**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

José Alves Lintz

**Pré e pós-condicionamento isquêmico em músculo
esquelético de ratos**

RIBEIRÃO PRETO

2011

José Alves Lintz

Pré e pós-condicionamento isquêmico em músculo esquelético de ratos

Dissertação de Mestrado
apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, para
obtenção do **Título de Mestre**.
Área de concentração: Clínica
Cirúrgica.

Orientador: **Prof. Dr. Carlos Eli Piccinato**

Ribeirão Preto

2011

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico para fins de estudo, pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Lintz, José Alves

Pré e pós-condicionamento isquêmico em músculo esquelético de ratos. Ribeirão Preto, 2011.

85 p.: il.; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Orientador: Piccinato, Carlos Eli.

1. Ratos. 2. Músculo esquelético. 3. Isquemia-reperfusão. 4. Pré-condicionamento. 5. Pós-condicionamento.

FOLHA DE APROVAÇÃO

José Alves Lintz

Pré e pós-condicionamento isquêmico em músculo esquelético de ratos.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do **Título de Mestre**. Área de concentração: Clínica Cirúrgica.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

À minha esposa Glória e minhas filhas Ana Maria e Carolina pelo incentivo incondicional em todos os momentos, em especial nos de incerteza, muito comuns para quem busca novos caminhos.

Sem vocês nenhuma conquista valeria a pena.

Aos meus pais José e Carmelita (in memoriam) pelo amor, orientação e fé que me ajudaram a vencer os obstáculos da vida.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao Prof. Dr. Carlos Elí Piccínato, o meu reconhecimento por partilhar o seu profundo saber na realização deste trabalho, bem como meu respeito e admiração pela sua serenidade e confiança em mim depositada.

AGRADECIMENTOS

A realização de um projeto de pesquisa como este só foi possível com o apoio de vários colaboradores. Aos membros do Laboratório de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia e Anatomia da FMRP-USP, por sua contribuição, o meu reconhecimento e gratidão.

À Tânia, Elis, Márcia e Juliana, pela solicitude, prontidão e suporte administrativo.

Ao pessoal do CEMEQ pela dedicação e desempenho na análise estatística .

.

“Uma pessoa inteligente resolve um problema, uma sábia o previne”

Albert Einstein

“Viver honestamente, não ferir ninguém, atribuir a cada um o que lhe cabe”

Ruy Ferreira-Santos

RESUMO

LINTZ, J. A. **Pré e pós-condicionamento isquêmico em músculo esquelético de ratos.** 2011, 85 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

Introdução: O pré-condicionamento isquêmico tem a capacidade de minimizar as lesões decorrentes do processo de isquemia e reperfusão. O pós-condicionamento isquêmico, descrito posteriormente, apresenta resultados semelhantes na proteção contra as lesões por isquemia e reperfusão em miocárdio, cérebro, rins, músculo esquelético e medula espinhal. **Objetivo:** Avaliar o efeito do pré e do pós-condicionamentos isquêmicos bem como sua associação sobre a lesão tecidual em músculo esquelético de ratos submetidos ao processo de isquemia e reperfusão. **Método:** Foram utilizados 50 ratos Wistar, distribuídos em cinco grupos de 10 animais: grupo Controle, em que se realizou isquemia parcial por clampeamento aórtico infra-renal (240 min) e reperfusão (60 min); Grupo *Sham*, fez-se o mesmo procedimento cirúrgico, porém sem o clampeamento da aorta abdominal; grupo Pós-condicionamento, onde precedendo o início da reperfusão, foi realizado o pós-condicionamento isquêmico (três ciclos de um minuto de reperfusão intercalados por três ciclos de um minuto de isquemia); grupo Pré-condicionamento, precedendo ao período isquêmico procedeu-se ao pré-condicionamento isquêmico (três ciclos de 5 min de isquemia intercalados por três ciclos de 5 min de reperfusão); grupo Pré e Pós-condicionamento, neste grupo associaram-se os dois métodos. Avaliaram-se os resultados pela dosagem de enzimas tissulares (aspartato aminotransferase-AST, creatinofosfoquinase-CK e desidrogenase láctica-DHL), malondialdeído (MDA) e glicogênio tissular com tratamento estatístico. **Resultado:** Houve elevação significativa dos níveis de CK em todos os grupos em relação ao grupo *sham*. A AST elevou-se no grupo pré+pós-condicionamento em relação ao grupo controle. O comportamento da LDH foi semelhante entre os grupos. O marcador de lesão de membrana celular representado pelo MDA mostrou-se elevado em todos os grupos, exceto no grupo pós-condicionamento em relação ao grupo *sham*. Não ocorreu diferença entre os grupos isquêmicos e reperfundidos. Quanto à reserva energética ocorreu queda significativa do glicogênio no grupo controle em relação aos grupos *sham*, pré-condicionamento e pré+pós-condicionamento, exceto no grupo pós. **Conclusão:** Concluiu-se que o pré-condicionamento bem como a associação do pré com o pós-condicionamento isquêmico foram capazes de minimizar a lesão tecidual em musculatura estriada de ratos submetidos à isquemia e reperfusão, porém a associação dos métodos não trouxe vantagens adicionais sobre os mesmos aplicados isoladamente.

Palavras-chave: Ratos, Músculo esquelético, Isquemia-reperfusão, Pré-condicionamento, Pós-condicionamento

ABSTRACT

Lintz, J.A. **Ischemic pre- and post-conditioning in skeletal muscle of rats.** 85 p. Dissertação de (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2011.

Background: Ischemic preconditioning has the ability to reduce injuries resulting from ischemia and reperfusion. Ischemic post-conditioning, described later, shows similar protective results against injury by ischemia and reperfusion in myocardium, brain, kidney, skeletal muscle, and spinal cord. **Objective:** To evaluate the effect of ischemic pre- and post-conditioning and their combination on protection against skeletal muscle tissue injury in rats subjected to ischemia and reperfusion. **Methods:** We used 50 Wistar rats divided into five groups of 10 animals each: Control group, subjected to partial ischemia by infrarenal aortic clamping (240 min) and reperfusion (60 min); *Sham* group, subjected to the same surgical procedure but without clamping of the abdominal aorta; Post-conditioning group, in which ischemic post-conditioning was performed before the onset of reperfusion (three cycles of one min of reperfusion interspersed with three cycles of one min ischemia); pre-conditioning group, subjected to ischemic pre-conditioning prior to the ischemic period (three cycles of 5 min ischemia interspersed with three cycles of 5 min reperfusion); pre-and post-conditioning group, in which the two methods were used in combination. Results were evaluated by measuring levels of tissue enzymes (aspartate aminotransferase (AST), creatine kinase (CK) and lactate dehydrogenase (LDH), malondialdehyde (MDA) and tissue glycogen, with statistical analysis. **Results:** There was a significant elevation of CK levels in all groups compared to the *sham* group. AST increased in the pre- + post-conditioning group compared to the control group. The behavior of LDH was similar for all groups. The marker of cell membrane damage represented by MDA was high in all groups except the post-conditioning one compared to the *sham* group. No significant difference was observed between the ischemic and reperfused groups. As to the energy reserve (glycogen), a significant decrease occurred in the control group compared to the *sham*, pre-conditioning and pre- + post-conditioning groups, but not in the post-conditioning group. **Conclusion:** We conclude that pre-conditioning and combined pre - and post-conditioning were able to minimize tissue injury in the skeletal muscle of rats subjected to the ischemia and reperfusion process, but the combined methods did not bring about additional advantages compared to each method applied alone.

Keywords: rats, skeletal muscle, ischemia-reperfusion, post-conditioning, pre-conditioning.

LISTA DE ABREVIATURAS e SÍMBOLOS

AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Adenosina trifosfato
CK	Creatino fosfoquinase
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EROS	Espécies reativas de oxigênio
GTP	Guanosina trifosfato
cGMP	Guanosina monofosfato cíclica
Controle	Grupo Controle
Pré	Grupo pré-condicionamento
Pós	Grupo pós-condicionamento
Pré+Pós	Grupo pré+pós-condicionamento
LDH	Desidrogenase láctica
MDA	Malondialdeído
ME	Músculo esquelético
MMII	Membros pélvicos
PoCI	Pós-condicionamento isquêmico
PCI	Pré-condicionamento isquêmico
OAA	Obstrução arterial aguda
mPTP	Poros de transição de permeabilidade mitocondrial
NO	Óxido nítrico
NOs	Óxido nítrico sintase
MPO	Mieloperoxidase
Cx43	Conexina 43
HEP	Fosfatos de alta energia
STAT3	Transdutor de sinal e ativador da transcrição 3
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
GSK-3 β	Glicogênio sintase quinase 3
RISK	Quinases de salvamento da lesão de reperfusão
MAPK	Quinases de proteínas ativadas por agentes mitogênicos

ERK	Quinases reguladas por sinal extracelular
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
C3a	Fator do complemento 3 ativado
C5a	Fator do complemento 5 ativado
mK _{Atp}	Canais mitocondriais de potássio ATP dependentes
HIF	Fator induzido por hipóxia
GYS-1	Glicogênio Sintase 1

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	-	Valores (U/L) das médias e desvios padrões das dosagens de aspartato aminotransferase (AST) nos cinco grupos estudados	42
Tabela 2	-	Pós-teste de Dunn: comparação da diferença entre os grupos com relação à variável AST	43
Tabela 3	-	Valores (U/L) das médias e dos desvios padrões das dosagens de desidrogenase láctica (LDH) nos cinco grupos estudados	43
Tabela 4	-	Valores (U/L) das médias e dos desvios padrões das dosagens de creatinino fosfoquinase (CK) nos cinco grupos estudados	44
Tabela 5	-	Pós-teste de Dunn: comparação da diferença entre os grupos com relação à variável CK	45
Tabela 6	-	Valores (μ mol) das médias e dos desvios padrões das dosagens de malondialdeído (MDA) muscular nos cinco grupos.....	46
Tabela 7	-	Pós-teste de Dunn: comparação da diferença entre os grupos com relação à variável MDA.....	47
Tabela 8	-	Valores estudados Valores (mg %) das médias e dos desvios padrões das dosagens de glicogênio muscular nos cinco grupos	47
Tabela 9	-	Pós-teste de Dunn: comparação da diferença entre os grupos com relação à variável Glicogênio ..	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Vista geral dos ratos sendo submetidos ao procedimento	33
Figura 2.	Aorta abdominal (seta preta) e veia cava inferior (seta branca) isoladas	33
Figura 3.	Posicionamento do <i>clampe</i> (seta) na aorta abdominal infra-renal.....	34
Figura 4.	Esquema demonstrativo dos períodos de isquemia e reperfusão nos grupos Controle, Sham, Pré, Pós e Pré+Pós (os números correspondem ao tempo em minutos)	37
Figura 5.	Gráfico de pontos dos valores de AST (aspartato aminotransferase) nos cinco grupos estudados	42
Figura 6.	Gráfico de pontos dos valores de LDH (dehidrogenase láctica) nos cinco grupos estudados ..	44
Figura 7.	Gráfico de pontos dos valores de CK (creatino fosfoquinase) nos cinco grupos estudados.....	45
Figura 8.	Gráfico de pontos dos valores de MDA (malondialdeído) muscular nos cinco grupos estudados.....	46
Figura 9.	Gráfico dos valores de glicogênio muscular nos cinco grupos estudados	48

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	30
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1. Animais Estudados	32
3.2. Procedimentos cirúrgicos.....	32
3.3. Grupos	34
3.3.1. Grupo Controle (n=10).....	34
3.3.2. Grupo <i>Sham</i> (n=10)	35
3.3.3. Grupo Pré-condicionamento Isquêmico – Pré (n=10).....	36
3.3.4. Grupo Pós-condicionamento Isquêmico – Pós (n=10).....	36
3.3.5. Grupo Pré e pós-condicionamento Isquêmico – Pré + Pós (n=10).....	36
3.4. Coletas de amostras	37
3.5. Eutanásia.....	38
3.6. Dosagens de marcadores séricos e tissulares	38
3.6.1. Dosagem de aspartato aminotransferase (ast).....	38
3.6.2. Dosagem de desidrogenase láctica (LDH).....	38
3.6.3. Dosagem de creatina quinase total (CK)	39
3.6.4. Dosagem do malondialdeído (MDA) muscular ..	39
3.6.5. Dosagem de glicogênio muscular	40
3.7. Análise estatística	40
4. RESULTADOS	42
4.1. Aspartato Aminotransferase (AST)	42
4.2. Desidrogenase Láctica (LDH)	43
4.3. Creatino fosfoquinase (CK).....	44
4.4. Malondialdeído (MDA) Muscular	46
4.5. Glicogênio Muscular	47

5. DISCUSSÃO	50
6. CONCLUSÕES	62
REFERÊNCIAS.....	64
APÊNDICES	78
ANEXOS	85

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A oclusão arterial aguda (OAA) continua sendo a ocorrência mais comum e desafiadora dentre as urgências vasculares, correspondendo a cerca de 10 a 16% de todos os atendimentos (SILVEIRA et al., 2004). Suas principais causas são as embolias, as trombozes e os traumas arteriais. Sendo um quadro grave, a isquemia e a reperfusão que a segue, podem levar a uma série de complicações que aumentam as lesões teciduais e provocam alterações sistêmicas que culminam por colocar em risco a vida do paciente (BITU-MORENO et al., 2002).

Com o avanço em complexidade e em número dos procedimentos cirúrgicos, complicações até então desconhecidas passaram a surgir em decorrência da revascularização de músculos submetidos à isquemia, tais como edema intenso, estase capilar, exudação inflamatória aguda, hemorragia e mioglobínúria entre outras, mostrando que a reperfusão pode ser até mais danosa para os tecidos que a própria isquemia. Este conjunto de eventos foi caracterizado como Síndrome da Isquemia-Reperfusão (SIR) (HAIMOVICI, 1973).

O processo isquêmico caracteriza-se pela privação de oxigênio aos tecidos, ocorrendo então consumo do substrato de alta energia (ATP) e passando o metabolismo de aeróbio à anaerobiose. A tolerância tecidual à isquemia é dependente de sua natureza bem como da presença ou ausência de circulação colateral. Tecidos como o muscular, toleram bem isquemia de 4-6 h de duração; nervos toleram até 6 h; tecido adiposo até 13h e a pele e os ossos de 1 a 4 dias, em condições de normotermia (PICCINATO, 2008).

Em experimento utilizando músculo grácil de cães submetidos a 3 h de isquemia seguidos de reperfusão, Cruz et al. (1997) não encontraram alterações significativas da função mitocondrial bem como no nível de glicogênio tecidual, demonstrando a resistência do músculo ao processo isquêmico.

Piccinato et al. (2004) utilizando o mesmo modelo canino, demonstraram que após 5 h de isquemia total, ocorriam alterações mitocondriais que eram revertidas decorridos 30 min de reperfusão.

A isquemia em sua fase inicial produz alterações que são reversíveis. Entretanto caso ela se prolongue, outras reações irão ocorrer de maneira sequencial, podendo culminar com situações irreversíveis e até a morte celular.

A falta de oxigênio, promove a necessidade de geração de ATP por via anaeróbica, causando queda nos estoques de glicogênio e fosfocreatina nos músculos o que determina, além de uma baixa geração de energia, o acúmulo de ácido lático e fosfatos inorgânicos no interior das células com consequente queda no pH intracelular, rompendo o equilíbrio homeostático.

Ocorrendo a queda nas reservas e estando as fontes de energia esgotadas, a bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase entra em falência, sobrevivendo então o acúmulo de Na^+ intracelular e a difusão do K^+ para o extracelular. O aumento do soluto intracelular é acompanhado de entrada de água, o que resulta em edema celular (WALKER et al., 1988).

Um fator também importante implicado na patogenia da lesão pela isquemia/reperfusão é o nível de Ca^{++} , já que o mesmo se acumula nos tecidos pós-isquêmicos. O mecanismo através do qual se relaciona este aumento do Ca^{++} intracelular com danos, envolve tanto a ativação de enzimas hidrolíticas dependentes do Ca^{++} (fosfolipases, proteases e nucleases), como o desacoplamento da fosforilação oxidativa mitocondrial, com conseqüente diminuição dos níveis de ATP (ROMANQUE; URIBE; VIDELA, 2005).

O processo isquêmico, dependendo do tempo de sua ocorrência, resulta em lesões altamente destrutivas aos tecidos e órgãos. Entretanto a reperfusão também dá início a processos altamente prejudiciais tanto a nível local como sistemicamente.

Em decorrência da revascularização, o aporte de O_2 em áreas anteriormente isquêmicas predispõe à formação de espécies reativas de oxigênio (EROS) que são moléculas instáveis, altamente reativas e

extremamente tóxicas para o metabolismo celular (SILVEIRA; YOSHIDA, 2004).

Dentre a grande variedade de fontes biológicas das EROS citam-se a via da xantina oxidase endotelial, a via da NADPH oxidase leucocitária, a cadeia de transporte de elétrons nas mitocôndrias, o metabolismo do ácido aracdônico além da auto-oxidação das catecolaminas. Após a sua formação, as EROS atacam uma grande variedade de biomoléculas onde se incluem as proteínas estruturais, contráteis e de transporte, ácidos nucleicos, enzimas, membranas lipídicas, receptores e glicosaminoglicanas.

Os efeitos das EROS estão ligados às lesões nas membranas celulares onde as mesmas atingem as ligações sulfidrílicas de proteínas, lipídios e nucleotídeos de DNA, resultando em lise e necrose celular. As EROS também alteram o potencial elétrico transmembrana dos miócitos, facilitam a atração e ativação dos neutrófilos além de aumentar a permeabilidade da microvasculatura (DAL MAESTRO, 1980).

O processo de recrutamento e ativação dos neutrófilos ocorre nos períodos de isquemia e reperfusão, a NADPH oxidase, enzima ligada à membrana celular dos neutrófilos, oxida o NADPH citoplasmático em NADP^+ e reduz o oxigênio molecular em superóxido, sendo que este radical superóxido pode ser espontaneamente dismutado para formar o peróxido de hidrogênio (GUTE et al., 1998).

Os neutrófilos ativados produzem enzimas, entre as quais a mieloperoxidase (MPO) que catalisa a reação do peróxido de hidrogênio com íons cloreto originando o ácido hipocloroso que por sua vez é um potente agressor de membranas celulares (GUTE et al., 1998).

As formações das EROS, o radical hidroxila em especial, dão início ao processo de peroxidação lipídica, com conseqüente destruição de membranas celulares e liberação do ácido aracdônico e radicais livres lipídicos peroxil. O radical peroxil por reação de desidrogenação dá origem ao malondialdeído (MDA) (AKIMITSU et al., 1994).

O ácido aracdônico sendo metabolizado pela lipooxigenase dá origem aos leucotrienos LTB_4 , C_4 , D_4 e E_4 que são vasoconstrictores e por

ação da ciclooxygenase origina tromboxanes que são vasoconstrictores e prostaglandinas E1 e I2 que são vasodilatadoras. Estes metabólitos, além de sua ação quimiotática, também favorecem a interação entre os neutrófilos e as células endoteliais sendo então os neutrófilos ativados com conseqüente produção de EROS e enzimas proteolíticas que irão afetar a microcirculação (WELBOURN et al., 1991).

As células endoteliais por sua vez, participam primariamente na resposta imune por meio da expressão de antígenos após a ativação das citocinas. A interleucina 1 (IL-1), o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interferons são capazes de modular respostas imunes sobre a superfície da célula endotelial. Estudos experimentais e clínicos demonstram que o processo de isquemia/reperfusão provoca a ativação local do sistema de complemento, levando à produção de fatores C3a e C5a (BELKIN; WRIGHT; LA MORTE, 1989).

O óxido nítrico (NO) é produzido por diversos tipos de células (endotélio, neurônios, macrófagos, epitélio) a partir do L-arginina, por ação da enzima NO sintetase (NOS) incluindo uma isoforma indutível que se expressa principalmente em condições patológicas (iNOS ou NOS-2) e duas constitutivas: a eNOS (NOS-3) e a nNOS (NOS-1) que se expressam no endotélio e no sistema nervoso respectivamente. A NOS é ativada pelo influxo de Ca^{2+} no interior das células (CAMPOS et al., 2004 ROMANQUE; URIBE; VIDELA, 2005; TZENG et al., 1994).

O óxido nítrico (NO) cumpre papel duplo, podendo ser agressor ou protetor celular. Como protetor, apresenta ação vasodilatadora direta sobre o endotélio, além de agir como inibidor da adesão leucocitária ao endotélio e também inibir a adesão e a agregação plaquetárias. Age também como citotóxico contra microorganismos e células tumorais (TZENG et al., 1994).

Entretanto em tecidos submetidos à isquemia/reperfusão, o NO torna-se agressor ao interferir na síntese de DNA e ao reagir com o radical superóxido, que dá origem ao íon peroxinitrito, ao ácido peroxinitroso e ao radical hidroxil, altamente tóxicos aos tecidos (SOUZA et al., 2001; BECKMAN et al., 1990).

O sistema de complemento também se ativa na isquemia/reperfusão, sendo importantes os fatores C3a, C5a, iC3b e C5b-9. O fator C5a além de estimular os leucócitos e a quimiotaxia, amplifica a resposta inflamatória ao induzir a produção de MCP-1 (*methyl-accepting chemotaxis proteins*), TNF- α , IL-6 e IL-1. Os fatores C5b e IC3b também podem alterar a homeostase vascular. O fator IC3B forma-se pela fragmentação de C3 e é um ligante específico para a adesão dos leucócitos ao endotélio vascular via integrina β_2 , CD11b-CD18 (Mac-1). Desta forma, a ativação do sistema de complemento contribui para amplificar o dano, de maneira direta, pela formação de complexos de ataque à membrana e indiretamente por estimular a produção de citocinas pró-inflamatórias e a migração e adesão dos leucócitos (ROMANQUE et al., 2005).

A isquemia/reperfusão produz alterações nos músculos que podem ter como indicadores enzimas liberadas na rutura de membranas celulares tais como a aspartato aminotransferase (AST), a creatino fosfoquinase (CK) e a dehidrogenase láctica (LDH), além de produtos da peroxidação lipídica como o malondialdeído (MDA) (ANTONIO; EVORA; PICCINATO, 2007). Estes indicadores permitem avaliar as repercussões da isquemia/reperfusão bem como a atividade protetora ou lesiva de substâncias ou procedimentos tais como o pré e o pós-condicionamento isquêmico.

Um procedimento para proteger os tecidos contra as lesões secundárias à isquemia /reperfusão é o pré-condicionamento isquêmico que foi inicialmente descrito por Murry, Jennings e Reimer (1986) e consiste em breves períodos de isquemia tecidual seguidos por iguais períodos de reperfusão antes de uma isquemia sustentada resultando em uma proteção celular altamente significativa. Estes autores submeteram coronárias de cães a quatro ciclos de 5 min de oclusão seguidos por 5 min de reperfusão antes do início de 40 min de oclusão e 4 dias de reperfusão. Os animais que receberam o pré-condicionamento exibiram áreas de infarto significativamente menores quando comparados aos animais de controle (MURRY; JENNINGS; REIMER, 1986).

Nos anos que se seguiram, numerosos estudos foram realizados, fornecendo informações sobre os mecanismos do pré-condicionamento para uma grande variedade de espécies animais, tanto *in vitro* como em modelos *in vivo*. O pré-condicionamento isquêmico exerce uma ação protetora em todas as espécies estudadas até agora, incluindo o homem, agindo em órgãos além do coração, como o cérebro (SCHALLER; GRAF, 2002), os rins (TORRAS et al., 2002), o fígado (CASTRO E SILVA Jr. et al., 2002) e o músculo esquelético (MOUNSEY; PANG; FORREST, 1992). O efeito benéfico do pré-condicionamento isquêmico pode ser transferido de uma para outra região no mesmo órgão e até mesmo para outros órgãos, sendo este o chamado pré-condicionamento remoto (LOUKOGEORGAKIS et al., 2006).

Duas fases distintas ou “janelas” do pré-condicionamento (PCI) foram descritas em 1993 (KUZUYA et al., 1993; MARBER et al., 1993). A proteção dada pelo PCI é desencadeada pela liberação de vários mediadores que por sua vez dependem da ativação de mensageiros em complexas cascatas de sinalização, incluindo um grande número de quinases de sobrevivência (RISK). Os efeitos da primeira “janela” ou pré-condicionamento precoce perduram por 1 a 2 h e se forem ultrapassadas a proteção diminui. A segunda “janela” ou pré-condicionamento tardio ocorre 24 h após o pré-condicionamento inicial e perdura por 48 a 72 h.

O pré-condicionamento precoce protege claramente o miocárdio contra o infarto, mas não limita o grau de disfunção contrátil. Em contraste, o PCI tardio protege tanto contra a morte celular como preserva a função ventricular esquerda. Portanto a segunda “janela” do PCI pode trazer mais benefícios clínicos como resultado das ações mais significativas na proteção contra os efeitos da isquemia/reperfusão, bem como a duração desta proteção (48-72 h vs 1-2 h) (KUZUYA et al., 1993; MARBER et al., 1993).

A transdução do sinal do pré-condicionamento isquêmico pode ser dividida em três partes:

1. os gatilhos que são ativados durante a primeira fase dos ciclos e dão início ao processo de proteção.

2. os mediadores que são ativos durante o pré-condicionamento e/ou durante a isquemia sustentada bem como durante a reperfusão subsequente, com efeito sinalizador intracelular.
3. efetores-fim que são ativos durante a isquemia sustentada e a reperfusão subsequente e que promovem a proteção final contra a morte celular (SCHULZ; HEUSCH, 2008).

Os gatilhos do pré-condicionamento isquêmico por sua vez, podem ser divididos em sinais mecânicos (calor ou alongamento) e sinais bioquímicos, que por sua vez são subdivididos em receptor-dependentes e receptor-independentes. Como exemplo de receptores dependentes tem-se o aumento da liberação de adenosina, bradicinina, prostaglandinas e opióides durante a fase inicial do pré-condicionamento os quais darão início ao ciclo de proteção através da via das Proteínas G. Outros receptores dependentes tais como a acetilcolina, angiotensina, endotelina e noradrenalina não estão envolvidos na cardioproteção dada pelo pré-condicionamento isquêmico, porém protegem quando administrados de forma exógena. Além de receptores específicos, o pré-condicionamento é induzido pela administração exógena de EROS, óxido nítrico e cálcio. As EROS também estão causalmente envolvidas no pré-condicionamento isquêmico endógeno. A importância do óxido nítrico como gatilho endógeno do pré-condicionamento isquêmico é menos clara, mas este papel pode ser explicado pela contribuição do caminho independente da óxido nítrico sintase (NOs) na síntese do óxido nítrico durante a isquemia (DAS; 2008; SCHULZ; HEUSCH, 2008).

Os canais mitocondriais de potássio ATP dependentes (mK_{ATP}) agem como sensores para o stress oxidativo, sendo ativados por EROS formadas na mitocôndria durante os períodos de pré-condicionamento e diminuindo a produção destas espécies servem como mecanismo de auto-controle. Além disso, atuam na prevenção do stress oxidativo promovido pelo Ca^{2+} , mantendo a integridade da membrana mitocondrial por prevenir a

abertura dos poros de transição (mPTP) e conseqüente morte celular (FACUNDO; DEPAULA; KOWALTOWSKI, 2007).

O pré-condicionamento isquêmico é mediado por uma complexa ativação da cascata de proteínas quinases (RISK). A adenosina e os opióides (receptores dependentes) são acoplados através de Proteínas G inibidoras à fosfolipase C entre outras. A fosfolipase C por sua vez catalisa a hidrólise de fosfolipídios de membrana que contém o inositol, em trifosfato de inositol e diacilglicerol (DAG), que promovem a ativação de proteína quinase C. A bradicinina e os opiáceos também induzem o pré-condicionamento pela ativação de quinases por caminhos que envolvem a ativação da fosfatidilinositol-3-quinase. O óxido nítrico estimula a guanilato ciclase a converter o GTP para cGMP que é o segundo mensageiro intracelular que por sua vez ativa a proteína quinase G (PEARSON et al., 2001).

Originalmente conceituava-se que a ativação das quinases era observada dentro dos ciclos de pré-condicionamento ou durante o período de isquemia sustentada, sendo este fato importante para a proteção dada pelo pré-condicionamento. Entretanto a ativação da proteína quinase B (AKT) e ERK1/2 no período da reperfusão precoce, logo após a isquemia sustentada foi relatada recentemente como resultado do pré-condicionamento isquêmico. A interação da AKT e ERK1/2 converge para a ativação da p70S6 quinase que funciona como um anti-sinal apoptótico, seguindo a inibição da GSK3 β que, por sua vez, aumenta o limite para a abertura dos poros mitocondriais (mPTP) (HAUSENLOY et al., 2007).

Estudos recentes revelaram que a conexina 43 (Cx43), mais provavelmente a Cx43 localizada na membrana mitocondrial interna é um elemento-chave na transdução do sinal de proteção miocárdica pelo pré-condicionamento isquêmico. Para gerar EROS por qualquer agonista dos canais de potássio ATP-dependente ou pelo pré-condicionamento, a presença da Cx43 na membrana mitocondrial interna é obrigatória. Em ratos com deficiência de Cx43, a proteção dada pelo pré-condicionamento isquêmico é abolida (RUIZ-MEANA et al., 2008).

O transdutor de sinais e ativador de transcrição 3 (STAT3), que promove a transdução de sinais de estresse da membrana plasmática para o núcleo, também está envolvido na proteção contra o infarto após a isquemia e reperfusão. O pré-condicionamento isquêmico induz um aumento do teor de proteína STAT3 no núcleo, sendo que a fosforilação do STAT3 e a sua ligação a sítios alvo STAT são reforçadas após o pré-condicionamento isquêmico. A importância da STAT3 no pré-condicionamento isquêmico é evidenciada em ratos que apresentam uma deleção específica de STAT3, pois nestes animais a redução do tamanho do infarto determinada pelo pré-condicionamento é abolida (BOENGLER et al., 2008).

As mitocôndrias são os efetores-fim do pré-condicionamento isquêmico. Todas as quinases envolvidas convergem para a fosforilação e, portanto para a inibição da glicogênio-sintase-quinase-3 β (GSK3 β). A inibição da GSK3 β aumenta o limiar para abertura dos mPTP durante as fases de isquemia/reperfusão ou hipóxia/reoxigenação. A abertura dos mPTP permite a entrada de íons e água para dentro da mitocôndria, causando acentuado edema, colapso da membrana e falhas no fornecimento da energia mitocondrial (LIM et al., 2007).

Por último, ocorrendo a ruptura da membrana mitocondrial externa, o citocromo C é liberado, e a apoptose é induzida. O edema celular é atenuado durante a reperfusão pelo pré-condicionamento isquêmico, porém o mecanismo regulador do volume ainda é obscuro em seus detalhes. Além disso, o pré-condicionamento isquêmico aumenta a estabilidade do citoesqueleto por uma diminuição da degradação das proteínas que é induzida pela calpaína. Finalmente, com a melhoria na recaptação de cálcio para o retículo sarcoplasmático, ocorre a diminuição da contração excessiva e não coordenada das miofibrilas no período imediato após a reperfusão (INSERTE et al., 2004).

Zhao et al., em 2003, apresentaram o conceito de pós-condicionamento isquêmico o qual consiste em ciclos curtos de reperfusão seguidos por ciclos de isquemia imediatamente após uma fase de isquemia sustentada e antes de ser iniciada a reperfusão permanente.

O fenômeno do pós-condicionamento isquêmico foi aplicado em numerosas espécies, incluindo ratos (TEIXEIRA et al., 2009), coelhos (HUANG et al., 2007), suíno (MCALLISTER et al., 2008) e também no homem (LOUKOGEORGAKIS et al., 2006). O tempo para a proteção eficaz do pós-condicionamento isquêmico é muito mais breve que o pré-condicionamento isquêmico. Um atraso que pode ser de segundos até alguns minutos entre o início da reperfusão e o procedimento de pós-condicionamento ou um número inadequado de ciclos reperfusão / oclusão podem anular o efeito protetor do pós-condicionamento. Além disso, a duração do tempo de isquemia sustentada irá determinar a redução ou o aumento da área comprometida no período pós-isquêmico.

A adenosina e a bradicinina, os canais mitocondriais de potássio ATP-dependentes, as ERO e a proteína quinase C também estão envolvidos de maneira similar a observada no pré-condicionamento isquêmico. A ativação da cascata das quinases de salvamento (RISK) ocorre também com o pós-condicionamento isquêmico e sua ativação converge para a fosforilação e inibição da glicogênio-sintase-quinase-3 β (GSK3 β) (JUHASZOVA et al., 2009). Conforme detalhado acima, a inibição da GSK3 β aumenta o limite para a abertura dos poros mitocondriais (mPTP), levando à sobrevivência mitocondrial.

O fato é que o pré e o pós-condicionamento compartilham de vias de sinalização comuns sem que estes mecanismos sejam realmente idênticos (SCHULZ; HEUSCH, 2008).

A principal limitação do pré-condicionamento é a dificuldade para a sua aplicação em situações clínicas ou cirúrgicas onde o episódio isquêmico não pode ser previsto tal como nas urgências vasculares. As cirurgias eletivas, entretanto são um exemplo em que o pré-condicionamento pode ser aplicado, uma vez que o evento isquêmico é previsível.

O pós-condicionamento, entretanto, pode ser aplicado mesmo quando o evento isquêmico ocorre de maneira não previsível. O protocolo do pós-condicionamento consiste em breves intervalos que não irão atrasar indevidamente os procedimentos de um cateterismo ou uma cirurgia vascular. As abordagens farmacológicas por outro lado poderão aproveitar os

efeitos protetores do pré e do pós-condicionamento tornando os mesmos aplicáveis clinicamente.

Futuros estudos serão necessários para identificar os agentes farmacológicos que, quando administrados antes, durante ou após um episódio isquêmico, irão estimular não só a cascata molecular por via das quinases, mas também para inibir eventos fisiopatológicos da reperfusão, tais como a inflamação, a bomba sódio/hidrogênio e os mPTP.

De fato, a combinação do pré ou do pós-condicionamento com agentes farmacológicos deve ser explorada para superar as limitações das manobras protetoras. A questão básica de qual protocolo é o ideal para o pré e o pós-condicionamento ainda não foi respondida. Os estudos devem resolver as diferenças na eficácia do pós-condicionamento entre os modelos experimentais e humanos, principalmente quando da presença de comorbidades.

Finalmente, ensaios clínicos maiores serão necessários para confirmar a eficácia comparativa do pré e do pós-condicionamento em situações clínicas e cirúrgicas sejam as mesmas vasculares, cardíacas ou em transplantes.

Buscando ampliar o conhecimento da fisiopatologia da isquemia/reperfusão em músculos esqueléticos, bem como testar os procedimentos de pré e pós-condicionamento, vários modelos experimentais foram propostos.

Alguns experimentos utilizam a interrupção total do fluxo sanguíneo no território muscular estudado, sendo conhecidos como modelos de isquemia total: o modelo clássico de torniquete aplicado ao membro pélvico (STROCK et al., 1969), o do músculo grácil de cães (KUZON et al., 1986), o do músculo cremaster de ratos (SUVAL et al., 1987), o do membro pélvico isolado de cão (DIANA et al., 1974) e do membro pélvico isolado de ratos (BEYERSDORF et al., 1989).

Outros modelos são elaborados para o estudo de isquemia parcial, procurando simular situações clínicas que se assemelhem às oclusões arteriais agudas em humanos, citando-se como exemplos o modelo

de oclusão de aorta abdominal infra-renal em ratos (PERRY; FANTINI, 1987) e o da oclusão de artéria ilíaca em porcos (HARKIN et al., 2001).

No presente experimento, empregou-se o modelo de isquemia parcial, representado pela oclusão da aorta abdominal infra-renal em ratos, para simular uma situação semelhante à encontrada por ocasião de oclusões arteriais agudas aorto-ilíacas em humanos.

Assim, propõe-se investigar neste trabalho, os efeitos do pré e do pós-condicionamento isquêmico, bem como a associação dos dois métodos na proteção contra as lesões produzidas pelo processo de isquemia/reperfusão em músculo esquelético de ratos, utilizando-se como marcadores as enzimas citoplasmáticas (AST, LDH e CK) liberadas, um produto da degradação das membranas celulares (malondialdeído - MDA) e os estoques energéticos tissulares (glicogênio tissular).

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Investigar a capacidade do pré-condicionamento bem como do pós-condicionamento e a associação de ambos em minimizar a lesão tecidual em músculo esquelético em um modelo experimental de isquemia parcial representado pela oclusão da aorta infra-renal de ratos, utilizando-se como marcadores as enzimas musculares - AST, DHL e CK, um produto da degradação da membrana celular - malondialdeído e a reserva energética muscular na forma de glicogênio.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS ESTUDADOS

O estudo prospectivo e randomizado foi realizado em 50 ratos machos albinos da linhagem Wistar, com peso variando entre 250 a 450 g, provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

A pesquisa foi conduzida respeitando-se as Normas de Experimentação Animal, regulamentadas pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA), da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, Protocolo nº 037/2008 (Anexo A).

Os animais foram submetidos ao experimento no Laboratório de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, sendo que no dia anterior ao procedimento os mesmos foram mantidos em gaiolas adequadas, com controle de temperatura e fornecimento de alimento e água *ad libitum*. O procedimento cirúrgico foi realizado em sala com temperatura ambiente controlada (22 a 24°C).

Os ratos foram alocados, aleatoriamente, por sorteio, em cinco grupos de igual tamanho (n= 10).

3.2 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

Os animais foram pesados em balança eletrônica e anestesiados com injeção intraperitoneal de Thiopental sódico na dose de 50 mg/kg, complementando-se quando necessário com o mesmo agente anestésico.

A veia dorsal da cauda foi a seguir canulada para a infusão do anestésico (complementação) e da solução de heparina (Figura 1).

Através de laparotomia mediana, realizou-se a dissecação e isolamento da aorta abdominal infra-renal para clampeamento e indução de isquemia parcial nos membros pélvicos e da veia cava inferior para coleta de sangue ao final do experimento (Figuras 2 e 3), baseando-se em modelo sugerido por Perry e Fantini (1987). Previamente ao clampeamento da aorta abdominal infra-renal, procedeu-se à infusão endovenosa de heparina na dose de 10 UI/100g de peso.

Figura 1 - Vista geral dos ratos sendo submetidos ao procedimento.

Figura 2 - Aorta abdominal (seta preta) e veia cava inferior (seta branca) isoladas.

Figura 3 - Posicionamento do *clampe* (seta) na aorta abdominal infra-renal.

3.3 GRUPOS

Os ratos foram divididos por sorteio em cinco grupos de 10 animais cada e designados: Grupo Controle, Grupo *Sham*, Grupo Pré-condicionamento Isquêmico (Pré), Grupo Pós-condicionamento Isquêmico (Pós) e Grupo Pré e Pós-condicionamento Isquêmico (Pré+Pós).

3.3.1 Grupo Controle (n=10)

Os ratos, neste grupo, foram anestesiados e posicionados nos suportes, sendo a seguir a aorta abdominal e a veia cava inferior infra-renais expostas através de laparotomia mediana. Posteriormente, a aorta abdominal infra-renal foi ocluída por clampe vascular atraumático que permaneceu durante 240 min (fase de isquemia). Após a colocação do clampe, o intestino foi reposicionado na cavidade abdominal e a ferida

operatória fechada com sutura da pele com fio de algodão 3-0 e a incisão coberta com gaze embebida em solução salina a 0,9%. Terminada a fase de isquemia, a parede abdominal foi novamente aberta pela remoção do fio de sutura e o clampe vascular retirado, dando início à fase de reperfusão, com duração de 60 min. Iniciada a fase de reperfusão, o abdome foi novamente fechado por sutura da pele com fio de algodão 3-0 até o término do experimento sendo novamente coberta com gaze embebida em solução salina 0,9%. Decorridos os 60 min a parede abdominal foi aberta, sendo então procedidas as colheitas das amostras de sangue na veia cava inferior para as dosagens de marcadores plasmáticos (AST, LDH e CK). O músculo gastrocnêmico do membro pélvico direito foi submetido à biópsia tissular para as dosagens de MDA e glicogênio.

3.3.2 Grupo *Sham* (n=10)

Os ratos deste grupo foram anestesiados e posicionados nos suportes. Por meio de laparotomia mediana, a aorta abdominal e a veia cava inferior infra-renais foram expostas, mas a aorta não foi ocluída. O intestino foi então reposicionado na cavidade abdominal e a ferida operatória fechada com sutura da pele com fio de algodão 3-0 e a incisão coberta com gaze embebida em solução salina a 0,9%. Transcorridos 240 min a parede abdominal foi novamente aberta pela remoção do fio de sutura, e as alças intestinais expostas e novamente recolocadas na cavidade abdominal e realizada a sutura da pele com fio de algodão 3-0. Decorridos 60 min a parede abdominal foi aberta, sendo procedidas as colheitas das amostras de sangue na veia cava inferior para as dosagens de marcadores plasmáticos (AST, LDH e CK). A seguir o músculo gastrocnêmico do membro pélvico direito foi submetido à biópsia tissular para as dosagens de MDA e glicogênio.

3.3.3 Grupo Pré-condicionamento Isquêmico – Pré (n=10)

Os ratos deste grupo foram submetidos a procedimentos semelhantes aos do grupo controle, entretanto, antes do clampeamento, realizaram-se três ciclos (retirada e colocação do clampe aórtico infra-renal) com duração de 5 min cada, de maneira intercalada seguidos de 240 min de isquemia e 60 min de reperfusão.

3.3.4 Grupo Pós-condicionamento Isquêmico – Pós (n=10)

Os ratos deste grupo foram preparados de maneira semelhante ao grupo controle, porém tendo decorrido os 240 min de isquemia e precedendo a fase de reperfusão de 60 min, foi realizado o pós-condicionamento isquêmico por meio de três ciclos de reperfusão (retirada do clampe vascular atraumático da aorta abdominal infra-renal) com duração de 1 min cada, intercalados com três ciclos de isquemia, também com duração de 1 min cada.

3.3.5 Grupo Pré e pós-condicionamento Isquêmico – Pré + Pós (n=10)

Os ratos deste grupo foram preparados de maneira semelhante ao grupo controle, porém, realizaram-se três ciclos (retirada e colocação do clampe aórtico infra-renal) com duração de 5 min intercalados (pré-condicionamento), seguindo-se 240 min de isquemia e imediatamente antes da reperfusão foram realizados três ciclos (retirada e colocação do clampe aórtico infra-renal) com duração de 1 min intercalados (pós-condicionamento) seguindo-se 60 min de reperfusão.

Completada a fase de reperfusão, nos quatro grupos, a parede abdominal foi novamente aberta pela remoção do fio de sutura, sendo colhido sangue na veia cava inferior e ressecado o músculo gastrocnêmico do

membro pélvico direito. Os tempos dos procedimentos para cada grupo são a seguir esquematizados (Figura 4).

Figura 4 - Esquema demonstrativo dos períodos de isquemia e reperfusão nos grupos Controle, *Sham*, Pré, Pós e Pré+Pós (os números correspondem ao tempo em minutos).

3.4 COLETAS DE AMOSTRAS

A coleta de amostras foi realizada ao final do período de reperfusão. Colheram-se 3 ml de sangue através da punção direta da veia cava inferior infra-renal. O sangue foi acondicionado em tubo seco e encaminhado rapidamente ao Laboratório.

As biópsias musculares, com peso de aproximadamente 3 g foram realizadas após a exposição do músculo gastrocnêmico do membro pélvico direito. As amostras foram acondicionadas em frascos com solução salina a 0.9% gelada (5 ml a 4°C), colocadas em caixas com gelo e encaminhadas rapidamente ao Laboratório.

3.5 EUTANÁSIA

A eutanásia dos ratos foi realizada logo após a coleta das amostras, por aprofundamento do plano anestésico.

3.6 DOSAGENS DE MARCADORES SÉRICOS E TISSULARES

3.6.1 Dosagem de Aspartato Aminotransferase (AST)

A determinação foi realizada por *kit*, utilizando-se um espectrofotômetro CELM (mod. E- 225D), pelo método cinético – UV (HENRY et al., 1960), otimizado pela CELM – Cia. Equipadora de Laboratórios Modernos. O soro extraído foi misturado aos reativos (tampão TRIS-HCl, NADH, MDH/LDH e 2-oxoglutarato). A seguir foram registradas as absorbâncias após 1, 2, 3, e 4 min para obtenção da variação de absorbância e a média dos valores. Os valores obtidos foram expressos em unidades por litro (U/L).

3.6.2 Dosagem de Dehidrogenase Láctica (LDH)

A determinação foi realizada por *kit*, utilizando-se de um espectrofotômetro CELM (mod. E- 225D), por meio do método cinético – UV (KEIDING et al., 1974), otimizado por LABORLAB – Produtos para

Laboratórios Ltda. O soro extraído foi misturado aos reativos: tampão fosfato e NADH. A seguir, foram registradas as absorbâncias após 1, 2 e 3 min para obtenção da variação de absorbância e a média dos valores. Os valores obtidos foram expressos em unidades por litro (U/L).

3.6.3 Dosagem de Creatina Quinase Total (CK)

A determinação foi realizada por *kit*, utilizando-se de um espectrofotômetro *CELM* (mod. E- 225D), pelo método cinético – UV (KEIDING et al., 1974), otimizado por WIENER Laboratórios. O soro extraído foi misturado aos reagentes tampão e substrato. Aguardaram-se 2 min a seguir foram registradas as absorbâncias após 1, 2 e 3 min para obtenção da variação de absorbância e a média dos valores. Os valores foram expressos em unidades por litro (U/L).

3.6.4 Dosagem do Malondialdeído (MDA) Muscular

As amostras de tecido muscular foram lavadas em Tris-HCl, 20 mM, pH 7,4, enxugadas em papel absorvente e a seguir pesadas e diluídas a 10% em Tris-HCl, 20 mM, pH 7,4. Feito isto, o tecido foi picotado e homogeneizado em três ciclos com 1 min de intervalo entre os ciclos. O homogenato obtido foi centrifugado a 3000 g por 10 min a 4°C e o sobrenadante foi coletado para a determinação do MDA. O MDA foi determinado a 586 nm, utilizando-se um espectrofotômetro DU 640B – Beckman Coulter (Fullerton, CA, USA), através do kit Lipid Peroxidation Assay (Calbiochem, San Diego, CA, USA). Os valores foram expressos em μ molar, obtidos a partir de uma curva padrão.

3.6.5 Dosagem de Glicogênio Muscular

Um fragmento de 500 mg de tecido muscular foi colocado em 2,0 ml de KOH a 30% para a extração do glicogênio (SJOGREEN et al., 1938).

O glicogênio foi determinado a 620 nm, utilizando-se um espectrofotômetro DU 640B – Beckman Coulter (Fullerton, CA, USA), mediante o método da Antrona (Hassid & Abraham, 1957). Foi utilizado como padrão uma solução glicose preparada em ácido benzóico 0,25% e os resultados obtidos foram expressos em mg%.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Realizou-se a análise descritiva dos dados tendo como objetivo básico sintetizar uma série de valores de mesma natureza, permitindo uma visão global da variação desses valores, organizando e descrevendo os dados de três maneiras: por meio de tabelas, de gráficos e de medidas descritivas, com nível de significância $p < 0,05$. Este procedimento foi realizado através do *software* SAS® 9.0, utilizando a *PROC MEANS*.

Com o objetivo de comparar os grupos, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis, (técnica não paramétrica para comparar distribuições de dois ou mais grupos). Sendo assim não são requeridas suposições quanto à distribuição dos dados. Nos casos onde houve diferença entre algum par de grupos, foi feito o pós-teste de Dunn. Os resultados foram obtidos com o auxílio do *software* SAS® 9, através da *PROC IML*.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Aspartato Aminotransferase (AST)

Os valores individuais observados de AST encontram-se na Tabela 3 do Apêndice A.

A Tabela 1 e a Figura 5 mostram os valores das dosagens de AST nos cinco grupos estudados.

Tabela 1 - Valores (U/L) das médias e desvios padrões das dosagens de aspartato aminotransferase (AST) nos quatro grupos estudados

Variável	Grupos	Média	Desvio Padrão	p-valor
AST	<i>Sham</i>	117,89	45,07	<0,01
	Controle	101,8	42,52	
	Pré	154,6	36,91	
	Pós	106,57	33,23	
	Pré+pós	170	41,54

Figura 5 - Gráfico de pontos dos valores de aspartato aminotransferase (AST) nos cinco grupos estudados.

Tabela 2 - Pós-teste de Dunn: comparação da diferença entre os grupos com relação à variável AST

Teste de Kruskal-Wallis			
AST			
Pós teste de Dunn	Diferença	Diferença Mínima Significativa	Significância
Controle - Pré	16,60	16,85	Não
Controle - Pós	1,55	18,57	Não
Controle - Pré+pós	19,75	16,85	Sim
Controle - Sham	4,66	17,31	Não
Pré - Pós	15,05	18,57	Não
Pré - Pré+pós	3,15	16,85	Não
Pré - Sham	11,94	17,31	Não
Pós - Pré+pós	18,20	18,57	Não
Pós - Sham	3,11	18,99	Não
Pré+pós - Sham	15,09	17,31	Não

Houve aumento significativo da AST no grupo pré+pós-condicionamento em relação ao grupo controle. Não houve diferença entre os outros grupos.

4.2 Desidrogenase Láctica (LDH)

Os valores individuais observados da LDH encontram-se na Tabela 4 do Apêndice A.

A Tabela 3 e a Figura 6 mostram os valores das dosagens de LDH nos cinco grupos estudados.

Tabela 3 - Valores (U/L) das médias e dos desvios padrões das dosagens de desidrogenase láctica (LDH) nos cinco grupos estudados

Variável	Grupos	Média	Desvio Padrão	p-valor
LDH	Sham	2198,33	1583,76	0,54
	Controle	1164,1	483,7	
	Pré	1370,9	548,07	
	Pós	999,86	475,21	
	Pré+pós	1247,7	386,21

Figura 6 - Gráfico de pontos dos valores de desidrogenase láctica (LDH) nos cinco grupos estudados

O comportamento da LDH foi semelhante entre os grupos.

4.3 Creatino fosfoquinase (CK)

Os valores individuais observados da CK encontram-se na Tabela 5 do Apêndice A.

A Tabela 4 e a Figura 7 mostram os valores das dosagens de CK nos quatro grupos estudados.

Tabela 4 - Valores (U/L) das médias e dos desvios padrões das dosagens de creatino fosfoquinase (CK) nos quatro grupos estudados

Variável	Grupos	Média	Desvio Padrão	p-valor
CK	<i>Sham</i>	1221,11	411,47	<0,01
	Controle	4621,1	2648,13	
	Pré	3966,3	1219,6	
	Pós	3744,86	1405,59	
	Pré+pós	3576,9	1625,21

Figura 7 - Gráfico de pontos dos valores de creatino fosfoquinase (CK) nos cinco grupos estudados.

Tabela 5 - Pós-teste de Dunn: comparação da diferença entre os grupos com relação à variável CK

Teste de Kruskal-Wallis			
CK			
Pós teste de Dunn	Diferença	Diferença Mínima Significativa	Significância
Controle - Pré	0,45	16,85	Não
Controle - Pós	3,21	18,57	Não
Controle - Pré+pós	5,10	16,85	Não
Controle - <i>Sham</i>	24,56	17,31	Sim
Pré - Pós	2,76	18,57	Não
Pré - Pré+pós	4,65	16,85	Não
Pré - <i>Sham</i>	24,11	17,31	Sim
Pós - Pré+pós	1,89	18,57	Não
Pós - <i>Sham</i>	21,34	18,99	Sim
Pré+pós - <i>Sham</i>	19,46	17,31	Sim

Houve elevação significativa dos níveis de CK em todos os grupos em relação ao grupo *sham*. Não ocorreu diferença entre os grupos isquêmicos e reperfundidos

4.4 Malondialdeído (MDA) Muscular

Os valores individuais observados de MDA encontram-se na Tabela 1 do Apêndice A.

A Tabela 6 e a Figura 8 mostram os valores de MDA nos cinco grupos estudados: Grupo Sham, Grupo Controle, Grupo Pré-condicionamento isquêmico (Pré), Grupo Pós-condicionamento isquêmico (Pós), Grupo Pré e Pós-condicionamento isquêmico (Pré+Pós).

Tabela 6 - Valores (μ mol) das dosagens de malondialdeído (MDA) muscular nos cinco grupos estudados

Variável	Grupos	Média	Desvio Padrão	p-valor
MDA	<i>Sham</i>	0,09	0,04	<0,01
	Controle	0,35	0,22	
	Pré	0,31	0,12	
	Pós	0,22	0,06	
	Pré+pós	0,28	0,13

Figura 8 - Gráfico de pontos dos valores de malondialdeído (MDA) muscular nos cinco grupos estudados.

Tabela 7 - Pós-teste de Dunn: comparação da diferença entre os grupos com relação à variável MDA

Teste de Kruskal-Wallis MDA			
Pós teste de Dunn	Diferença	Diferença Mínima Significativa	Significância
Controle - Pré	0,05	17,21	Não
Controle - Pós	7,25	18,97	Não
Controle - Pré+pós	2,65	17,21	Não
Controle - <i>Sham</i>	23,95	17,21	Sim
Pré - Pós	7,20	18,97	Não
Pré - Pré+pós	2,60	17,21	Não
Pré - <i>Sham</i>	23,90	17,21	Sim
Pós - Pré+pós	4,60	18,97	Não
Pós - <i>Sham</i>	16,70	18,97	Não
Pré+pós - <i>Sham</i>	21,30	17,21	Sim

Houve aumento significativo do MDA em todos os grupos, exceto no grupo pós-condicionamento em relação ao grupo *sham*. Não ocorreu diferença entre os grupos isquêmicos e reperfundidos

4.5 Glicogênio Muscular

Os valores individuais observados de Glicogênio encontram-se na Tabela 2 do Apêndice A.

A Tabela 8 e a Figura 9 mostram os valores das dosagens de glicogênio nos cinco grupos estudados.

Tabela 8 - Valores (mg %) das médias e dos desvios padrões das dosagens de glicogênio muscular nos cinco grupos

Variável	Grupos	Média	Desvio Padrão	p-valor
Glicogênio	<i>Sham</i>	0,54	0,14	<0,01
	Controle	0,23	0,11	
	Pré	0,46	0,16	
	Pós	0,38	0,17	
	Pré+pós	0,48	0,06

Figura 9 - Gráfico de pontos dos valores de glicogênio muscular nos cinco grupos estudados

Tabela 9. Pós-teste de Dunn: comparação da diferença entre os grupos com relação à variável Glicogênio

Teste de Kruskal-Wallis			
GLIC			
Pós teste de Dunn	Diferença	Diferença Mínima Significativa	Significância
Controle - Pré	16,53	16,19	Sim
Controle - Pós	10,28	18,58	Não
Controle - Pré+pós	18,00	16,62	Sim
Controle - <i>Sham</i>	22,61	16,62	Sim
Pré - Pós	6,25	18,20	Não
Pré - Pré+pós	1,47	16,19	Não
Pré - <i>Sham</i>	6,08	16,19	Não
Pós - Pré+pós	7,72	18,58	Não
Pós - <i>Sham</i>	12,33	18,58	Não
Pré+pós - <i>Sham</i>	4,61	16,62	Não

Ocorreu queda significativa do glicogênio no grupo controle em relação aos grupos *sham*, pré-condicionamento e pré+pós-condicionamento, exceto no grupo pós. Não houve diferença entre os grupos *sham*, pré-condicionamento, pré+pós e pós-condicionamento.

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O pré e o pós-condicionamento isquêmico são fenômenos em que breves episódios de isquemia/reperfusão realizados antes ou após uma isquemia prolongada tornam o órgão ou tecido resistentes a lesões decorrentes da isquemia/reperfusão.

No presente estudo observou-se que os níveis de CK elevaram-se significativamente em todos os grupos em relação ao grupo *sham*. A AST elevou-se no grupo pré+pós-condicionamento em relação ao grupo controle. O comportamento da LDH foi semelhante entre os grupos. O marcador de lesão de membrana celular representado pelo MDA mostrou-se elevado em todos os grupos, exceto no grupo pós-condicionamento em relação ao grupo *sham*, não ocorrendo diferença entre os grupos isquêmicos e reperfundidos. Quanto à reserva energética ocorreu queda significativa do glicogênio no grupo controle em relação aos grupos *sham*, pré-condicionamento e pré+pós-condicionamento, exceto no grupo pós-condicionamento. Assim o pré e o pré+pós-condicionamento protegeram o músculo da lesão de isquemia e reperfusão com base na reserva de glicogênio. Por outro lado a associação dos dois procedimentos não mostrou vantagens em relação ao pré-condicionamento isolado.

A primeira demonstração do efeito protetor do pré-condicionamento em músculo esquelético foi num modelo de isquemia total, empregando músculos grandes dorsais de suínos, onde foram aplicados 3 ciclos de 10 min seguidos de 4 h de isquemia (MOUNSEY et al., 1992).

Vários protocolos experimentais foram posteriormente desenvolvidos visando à análise de como devem ser aplicados os ciclos de pré-condicionamento. Os regimes de pré-condicionamento mais frequentemente utilizados empregam tempos seqüenciais entre 5 min e 10 min, variando de uma a cinco repetições dos ciclos de isquemia/reperfusão prévios à isquemia sustentada.

Pang et al. em 1994, utilizando o modelo dos músculos grandes dorsais e gráceis de suínos, conseguiram obter resultados positivos

empregando um regime de pré-condicionamento de 3 ciclos alternados de I/R, de 10 min de duração, seguidos de 4 h de isquemia e 1,5 h de reperfusão, mantendo-se a fosfocreatina e o ATP muscular preservados, e os níveis de lactato baixos no grupo pré-condicionado .

Em 1997, Carroll et al. pesquisaram o pré-condicionamento, objetivando o estudo das fases precoce e tardia. Para tal utilizaram o modelo de isquemia total do músculo grande dorsal em ratos. No primeiro grupo (controle), o músculo foi isolado sem pré-condicionamento isquêmico, no segundo grupo foram investigados os efeitos do pré-condicionamento isquêmico na fase inicial. Neste grupo, o músculo grande dorsal foi isolado imediatamente após o pré-condicionamento. No terceiro grupo foram investigados os efeitos do pré-condicionamento isquêmico em sua fase tardia, sendo o músculo isolado 24 h após o pré-condicionamento isquêmico. O regime de pré-condicionamento nos dois grupos foi de dois episódios de 30 min de isquemia global normotérmica com intervalo de 10 min de reperfusão. Os resultados mostraram que o pré-condicionamento isquêmico resultou em uma redução significativa da necrose tanto na fase imediata como na fase tardia.

Zahir et al., em 1998, realizaram experimento objetivando determinar como o tempo do ciclo de isquemia bem como o número de ciclos influenciariam na eficácia do pré-condicionamento isquêmico. Grupos de ratos foram estudados num modelo do músculo reto abdominal. O músculo reto abdominal, tendo o pedículo dos vasos epigástricos inferiores preservado, foi isolado em cada animal. Os retalhos foram pré-condicionados pelo pedículo em ciclos de 5 ou 10 min, sendo este tempo repetido para um, dois e três ciclos. A sobrevida do retalho foi melhorada aumentando o número dos ciclos de 10 min. O tempo e o número de ciclos têm efeito benéfico sobre as áreas de sobrevivência de retalhos pré-condicionados. O pré-condicionamento isquêmico, com ciclos de 10 min é superior a ciclos de 5 min. Três ciclos de 10 min de pré-condicionamento foram estatisticamente superiores a um ou dois ciclos. Os ciclos de 5 min resultaram em uma redução do efeito de pré-condicionamento, com sobrevida de retalhos não diferente do controle.

Mattei et al. (2000) investigaram a eficácia do pré-condicionamento isquêmico em músculo esquelético de ratos em relação à duração dos ciclos de pré-condicionamento. Quarenta animais, num modelo de isquemia total, foram divididos em quatro grupos. O grupo controle foi submetido a 2,5 h de isquemia seguida de 2 h de reperfusão em seu membro pélvico direito. A função muscular foi analisada *in vitro* para estudo de fosfatos de alta energia. Os animais dos grupos de estudo foram submetidos a três ciclos de isquemia/reperfusão de 2,5 min, 5 min e 10 min de isquemia / reperfusão. A função dos músculos extensores foi significativamente melhorada em todos os três protocolos de pré-condicionamento, porém o funcionamento do músculo sóleo só foi melhorado no grupo com três ciclos de 5 min de isquemia por 5 min de reperfusão. Os níveis teciduais de fosfatos de alta energia não foram influenciados, demonstrando que o pré-condicionamento aumenta a tolerância isquêmica não só do músculo de contração rápida, como também aqueles de contração lenta. A eficácia do pré-condicionamento parece ser menos dependente da duração dos ciclos do que o número de ciclos executados. Três ciclos, cada um com 2,5, 5 ou 10 min melhoraram significativamente a função do músculo esquelético. Teores de fosfatos de alta energia, no entanto, não foram influenciados, indicando que não desempenham um papel importante nos efeitos do pré-condicionamento.

Qi et al. (2005) estudaram vários protocolos de tempos de pré-condicionamento isquêmico em músculo esquelético de ratos (n=36) em modelo de amputação temporária (isquemia total) ao nível do fêmur, com exclusão dos vasos femorais. Os animais foram divididos em 6 grupos (n=6), sendo o grupo A o controle (4 h de isquemia e posterior reperfusão), os grupos B, C, D, E com 5, 10, 15, 20 min de isquemia e 5, 10, 15, 20 min de reperfusão, respectivamente, em 3 ciclos, seguidos de 4 h de isquemia e posterior reperfusão. O grupo F foi o grupo *sham*. Decorridas 24 h dosou-se o MDA e foram medidas a extensão do edema e da necrose do músculo esquelético. O grupo de 5 min de pré-condicionamento isquêmico mostrou proteção eficaz contra necrose, com área de sobrevivência do músculo de 82,47% em relação ao controle. Os efeitos nos grupos de 10 min e 15 min

foram superiores ao do grupo de 5 min, sendo que as áreas de sobrevivência do músculo foram de 89,03% e 89,49%, respectivamente. Os efeitos no grupo de 20 min (78,27%) foram significativamente inferiores ao grupo de 5min. O ciclo de 5 min de pré-condicionamento pode reduzir as lesões musculares, sendo o ciclo de 10 min significativamente superior ao de 5min. Ciclos de 5,10 e 15 min, podem diminuir o nível de MDA, porém o ciclo de 20 min não apresenta os mesmos resultados favoráveis. A conclusão é que a tendência do efeito protetor do pré-condicionamento na isquemia e reperfusão do músculo de ratos são variáveis em função do tempo dos ciclos apresentando 10 min como um valor ideal.

Tatlidede et al. (2009), utilizando retalhos de pele de camundongos num modelo de isquemia total, dividiram três grupos de animais sendo um grupo controle (*sham*) sem isquemia, outro grupo submetido a 10 h de isquemia e o terceiro grupo onde se aplicaram ciclos de pré-condicionamento (2 ciclos de isquemia/reperfusão de 20 min) seguidos por 10 h de isquemia. Em todos os animais a isquemia foi seguida por uma semana de reperfusão. A porcentagem de necrose foi medida, sendo de 1,1% $\pm$ 1,11% no controle, de 33,14% $\pm$ 7,23% nos animais submetidos a 10 h de isquemia. Nos animais pré-condicionados ocorreu uma redução de 43% na área de necrose.

Em 2003, Zhao et al. apresentaram o conceito de pós-condicionamento isquêmico, onde um ou mais ciclos curtos de reperfusão eram seguidos por um ou mais ciclos curtos de isquemia, imediatamente após um período de isquemia e antes da reperfusão permanente. Estes autores demonstraram que o pós-condicionamento era tão eficiente quanto o pré-condicionamento na prevenção das lesões de reperfusão miocárdica, desde então vários protocolos de pós-condicionamento foram criados.

McAllister et al. (2008) testaram pela primeira vez a hipótese do pós-condicionamento ser eficaz no salvamento do músculo esquelético isquêmico das lesões de reperfusão. O mecanismo de proteção envolveria a inibição da abertura dos poros de transição de permeabilidade mitocondrial (mPTP). Para testar estas duas hipóteses, músculos grandes dorsais de suínos (modelo de isquemia total) foram submetidos a 4 h de isquemia

(grupo controle). No grupo de estudo, o pós-condicionamento foi induzido, após 4h de isquemia, por 4 ciclos de 30s de reperfusão / oclusão, tendo como resultado a redução da área de infarto muscular em 44 ± 2 - $22 \pm 2\%$ após 48h de reperfusão. O efeito protetor do pós-condicionamento foi também obtido por uma injeção intravenosa de inibidor da abertura dos mPTP (ciclosporina ou NIM-811 (10 mg / kg) 5 min antes da reperfusão e ao final de 4 h de isquemia e abolido por uma injeção intravenosa de atractilósídeo (10 mg/kg) que é uma droga que promove a abertura dos mPTP, 5 min antes do pós-condicionamento. O pós-condicionamento ou a injeção intravenosa de ciclosporina 5 min antes da reperfusão provocaram diminuição da atividade da mieloperoxidase muscular e da concentração de Ca^{2+} mitocondrial livre e aumento no teor de ATP muscular decorridas 4 h de isquemia e 2 h de reperfusão comparando-se com o tempo dos controles correspondentes. Os efeitos do pós-condicionamento foram abolidos pela injeção intravenosa de atractilósídeo 5 min antes da reperfusão, demonstrando que o pós-condicionamento é eficaz no salvamento do músculo esquelético isquêmico e esta ação envolve o mecanismo de inibição da abertura dos mPTP.

Szijártó et al. (2009) testaram o pós-condicionamento num experimento de isquemia parcial (clampeamento infra-renal da aorta abdominal). Ratos foram submetidos a 180 min de isquemia dos membros pélvicos e 4 h de reperfusão. Os animais controle não foram submetidos a nenhuma outra intervenção adicional (*sham*). O grupo pós-condicionamento foi submetido a 6 ciclos de 10s de reperfusão/oclusão antes do início da reperfusão. Os parâmetros hemodinâmicos foram observados com manômetro arterial invasivo e a microcirculação do membro foi detectada com fluxometro laser-Doppler. Após 4 h de reperfusão, os resultados mostraram que o pós-condicionamento provocou redução significativa da resposta inflamatória sistêmica (TNF- α e EROS), bem como significativa diminuição das disfunções decorrentes da isquemia/reperfusão em órgãos à distância (pulmões e rins) no grupo pós-condicionado. Concluíram que o pós-condicionamento provou ser capaz de conferir proteção contra lesões mesmo em órgãos à distância.

O modelo de isquemia parcial utilizado no presente experimento difere dos encontrados na literatura, pois em termos de estruturas envolvidas, os modelos na sua maioria utilizam retalhos musculares onde se preserva o pedículo vascular e pelo qual se procede aos ciclos de isquemia/reperfusão em isquemia total. Encontrou-se apenas um trabalho, na literatura pesquisada, em que se aplicou o clampeamento aórtico infra-renal, porém com tempo de reperfusão de 4h e testou-se apenas o pós-condicionamento isquêmico (SZIJÁRTÓ et al., 2009).

O pré-condicionamento investigado neste trabalho consistiu em 3 ciclos de isquemia intercalados por 3 ciclos de reperfusão de 5 min cada, perfazendo 30 min no total. Além do pré-condicionamento adicionou-se o pós-condicionamento com três ciclos de 1min os quais devem ser acrescidos às 4 h de isquemia sustentada, sendo este, portanto, um tempo adicional de isquemia.

As enzimas musculares apresentam um comportamento dependente dos tempos de isquemia e reperfusão bem como do tipo de tecido ou órgão pesquisado, porém sempre são encontrados aumentos significativos das mesmas em músculos esqueléticos submetidos ao processo de isquemia (BOZKURT, 2002).

As dosagens enzimáticas em outros trabalhos, geralmente se referem a tempos de reperfusão maiores, em geral acima de 4h, sendo por vezes 24 h ou até mesmo dias, não sendo encontrada na literatura pesquisada referência de dosagens num tempo relativamente curto como no presente experimento, o que confere ao mesmo a originalidade em relação ao tempo de reperfusão.

Acredita-se que o tempo adicional de isquemia, determinado pelo pré-condicionamento, quando aplicado a um modelo de isquemia parcial, como o do presente trabalho, promova na fase inicial da reperfusão, aumento nas enzimas séricas, como o demonstrado, caracterizado pela AST elevada significativamente no grupo pré+pós-condicionamento. No grupo pré-condicionamento a AST elevou-se embora de forma não significativa, quando comparados aos grupos controle e ao pós-condicionamento.

Resultados semelhantes foram observados por Castro e Silva Jr. et al. (2002) estudando isquemia hepática e pré-condicionamento.

Ressalte-se que os valores de CK não apresentaram diferenças significativas entre os grupos pré, pós e pré+pós-condicionamento quando comparados ao grupo controle, o que denota, conforme visto na literatura, que a CK aparece elevada antes da AST e também desaparece primeiro. Assim os valores dessas enzimas podem indicar o estágio do processo isquêmico. Estando os níveis de CK aumentados e de AST baixos, os mesmos indicariam lesão recente. Níveis persistentemente altos das duas enzimas indicariam lesão continuada enquanto níveis baixos de CK e altos de AST indicariam processo de recuperação (PEREZ et al., 1997; FRANCISCATO et al., 2006; ANTUNES NETO et al., 2008; MELLO et al., 2008).

Pelo acima exposto, resumidamente pode-se dizer que pela dosagem enzimática, a associação pré+pós-condicionamento promove neste modelo experimental, decorrido o tempo de 1 h de reperfusão, significativo aumento da AST, sendo que os valores de CK e LDH não diferiram do controle, o que indicaria processo de isquemia em recuperação. Este comportamento das enzimas é interessante e pode sinalizar para outros aspectos dos procedimentos de pré e pós-condicionamento ainda não totalmente explorados, tais como o pré-condicionamento remoto (HAUSENLOY et al., 2008; WALSH et al., 2007).

A peroxidação lipídica gera um grande número de substâncias, as quais reagindo com proteínas e o DNA resultam em produtos tóxicos e mutagênicos dentre os quais o MDA. Os maiores danos da peroxidação lipídica ocorrem na membrana celular, pois esta contém ácidos graxos poliinsaturados e ocorrendo a elevação das EROS e peroxidação destes ácidos, as mesmas por sua ação tóxica pode levar à desintegração da membrana (TEIXEIRA et al., 2009).

Kin et al. (2005) mostraram que a adenosina endógena, pela ativação de receptores A2A e A3AR, promove o efeito protetor do pós-condicionamento. Concluíram que a adenosina é um substrato muito

importante para reequilibrar o metabolismo energético e que após a reperfusão é também um potente vasodilatador da microvasculatura.

Os grupos pós-condicionados, em experimentos envolvendo tecido hepático, apresentaram diminuição da peroxidação lipídica, tal como nos experimentos envolvendo miocárdio, sendo este fato relacionado aos efeitos protetores da adenosina. A reperfusão abrupta promove lavagem de substâncias endógenas protetoras, dentre as quais a adenosina, que foram produzidas nos tecidos durante a isquemia, porém quando a reperfusão é gradual estas substâncias permanecem no interior do tecido exercendo ação protetora (TEIXEIRA et al. 2009).

No presente experimento, não foi encontrada diferença significativa dos valores de malondialdeído (MDA) em todos os grupos onde houve isquemia e reperfusão indicando haver lesão celular e os processos de pré e pós-condicionamento não foram capazes de minimizar estas lesões de membrana.

Kin et al. (2004), num experimento com miocárdio de ratos, demonstraram o efeito protetor do pós-condicionamento isquêmico analisando a extensão da área infartada, o MDA e a mieloperoxidase. Ressaltaram a importância do tempo para o início da aplicação do procedimento.

O processo isquêmico afeta a respiração aeróbica celular a nível mitocondrial. Quando a tensão de oxigênio intracelular cai, ocorre perda da fosforilação oxidativa com conseqüente diminuição da geração de adenosina trifosfato (ATP). As células mudam a rota metabólica para a anaerobiose, ocorrendo então o estímulo das vias glicolíticas. O metabolismo anaeróbico depleta rapidamente as reservas de glicogênio, promovendo a glicólise anaeróbica com o acúmulo de ácido láctico e fosfatos orgânicos, derivados da hidrólise de ésteres de fosfato, e conseqüente diminuição do pH celular. Após esta ocorrência existe uma ruptura estrutural do aparelho de síntese de proteínas (WEISS et al., 1996).

Os ciclos de isquemia/reperfusão do pré-condicionamento depletariam os estoques de glicogênio sendo que posteriormente, durante o período da isquemia sustentada que se sucede, ocorreria uma menor

disponibilidade de substrato para glicólise anaeróbica tendo como consequência um menor acúmulo de lactato e íons H^+ e uma menor acidose intracelular, sendo que esta redução do acúmulo de prótons diminuiria a injúria isquêmica (WEISS et al., 1996).

Sendo o estado de hipóxia caracterizado por um aumento na demanda da glicose, a indução da síntese de glicogênio pode parecer paradoxal, entretanto, esta indução requer fatores induzidos por hipóxia (HIF) dependentes de expressão gênica, os quais atuando na Glicogênio Sintase 1 (GSY-1) se tornam eficazes durante o período de hipóxia. Para isso a indução da síntese de glicogênio durante a hipóxia precoce poderá servir para repor os estoques de glicogênio que virão a ser utilizados em períodos posteriores. Assim, é proposto que a indução da GYS-1 pelos HIF constitui uma resposta celular à adaptação para o estado de hipóxia, onde as células se preparam para lidar melhor com futuras restrições de oxigênio. A compreensão desta resposta em nível do mecanismo molecular poderá ser benéfica, não só para elucidar a fisiologia das adaptações à hipóxia, como também para estratégias terapêuticas no tratamento de doenças nas quais a hipóxia esteja presente (PESCADOR et al., 2010).

Os resultados deste experimento mostraram que os valores do glicogênio nos grupos pré-condicionamento e pré+pós-condicionamento foram significativamente maiores que o grupo controle, demonstrando que o processo isquêmico consumiu energia sob a forma de glicogênio neste grupo sendo, entretanto, o mesmo preservado nos dois primeiros.

O processo de preservação do glicogênio pelo pré ou pelo pós condicionamento, conforme as teorias de Weiss et al. (1996) ou Pescador et al., (2010), demonstra que apesar dos resultados serem semelhantes, a explicação para o mecanismo molecular envolvido demanda maiores estudos para a sua compreensão.

Xiaorong et al. (2009) demonstraram que o pré-condicionamento, bem como o pós-condicionamento isolados podem reduzir as lesões miocárdicas (tamanho do infarto, LDH, CK e MDA) que são os mais importantes componentes da fisiopatologia das lesões por isquemia / reperfusão. Entretanto a associação entre os dois métodos parece não

oferecer proteção sinérgica contra as lesões de isquemia/reperfusão. Os resultados deste estudo sugerem que o pré e o pós-condicionamentos parecem partilhar de vias comuns de sinalização.

Trabalho realizado em musculatura cardíaca por Halkos et al. (2004) mostrou resultados semelhantes, onde não são encontrados benefícios adicionais quando é feita a associação dos dois métodos (pré+pós-condicionamento) e é feita a comparação dos métodos aplicados isoladamente.

Em cirurgias vasculares eletivas é pouco provável benefício significativo do pré-condicionamento isquêmico, pois o músculo esquelético é capaz de resistir a períodos isquêmicos de até várias horas com pouca repercussão clínica para o paciente. Entretanto em procedimentos que envolvam isquemia prolongada, tais como em cirurgias da aorta abdominal ou tóraco-abdominal, reconstruções de vasos mesentéricos, ou procedimentos complexos por traumas, os mesmos podem se tornar mais seguros com o uso do pré-condicionamento isquêmico, ressaltando-se, entretanto as limitações práticas do mesmo em emergências.

Deve ser ressaltado ainda que o pré-condicionamento remoto pode conferir proteção a tecidos ou órgãos distantes. Ensaio clínico demonstram que o pré-condicionamento isquêmico pode reduzir lesões por infarto de miocárdio em cirurgias para correção de aneurismas de aorta abdominal, entretanto mais estudos serão necessários para comprovar sua real utilidade, bem como os métodos para sua aplicação (WALSH et al., 2009).

O pós-condicionamento, pelo menos em humanos, por ser realizado ao final do período isquêmico, apresenta vantagens sobre o pré-condicionamento em decorrência das limitações citadas acima, porém estudos adicionais com certeza serão necessários tendo em vista a grande abrangência destes dois métodos em termos de tecidos ou órgãos, bem como as diferenças de resultados obtidas dentre as diversas espécies animais e os tempos necessários para a obtenção destes efeitos protetores. Acrescentar novas linhas de pesquisa é necessário com o objetivo de estudar o pré e o

pós-condicionamento remoto ou o uso de drogas que venham a produzir resultados semelhantes na proteção aos tecidos.

Concluindo, este trabalho demonstrou que em isquemia parcial produzida pela oclusão da aorta abdominal infra-renal em ratos, o pré bem como o pré+pós-condicionamento protegeram o músculo esquelético da lesão de isquemia e reperfusão com base na reserva de glicogênio. Por outro lado a associação dos dois procedimentos não mostrou vantagens em relação ao pré-condicionamento aplicado isoladamente.

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Concluiu-se que o pré-condicionamento bem como a associação do pré com o pós-condicionamento isquêmico foram capazes de minimizar a lesão tecidual em musculatura estriada de ratos submetidos à isquemia e reperfusão, porém a associação dos métodos não trouxe vantagens adicionais sobre o pré-condicionamento aplicado isoladamente.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

AKIMITSU, T.; GUTE, D. C.; JEROME, S.N. In: Ischemia-Reperfusion injury of skeletal muscle, RG Landes Company (Austin), 1. ed., p. 5-31, 1994.

ANTONIO, L. G.; EVORA, P. R.; PICCINATO, C. E. Use of alprostadil, a stable prostaglandin E1 analogue, for the attenuation of rat skeletal muscle ischemia and reperfusion injury. **Minerva Chir.**, (Torino), v. 64, n. 6, p. 559-64, 2009.

ANTUNES NETO, J. M. F.; PEREIRA-DA-SILVA, L.; MACEDO, D. V. Heat shock proteins as oxidative stress markers in rats submitted to exhaustive intermittent running training **Braz. J. Biomotr.**, (Itaperuna), v. 2, n. 3, p. 160-75, 2008.

ARGAUD, L.; GATEAU-ROESCH, O.; AUGÉUL, L.; COUTURE-LEPETIT, E.; LOUFOUAT J.; GOMEZ L.; ROBERT D.; OVIZE M. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, (Bethesda), v. 294, n. 1, p. 386-91, 2008.

ATTKISS, K. J.; SUSKI, M.; HUNT, T. K.; BUNCKE, H. J. Ischemic preconditioning of skeletal muscle improves tissue oxygenation during reperfusion. **J. Reconstr. Microsurg.**, (New York), v. 15 n. 3, p. 223-8, 1999.

BECKMAN, J. S.; BECKMAN, T. W.; CHEN, J.; MARSHAL P.A.; FREEMAN, B.A. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA** (Washington), v. 87, p. 1620-24, 1990.

BELKIN, M.; WRIGHT, J. G.; LA MORTE, W. L. The role of leukocyte in the pathophysiology of skeletal muscle ischemia injury. **J. Vasc. Surg.**, (Saint Louis), v. 10, n. 1, p. 14-8, 1989.

BEYERSDORF, F.; MATHEIS, G.; KRUGER, S.; HANSELMANN, H.G.; FREISLEBEM, G.; ZIMMER, G.; SATTER, P. Avoiding reperfusion injury after limb revascularization: experimental observation and recommendations for clinical applications. **J. Vasc. Surg.**, (Saint Louis), v. 9, n. 6, p. 757-66, 1989.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BITU-MORENO, J.; FRANCISCHETTI, I.; HAFNER, L. Lesões de isquemia-reperfusão em músculos esqueléticos: fisiopatologia e novas tendências de tratamento, com ênfase em reperfusão controlada. **J Vasc Bras.**, (São Paulo), v. 6, n. 1, p. 113-20, 2002.

BOENGLER, K.; BUECHERT, A.; HEINE, Y.; ROESKES, C.; HILFIKER-KLEINER, D.; HEUSCH, G.; SCHULZ, R. Cardioprotection by ischemic postconditioning is lost in aged and STAT3-deficient mice. **Circ. Res.**, (Baltimore), v. 102, p. 131, 2008.

BOZKURT, A. K. Alpha-tocopherol (Vitamin E) and iloprost attenuate reperfusion injury in skeletal muscle ischemia/reperfusion injury. **J. Cardiovasc. Surg.** (Torino), v. 43, n. 5, p. 693-6, 2002.

BUSHELL, A. J.; KLENERMAN, L.; TAYLOR, S.; DAVIES, H.; GRIERSON, I.; HELLIWELL, T. R.; JACKSON, M. J. Protection against the structural changes induced by ischemia/reperfusion injury. **J. Bone Joint Surg. Br.**, (London), v. 84-B, n. 8, p. 1184-8, 2002.

CAMPOS, E. P. B.; YOSHIDA, W. B.; O papel dos Radicais Livres na Fisiopatologia da Isquemia e Reperfusão em retalhos Cutaneos: Modelos Experimentais e Estratégias de Tratamento. **J. Vasc Bras.**, (São Paulo), v. 3, n. 4, 357-66, 2004.

CARROLL, C. M.; CARROLL, S. M.; OVERGOOR, M. L.; TOBIN, G.; BARKER, J. H. Acute ischemic preconditioning of skeletal muscle prior to flap elevation augments muscle-flap survival. **Plast. Reconstr. Surg.**, (Dallas), v. 100, p. 58, 1997.

CASTRO E SILVA JUNIOR, O.; CENTURION, S. A. R.; PACHECO, E. G.; BRISOTTI, J. L.; OLIVEIRA, A. F.; SASSO, K. Aspectos básicos da lesão de isquemia e reperfusão e do pré-condicionamento isquêmico. **Acta Cir. Bras.**, (São Paulo), v. 17, n. 3, p. 96-100, 2002.

DA CRUZ, C. A.; MASSUDA, C. A.; CHERRI, J.; PICCINATO, C. E. Metabolic alterations of skeletal muscle during ischemia and reperfusion. **J. Cardiovasc. Surg.** (Torino), v. 38, n. 5, p. 473-7, 1997.

DAL MAESTRO, R. F. An approach to free radicals in medicine and biology. **Plast. Reconstr. Surg.**, (Dallas), v. 492, p. 153-68, 1980.

DARLING, C. E.; JIANG, R.; MAYNARD, M.; WHITTAKER, P.; VINTEN-JOHANSEN, J.; PRZYKLENK K. "Postconditioning" via stuttering reperfusion limits myocardial infarct size in rabbit hearts: role of ERK 1/2. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, (Bethesda), v. 289, p. 618-26, 2005.

DAS, M.; DAS, D. K. Molecular mechanism of preconditioning. **IUBMB Life**, (London), v. 60, n. 4, p. 199-203, 2008.

DEYHIMY, D. I.; FLEMING, N. W.; BRODKIN, I. G.; LIU, H. Anesthetic preconditioning combined with postconditioning offers no additional benefit over preconditioning or postconditioning alone. **Anesth. Analg.**, (New York), v. 105, n. 2, p. 316-24, 2007.

DIANA, J. N.; LAUGGHLIN, M. H. Effect of ischemia on capillary pressure and equivalent pore radius in capillaries of isolated dog hind limb. **Circ. Res.**, (Baltimore), v. 35, n. 1, p. 77-101, 1974.

DONATO, M.; D'ANNUNZIO, V.; SABÁN, M.; FLOR, L.; GELPI, R. J. Poscondicionamiento: un nuevo mecanismo protector. Su comparación con el preconditionamiento en el infarto experimental. **Rev. Arg. Cardiol.**, (Buenos Aires), v. 72, n. 4, p. 258-62, 2004.

DONATO, M.; D'ANNUNZIO, V.; BERG, G.; GONZALEZ, G.; SCHREIER, L.; MORALES, C.; WIKINSKI, R. L.; GELPI, R. Ischemic postconditioning reduces infarct size by activation of A1 receptors and K⁺ATP channels in both normal and hypercholesterolemic rabbits. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, (New York), v. 49, n. 5, p. 287-92, 2007.

ESPER, R. J.; NORDABY, R. A.; VILARIÑO, J. O.; PARAGANO, A.; CACHARRÓN, J. L.; MACHADO, R. A. Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal. **Cardiovasc. Diabetol.**, (London), v. 5, p. 4, 2006.

FACUNDO, H.; DEPAULA, J.; KOWALTOWSKI, A. Mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels are redox-sensitive pathways that control reactive oxygen species production. **Free Radic. Biol. Med.** (San Diego), v. 42, p. 1039-48, 2007.

FRANCISCATO, C.; LOPES, S. T. A.; VEIGA, A. P. M.; MARTINS, D. B.; EMANUELLI, M. P. Atividade sérica das enzimas AST, CK e GGT em cavalos Crioulos. **Pesq. Agropec. Bras.** (Brasília), v. 41, n. 10, p. 1561-65, 2006.

GATEAU-ROESCH, O. L.; ARGAUD, L.; OVIZE, M. Mitochondrial permeability transition pore and Postconditioning. **Cardiovasc. Res.**, (Oxford), v. 70, n. 2, p. 264-73, 2006.

GRANFELDT, A.; LEFER, D. J.; VINTEN-JOHANSEN, J. Protective ischaemia in patients: preconditioning and postconditioning. **Cardiovasc. Res.**, (Oxford), v. 83, n. 2, p. 234-46, 2009.

GUTE, D.C.; ISHIDA, T.; YARIMIZU, K. Inflammatory responses to Ischemia and Reperfusion in Skeletal Muscle. **Mol. Cell. Biochem.**, (New York), v. 179, n. 1-2, p. 169-87, 1998.

HAIMOVICI, H. Myopathic-nephrotic-metabolic syndrome and massive acute arterial occlusions. **Arch. Surg.**, (Chicago), v. 106, n. 5, p. 628-9, 1973.

HALKOS, M. E.; KERENDI, F.; CORVERA, J. S.; WANG, N. P.; KIN, H.; PAYNE, C. S.; SUN, H. Y.; GUYTON, R. A.; VINTEN-JOHANSEN, J.; ZHAO, Z. Q. Myocardial protection with postconditioning is not enhanced by ischemic preconditioning. **Ann. Thorac. Surg.**, (Philadelphia), v. 78, p. 961-9, 2004.

HARKIN, D. W.; BARROS, D'SA. A. A.; MCCALLION, K.; HOPER, M.; HALLIDAU, M. I.; CAMPBELL, F.C. Bactericidal/permeability increasing protein attenuates systemic inflammation and acute lung injury in porcine lower limb ischemia-reperfusion injury. **Ann. Surg.**, (Philadelphia), v. 234, n. 2, p. 233-44, 2001.

HARRALSON, M. S.; GROSSI, F. V.; QUAN, E. E.; TECIMER, T.; PEREZ-ABADIA, G.; ANDERSON, G.; BARKER, J.; MALDONADO, C. Ischemic preconditioning of skeletal muscle: Duration of late-phase protection. **Ann. Plast. Surg.**, (Philadelphia), v. 55, n. 2, p. 216-22, 2005.

HAUSENLOY, D. J.; MOCANU, M. M.; YELLON, D. M. Ischemic preconditioning protects by activating pro-survival kinases at reperfusion. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, (Bethesda), v. 88, n. 2, p. 971-6, 2005.

HAUSENLOY, D. J.; MWAMURE, P.; VENUGOPAL, V.; HARRIS, J.; BARNARD, M.; GRUNDY, E. Effect of remote ischaemic preconditioning on myocardial injury in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery: a randomised controlled trial. **Lancet.**, (London), v. 370, n. 9587, p. 542-3, 2007.

HAUSENLOY, D. J.; YELLON, D. M. Remote ischaemic preconditioning: underlying mechanisms and clinical application. **Cardiovasc. Res.**, (Oxford), v. 79, n. 3, p. 377-86, 2008.

HUANG, H.; ZHANG, L.; WANG, Y.; YAO, J.; WENG, H.; WU, H.; CHEN, Z.; LIU, J. Effect of ischemic post-conditioning on spinal cord ischemic-reperfusion injury in rabbits. **Can. J. Anaesth.**, (Ottawa), v. 54, p. 42-8, 2007.

HUFFMYER, J.; RAPHAEL, J. Physiology and pharmacology of myocardial preconditioning and postconditioning. **Semin. Cardiothorac. Vasc. Anesth.**, (New York), v. 13, n. 1, p. 5-18, 2009.

ILIODROMITIS, E. K.; DOWNEY, J. M.; HEUSCH, G.; KREMASTINOS, D. T. What is the optimal postconditioning algorithm? **J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.**, (Los Angeles), v. 14, n. 4, p. 269-73, 2009.

INSERTE, J.; GARCIA-DORADO, D.; RUIZ-MEANA, M.; AGULLÓ, L.; PINA, P.; SOLER-SOLER, J. Ischemic preconditioning attenuates calpain-mediated degradation of structural proteins through a protein kinase A-dependent mechanism. **Cardiovasc. Res.**, (Oxford), v. 64, n. 1, p. 105-14, 2004.

JAMES, M.; DOWNEY, J. M.; COHEN, M. V. We think we see a pattern emerging here. **Circulation**, (Dallas), v. 111, p. 120-21, 2005.

JUHASZOVA, M.; ZOROV, D. B.; YANIV, Y.; NUSS, H. B.; WANG, S.; SOLLOTT, S. J. Role of glycogen synthase kinase-3 beta in cardioprotection. **Circ. Res.**, (Baltimore), v. 104, n. 11, p. 1240-52, 2009.

KIN, H.; ZHAO, Z. Q.; SUN, H. Y.; WANG, N-P.; CORVERA, J. S.; HALKOS, M. E.; KERENDI, R. A.; VINTEN-JOHANSEN, J. Postconditioning attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting events in the early minutes of reperfusion. **Cardiovasc. Res.**, (Oxford), v. 62, n. 1, p. 74-85, 2004.

KIN, R.; ZATTA, A. J.; LOFYE, M. T.; AMERSON, B. S.; HALKOS, M. E.; KERENDI, F.; ZHAO, Z. Q.; GUYTON, R. A.; HEADRICK, J. P.; VINTEN-JOHANSEN J. Postconditioning reduces infarct size via adenosine receptor activation by endogenous adenosin. **Cardiovasc. Res.**, (Oxford), v. 67, n. 1, p. 124-33, 2005.

KLONER, R. A.; REZKALLA, S. H. Preconditioning, postconditioning and their application to clinical cardiology. **Cardiovasc. Res.**, (Oxford), v. 70, n. 2, p. 297-307, 2006.

KUZON, JR., W. M.; WALKER, P.M.; MICKLE, D.S.; HARRIS, K.A.; PYNN B.R.; MCKEE, N.H. An Isolated Skeletal Muscle Model Suitable for Acute Ischemia Reperfusion Injury. **J. Surg. Res.**, (New York), v. 41, n. 1, p. 24-32, 1986.

KUZUYA, T.; HOSHIDA, S.; YAMASHITA, N.; FUJI, H.; OE, H.; HORI, M.; KAMADA, T.; TADA, M. Delayed effects of sublethal ischemia on the acquisition of tolerance to ischemia. **Circ. Res.**, (Baltimore), v. 72, p. 1293-9, 1993.

LIM, S. Y.; DAVIDSON, S. M.; HAUSENLOY, D. J.; YELLON, D. M. Preconditioning and postconditioning: the essential role of the mitochondrial permeability transition pore. **Cardiovasc. Res.**, (Oxford), v. 75, n. 3, p. 530-5, 2007.

LIU, X.; CHEN, H.; ZHAN, B.; XING, B.; ZHOU, J.; ZHU, H.; CHEN, Z. Attenuation of reperfusion injury by renal ischemic postconditioning: the role of NO. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, (New York), v. 359, p. 628-34, 2007.

LOUKOGEORGAKIS, S. P.; PANAGIOTIDOU, A. T.; YELLON, D. M.; DEANFIELD, J. E.; MCALLISTER, R. J. Postconditioning protects against endothelial ischemia-reperfusion injury in the human forearm. **Circulation**, (Dallas), v. 113, p. 1015-9, 2006.

LUDMAN, A. J.; YELLON, D. M.; HAUSENLOY, D. J. Cardiac preconditioning for ischaemia: lost in translation. **Dis. Model. Mech.**, (Cambridge), v. 3, n. 1-2, p. 35-8, 2010.

MANINTVELD, O. C.; HEKKERT, M. T. L.; VAN DER PLOEG, N. T.; VERDOUW, P. D.; DUNCKER, D. J. Interaction between pre and postconditioning in the *In vivo* rat Heart **Exp. Biol. Med.**, (London), v. 234, n. 11, p. 1345-54, 2009.

MARBER, M. S.; LATCHMAN, D. S.; WALKER, J. M.; YELLON, D. M. Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction. **Circulation**, (Dallas), v. 88, p. 1264-74, 1993.

MATTEI, A.; SUTTER, P. M.; MARX, A.; STIERLI, P.; HEBERER, M.; GÜRKE, L. Preconditioning with short cycles improves ischemic tolerance in rat fast- and slow-twitch skeletal muscle. **Eur. Surg. Res.**, (Mainz), v. 32, p. 297-304, 2000.

MELO, M. M.; VERÇOSA JÚNIOR, D.; PINTO, M. C. L.; SILVEIRA, J. B.; FERRAZ, V.; ECCO, R.; PAES, P. R. O. Intoxicação experimental com extratos de *Mascagnia rigida* (Malpighiaceae) em camundongos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, (Belo Horizonte), v. 60, n. 3, p. 631-40, 2008.

MCALLISTER, S. E.; ASHRAFFPOUR, H.; HUANG, N.; CAHOON, N.; MOSES, M. A.; NELIGAN, P. C.; FORREST, C. R.; LIPA, J. E.; PANG, C. Y. Postconditioning for salvage of ischemic skeletal muscle from reperfusion injury: efficacy and mechanism. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, (Bethesda), v. 295, p. 681-9, 2008.

MOUNSEY, R. A.; PANG, C. Y.; FORREST, C. Preconditioning: a new technique for improved muscle flap survival. **Otolaryngol. Head Neck Surg.**, (Alexandria), v. 107, p. 549-52, 1992.

MURRY, C. E.; JENNINGS, R. B.; REIMER, K. A. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. **Circulation**, (Dallas), v. 74, p. 1124-36, 1986.

MURPHY, E.; STEENBERGEN, C. Mechanisms underlying acute protection from cardiac Ischemia-reperfusion Injury. **Physiol. Rev.**, (Bethesda), v. 88, n. 2, p. 581-609, 2008.

NISHINO, Y.; WEBB, I. G.; DAVIDSON, S. M.; AHMED, A. I.; CLARK, J. E.; JACQUET, S.; SHAH, A. M.; MIURA, T.; YELLON, D. M.; AVKIRAN, M.; MARBER, M. S. Glycogen synthase kinase-3 inactivation is not required for ischemic preconditioning or postconditioning in the mouse. **Circ. Res.**, (Baltimore), v. 103, n. 3, p. 307-14, 2008.

OLGUNER, C.; KOCA, U.; KAR, A.; KARCI, A.; İŞLEKEL, H.; CANYILMAZ, M.; MAVIOĞLU, O.; KIZILDAĞ, S.; UNLÜ, G.; ELAR, Z. Ischemic preconditioning attenuates the lipid peroxidation and remote lung injury in the rat model of unilateral lower limb ischemia reperfusion. **Acta. Anaesth. Scand.**, (Copenhagen), v. 50, n. 2, p. 150-5, 2006.

ORBAN, J. C.; LEVRAUT, J.; GINDRE, S.; DEROCHE, S. B.; ICHAI, C.; GRIMAUD, D. Effects of acetylcysteine and ischaemic preconditioning on muscular function and postoperative pain after orthopaedic surgery using a pneumatic tourniquet. **Eur. J. Anaesthesiol.**, (Cambridge), v. 23, n. 12, p. 1025-30, 2006.

PANG, C. Y.; YANG, R. Z.; ZHONG, A.; XU, N.; BOYD, B.; FORREST C. Acute ischaemic preconditioning protects against skeletal muscle infarction in the pig. **Cardiovasc. Res.**, (Oxford), v. 29, n. 6, p. 782-8, 1994.

PAPANASTASIOU, S.; ESTDALE, E.; HOMER-VANNIASINKAM, S.; MATHIE, T. Protective effect of preconditioning and adenosine pretreatment in experimental skeletal muscle reperfusion injury. **Br. J. Surg.**, (London), v. 86, n. 7, p. 916-22, 2002.

PASQUALIN, R. C.; AULER JÚNIOR, J. O. C. Myocardial protection by pre and post-anesthetic conditioning. **Rev. Bras. Anesthesiol.**, (Rio de Janeiro), v. 58, n. 5, p. 506-19, 2008.

PEREZ, R.; GARCIA, M.; CABEZAS, I.; GUZMAN, R.; MERINO, V.; VALENZUELA, S.; GONZALEZ, C. Actividad física y cambios cardiovasculares y bioquímicos del caballo chileno a la competencia de rodeo. **Arch. Med. Vet.**, (Valdivia), v. 29, n. 2, p. 221-34, 1997.

PERRY, M. O.; FANTINI, G. Ischemia: profile of an enemy. Reperfusion injury of skeletal muscle. **J. Vasc. Surg.**, (Saint Louis), v. 6, n. 3, p. 231-4, 1987.

PESCADOR, N.; VILLAR, D.; CIFUENTES, D.; GARCIA-ROCHA, M.; ORTIZ-BARAHONA, A.; VAZQUEZ, S.; ORDOÑEZ, A.; CUEVAS, Y.; SAEZ-MORALES, D.; GARCIA-BERMEJO, M. L.; LANDAZURI, M. O.; GUINOVART, J.; DEL PESO, L. Hypoxia promotes glycogen accumulation through Hypoxia Inducible Factor (HIF)-mediated induction of glycogen synthase-1. **PLoS ONE**, (San Francisco), v. 5, n. 3, p. e9644, 2010.

PEARSON, G.; ROBINSON, F.; BEERS, G. T.; XU, B.; KARANDIKAR, M.; BERMAN, K.; COBB, M. H. Mitogen Activated Protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. **Endocr. Rev.**, (Chevy Chase), v. 22, n. 2, p. 153-83, 2001.

PICCINATO, C. E.; ROSELINO, J. E. S.; MASSUDA, C. A.; CHERRI, J. Lack of chlorpromazine effect on skeletal muscle metabolism after ischemia and a short reperfusion period. **Microsurgery**, (New York), v. 24, n. 3, p. 194-9, 2004.

PICCINATO, C. E. Fisiopatologia da isquemia e reperfusão. In: MAFFEI, F. H. A. (Org.). **Doenças vasculares periféricas**. 4. ed. (Rio de Janeiro): Guanabara Koogan, 2008. v. 1, p. 221-7.

QUAN, E. E.; RAMIREZ, S.; TECIMER, T.; GROSSI, F. V.; BARKER, J. H.; MALDONADO, C. Late-phase ischemic preconditioning in skeletal muscle: is the phenomenon protective? **Microsurgery**, (New York), v. 24, n. 2, p. 151-6, 2004.

QI, W.; KAN, S. L. Protective effect of ischemic preconditioning duration against Ischemia-reperfusion injury of skeletal muscle in rats. **Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi**, (Peking), v. 19, n. 4, p. 274-7, 2005.

REHNI, A. K.; SINGH, N. Role of phosphoinositide 3-kinase in ischemic postconditioning-induced attenuation of cerebral ischemia-evoked behavioral deficits in mice. **Pharmacol. Rep.** (Bethesda), v. 59, p. 192-8, 2007.

ROMANQUE, P. U.; URIBE, M. M.; VIDELA, L. A. Mecanismos moleculares en el daño por isquemia-reperfusión hepática y en el preacondicionamiento isquêmico. **Rev Méd Chile**, (Santiago), v. 133, p. 469-76, 2005.

RUIZ-MEANA, M.; RODRÍGUEZ-SINOVAS, A.; CABESTRERO, A.; BOENGLER, K.; HEUSCH, G.; GARCIA-DORADO, D. Mitochondrial connexin 43 as a new player in the pathophysiology of myocardial ischaemia-reperfusion injury. **Cardiovasc. Res.**, (Oxford), v. 77, n. 2, p. 325-33, 2008.

SAITA, Y.; YOKOYAMA, K.; NAKAMURA, K.; ITOMAN, M. Protective effect of ischaemic preconditioning against ischemia-induced reperfusion injury of skeletal muscle: how many preconditioning cycles are appropriate? **Br. J. Plast. Surg.**, (London), v. 55, n. 3, p. 241-5, 2002.

SANTOS, C. H. M.; GOMES, O. M.; PONTES, J. C. D. V.; MIJJI, L. N. O.; BISPO, M. A. Postconditioning: preliminary results of this new option in the treatment of mesenteric ischemia and reperfusion. **Cardiovasc. Sci. Forum**, (Belo Horizonte), v. 2, n. 2, p. 14-25, 2007.

SANTOS, C. H. M.; GOMES, O. M.; PONTES, J. C. D. V.; MIJI, L. N. O.; BISPO, M. A. The ischemic preconditioning and postconditioning effect on the intestinal mucosa of rats undergoing mesenteric ischemia/reperfusion procedure. **Acta Cir. Bras.**, (São Paulo), v. 23, n. 1, p. 22-8, 2008.

SCHALLER, B.; GRAF, R. Cerebral ischemic preconditioning an experimental phenomenon or a clinical important entity of stroke prevention? **J. Neurol.**, (München), v. 249, p. 1503-11, 2002.

SCHIPKE, J. D.; HALKOS, M. E.; KERENDI, F.; GAMS, E.; VINTEN-JOHANSEN, J. Postconditioning: a brief review. **Arch. Med. Sci.**, (Lodz), v. 2, p. 137-45, 2006.

SCHOEN, M.; ROTTER, R.; GIERER, P.; GRADL, G.; STRAUSS, U.; JONAS, L.; MITTLMEIER, T.; VOLLMAR, B. Ischemic preconditioning prevents skeletal muscle tissue injury, but not nerve lesion upon tourniquet-induced ischemia. **J. Trauma**, (San Antonio), v. 63, n. 4, p. 788-97, 2007.

SCHULZ, R.; HEUSCH, G. Protection by ischemic preconditioning and postconditioning. **SciTopics**, 2008. Disponível em: <http://www.scitopics.com/Protection_by_ischemic_preconditioning_and_postconditioning.html>. Acesso em: 25 mar. 2010.

SILVEIRA, M.; YOSHIDA, W. B. Ischemia and reperfusion in skeletal muscle: injury mechanisms and treatment perspectives. **J. Vasc. Bras.**, (São Paulo), v. 3, n. 4, p. 367-78, 2004.

SKYSCHALLY, A.; VAN CASTER, P.; BOENGLER, K.; GRES, P.; MUSIOLIK, J.; SCHILAWA, D.; SCHULZ, R.; HEUSCH, G. Ischemic postconditioning in pigs: No causal role for RISK activation. **Circ. Res.**, (Baltimore), v. 104, n. 1, p. 15-8, 2009.

SOUZA, A. C., PICCINATO, C. E.; CHERRI, J.; MORIYA, T. Mecanismos Celulares e Moleculares da Lesão de Isquemia e Reperfusão de Músculo Esquelético. **Cir. Vasc. Angiol.**, (São Paulo), v. 17, n. 3, p. 80-6, 2001.

STAAT, P.; RIOUFOL, G.; PIOT, C.; COTTIN, Y.; CUNG, T.T.; L'HUILLIER, I.; AUPETIT, J. F.; BONNEFOY, E.; FINET, G.; ANDRE-FOUET, X.; OVIZE, M. Postconditioning the human heart. **Circulation**, (Dallas), v. 112, p. 2143-8, 2005.

STROCK, P.E.; MAJNO, G. Vascular Responses to Experimental Tourniquet Ischemia. **Surg. Gynecol. Obstet.**, (Chicago), v. 129, n. 2, p. 309-18, 1969.

SUN, H. Y.; WANG, N. P.; KERENDI, F.; HALKOS, M.; KIN, H.; GUYTON, R. A.; VINTEN-JOHANSEN, J.; ZHAO, Z. Q. Hypoxic postconditioning reduces cardiomyocyte loss by inhibiting ROS generation and intracellular Ca^{2+} overload. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, (Bethesda), v. 288, p. 1900-8, 2005.

SUVAL, W. D.; DURAN, W. N.; BORIC, M. P.; HOBSON, R. W. 3rd.; BERENDSEN, P. B.; RITTER A.B. Microvascular transport and endothelial cell alterations preceding skeletal muscle damage in ischemia and reperfusion injury. **Am. J. Surg.**, (New York), v. 154, n. 2, p. 211-18, 1987.

SZABÓ, A.; VARGA, R.; KERESZTES, M.; VÍZLER, C.; NÉMETH, I.; RÁZGA, Z.; BOROS, M. Ischemic limb preconditioning down regulates systemic inflammatory activation. **J. Orthop. Res.**, (New York), v. 27, n. 7, p. 897-902, 2009.

SZIJÁRTÓ, A.; GYURKOVICS, A.; ARÁNYI, P.; ONODY, P.; STANGL, R.; TÁTRAI, M.; LOTZ, G.; MIHÁLY, Z.; HEGEDÜS, V.; BLÁZOVICS, A.; KUPCSULIK, P. Effect of postconditioning in major vascular operations on rats. **Magyar Sebészet**, (Győr), v. 62, n. 4, p. 180-7, 2009.

TATLIDEDE, S.; MCCORMACK, M. C.; EBERLIN, K. R.; NGUYEN, J. T.; RANDOLPH, M. A.; AUSTEN, W. G. A novel murine island skin flap for ischemic preconditioning. **J. Surg. Res.**, (Los Angeles), v. 154, n. 1, p. 112-7, 2009.

TEIXEIRA, A. R. F.; MOLAN, N. T.; KUBRUSLY, M. S.; BELLODI-PRIVATO, M.; COELHO, A. M.; LEITE, K. R.; MACHADO, M. A. C.; BACCHELLA, T.; MACHADO, M. C. C. Postconditioning ameliorates lipid peroxidation in liver ischemia-reperfusion injury in rats. **Acta Cir. Bras.**, (São Paulo), v. 24, n. 1, p. 52-6, 2009.

THAVEAU, F.; ZOLL, J.; ROUYER, O.; CHAFKE, N.; KRETZ, J. G.; PIQUARD, F.; GENY, B. Ischemic preconditioning specifically restores complexes I and II activities of the mitochondrial respiratory chain in ischemic skeletal muscle. **J. Vasc. Surg.**, (Saint Louis), v. 46, n. 3, p. 541-7, 2007.

THIBAUT, H. Long-term benefit of postconditioning. **Circulation**, (Dallas), v. 117, n. 8, p. 1037-44, 2008.

TORRAS, J.; HERRERO-FRESNED, I.; LLOBERAS, N.; RIERA, M.; CRUZADO, J.; GRINYÓ, J. Promising effects of ischemic preconditioning in renal transplantation **Kidney Int.**, (New York), v. 61, n. 6, p. 2218-27, 2002.

TZENG E, BILLIAR T. Nitric Oxide In Ischemia – Reperfusion Injury of Skeletal Muscle. **RG Landes Company** (Austin), 1. ed. , p. 103-24, 1994.

XIAORONG, H.; HONG, J.; FENNA, M.; CHANGWU, X.; CUI, B. O.; HUAZHI, W.; BING, W.; ZHIBING, L. Similarities between ischemic preconditioning and postconditioning in myocardial ischemia/reperfusion injury. **Int. J. Cardiol.**, (London), v. 144, n. 1, p. 135-6, 2010.

XIN, P.; ZHU, W.; LI, J.; MA, S.; WANG, L.; LIU, M.; LI, J.; WEI, M.; REDINGTON, A. N. Combined local ischemic postconditioning and remote preconditioning recapitulate the cardioprotective effects of local ischemic preconditioning. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, (Bethesda), v. 298, n. 6, p. 1819-31, 2010.

WALKER NI, HARMON BW, GOBE GC. Patterns of cell death. **Methods Achiev. Exp. Pathol.**, (Basel), v. 13, p. 18-54, 1988.

WALSH, S. R.; TANG, T. Y.; SADAT, U.; DUTKA, D. P.; GAUNT, M. E. Cardioprotection by remote ischaemic preconditioning. **Br. J. Anaesth.**, (Oxford), v. 99, n. 5, p. 611-6, 2007.

WALSH, S. R.; TANG, T. Y.; SADAT, U.; GAUNT, M. E. Remote ischemic preconditioning in major vascular surgery. **J. Vasc. Surg.**, (Saint Louis), v. 49, p. 240-3, 2009.

WANG, Q. L.; WANG, G.; WANG, H. M.; PEI, G. X. Effect of pretreatment with adenosine, diazoxide or ischemic preconditioning on ischemia- reperfusion injury in the limbs of rats. **Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao**, (Shangai), v. 22, n. 7, p. 617-9, 2002.

WANG, K. X.; HU, S. Y.; JIANG, X. S.; ZHU, M.; JIN, B.; ZHANG, G. Y.; CHEN, B. Protective effects of ischaemic postconditioning on warm/cold ischaemic reperfusion injury in rat liver: a comparative study with ischaemic preconditioning. **Chin. Med. J.**, (Beijing), v. 121, n. 20, p. 2004-9, 2008.

WEISS, R. G.; DE ALBUQUERQUE, C. P.; VANDEGAER, K.; CHACKO, V. P.; GERSTENBLITH, G. Attenuated glycogenolysis reduces glycolytic catabolite accumulation during Ischemia in preconditioned rat hearts. **Circ. Res.**, (Dallas), v. 79, n. 3, p. 435-46, 1996.

WELBOURN, C. R. B.; GOLDMAN, G.; PATERSON, I. S.; VALRI, C. R.; SHEPRO, D.; HECHTMAN, H.B. Pathophysiology of ischemia reperfusion injury: central role of neutrophil Br **J. Surg.**, (London), v. 78, p. 651-5, 1991.

WU, B. Q.; CHU, W. W.; ZHANG, L. Y.; WANG, P.; MA, Q. Y.; WANG, D. H. Protection of preconditioning, postconditioning and combined therapy against hepatic ischemia/reperfusion injury. **Chin. J. Traumatol.**, (Singapore), v. 10, n. 4, p. 223-7, 2007.

ZAHIR, T. M.; ZAHIR, K. S.; SYED, S. A.; RESTFIFO, R. J. Ischemic preconditioning of musculocutaneous flaps: effects of ischemia cycle length and number of cycles. **Ann. Plast. Surg.**, (Philadelphia), v. 40, p. 430-5, 1998.

ZHAO, Z. Q.; CORVERA, J. S.; HALKOS, M. E.; KERENDI, F.; WANG, N. P.; GUYTON, R. A.; VINTEN-JOHANSEN, J. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, (Bethesda), v. 285, p. 579-88, 2003.

ZHANG, W. X.; YIN, W.; ZHANG, L.; WANG, L. H.; BAO, L.; TUO, H. F.; ZHOU, L. F.; WANG, C. C. Preconditioning and postconditioning reduce hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. **Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.**, (Hangzhou), v. 8, p. 586-90, 2009.

APÊNDICES

APÊNDICES

APÊNDICE A – TABELAS

Tabela 1 - Valores de malondialdeído (MDA) tissular, em μ mol, nos grupos estudados: Grupo Sham, Grupo Controle (Controle), Grupo Pré-condicionamento isquêmico (Pré), Grupo Pós-condicionamento isquêmico (Pós), Grupo Pré e pós-condicionamento isquêmico (Pré-Pós).

Rato	Sham	Control e	Pré	Pós	Pré+Pós
1	0,04	0,35	0,45	0,22	0,48
2	0,05	0,89	0,47	0,13	0,40
3	0,08	0,49	0,39	0,13	0,38
4	0,15	0,22	0,40	0,26	0,16
5	0,06	0,35	0,24	0,23	0,20
6	0,11	0,26	0,36	0,19	0,43
7	0,09	0,36	0,22	0,13	0,19
8	0,14	0,11	0,19	0,25	0,20
9	0,08	0,31	0,13	0,30	0,24
10	0,13	0,14	0,20	0,18	0,12
Média	0,09	0,35	0,31	0,2	0,28

Tabela 2 - Valores do Glicogênio tissular, em mg %, nos grupos estudados: Grupo Sham, Grupo Controle (Controle), Grupo Pré-condicionamento isquêmico (Pré), Grupo Pós-condicionamento isquêmico (Pós), Grupo Pré e pós-condicionamento isquêmico (Pré-Pós).

Rato	Sham	Controle	Pré	Pós	Pré+Pós
1	x	0,17	0,61	0,27	x
2	0,42	0,13	0,63	0,21	0,41
3	0,57	0,15	0,48	0,26	0,41
4	0,63	x	0,45	0,33	0,51
5	0,74	0,24	0,09	0,08	0,50
6	0,38	0,22	0,48	0,52	0,48
7	0,64	0,09	0,63	0,43	0,56
8	0,5	0,31	0,47	x	0,41
9	0,66	0,45	0,42	0,55	0,52
10	0,36	0,31	0,35	0,36	0,56
Média	0,54	0,23	0,46	0,33	0,48

Tabela 3. Valores de aspartato aminotransferase (AST), em U/L, nos grupos estudados: Grupo Sham, Grupo Controle (Controle), Grupo Pré-condicionamento isquêmico (Pré), Grupo Pós-condicionamento isquêmico (Pós) e Grupo Pré e pós-condicionamento isquêmico (Pré-Pós).

Rato	Sham	Control	Pré	Pós	Pré+Pós
1	x	100	133	65	183
2	91	63	138	138	136
3	90	82	133	122	124
4	77	79	126	77	166
5	61	94	209	106	246
6	119	75	222	82	227
7	180	204	185	73	186
8	193	68	150	115	125
9	136	115	129	166	164
10	114	138	121	127	143
Média	117,89	101,8	154,6	107,1	170

Tabela 4 - Valores de desidrogenase láctica (LDH), em U/L, nos grupos estudados: Grupo Sham, Grupo Controle (Controle), Grupo Pré-condicionamento isquêmico (Pré), Grupo Pós-condicionamento isquêmico (Pós), Grupo Pré e pós-condicionamento isquêmico (Pré-Pós).

Ratos	Sham	Controle	Pré	Pós	Pré+Pós
1	X	744	1800	700	1689
2	403	589	2433	1089	1733
3	1227	644	1511	1911	1000
4	671	1511	1033	611	967
5	483	1533	1144	789	1455
6	2866	755	1455	989	1344
7	4326	2066	1789	689	1522
8	4473	1444	1211	1844	1389
9	2803	1255	611	1455	700
10	2533	1100	722	622	678
Média	2198,33	1164,1	1370,9	1069,9	1247,7

Tabela 5. - Valores de Creatinino fosfoquinase (CK), em U/L, nos grupos estudados: Grupo Sham, Grupo Controle (Controle), Grupo Pré-condicionamento isquêmico (Pré), Grupo Pós-condicionamento isquêmico (Pós), Grupo Pré e pós-condicionamento isquêmico (Pré-Pós).

Ratos	Sham	Controle	Pré	Pós	Pré+Pós
1	X	5775	3805	1616	7060
2	1380	1723	2620	4800	3380
3	1673	3670	3965	7265	5040
4	1101	2310	5110	3435	1698
5	647	4200	3932	3380	3460
6	813	1974	3460	3964	2078
7	1088	5590	4961	2409	4818
8	1982	3919	5941	2350	2849
9	1218	6520	4152	6515	2829
10	1088	10530	1717	4161	2557
Média	1221,11	4621,1	3966,3	3744,86	3576,9

Tabela 6 - Peso, em gramas, dos animais, nos grupos estudados: Grupo *Sham*, Grupo Controle (Controle), Grupo Pré-condicionamento isquêmico (Pré), Grupo Pós-condicionamento isquêmico (Pós), Grupo Pré e pós-condicionamento isquêmico (Pré-Pós).

Ratos	<i>Sham</i>	Controle	Pré	Pós	Pré+Pós
1	250	256	308	296	258
2	250	284	300	298	270
3	250	295	308	269	300
4	250	350	305	330	430
5	250	292	360	258	380
6	340	325	345	360	260
7	260	320	360	420	300
8	330	294	400	322	352
9	310	410	270	325	380
10	326	380	300	340	363
Média	281,6	320,6	325,6	321,8	329,3

ANEXOS

ANEXOS

ANEXO A – Aprovação pela Comissão de Ética em Experimentação em Animal, para utilização de animais em projetos de pesquisa.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

— Comissão de Ética em Experimentação Animal —

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 037/2008, sobre o projeto intitulado “*Precondicionamento e poscondicionamento isquêmico em músculo esquelético de ratos*”, sob a responsabilidade do **Professor Doutor Carlos Eli Piccinato** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CETEA) em reunião de **28 de julho de 2008**.

(We certify that the protocol n° 037/2008, about “*The ischemic preconditioning and postconditioning effect on rat skeletal muscle*”, agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the COLLEGE OF MEDICINE OF RIBEIRÃO PRETO OF THE UNIVERSITY OF SÃO PAULO – ETHICAL COMMISSION OF ETHICS IN ANIMAL RESEARCH (CETEA) in **07/28/2008** meeting).

Ribeirão Preto, 28 de julho de 2008.

Prof. Dr. Eduardo Melani Rocha
Presidente da Comissão de Ética em
Experimentação Animal