroforese.

Para a determinação da expressão do *mRNA* correspondente a Gja1 (gene da conexina 43) no miocárdio de cães saudáveis submetidos à CEC foi realizado inicialmente a extração do RNA das amostras obtidas nos diferentes momentos.

Os métodos utilizados para a extração de proteínas e para a extração de RNA foram idênticos aos realizados para os animais indenes não submetidos à CEC, no entanto, ao realizarmos a quantificação das amostras, não obtivemos valores desejáveis para a realização do *western blot* e do *RT-PCR*. Uma vez que a biópsia do miocárdio foi realizada em momentos no transcorrer da intervenção cirúrgica, não pudemos colher grande quantidade de tecido para cada amostra, e sendo assim, não tivemos material suficiente para realizar nova extração de proteínas. A quantidade necessária para essa extração seria de 80 mg de tecido do miocárdio, sendo 40mg para se extrair as proteínas e 40 mg para se extrair o RNA, conforme descrito nos itens 4.3.2 e 4.3.3.

Não pudemos repetir as intervenções cirúrgicas para a execução de CEC por duas horas e circulação espontânea por uma hora em outros cães provenientes de Centros de Controle de Zoonoses localizados em municípios próximos da Grande São Paulo, de acordo com a lei estadual 11.977.

6 DISCUSSÃO

A intervenção cirúrgica utilizando a circulação extracorpórea em cães é tecnicamente exeqüível, desde que obedecidas regras básicas relacionadas ao procedimento em questão, ou seja, antes, durante e após a utilização da CEC (KWASNICKA, 2003). Ainda assim, sua implantação pode ser considerada um procedimento seguro e facilmente aplicado, conforme relatado por Orton (1994) e Freitas (2004).

Além do conhecimento da anatomia e fisiologia do sistema cardiovascular é necessário a presença de uma equipe cirúrgica (cirurgião, perfusionista, anestesista, auxiliares e intensivistas) devidamente treinada e principalmente familiarizada com o procedimento da CEC para se obter resultados satisfatórios (KLEMENT et al., 1987a; ORTON et al., 1994; FREITAS, 2004; HUNT, 2005).

A toracotomia intercostal direita utilizada nesse estudo é considerada preferencial em cães para a maioria dos procedimentos cirúrgicos (ORTON, 1994). Tal acesso promove a exposição cirúrgica das veias cava caudal e cranial, veia ázigos, aurícula direita, átrio direito e a principal porção do ventrículo direito. Tanto o nervo vago quanto o nervo frênico também são visualizados (ANDERSON, 1993; EVANS; DELAHUNTA, 2001) e constituem estruturas anatômicas que merecem cuidado durante o procedimento cirúrgico.

Em pacientes humanos, as intervenções cirúrgicas que requerem o uso da CEC são realizadas através de esternotomia mediana, sendo a drenagem processada pelo átrio direito e a perfusão pela artéria aorta (COOLEY, 1984). Em cães, entretanto, a toracotomia intercostal seguida da canulação do átrio direito e da artéria femoral esquerda (contra-lateral) para perfusão é melhor tolerada, simplifica o campo cirúrgico e minimiza as complicações associadas à canulação e perfusão pela delicada artéria aorta (KLEMENT et al., 1987a; ORTON, 1994). Observamos que a artéria aorta em cães é relativamente mais friável em relação a dos humanos, ou seja, a utilização desta aumentaria o risco de rupturas e certamente comprometeria o resultado de nossa pesquisa.

Embora existam trabalhos na literatura que referem o uso da esternotomia mediana (ORTON et al., 2001; HIRAO et al., 2003), Klement et al. (1987b) em estudo sobre intervenção cirúrgica visando à substituição da valva mitral, postula

que no período pós-operatório, os animais da espécie canina parecem ser mais tolerantes à toracotomia intercostal em relação à esternotomia mediana.

No tocante a anestesia, não houve intercorrências durante o ato operatório dos animais analisados no presente estudo. Embora tenhamos buscado tanto o emprego de estratégias protetoras ao parênquima pulmonar (AMATO et al., 1995; SCHREITER et al., 2000) quanto o de manobras de recrutamento (LAHMANN, 1992; VALENTE BARBAS, 2003) visando otimizar-se a ventilação e os parâmetros de oxigenação, verificamos a presença de injúria pulmonar como alteração decorrentes da CEC.

De acordo com Holmberg (1998), em medicina veterinária, tanto o equipamento (máquina) quanto o material utilizado na implantação da CEC é o mesmo utilizado na espécie humana, sem qualquer modificação. No entanto, existem particularidades que devem ser levadas em consideração durante a monitorização do cão e do equipamento, visando à correta execução da técnica (KWASNICKA, 2003).

Os circuitos da CEC, ou seja, o conjunto de tubos e conectores que fazem a interligação entre o oxigenador, as bombas propulsoras e o paciente, permitindo a realização dos procedimentos de perfusão (SOUZA; ELIAS, 1995; TEIXEIRA, 1997) devem ser escolhidos de acordo com a previsão do fluxo teórico, peso e superfície corpórea do paciente.

Tanto a cânula venosa (responsável pela drenagem do sangue venoso do átrio direito do cão para o reservatório venoso) quanto a cânula arterial (utilizada para reinfundir o sangue oxigenado pela artéria femoral), mostraram-se satisfatórias quando utilizadas nos cães de nosso trabalho apesar de terem sido desenvolvidas para o uso em pacientes humanos,. Não observamos a formação de êmbolos pelo sistema de tubos da máquina de CEC em nosso estudo, à semelhança do que fora relatado anteriormente por Freitas (2004).

Contudo, face às variações anatômicas de diâmetro dos vasos, em cães com peso muito próximo leva-nos a sugerir a necessidade de estudos anatômicos para padronizar melhor as cânulas a serem utilizadas em medicina veterinária.

No que diz respeito à heparinização do paciente, realizada previamente à canulação e início da circulação extracorpórea, não tivemos intercorrências. Embora Klement et al. (1987a) e Orton (1994) tenham realizado em seus estudos a administração de heparina sódica na dose de 3 mg/kg, utilizamos dose

correspondente a 1 mg/kg por observarmos que a resposta à heparina sofre grande variação individual, e além disso, o excesso na sua administração é prejudicial ao paciente, indo de encontro ao relatado por Kwasnicka (2003). O tempo de coagulação ativado deve ser avaliado periodicamente, não podendo ser inferior a 480 segundos.

A utilização de solução cristalóide, do tipo ringer com lactato, no preenchimento do circuito de CEC para hemodiluição dos animais neste experimento não apresentou inconvenientes, corroborando com os relatos de outros autores (KLEMENT et al., 1987a,b; ORTON, 1994; MONET et al., 1996; KWASNICKA, 2003; FREITAS, 2004).

No século passado, a alta taxa de mortalidade, variando entre 25 a 50%, foi considerada a razão mais comum pelo fato da circulação extracorpórea ainda não ser satisfatoriamente garantida em medicina veterinária. (KLEMENT et al., 1987b; EYSTER, 1988; EYSTER et al., 1993). Posteriormente, alguns estudos relatam sucessos nas intervenções cirúrgicas realizadas com o uso da CEC (ORTON et al., 2001; BORESTEIN et al., 2004; HIRAO et al., 2004; TAKASHIMA et al., 2007; TAKASHIMA et al., 2008). Mesmo assim, diversos estudos referem-se às alterações ocasionadas pela circulação extracorpórea no organismo do paciente, a seguir discutidas.

No que se refere à pressão parcial de oxigênio, embora no momento T0 tenha se verificado um aumento da PaO_2 , em função do início da ventilação assistida, quando a fração inspirada de O_2 é superior a 21%, (MASSONE, 1994), a diminuição dos níveis de O_2 no sangue arterial e venoso promove uma deficiente oxigenação, sendo que tal observação vai ao encontro a Klement (1987a); Bunitian (1990); Polese et al. (1997) e Freitas (2004). Tal parâmetro é vital para o organismo, uma vez que o organismo não é capaz de suportar grandes variações em seu valor. A hemólise ocasionada pelo oxigenador de membrana também influencia na diminuição dos níveis de O_2 .

A insuficiente ventilação pulmonar pode justificar a elevação dos níveis de CO_2 verificada no sangue arterial e venoso, conforme identificado em estudos anteriores (NIEMAN et al., 1999; LIU et al., 2000; FREITAS, 2004). Os altos valores de $PaCO_2$ podem estar relacionados à maior concentração de catecolaminas circulantes e em consequência disso, maior incidência de alterações cardíacas (FANTONI; CORTOPASSI, 2002). Tal alteração nos valores da $PaCO_2$ são

esperadas e verificadas em pacientes submetidos à CEC, conforme relatado por Klement et al. (1987a); Bunitian (1990); Polese et al. (1997) e Freitas (2004).

Outra alteração decorrente da má ventilação pulmonar é a queda do pH, promovendo uma acidose respiratória, de acordo com relatos de Komtebedde (1993); Sant'ana e Lucchese (1994) e Freitas (2004). Estudo em condições de hipotermia experimental, o pH alcalino mostrou-se benéfico para a manutenção dos órgãos (KLEMENT et al., 1987a). Nesse mesmo estudo, o autor não identificou presença de alterações pulmonares.

No que diz respeito aos eletrólitos séricos, o íon potássio sofreu decréscimo considerável, à semelhança do relatado por Mactinre (1997) e Holmberg (1998), enquanto que o cálcio ionizado apresentou um decréscimo menor. A redução da concentração de cálcio ionizado pode deprimir a função do miocárdio, sendo que essa depressão deve ser revertida pela administração de cálcio (KOMTEBEDDE, 1993; TCHIKAWA, 1998).

A variação na frequência cardíaca indica ser este um parâmetro fundamental, que deve ser constantemente monitorado. Komtebedde (1993) observou em seu estudo a presença de arritmias como contração ventricular prematura, taquicardia ventricular além da elevação do segmento ST.

Uma vez que os animais desse estudo foram submetidos à ventilação controlada antes, durante e após a aplicação da circulação extracorpórea, não observamos alterações significativas referentes à frequência respiratória, indo ao encontro a Klement et al. (1987a); Orton et al. (2001) e Freitas (2004). No entanto, Klement et al. (1987b) verificou em seu estudo a presença de embolia pulmonar.

A pressão arterial média (PAM) permaneceu praticamente constante durante todo procedimento, devido ao uso da máquina de CEC (por meio da qual o perfusionista pode proporcionar aumento ou diminuição da referida pressão) e posteriormente devido à correta manutenção da volemia inicial dos animais. Caso a manutenção da pressão arterial seja difícil para o organismo, faz-se necessário o suporte terapêutico através de fármacos vasoativos, objetivando restabelecer o equilíbrio hemodinâmico do paciente (ORNSTEIN et al., 1998).

A trombocitopenia justifica-se pelo traumatismo decorrente da passagem de sangue pelos túbulos do sistema de CEC. Entre outras alterações verificadas destacam-se a hemólise, anemia (KOMTEBEDDE, 1993) e a hemorragia (KLEMENT et al., 1987b; ORTON, 1994). O procedimento cirúrgico, os componentes do circuito

da CEC, tipo e duração da perfusão, o uso da sucção por cardiectomia, a técnica de *priming*, e hipotermia constituem as principais causas dos distúrbios na hemostasia. Dias após a CEC, a imunidade celular do cão ainda encontra-se suprimida, e por essa razão, o uso de antibióticos profiláticos é altamente recomendado (KLEMENT et al., 1987a).

O aumento nas concentrações séricas de glicose por nós observado está associado à CEC em diversos estudos presentes na literatura compilada. A hiperglicemia tem sido encontrada como ocorrência em crianças submetidas à CEC (BANDALI et al., 2003). Fatores hormonais e metabólicos permitem o desenvolvimento da hiperglicemia durante a CEC, mas esta depende também da quantidade de glicose infundida durante o procedimento (BRADEN et al., 1998). Os níveis de glicose sérica devem ser mensurados rotineiramente, durante e após a CEC (DOBBS et al., 1997). A hiperglicemia durante a CEC aumenta significativamente os níveis de lactato cerebral, sem no entanto alterar o metabolismo cerebral, o seu fluxo sanguíneo e o pH do fluido cerebroespinal (FEERICK et al., 1995). A função pancreática endócrina e exócrina são influenciadas pela CEC, ou seja, ocorrem alterações patofisiológicas (WANG et al., 1998). As células endoteliais do sinusóide hepático são essenciais à regulação da circulação sanguínea no sinusóide. Há uma função diminuída destas células durante e após a CEC (OKANO et al., 2002).

Embora hemodiluição proteja a integridade renal tubular e aumente a função renal, Klement et al. (1987a) observaram alteração na função renal.

Em 1977, Kajihara et al. descreveram alterações ultra-estruturais no miocárdio de cães após a instituição da circulação extracorpórea. A hemorragia subendocardial foi comumente identificada em ambos os ventrículos, porém aparece inicialmente e mais severamente no ventrículo direito em relação ao ventrículo esquerdo.

Mister se faz frisar, evidentemente, que o sucesso da técnica de circulação extracorpórea depende de uma minuciosa e cuidadosa monitorização do paciente durante e após a intervenção cirúrgica. Klement et al. (1987a) postulam que a monitoração cardíaca, respiratória, renal e da função neurológica antes, durante e depois da cirurgia permitirá que a CEC possa ser feita com uma mínima mortalidade e morbidade.

Apesar dos diversos estudos relatando as alterações ocasionadas pela CEC, as informações sobre sua aplicação em animais domésticos, principalmente nos

cães, ainda são genéricas e esparsas (KWASNICKA, 2003) Assim, torna-se fundamental e necessário a realização de novos estudos multidisciplinares para se avaliar cada particularidade da técnica de circulação extracorpórea, solucionando ou pelo menos minimizando seus efeitos deletérios ao organismo do paciente.

Dentro desse contexto, nos propusemos ao estudo da conexina 43, proteína presente em diversos tecidos, inclusive no miocárdio e responsável pela formação das junções intercelulares do tipo gap.

O objetivo inicial do presente estudo consistia em estabelecer as possíveis modificações, alterações da conexina 43 em animais da espécie canina quando submetidos à técnica de circulação extracorpórea. No entanto, verificamos a importância e a necessidade em realizar-se previamente o estudo da referida proteína (Cx43) no miocárdio de cães indenes, através de imunofluorescência, *western blot* e *RT-PCR*, objetivando uma padronização da mesma. Segundo Severs et al. (2003) as junções *gap* no coração variam em tamanho, abundância, distribuição e se compõe de acordo com sua localização nos diferentes tecidos miocárdicos.

À análise da imunofluorescência das regiões do miocárdio dos animais saudáveis, observamos a marcação da Cx43 em todas as regiões. No entanto, aparentemente ocorre maior marcação da referida conexina nas regiões correspondentes ao septo interventricular e aos ventrículos direito e esquerdo em relação às regiões correspondentes aos átrios direito e esquerdo. Vozzi et al. (1999) e Severs et al. (2003) referem que na maioria dos mamíferos, incluindo o homem, a Cx43 é expressa tanto nos ventrículos quanto nos átrios. Porém a Cx40 é abundantemente expressa na maioria dos cardiomiócitos atriais, estando co-localizada com a Cx43. Tanto no ventrículo quanto no átrio de humanos, a Cx45 está presente em pequena quantidade, apresentando níveis maiores nos átrios. Os miócitos do nó sinoatrial também expressam a Cx45, assim como os do nó atrioventricular. Já os cardiomiócitos do sistema de condução His-Purkinje expressam a Cx40.

Curiosamente, ao analisarmos o resultado do *western blot* e do *RT-PCR* realizado para cada animal indene avaliado, as regiões correspondentes ao septo interventricular, ventrículos e átrios não apresentaram diferença significativa na expressão, indo ao encontro da informação de Severs et al. (2003), de que estudos apontam que a conexina não apresenta uma variação randômica, sendo as

conexinas do coração (Cx43, Cx40 e Cx45) expressas em combinações características e quantidades relativas.

Por outro lado, a alta variância observada em nossos resultados pode ser devido ao efeito animal, uma vez que no presente estudo, foram utilizados cães sem raça definida, diferentemente de estudos que utilizam animais isogênicos. Dentro desse contexto, ao analisarmos individualmente o *western blot* de cada animal, observamos que existe uma tendência com relação à expressão relativa da conexina 43, ou seja, a presença de uma marcação mais intensa nas regiões correspondentes ao septo interventricular e ventrículos direito e esquerdo em comparação à marcação das regiões correspondentes aos átrios direito e esquerdo, corroborando com os achados da imunofluorescência.

Dentre os trabalhos na literatura perquerida, encontramos dois estudos realizados em pacientes humanos que correlacionaram à instituição da circulação extracorpórea com as conexinas, objetivando-se identificar as prováveis alterações das proteínas (YEH et al., 2002; PAVLOVIC et al., 2006).

Durante a isquemia cardíaca, segundo Huang et al. (1999) ocorre modificação na distribuição e na concentração da conexina 43, sendo a perda da proteína heterogênea e a desfosforilação ocorrendo após uma hora de isquemia. Na insuficiência cardíaca congestiva humana ocorrem alterações quantitativas na expressão da conexina bem como uma redução dos níveis ventriculares da Cx43 (SEVERS et al., 2003). Em estudo realizado em 2007, por Lin et al. (2007), verificou-se alteração na restauração e distribuição da Cx43 após a isquemia do miocárdio em animais da espécie canina.

Modificações na fosforilação e na localização da conexina 43 podem contribuir para disfunção nas junções do tipo gap, diminuição na velocidade de condução e também para arritmias (SEVERS et al., 2003; AKAR et al., 2004). No mesmo ano, Poelzing e Rosebaum demonstraram que uma redução na expressão da conexina 43 produz desunião entre as camadas musculares transmuralis promovendo uma condução mais lenta e uma dispersão de repolarização entre a camada epicárdica e as camadas miocárdicas mais profundas. Entretanto, a forma da expressão da conexina 43 pode contribuir potencialmente para a ocorrência de arritmias em animais cardiopatas.

A permeabilidade dos canais das junções gap é regulada por alterações específicas na composição iônica citosólica, fosforilação e na voltagem

transjuncional. Peracchia (2003) em seu estudo sugere que o aumento na concentração de cálcio rapidamente promove o fechamento do canal, porém a concentração que ativa o canal ainda é incerta. Com relação ao pH, nas últimas duas décadas vários estudos aceitam que a acidificação citosólica das células promove uma diminuição nas junções gap. Concordamos com o autor supracitado, uma vez que em nossa pesquisa, os animais submetidos à CEC apresentaram uma diminuição nos valores do pH e as regiões do miocárdio estudadas apresentaram uma menor expressão da conexina 43, ao analisarmos as fotomicrografias referentes à imunofluorescência.

Em 2004, Freitas verificou durante a avaliação ultra-estrutural do músculo cardíaco de cães submetidos à CEC por duas horas e reperfusão por uma hora, a presença de figuras de mielina indicativas de degeneração de organelas. Este grau de injúria, ao ponto comprometer as organelas, pode influenciar diretamente a síntese das conexinas, ao analisarmos o ciclo de vida de uma conexina (LAIRD, 2004).

Como mencionamos anteriormente, as arritmias podem ser observadas entre os animais submetidos à CEC (KOMTEBEDDE, 1993), sendo que tais distúrbios podem ser decorrentes da diminuição da expressão da conexina 43. Tal teoria pode ser comprovada em estudos realizados em humanos portadores de insuficiência cardíaca, nos quais foi reportado uma redução na expressão da Cx43 de 50% em relação ao valor normal (DUPONT et al., 2001; KITAMURA et al., 2002; KOSTIN et al., 2003; KOSTIN et al., 2004; FALCAO et al., 2007). Posteriormente, no ano de 2007, Falcao et al. conduziram estudo em cães demonstrando que a redução na Cx43 pode contribuir para a ocorrência de distúrbios de condução. Uma das limitações do presente estudo é o fato de não termos conseguido obter resultados referente às técnicas de *western blot* e *RT-PCR*, o que poderia confirmar a teoria sugerida.

Dois estudos semelhantes ao nosso, porém realizados em pacientes humanos, corroboram com os resultados encontrados nos cães submetidos à CEC. Em 2002, Yeh et al. verificaram uma diminuição das conexinas acompanhadas por uma redução nas junções do tipo *gap* em cardiomiócitos do ventrículo direito de 21 pacientes operados com a utilização da circulação extracorpórea. Foram analisadas as três conexinas (Cx40, Cx43 e Cx45) por imunofluorescência e *western blot*. Estudo semelhante a este, realizado em 2006, por Pavlovic et al., avaliou 16

crianças submetidas a cirurgia cardíaca corretiva, verificando uma diminuição da expressão da Cx43 atrial durante a CEC e por outro lado, não observando nenhuma modificação na expressão da Cx40 atrial durante o mesmo período de CEC.

Através deste estudo verificamos a importância da conexina 43 no miocárdio dos cães e pudemos perceber que a referida proteína encontra-se intimamente relacionado aos processos fisiológicos e fisiopatológicos no coração saudável ou doente. Novas pesquisas deverão ser conduzidas no intuito de se estudar melhor as alterações, tanto da conexina 43, quanto das conexinas 40 e 45 presentes no miocárdio de cães, quando da instituição da circulação extracorpórea. Para tal fim, aguardamos a normatização de uso de cães de biotério a fim de prosseguirmos nessa linha de investigação.

7 CONCLUSÃO

O presente estudo possibilitou-nos concluir que:

- em cães indenes não operados, a expressão da conexina 43 apresenta localização em todas as regiões estudadas, septo interventricular, ventrículos direito e esquerdo, átrios direito e esquerdo, não apresentando diferença significativa com relação à expressão entre as mesmas.
- em cães submetidos à circulação extracorpórea, de acordo com a análise realizada por imunofluorescência, a conexina 43 no miocárdio apresenta-se diminuída, principalmente após duas horas do procedimento.
- a circulação extracorpórea por duas horas com uma hora de restauração da circulação espontânea é técnica exeqüível, porém determina sérias alterações clínicas e induz a processos patológicos nos organismos de cães.

REFERÊNCIAS

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Molecular biology of the cell**. New York, NY: Garland; United States of America, 1994.

ALLESSIE, M. A.; SCHALIJ, M. J.; KIRCHHOF, C. J.; BOERSMA, L.; HUYBERS, M.; HOLLEN, J. Experimental electrophysiology and arrhythmogenicity. Anisotropy and ventricular tachycardia. **European Heart Journal**, v. 10, p. E2-E9, 1989. Supplement, E.

AMARAL, R. V. G.; MARCIAL, M. B.; BITTENCOURT, D.; ZERBINI, E. J. Alterações do equilíbrio ácido-básico durante a correção cirúrgica de cardiopatias cianóticas, com circulação extracorpórea. Estudo de 50 casos. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 20, supl. 1, p.110-111, 1967.

AMATO, M. B. P.; BARBAS, C. S. V.; MEDEIROS, D. M. Beneficial effects of the “Open lung approach” with low distending pressures in acute respiratory distress syndrome. **American Journal Respiratory Critical Care Medicine**, v. 152, p. 1835-1846, 1995.

ANDERSON, L. K. Surgical anatomy. In: SLATTER, D. **Textbook of small animal surgery**. 2. ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 1993. v. 1, p. 821-826.

ANDRADE, J. N. B. M.; STOPIGLIA, A. J.; FANTONI, D. T.; ABDUCH, M. C. D.; KAHVEGIAN, M. Estudo hemodinâmico e hemogasométrico da técnica de “Outflow Occlusion” em cães. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, p. 31-33, 2006. Suplemento 1.

AKAR, F. G.; SPRAGG, D. D.; TUNIN, R. S.; KASS, D. A.; TOMASELLI, G. F. Mechanisms underlying conduction slowing and arrhythmogenesis in nonischemic dilated cardiomyopathy. **Circulation Research**, v. 95, n. 7, p. 717-725, 2004.

AVANZO, J. L. **Carcinogênese pulmonar em camundongos portadores de deleção em um dos alelos do gene da Cx43**. 2005. 303 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, São Paulo, 2005.

BENNETT, M. V. L.; BARRIO, L. C. BARGIELLO, T. A.; SPRAY, D. C.; HERTZBERG, E. SAEZ, J. C. Gap junctions: new tools, new answers, new questions. **Neuron**, v. 6, n. 3, p. 305-320, 1991.

BEYER, E. C. Gap junctions. **International Review of Cytology**, v. 137, p. 1-37, 1993.

BEYER, E. C.; PAUL, D. L.; GOODENOUGH, D. A. Connexin 43: a protein from rat heart homologous to a gap junction protein from liver. **The Journal of Cell Biology**, v. 105, p. 2621-2629, 1987.

BINOKI, D. H.; JATENE, F. B.; FANTONI, D. T.; STOPIGLIA, A. J.; SANTOS, A. L. S.; FREITAS, R. R.; SIMÕES, E. A.; IRINO, E. T.; MONTEIRO, R.; LOFIEGO, R. Avaliação hemogasométrica em cães submetidos à pneumonectomia esquerda. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, p. 345-351, 2007.

BORDLEY, J.; HARVEY, A. M. **Two centuries of american medicine**. 1776-1976. Philadelphia: W.B. Saunders Co, 1976.

BORENSTEIN, N.; DANIEL, P.; BEHR, L.; POUCHOLON, J. L.; CARBOGNANI, D.; PIERREL, A.; MACABET, V.; LACHEZE, A.; JAMIN, G.; CARLOS, C.; CHETBOUL, V.; LABORDE, F. Succesful surgical treatment of mitral valve stenosis in a dog. **Veterinary Surgery**, v. 33, n. 2, p. 138-145, 2004.

BROURMAN, J. D.; SCHERTEL, E. R.; HOLT, D. W.; OLSHOVE, V. A. Cardiopulmonary bypass in the cat. **Veterinary Surgery**, v. 31, n. 5, p. 412-417, 2003.

BUNITIAN, A. A.; TREKOVA, N. A.; ENGONIAN, G. V.; FLEROV, E. V.; ASMANGULIAN, E. T. Disorders of the oxygenating function of the lungs during open-heart surgery. **Vestnik Akademii Meditsinskikh Nauk SSSR**, v. 12, p. 8-12, 1990.

CATINELLA, F. P.; CUNNINGHAM, J. N.; STRAUSS, E. D.; ADAMS, P. X.; LASCHINGER, J. C.; SPENCER, F. C. Variations in total and ionized calcium during cardiac surgery. **The Journal of Cardiovascular Surgery**, v. 24, n. 6, p. 593-602, 1983.

CAYWOOD, DD. Cardiovascular surgery. In: **Complications in small animal surgery - diagnosis, management, prevention**. p.265-266, 1996.

COOLEY, D. A. **Techniques in cardiac surgery**. 2ª ed. Houston, Tex: Medical Press Inc, 1984.

COPPEN, S. R.; KODAMA, I.; BOYETT, H.; DOBRZYNSKI, H.; TAKAGISHI, H.; HONJO, H.; YEH, H. I.; SEVERS, N. J. Connexin 45, a major connexin of the rabbit sinoatrial node, is co-expressed with connexin 43 in a restricted zone at the nodal-crista terminals border, **Journal Histochemistry. Cytochemistry**, v. 47, p. 907-918, 1999.

DAGLI, M. L. Z. **Regeneração hepática e hepatocarcinogênese em camundongos transgênicos que expressam um mutante da conexina 32 somente no fígado**. 2000. 47 f. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

DERMIETZEL, R.; WANG, T. K.; SPRAY, D. S. The gap junction family: structure, function and chemistry. **Anatomy and Embryology**, v. 182, p. 517-528, 1990.

EVANS, H. E.; DELAHUNTA, A. Pescoço, tórax e membro torácico. In: EVANS, H. E.; DELAHUNTA, A. **Guia para a dissecação do cão**. 5. ed. 2001. p. 79-116.

EVANS, W. H.; MARTIN, P. E. Gap junctions: structure and function. **Molecular Membrane Biology**, v. 19, p. 121-136, 2002.

EVERT, M.; OTT, T.; TEMME, A.; WILLECKE, K.; DOMBROWSKI, F. Morphology and morphometric investigation of hepatocellular preneoplastic lesions and neoplasms in connexin32-deficient mice. **Carcinogenesis**, v. 23, n. 5, p. 697-703, 2002.

EYSTER, G. E. Surgery for aortic stenosis in the dog: long-term evaluation. In: AMERICAN COLLEGE OF VETERINARY INTERNAL MEDICINE, 6., 1988,. **Proceedings...** 1988. p. 594-596.

EYSTER, G. E.; GABER, C. E.; PROBST, M. Cardiac disorders. In: SLATTER, D. **Textbook of small animal surgery**. 2. ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 1993. v. 1, p. 856-889.

FALCAO, S.; ROUSSEAU, G.; BAROUDI, G.; VERMEULEN, M.; BOUCHARD, C.; JONES, D. L.; CARDINAL, R. Combined effects of reduced connexin 43, depressed active generator properties and energetic stress on conduction disturbances in canine failing myocardium. **Pflügers Archiv: European Journal of Physiology**, v. 454, p. 999-1009, 2007.

FANTONI, D. T.; CORTOPASSI, S. R. G. **Anestesia em cães e gatos**. São Paulo: Roca, 2002. p. 350.

FREITAS, R. R.; STOPIGLIA, A. J.; FANTONI, D. T.; LARSSON, M. H. M. A.; JATENE, F. B.; BARBUSCI, L. O. D.; ANELI, E.; IRINO, E. T. Implantação de marcapasso no cão. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP**, São Paulo, v. 5, n. 2, p. 164-170, 2002.

FREITAS, R. R.; STOPIGLIA, A. J.; IRINO, E. T.; LARSSON, M. H. M. A. Tetralogia de Fallot em cão. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 6, p. 1179-1184, 2003.

FREITAS, R. R. **Avaliação de alterações ocasionadas pela circulação extracorpórea em cães: estudo clínico, laboratorial e anátomo-histopatológico do coração e pulmões**. 2004. 152 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

FREITAS, R. R.; NOGUEIRA, G. A. K. A.; IRINO, E. T.; SOUZA, S. L.; STOPIGLIA, A. J.; FANTONI, D. T.; BARBUSCI, L. O. D.; LARSSON, M. H. M. A.; JATENE, F. B. Diagnosis and surgical correction of atrial septal defect by the inflow occlusion technique. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 42, n. 3, p. 193-196, 2005.

GARCIA, D. C.; STOPIGLIA, A. J.; MINGRONE, L. E.; FANTONI, D. T.; PAULO, R. T. C. Avaliação hemogasométrica de cães submetidos à parada circulatória total através do "Inflow Occlusion" - resultados preliminares. **Revista Universidade Rural**, v. 25, p. 272-273, 2005. Suplemento.

GARCIA, D. C. **Parada circulatória total em cães por diferentes períodos de tempo através da técnica de "Inflow Occlusion". Avaliação clínica e hemogasométrica**. 2006. 93 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

GIBSON, U. E. M.; HELD, C. A.; WILLIAMS, P. M. A novel method for real time quantitative RT-PCR. **Genomes Methods**, v. 6, p. 995-1001, 1996.

GNECCHI, M.; HE, H.; LIANG, O.D. ; MELO, L. G.; MORELLO, F.; MU, H.; NOISEUX, N.; ZHANG, L.; PRATT, R. E.; INGWALL, J. S.; DZAU, V, J. Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart byAkt-modified mesenchymal stem cells. **Nature Medicine**, v. 11, p. 367-368, 2005.

GOLDBERG, G. S.; VALIUNAS, V.; BRINK, P. R. Selective permeability of gap junction channels. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1662, p. 96-101, 2004.

GOMES, O. M. **Circulação extracorporea**, 2 ed. Belo Horizonte: Epsis, 1985.

GOODENOUGH, D. A.; STOECKENIUS, W. The isolation of mouse hepatocyte gap junctions. Preliminary chemical characterization and x-ray diffraction. **Journal Cell Biology**, v. 54, n. 3, p. 646-656, 1972.

GOODENOUGH, D. A.; GOLIGER, J. A.; PAUL, D. L. Connexins, connexons and intercellular communication. **Annual Reviews on Biochemistry**, v. 65, p. 475-502, 1996.

GUERRA, J. L. **Hepatocarcinogênese em camundongos portadores de deleção em um dos alelos da conexina 43 (Cx43^{+/-}): estudos histomorfométricos**. 2003. 86 f. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

GUTSTEIN, D. E.; MORLEY, G. E.; TAMADDON, H.; VAIDYA, D.; SCHNEIDER, M. D.; CHEN, J.; CHIEN, K. R.; STUHLMANN, H.; FISHMAN, G. I. Conduction slowing and sudden arrhythmic death in mice with cardiac-restricted inactivation of connexin-43. **Circulation Research**, v. 80, p. 88-94, 1997.

HELD, C. A.; STEVENS, J.; LIVAK, K. J.; WILLIAMS, P. M. Real-time quantitative PCR. **Genomic Research**, v. 6, p. 986-994, 1996.

HIRAO, H.; HOSHI, K.; KOBAYASHI, M.; SHIMIZU, M.; SHIMAMURA, S.; TANAKA, R.; MACHIDA, N.; MARUO, K.; YAMANE, Y. Surgical Correction of Subvalvular

Aortic Stenosis Using Cardiopulmonary Bypass in a Dog. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 66, v. 5, p. 559-562, 2004.

HOLMBERG, D. L. Auxílio circulatório extracorpóreo. In: SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. 2 ed. São Paulo: Editora Manole, p. 1105-1110, 1998.

HUANG, X. D.; SANDUSKY, G. E.; ZIPES, D. P. Heterogeneous loss of connexin 43 protein in ischemic dog hearts. **Journal of Cardiovascular Electrophysiology**. v. 10, n. 1, p. 79-91, 1999.

HUNT, G. B. The heart including pericardium and great vessels. In: BROCKMAN, D. J.; HOLT, D. E. **British small animal veterinary association manual of canine and feline Head, Neck and Thoracic Surgery**, 2005. Cap. 16, p. 181-193.

IRINO, E. T.; STOPIGLIA, A. J.; LARSSON, M. H. M. A.; GUERRA, J. L.; SIMÕES, E. A.; SHINKAI, M. T.; FANTONI, D. T.; OTSUKI, D. A.; FREITAS, R. R.; SALDIVA, P. H. N.; JATENE, F. B. Avaliação histopatológica do pulmão direito e avaliação eletrocardiográfica de cães submetidos à pneumonectomia esquerda. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 41, n. 1, p. 58-66, 2004

KAWAI, T.; WADA, Y.; KAWACHI, H.; OHGA, K.; OKA, T. YASUDA, M.; YOSHIKAWA, T. Metabolism of Ca²⁺ in myocytes and peroxidation products in ischemia-reperfusion injury under extracorporeal circulation. **Nippon Kyobu Geba Gakkai Zasshi**, v. 40, n. 11, p. 2040-2047, 1992.

KLEMENT, P.; DEL NIDO, P. J.; MICKLEBOROUGH, L.; MACKAY, C. KLEMENTT, G.; WILSON, G. J. Technique and postoperative management for successful cardiopulmonary bypass and open-heart surgery in dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 190, n. 7, p. 869-874, 1987a.

KLEMENT, P.; FEINDEL, C. M.; SCULLY, H. E.; MESHER, E.; KLEMENTT, G.; DEL NIDO, P. J.; WILSON, G. J. Mitral Valve Replacement in Dogs Surgical Technique and Postoperative Management. **Veterinary Surgery**, v. 16, n. 3, p. 231-237, 1987b.

KOLOSISOV, E.; BOSTANI, T.; ROELL, W.; BREITBACH, M.; PILLEKAMP, F.; NYGREN, J. M.; SASSE, P.; RUBENCHIK, O.; FRIES, J. W. U.; WENZEL, D.; GEISEN, C.; YING XIA, LU, Z.; DUAN, Y.; KETTENHOFEN, R.; JOVINGE, S.; BLOCH, W.; BOHLEN, H.; WELZ, A.; HESCHELER, J.; JACOBSEN, S. E.; FLEISCHMANN, B. K. Engraftment of engineered ES cell-derived cardiomyocytes but not BM cells restores contractile function to the infarcted myocardium. **Journal of Experimental Medicine**, v. 203, p. 2315-2327, 2006.

KOMTEBEDDE, J.; ILKIW, J. E.; FOLLETTE, D. M.; BREZNOCK, E. M.; TOBIAS, A. H. Resection of Subvalvular Aortic Stenosis Surgical and Perioperative Management in Seven Dogs. **Veterinary Surgery**, v. 22, n. 6, p. 419-430, 1993.

KOVAL, M. Pathways and control of connexin oligomerization. **Trends Cell Biology**, v. 16, n. 3, p. 159-166, 2006.

KURUSZ, M. Early techniques of extracorporeal circulation. **Perfusion**, v. 18, n. 3, p. 191-200, 2003.

KWASNICKA, K. L.; STOPIGLIA, A. J.; FREITAS, R. R.; FANTONI, D. T. 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**, São Paulo, v. 37, n. 3, p. 234-242, 2000.

KWASNICKA, K. L. **Procedimentos básicos aplicados nos períodos pré, trans e pós-circulação extracorpórea em cães**. 2003. 163 f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

LACHMANN, B. Open up the lung and keep the lung open. **Intensive Care Medicine**, v. 18, p. 319-321, 1992.

LAIRD, D. W. Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to gap junction internalization and degradation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1711, p. 172-182, 2005.

LE GALLOIS, J. J. C. **Experiments on the principle of life**. Philadelphia: M. Thomas, 1813.

LI, X.; WANG, X. Application of real-time polymerase chain reaction for the quantification of interleukin-1 β mRNA upregulation in brain ischemic tolerance. **Brain Research Protocols**, v. 5, p. 211-217, 2000.

LIN, J.; LI, Y.; LIN, S.; LIANG, Q.; TAN, X. The effect of delayed preconditioning on connexin 43 in ischemic myocardium. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 85, p. 175-181, 2007.

LIVAK, K. J.; FLOOD, S. J.; MARMARO, J.; GIUSTI, W.; DEETZ, K. Oligonucleotide probe with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. **PCR Methods Applications**, v. 2, p. 357-362, 1995.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

MACINTIRE, D. K. Disorders of potassium, phosphorus and magnesium in critical illness. **Compendium of Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 19, n. 1, p. 41-46, 1997.

MAGILLIGAN, D. J. J.; VIJ, D.; PEPER, W.; ALLOR, D.; FRINAK, S.; TILLEY, B. Failure of standard cardioplegic techniques to protect the conducting system. **The Annals of Thoracic Surgery**, v. 39, n. 5, p. 403-408, 1985.

MAKKAR, R. R.; LILL, M.; CHEN, P. S. Stem cell therapy for myocardial repair: is it arrhythmogenic? **Journal American College Cardiology**, v. 42, p. 2070-2072, 2002.

MAKOWSKI, L.; CASPAR, D. L. D.; PHILIPS, W. C.; GOODENOUGH, D. A. Gap junction structures. II, analysis of the x-ray diffraction data. **The Journal of Cell Biology**, v. 74, p. 629-645, 1977.

MARQUES, E.; OSHIRO, M. S.; CESTARI, I. A.; HAYASHIDA, S. A.; LEIRNER, A. A. Extracorporeal circulation with autogenous oxygenation: hemodynamic and gasometric parameters. **Artificial Organs**, v. 19, n. 5, p. 470-474, 1995.

MASSONE, F. **Anestesia veterinária: farmacologia e técnica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.

MESNIL, M.; YAMASHI, H. Role of junctional intercellular communication in hepatic carcinogenesis in rats. **Bulletin Cancer**, v. 77, n. 5, p. 485-488, 1990.

MINGRONE, L. E. **Avaliação hemodinâmica de cães submetidos à parada circulatória total através da técnica do "Inflow Occlusion" por diferentes períodos de tempo**. 2006. 122 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

MONET, E.; ORTON, C. E.; GAYNOR, J. S.; BOON, J. WAGNER, A.; LINN, K.; EDDLEMAN, L. A.; BREVARD, S. Open resection for subvalvular aortic stenosis in dogs. **Journal of American Veterinary Association**, v. 209, n. 7, p. 1255-1261, 1996.

MOORE, D.; BERNHARD, W. F. The prevention and treatment of acute metabolic complications associated with prolonged extracorporeal circulation. **Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 45, p. 565-573, 1963.

NICHOLSON, B. J.; HUNKAPILLER, M. W.; GRIM, L. B.; HOOD, L. E.; REVEL, J. P. Rat liver gap junction protein: properties and partial sequence. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of Ame.**, v. 78, n. 12, p. 7594-7598, 1981.

NIEMAN, G.; SEARLES, B.; CARNEY, D.; MCCANN, U.; SCHILLER, H.; LUTZ, C.; LINCK, C.; GATTO, L. A.; HODELL, M.; PICONE, A. Systemic inflammation induced by cardiopulmonary bypass: a review of pathogenesis and treatment. **Journal of Extra-Corporeal Technology**, v. 31, n. 4, p. 202-210, 1999.

OKANO, N.; MIYOSHI, S.; OWADA, R.; FUJITA, N.; KADOI, Y.; SAITO, S.; GOTO, F.; MORITA, T. Impairment of hepatosplanchnic oxygenation and increase of serum hyaluronate during normothermic and mild hypothermic cardiopulmonary bypass. **Anesthesia and Analgesia**, v. 95, n. 2, p. 278-286, 2002.

OLORIS, S. C. S. **Avaliação do papel da conexina 43 no desenvolvimento do granuloma, experimentalmente induzido em camundongos**. 2005. 118 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

ORNSTEIN, E.; EIDELMAN, L. A.; DRENGER, B.; ELAMI, A.; PIZOV, R. Systolic pressure variation predicts the response to acute blood loss. **Journal of Clinical Anesthesia**, v. 10, n. 2, p. 137-140, 1998.

ORTON, E. C. Cardiopulmonary bypass for small animals. **Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal)**, v 9, n. 4, p. 210-216, 1994.

ORTON, E. C.; MAMA, K. R.; HELLYER, P.; HACKETT, T. B. Open surgical repair of tetralogy of fallot in dogs. **Journal of America Veterinary Medical Association**, v. 219, n. 8, p. 1089-1093, 2001.

OU, C. W.; ORSINO, A.; LYE, S. J. Expression of connexin43 and connexin26 in the rat myometrium during pregnancy and labor is differentially regulated by mechanical and hormonal signals. **Endocrinology**, v. 138, p. 5398-5407, 1997.

PAVLOVIC, M.; SCHALLER, A.; AMMANN, R. A.; SANZ, J.; PFAMMATTER, J-P.; CARREL, T.; BERDAT, P.; GALLATI, S. Reduced atrial connexin 43 expression after pediatric heart surgery. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 342, p. 310-315, 2006.

PERACCHIA, C. Chemical gating of gap junction channels. Roles of calcium, pH and calmodulin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1662, p. 61-80, 2004.

PINTO, M. P. S. F.; KOZLOWSKY, G.; STOPIGLIA, A. J.; FREITAS, R. R.; FANTONI, D. T.; SIMÕES, E. A.; BINOKI, D. H. Estudo comparativo entre toracotomia intercostal, esternotomia mediana parcial e total em cães saudáveis. Avaliação clínica e hemogasométrica. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 15, n. 4, p. 207-214, 2000.

POELZING, S.; ROSENBAUM, D. S. Altered connexin 43 expression produces arrhythmia substrate in heart failure. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 287, n. 4, p. 1762-1770, 2004.

POLESE, G.; LUBLI, P.; POGGI, R.; LUZZANI, A.; MILIC, E. J.; ROSSI, A. Effects of inspiratory flow waveforms on arterial blood gases and respiratory mechanics after open heart surgery. **European Respiratory Journal**, v. 10, n. 12, p. 2820-2824, 1997.

REAUME, A. G.; DE SOUSA, P. A.; KULKARNI, S.; LANGILLE, B. L.; ZHU, D.; DAVIES, T. C.; JUENJA, S. C.; KIDDER, G. M.; ROSSANT, J. Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin 43. **Science**, v. 267, p. 1831-1834, 1995.

RODRIGUES, A. S. **Expressão e distribuição da conexina 32 em fígados com fibrose experimentalmente induzida**. 2004. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

SANT'ANA, J. R. M.; LUCCHESI, F. A. Circulação extracorpórea para cirurgia cardíaca. In: NESRALLA, I. **Cardiologia cirúrgica**: perspectivas para o ano 2000. 1. ed. São Paulo: Fundação editorial BYK, p. 244-263, 1994.

SCHREITER, D.; SCHEIBNER, L.; KATSCHER, S.; JOSTEN, C. Prevention of acute respiratory failure by optimal ventilator settings: the open lung concept. In: GULLO, A. **Anesthesia pain intensive care and emergency medicine**. Milano: Springer, 2000. p.213-220.

SEGRETAIN, D.; FALK, M. M. Regulation of connexin biosynthesis, assembly, gap junction formation, and removal. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1662, p. 3-21, 2004.

SEVERS, N. J.; DUPONT, E.; COPPEN, S. R.; HALLIDAY, D.; INETT, E.; BAYLIS, D.; ROTHERY, S. Remodelling of gap junctions and connexin expression in heart disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1662, p. 138-148, 2004.

SIMÕES, E. A.; JATENE, F. B.; STOPIGLIA, A. J.; MONTEIRO, R.; FANTONI, D. T.; GUERRA, J. L.; AIELLO, V. D.; MONTEIRO, R.; IRINO, E. T.; OTSUKI, D. A.; BINOKI, D. H.; FREITAS, R. R.; UNRUH, S. M. Estudo comparativo entre sutura mecânica e manual em brônquio após pneumonectomia esquerda em cães (*Canis familiaris*). Uma avaliação anatomopatológica. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 42, n. 5, p. 357-366, 2005.

SIMÕES, E. A.; JATENE, F. B.; BERNARDO, W. M.; STOPIGLIA, A. J.; MONTEIRO, R.; FANTONI, D. T.; ABDUCH, M. C. D.; YAZBEK, K. V. B.; IRINO, E. T.; UNRUH, S. M.; KAHVEGIAN, M.; SANTOS, A. L. S. Viabilidade da pneumonectomia direita em cães : uma avaliação paramétrica, hemogasométrica e radiográfica. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, p. 447-454, 2007.

SOUTHWORTH, J. L.; PIERCE, E. C. Cross circulation for intracardiac surgery. **British. Journal of Surgery**, v. 64, p. 58-63, 1952.

STOPIGLIA, A. J.; FREITAS, R. R.; IRINO, E. T.; POGLIANI, F. C.; SIMÕES, E. A.; FANTONI, D. T.; KWASNICKA, K. L.; JATENE, F. B. Avaliação clínica da parada circulatória total em cães (Canis familiaris). **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 16, n. 4, p. 211-217, 2001.

STOPIGLIA, A. J.; FREITAS, R. R.; IRINO, E. T.; LARSSON, M. H. M. A.; JATENE, F. B. Persistência do ducto arterioso em cães: revisão. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP**, São Paulo, v. 7, n. 1/3, p. 23-33, 2004.

TAKASHIMA, K.; SODA, A.; TANAKA, R.; YAMANE, Y. Short-term performance of mitral valve replacement with porcine bioprosthetic valves in dogs. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 69, n. 8, p. 793-798, 2007.

TAKASHIMA, K.; SODA, A.; TANAKA, R.; YAMANE, Y. Long-term performance of mitral valve replacement with porcine bioprosthetic valves in dogs. **The Journal of veterinary medical science**, v. 70, n. 3, p. 279-283, 2008.

TAMADDON, H. S.; VAIDYA, D.; SIMON, A. M.; PAUL, D. L.; JALIFE, J.; MORLEY, G. E. High-resolution optical mapping of the right bundle branch in connexin 40 knockout mice reveals slow conduction in the specialized conduction system. **Circulation Research**, v. 87, p. 929-936, 2000.

TCHIKAWA, S. Magnesium and calcium changes in serum and atrial muscle caused by open heart surgery and the effect of preoperative oral magnesium administration. **Japan Journal of Cardiovascular Surgery**, v. 46, n. 3, p. 287-298, 1998.

UNWIN, P. N.; ZAMPIGHI, G. Structure of the junction between communicating cells. **Nature**, v. 283, n. 5747, p. 545-549, 1980.

VALENTE BARBAS, C. S. Lung recruitment maneuvers in acute respiratory distress syndrome and facilitating resolution. **Critical Care Medicine**, v. 31, p. 265-271, 2003. Suplemento, 4.

VOZZI, C.; DUPONT, S. R.; COPPEN, H. I.; YEH, N. J. Chamber-related differences in connexin expression in the human heart. **Journal of Molecular and Cellular cardiology**, v. 31, p. 991-1003, 1999.

WANG, D.; FENG, W.; WANG, C.; SHEN, W.; LU, S.; XIANG, L.; LI, C. The changes of pancreatic function after cardiopulmonary bypass. **Zhonghua Wai Ke Za Zhi**, v. 36, n. 12, p. 735-737, 1998.

YAMASAKI, H.; NAUS, C. Role of connexin genes in growth control. **Carcinogenesis**, v. 17, n. 6, p. 1199-1213, 1996.

YEH, H. I.; HOU, S. H.; HU, H-R.; LEE, Y-N.; LI, J-Y.; DUPONT, E.; COPPEN, S. R.; KO, Y-S.; SEVERS, N. J.; TSAI, C-H. Alteration of gap junctions and connexins in the right atrial appendage during cardiopulmonary bypass. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 124, n. 6, p. 1106-1112, 2002.

YOSHIDA, K.; YOSHIKAWA, J.; KATO, H.; YANAGIHARA, K.; OKUMACHI, F.; SHIRATORI, K.; INANAMI, H.; ASAKA, T.; OKADA, Y.; SHOMURA, T. Mechanism of post-operative abnormal septal motion: clinical and experimental studies. **Journal of Cardiography**, v. 3, p. 63-74, 1984.