Fabício de Oliveira Frazílio

Avaliação dos precursores da apoptose neuronal em preparados citosólicos, mitocondriais e nucleares do córtex cerebral frontal e hipocampo de porcos submetidos à hemodiluição normovolêmica aguda

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

Programa: Anestesiologia

Orientadora: Profa. Dra. Denise Tabacchi
Fantoni

São Paulo

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Frazílio, Fabrício de Oliveira

Avaliação dos precursores da apoptose neuronal em preparados citosólicos, mitocondriais e nucleares do córtex cerebral frontal e hipocampo de porcos submetidos à hemodiluição normovolêmica aguda / Fabrício de Oliveira Frazílio. -- São Paulo, 2011.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Anestesiologia.

Orientadora: Denise Tabacchi Fantoni.

Descritores: 1.Apoptose 2.Córtex cerebral 3.Hipocampo 4.Suíños
5.Hemodiluição normovolêmica aguda

USP/FM/DBD-399/11

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação.

Referências: adaptado do *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Sousa Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

DEDICATÓRIA

À minha esposa Maria Paula Ferreira Fialho Frazílio, minha inspiração, sem ela nada disso seria possível ou valeria a pena.

Aos meus pais, José Carlos Frazílio e Ivete de Oliveira Frazílio, pelo amor, carinho, dedicação e pelo exemplo de vida a ser seguido.

Ao meu irmão Fabiano de Oliveira Frazílio, pelos grandes ensinamentos na Medicina Veterinária.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado saúde e força para o desenvolvimento deste trabalho.

À professora Dra. Denise Tabacchi Fantoni pela oportunidade, amizade e pelos grandes ensinamentos científicos ao longo de todo esse trabalho.

Ao professor Dr. José Otávio Costa Auler Junior pela oportunidade e confiança.

Ao professor Dr. Gerson Chadi pela grande oportunidade de trabalhar com toda sua equipe no Laboratório de Investigação Médica LIM45 e pelos ensinamentos.

À pesquisadora Dra. Denise Aya Otsuki pela ajuda indispensável para a realização deste trabalho e pela amizade construída durante este tempo de convivência.

À pesquisadora Dra. Jéssica Ruivo Maximino pela grande ajuda na realização da etapa laboratorial deste trabalho.

Ao Professor Dr. Edmar Zanoteli pela ajuda na realização deste trabalho.

Aos Professores da disciplina de Anestesiologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo FMVZ-USP, pela ajuda e pelos ensinamentos.

Ao Professor Rafael DeRossi, pela grande amizade e por seus ensinamentos durante toda minha carreira.

Aos pós-graduandos do Laboratório LIM45, em especial à Chary Ely Martin Marquez Batista, Gabriela Pintar de Oliveira, Juliana Milani Scorisa, Tatiana Duobles, Thaís Moura e Chrystian Junqueira Alves.

Ao técnico do laboratório LIM08, Gilberto de Melo Nascimento, um grande companheiro nos longos períodos de laboratório e um grande amigo.

Aos funcionários do LIM45, Florence, Sarah e Gilmar, pela grande ajuda no decorrer deste experimento.

A todos os Pós-graduandos da Anestesiologia que sempre me apoiaram durante essa caminhada.

Aos amigos Rafael Parra Lessa e Alessandro Rodrigues de Carvalho Martins, grandes amigos e companheiros de república.

Ao grande amigo Thalles Monteiro Ovando pelo apoio dado durante o desenvolvimento deste projeto.

A todos os amigos que me ajudaram de forma indireta para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO	2
2 OBJETIVO	6
3 REVISÃO DE LITERATURA	8
3.1 Hemodiluição normovolêmica aguda	8
3.2 Apoptose neuronal	13
4 MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1 Local de realização e comissão de ética	20
4.2 Animais	20
4.3 Anestesia	21
4.4 Preparo dos animais	22
4.5 Procedimento experimental	23
4.6 Parâmetros hemodinâmicos	25
4.7 Processamento do tecido	27
4.7.1 Extração de proteína total do córtex cerebral	27
4.7.2 Técnica de isolamento das frações subcelulares (nuclear e mitocondrial) e extração das proteínas	27
4.7.3 Isolamento da fração citosólica do hipocampo	32

4.8 Western blot das proteínas pro-apoptótica Bax e anti-apoptótica Bcl-x nas preparações de extração de proteína total de córtex frontal, frações nucleares e mitocondriais	32
4.9 Western blot do anticorpo anti-NeuN em extração de proteína total do córtex frontal	33
4.10 Determinação da atividade das caspases 3 e 9 na fração citosólica do hipocampo e mitocondrial do córtex frontal	34
4.11 Determinação da fragmentação do DNA nuclear e mitocondrial	35
4.12 Delineamento do experimento	36
4.13 Descarte dos animais	37
4.14 Análise estatística	37
5 RESULTADOS	40
5.1 Avaliação dos marcadores de apoptose	40
5.2 Avaliação dos parâmetros hemodinâmicos e hemogasométricos	55
6 DISCUSSÃO	62
7 CONCLUSÃO	70
8 ANEXOS	72
9 REFERÊNCIAS	87

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Via intrínseca da apoptose	16
Figura 2. Tecido cortical pronto para ser lavado e picotado	29
Figura 3. Núcleos neuronais de tecido cortical	30
Figura 4. Western blot de laminina-A no extrato de proteína total, frações nuclear e mitocondrial	31
Figura 5. Western blot representativo da expressão de proteína pró-apoptótica Bax no extrato de proteína total do córtex frontal nos grupos controle, Ht 15%, Ht 10% e hipóxia-hipóxica	41
Figura 6. Western blot representativo da expressão de proteína pró-apoptótica Bax na fração mitocondrial do córtex frontal nos grupos controle, Ht 15%, Ht 10% e hipóxia-hipóxica	42
Figura 7. Western blot representativo da expressão de proteína pró-apoptótica Bax na fração nuclear do córtex frontal nos grupos controle, Ht 15%, Ht 10% e hipóxia-hipóxica	43
Figura 8. Western blot representativo da expressão de proteína anti-apoptótica Bcl-x no extrato de proteína total do córtex frontal nos grupos controle, Ht 15%, Ht 10% e hipóxia-hipóxica	44
Figura 9. Western blot representativo da expressão de proteína anti-apoptótica Bcl-x na fração mitocondrial de córtex frontal nos grupos controle, Ht 15%, Ht 10% e hipóxia-hipóxica	45

Figura 10. Western blot representativo da expressão de proteína anti-apoptótica Bcl-x na fração nuclear de córtex frontal nos grupos controle, Ht 15%, Ht 10% e hipóxia-hipóxica	46
Figura 11. Western blot representativo da expressão de NeuN 46 kDa no extrato de proteína total de córtex frontal nos grupos controle, Ht 10%, Ht 15% e hipóxia-hipóxica	47
Figura 12. Western blot representativo da expressão de NeuN 48 kDa no extrato de proteína total de córtex frontal nos grupos controle, Ht 15%, Ht 10% e hipóxia-hipóxica	48
Figura 13. Atividade da caspase 9 na fração citosólica do hipocampo nos grupos controle, Ht 15%, Ht 10% e hipóxia-hipóxica	49
Figura 14. Atividade da caspase 9 na fração mitocondrial nos grupos controle, Ht 15%, Ht 10% e hipóxia-hipóxica	50
Figura 15. Atividade da caspase 3 na fração citosólica do hipocampo nos grupos controle, Ht 15%, Ht 10% e hipóxia-hipóxica	51
Figura 16. Atividade da caspase 3 na fração mitocondrial nos grupos controle, Ht 15%, Ht 10% e hipóxia-hipóxica	52
Figura 17. Efeito da hipóxia na fragmentação do DNA mitocondrial no córtex cerebral. Gel representativo contendo fragmentos de DNA mitocondrial do grupo controle, Ht 15%, Ht 10% e hipóxia-hipóxica	53
Figura 18. Avaliação da fragmentação do DNA mitocondrial no córtex cerebral dos grupos controle, Ht 15% e Ht 10%	53

Figura 19. Efeito da hipóxia na fragmentação do DNA nuclear no córtex cerebral. Gel representativo contendo fragmentos de DNA nuclear do grupo controle, Ht 15%, Ht 10% e do grupo hipóxia-hipóxica 54

Figura 20. Avaliação da fragmentação do DNA nuclear no córtex cerebral dos grupos controle, Ht 15%, Ht 10% e hipóxia-hipóxica 54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros hemodinâmicos dos animais do grupo Controle, hematócrito 15% e hematócrito 10%	57
Tabela 2. Gases sangüíneos e eletrólitos dos animais do grupo Controle, hematócrito 15% e hematócrito 10%	59
Tabela 3. Parâmetros de oxigenação dos animais do grupo Controle, hematócrito 15% e hematócrito 10%	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<	Menor
>	Maior
AP	Artéria pulmonar
ATP	Adenosina trifosfato
AVC	Acidente vascular cerebral
BSA	Albumina bovina
CAD	DNAase caspase ativada
CAM	Concentração alveolar mínima
cm	Centímetro
cmH ₂ O	Centímetro de água
DC	Débito cardíaco
DEVD-AFC	Substrato Fluorogênico que reconhece caspase 3
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGTA	Ácido etilenoglicol-bis (β -aminoetiléter)-N,N,N',N'- tetracético
FADD/MORT-1	Receptor de morte
FC	Frequência cardíaca
FiO ₂	Fração inspirada de oxigênio
g/dl	Gramas por decilitro
HCl	Ácido clorídrico

Hd	Hematócrito desejado
HEPES	Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2' Etanossulfônico
Hi	Hematócrito inicial
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
Hm	Média dos hematócritos
HNA	Hemodiluição normovolêmica aguda
Ht	Hematócrito
IC	Índice cardíaco
IDO ₂	Índice de transporte de oxigênio
IRVP	Índice de resistência vascular pulmonar
IRVS	Índice de resistência vascular periférica
IS	Índice sistólico
IV	Intravenoso
IVO ₂	Índice de consumo de oxigênio
KDa	Quilodalton
LEHD-AFC	Substrato Fluorogênico que reconhece caspase 9
M	Molar
mg/kg	Miligrama por quilo
ml	Mililitro
ml/Kg	Mililitro por quilo
mM	Milimolar
mmHg	Milímetros de mercúrio
Na ₃ VO ₄	Ortovanadato de sódio

NaCl	Cloreto de Sódio
O ₂	Oxigênio
PAD	Pressão arterial diastólica
PADd	Pressão do átrio direito
PAM	Pressão arterial média
PaO ₂	Pressão parcial de oxigênio
PAP	Pressão de artéria pulmonar
PAS	Pressão arterial sistólica
pH	Potencial hidrogeniônico
PMSF	Fluoreto de fenilmetil- sulfonil
POAP	Pressão de oclusão de artéria pulmonar
PVDF	Fluoreto de Polivinilideno
PVO ₂	Pressão parcial de oxigênio no sangue venoso
rpm	Rotação por minuto
rTNF	Receptor de fator de necrose tumoral
SVO ₂	Saturação de oxigênio no sangue venoso misto
TBS	Solução tampão Tris
TBS-T	Solução tampão Tris acrescida de tween-20
TEO ₂	Taxa de extração de oxigênio
V	Volume
VES	Volume estimado de sangue

RESUMO

FRAZÍLIO FO. Avaliação dos precursores da apoptose neuronal em preparados citosólicos, mitocondriais e nucleares do córtex cerebral frontal e hipocampo de porcos submetidos à hemodiluição normovolêmica aguda (tese). São Paulo. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, SP. Brasil.

Introdução: A anemia aguda tem sido associada com distúrbios neurofisiológicos e cognitivos em pacientes saudáveis. Evidências experimentais sugerem que a hemodiluição pode aumentar lesões cerebrais, limitando o suprimento de oxigênio ao tecido cerebral. No entanto, o mecanismo exato pelo qual as lesões cerebrais ocorrem em pacientes anêmicos ainda não está claramente definido. O objetivo desse estudo foi avaliar os precursores da apoptose neuronal Bax, Bcl-x no córtex frontal, atividade das caspases 3 e 9 na fração citosólica do hipocampo e na fração mitocondrial do córtex frontal, assim como a fragmentação do DNA na fração nuclear e mitocondrial do córtex frontal, após hemodiluição normovolêmica aguda. **Métodos:** Vinte e quatro porcos foram anestesiados e randomizados em 4 grupos de 6 animais: Controle, hemodiluição normovolêmica aguda (HNA) com hematócrito alvo de 15% (Ht 15%), HNA com hematócrito alvo de 10% (Ht 10%) e hipóxia-hipóxica (HH). A HNA foi realizada com 1ml de hidroxetil amido (130/0,4) por ml de sangue retirado, até o hematócrito alvo desejado (10 ou 15%). O HH consistiu de ventilação com baixa fração expirada de O₂ (FiO₂), sendo de 6% por 60 minutos, servindo como grupo controle positivo. Os animais do grupo controle não sofreram nenhuma dessas intervenções. As proteínas pró-apoptóticas Bax e anti-apoptóticas Bcl-x foram avaliadas por Western blotting nas frações nucleares e mitocondriais do córtex frontal. A atividade das caspases 3 e 9 foi avaliada nas frações mitocondrial e citosólica do hipocampo por espectrofluorometria. A fragmentação do DNA foi avaliada por eletroforese nas frações nuclear e mitocondrial do córtex frontal. Os dados foram comparados por análise de

variância (ANOVA) seguida por teste de Tukey ($p < 0,05$). **Resultados:** Não foi observada diferença significativa entre os grupos controle, Ht 15% e Ht 10% em relação à proteína pró-apoptótica Bax nas frações nuclear e mitocondrial. Entretanto, o grupo HH foi significativamente diferente dos grupos controle e Ht 15% na fração nuclear e de todos os grupos na fração mitocondrial. Não foi encontrada diferença significativa em relação à Bcl-x. A atividade das caspases 3 e 9 nas frações mitocondrial e nuclear foi diferente no grupo HH quando comparado com os demais grupos. Não foi observada diferença significativa em relação à fragmentação do DNA entre os grupos controle, Ht 15% e Ht 10%. **Conclusão:** A avaliação dos precursores da apoptose demonstrou que a hemodiluição normovolêmica aguda com hematócrito alvo de 15% e 10% não induziu apoptose, sugerindo que a oxigenação cerebral foi preservada.

Descritores: 1.Apoptose 2.Córtex cerebral 3.Hipocampo 4.Suínos
5.Hemodiluição normovolêmica aguda

ABSTRACT

FRAZILIO FO. Evaluation of neuronal apoptosis precursors in cytosolic, mitochondrial and nuclear fraction of cerebral cortex and hippocampus in pigs after acute normovolemic hemodilution (thesis). São Paulo. “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”, SP. Brazil.

Background: Acute anemia has been associated with neurophysiologic and cognitive dysfunctions in healthy patients. Experimental evidences suggest that hemodilution may increase cerebral lesions, limiting oxygen supply to the brain tissue. Nevertheless, the exact mechanisms through which cerebral lesions occur in anemic patients haven't been clearly defined. Therefore, the objective of the present study was to evaluate neuronal apoptosis precursors Bax, Bcl-x in the frontal cortex, caspase 3 and 9 activity in the mitochondrial and cytosolic fractions of the hippocampus, even as DNA fragmentation in the mitochondrial and nuclear fractions of the frontal cortex after acute normovolemic hemodilution. **Methods:** Twenty four pigs were anesthetized and randomized into 4 groups of 6 animals: sham, acute normovolemic hemodilution (ANH) to reach a hematocrit of 15% (Ht 15%), ANH to reach a hematocrit of 10% (Ht 10%) and hypoxic-hypoxia (HH). ANH was performed with 1ml hydroxyethyl starch 130/0.4 (HES) per ml of blood withdrawn to the desired target hematocrit (10 or 15%). HH consisted of ventilation with low fraction of inspired oxygen (FiO₂) of 6% for 60 minutes, serving as a positive control group. Sham animals were not involved in any of these interventions. Pro-apoptotic Bax and anti-apoptotic Bcl-x proteins were evaluated by Western blotting in nuclear and mitochondrial fractions of the frontal cortex and activities of caspases-3 and-9 were evaluated in the mitochondrial and cytosolic fractions of the hippocampus by spectrofluorometry. DNA fragmentation was evaluated by electrophoresis in the mitochondrial and nuclear fraction. Data were compared by analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test ($p < 0.05$). **Results:** No statistical significance was found among sham, Ht 15% or Ht 10% groups regarding pro-apoptotic

protein Bax, in nuclear or mitochondrial fractions. However, group HH presented significant difference from sham and Ht 15% groups in the nuclear fraction and from all groups in the mitochondrial fraction. No statistical significance was found with Bcl-x. The activities of caspases-3 and-9 in cytosolic and mitochondrial fractions were statistically different in group HH when compared with all other groups. No statistical significance was found in relation to DNA fragmentation among sham, Ht 15% or Ht 10%. **Conclusion:** The evaluation of apoptosis precursors demonstrated that ANH with target hematocrit 15% and 10% did not induce neuronal lesion, suggesting that cerebral oxygenation was preserved.

Descriptors: 1.Apoptosis 2.Frontal cortex 3.Hippocampus 4.Swine 5.Acute normovolemic hemodilution

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Procedimentos cirúrgicos extensos, associados a grandes perdas sanguíneas estão se tornando cada vez mais frequentes, aumentando a necessidade de reposição de sangue total e seus componentes nos períodos trans e pós-operatório.¹ A anemia, perda sanguínea e hemodiluição estão muitas vezes associados ao aumento da incidência de acidente vascular cerebral (AVC), da mortalidade² e de distúrbios cognitivos.³

Apesar da transfusão de sangue ser comumente usada para tratar esses pacientes, a utilização de sangue homólogo vem sendo cada vez mais questionada devido à maior preocupação em relação aos potenciais riscos para o receptor. Sabe-se que a transfusão de sangue homólogo aumenta o risco de transmissão de doenças infecciosas como as hepatites⁴ e o vírus da imunodeficiência humana (HIV).⁵ Além disso, a transfusão também está relacionada à ocorrência de reação transfusional, aumento de morbidade e de mortalidade pós-operatória, risco de imunossupressão e aumento do tempo de internação hospitalar.⁶

A transmissão de doenças infecciosas via transfusão sanguínea foi um grande problema entre os anos de 1943 e 1996. Estima-se que cerca de 10% dos pacientes que receberam sangue nesse período tornaram-se positivos para hepatite.⁷ No final da década de 80 e início da de 90, com o estabelecimento de regras mais rigorosas para a doação de sangue e o surgimento de novos testes, a transmissão de doenças infecciosas por

transfusão foi reduzida, porém continua a ser um risco considerável nesse procedimento.⁸

A hemodiluição normovolêmica aguda (HNA) foi introduzida na prática cirúrgica no final da década de 70 e, a partir de então, vem sendo estudada como uma das estratégias para reduzir a transfusão de sangue homólogo.⁹ A HNA tem sido utilizada pois reduz a necessidade de sangue e derivados, atenua o risco transfusional e a resposta inflamatória sistêmica e, ainda, por ocasionar a redução do custo hospitalar.¹⁰ Ainda, a hemodiluição, induzida experimentalmente, simula uma situação real vivenciada diuturnamente nos centros cirúrgicos, tendo-se em vista que durante os procedimentos cirúrgicos de grande porte, que cursam com sangramento importante, a reposição volêmica agressiva promove esse quadro.

A fisiologia dos mamíferos é particularmente bem adaptada para compensar reduções significativas na concentração de hemoglobina.¹¹ Dessa forma, a hemodiluição ativa respostas adrenérgicas compensatórias para manter a perfusão dos órgãos, tais como aumento do índice cardíaco, do volume de ejeção e do débito cardíaco.¹² Uma grande porcentagem desta resposta no débito cardíaco é direcionada ao cérebro.¹³ Esses e outros mecanismos compensatórios garantem que seja mantida uma adequada tensão de oxigênio no tecido cerebral durante a hemodiluição normovolêmica aguda.¹⁴

Entretanto, evidências experimentais sugerem que a hemodiluição pode aumentar a ocorrência de lesão cerebral, limitando a oferta de oxigênio ao tecido cerebral e, conseqüentemente, levando à hipóxia tecidual.¹⁵

Weiskopf et al.¹⁶ demonstraram que a hipóxia provocada pela hemodiluição normovolêmica aguda levou a distúrbios cognitivos, mesmo em indivíduos saudáveis e não cirúrgicos.

Distúrbios cognitivos pós-operatórios podem ocorrer em cerca de 40 a 60% dos pacientes após cirurgias cardíacas e, com menor frequência, após cirurgias ortopédicas e cirurgias vasculares.¹⁷ A idade e a hipertensão, associadas à anemia, parecem ser os fatores de risco mais importantes para essa ocorrência.³

Estudos sugerem que a hipóxia pode induzir a apoptose, dependendo da ativação da transcrição de fatores apoptóticos.¹⁸ A apoptose, ou morte celular programada, é reconhecida como um mecanismo importante na manutenção da homeostase celular durante o desenvolvimento, sendo um processo que elimina células supérfluas, danificadas ou células mutantes.¹⁹ No entanto, a apoptose tem sido implicada em muitas doenças, incluindo doenças vasculares isquêmicas, doenças neurodegenerativas e lesão cerebral isquêmica causada pela hipóxia.²⁰

Assim sendo, justifica-se o presente estudo pela necessidade de se avaliar a ocorrência de lesão neuronal durante a hemodiluição normovolêmica aguda, tendo-se em vista a pequena quantidade de literatura voltada para esse tema.

OBJETIVO

2 OBJETIVO

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos de dois diferentes níveis de hematócrito na hemodiluição normovolêmica aguda sobre a oxigenação cerebral por meio da análise de precursores de apoptose neuronal. Ademais foi analisada a oxigenação sistêmica por meio da monitoração contínua da saturação venosa mista, parâmetros hemodinâmicos e cálculos de oxigenação, derivados desses dados.

REVISÃO DE LITERATURA

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Hemodiluição Normovolêmica Aguda

A hemodiluição compreende método no qual sangue total é coletado do paciente imediatamente antes de procedimentos nos quais perdas sangüíneas expressivas são esperadas. Simultaneamente, soluções de cristalóides ou colóides são administradas para a manutenção do volume circulante. O próprio sangue do paciente é reinfundido ao término da cirurgia, no momento em que a maior perda de sangue cesse.²¹ A diluição pré-operatória do sangue circulante reduz a perda de células vermelhas e de constituintes do plasma durante o sangramento cirúrgico.²²

Durante a hemodiluição normovolêmica aguda a oxigenação tecidual é preservada até que se atinja um valor crítico de hemoglobina no sangue abaixo do qual os mecanismos compensatórios do organismo, como aumento do débito cardíaco, tornam-se insuficientes para manter a demanda de oxigênio dos tecidos. Do ponto de vista fisiológico, o valor crítico de hemoglobina representa o momento no qual ocorre hipóxia tecidual generalizada, de modo que, qualquer intervenção com o objetivo de prevenir a hipóxia deve ser iniciada antes de esse valor ser atingido.²³

Com base em resultados de estudos científicos, importantes associações de anesthesiologistas desenvolveram recomendações em relação a esse valor crítico de hemoglobina, abaixo do qual há necessidade

de transfusão sanguínea. A associação de anesthesiologistas da Inglaterra e Irlanda afirma que o hematócrito abaixo de 20% é um forte indicativo da necessidade de transfusão.²⁴ De forma similar, a Sociedade Americana de Anesthesiologistas considera que pacientes com hematócrito abaixo de 18% devem receber transfusões de sangue.²⁵ Em concordância com essas recomendações, Crystal e Salem²⁶ afirmam que pacientes hemodiluídos para hematócrito de até 20% conseguem manter a oferta de oxigênio para os tecidos, em decorrência dos mecanismos compensatórios que se instalam.

Recentemente, um estudo realizado por Vovenko e Chuikin²⁷ avaliou a pressão parcial de O₂ (PaO₂) na microcirculação cerebral em ratos hemodiluídos com hematócrito alvo de 30%, 20% e 10%. Eles observaram que, apesar dos primeiros sinais de hipóxia cerebral serem aparentes com hematócrito em torno de 18 a 20%, deficiências no metabolismo oxidativo ocorreram apenas com hematócrito de 8 a 10%. De modo geral, o nível de oxigenação no tecido cerebral foi mantido acima do limite hipóxico (8 – 10mmHg) em animais com hematócrito até 10%.

Pontos importantes para que a hemodiluição seja procedimento isento de riscos para o paciente dizem respeito à técnica anestésica empregada, fluidos empregados na reposição volêmica, bem como o hematócrito alvo a ser atingido.

Os colóides são compostos de moléculas grandes, como proteínas, que não conseguem ultrapassar uma membrana semipermeável. Deste modo, a concentração de soluto dentro da célula é maior que fora,

aumentando o fluxo de água para dentro da célula, criando assim uma pressão chamada de pressão oncótica ou pressão osmótica colóide. Essa pressão oncótica leva a um aumento do volume do espaço intravascular, especificamente do volume de plasma. Como resultado, menor quantidade de solução colóide precisa ser injetada para que seja mantida no espaço intravascular, quando comparado com as soluções cristalóides.²⁸

O hidroxietilamido (HEA) é uma macromolécula derivada da amilopectina, a fração polissacarídica do amido de milho que, submetida à ação de óxido de etileno, sofre hidrólise ácida.²⁹ O HEA é uma solução levemente hipertônica e hiperosmolar, como peso molecular médio de 450.000 dalton²⁹, pressão oncótica de cerca de 36 mmHg³⁰ e meia vida de eliminação de 13 a 36 horas.³¹

Por meio de microscopia eletrônica de varredura, foram estudadas alterações no miocárdio em HNA extrema, hematócrito de 10% e hemoglobina em torno de 3,5g/dl, com soluções de Ringer lactato e amido hidroxietílico. Uma significativa alteração no miocárdio foi observada, principalmente no grupo Ringer lactato, e a redução da osmolaridade e concentração de sódio ocasionou rompimento dos miofilamentos, provavelmente causado pelo aumento de concentração de água extravascular no miocárdio. O grupo tratado com hidroxietilamido apresentou melhor estabilidade dos parâmetros hemodinâmicos, função sistólica ventricular, bem como do transporte e extração sistêmica de oxigênio.³²

Otsuki et al.³³ compararam as alterações hemodinâmicas, os parâmetros de oxigenação, marcadores metabólicos, parâmetros ecocardiográficos, tonometria gástrica e osmolaridade sérica de dois grupos de 24 porcos submetidos à HNA e tratados aleatoriamente com Ringer lactato e hidroxietilamido. Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que o aumento do índice cardíaco, volume sistólico, força de contração ventricular esquerda, foram mais estáveis no grupo hidroxietilamido, indicando uma melhor resposta hemodinâmica deste grupo.

Em relação à técnica anestésica empregada, foi realizado estudo comparativo em cães anestesiados pelo halotano, isoflurano e sevoflurano, em que os mesmos foram submetidos à hemodiluição normovolêmica aguda com hematócrito alvo de 28%. Os dados demonstraram que, com 1 CAM (Concentração Alveolar Mínima) de halotano, isoflurano e sevoflurano não houve depressão na resposta hemodinâmica à HNA. Observou-se aumento do débito cardíaco, frequência cardíaca e pressão arterial em resposta à diminuição da viscosidade sangüínea, resultando em aumento do transporte de oxigênio (DO_2), apesar da diminuição da hemoglobina e do conteúdo de oxigênio arterial.³⁴

Em relação ao cérebro, existem na literatura alguns trabalhos relacionados à hemodiluição e trauma craniano.³⁵ Entretanto, os efeitos da diminuição do hematócrito sobre os neurônios íntegros ainda são pouco conhecidos.

Em um modelo experimental de lesão cerebral criogênica em trinta e cinco cães, foi avaliada a hemodiluição com solução de ringer lactado ou

hidroxietilamido atingindo hematócrito de 27% ou 35%. Foi observado que a hemodiluição com hematócrito alvo de 27% provocou aumento da pressão intracraniana (PIC) e, conseqüentemente, redução da pressão de perfusão cerebral (PPC). No entanto, não foi observada diferença na hemodiluição com solução cristalóide ou colóide.³⁵

Fraga et al.³² avaliaram a administração de cristalóides ou colóides em cães e observaram que a hemodiluição com hidroxietilamido (200/0,5) atingindo hematócrito de 10% permitiu maior preservação da função e estrutura miocárdica quando comparada à hemodiluição com ringer lactato. Entretanto, em estudos no cérebro os resultados são inconclusivos, sendo que nas lesões traumáticas os resultados indicam não haver diferenças entre as soluções cristalóides ou colóides.^{35, 36}

Evidências de hipóxia celular cerebral e distúrbios cognitivos foram observadas em ratos hipertensos submetidos à hemodiluição normovolêmica, até níveis de hemoglobina de 5g/dl (hematócrito menor que 15%). Essas alterações foram idade-dependente e similares aos distúrbios observados clinicamente em humanos submetidos a procedimentos semelhantes. Esses dados oferecem suporte a uma possível ligação entre a hipóxia anêmica e disfunções cognitivas pós-operatórias em humanos.³

Weiskopf et al.¹⁶ submeteram indivíduos saudáveis à HNA até concentração de hemoglobina de $5,7 \pm 0,3$ g/dl (hematócrito de 17%). Por meio de testes neuropsicológicos, aplicados antes e durante a redução da concentração de hemoglobina, confirmaram que a anemia normovolêmica aguda reduziu o tempo de reação, prejudicou a memória, aumentou a

freqüência cardíaca e reduziu o nível de energia dos voluntários. Foi demonstrado, ainda, que a elevação da pressão parcial de oxigênio arterial (PaO_2) para 350 mmHg ou mais, por meio do fornecimento de O_2 , reverteu os efeitos da anemia.

Kulier et al.³⁷ demonstraram que anemia severa durante cirurgia cardíaca levou a retardo de desenvolvimento em crianças. Outro estudo demonstrou maior grau de distúrbios cognitivos em idosos que apresentaram hematócrito de 18% durante cirurgia cardíaca em relação aos com hematócrito de 27%.³⁸

3.2 Apoptose neuronal

Por muitos anos, acreditou-se que a mitocôndria desempenhava exclusivamente o papel de produção da energia celular, por meio da fosforilação oxidativa.³⁹ No entanto, a mitocôndria vem sendo cada vez mais reconhecida como mediadora da morte celular, sendo que ambas as formas de morte (apoptose e necrose) requerem participação ativa dessa organela.⁴⁰

Em células saudáveis, a membrana mitocondrial interna é praticamente impermeável a qualquer íon. Isso permite que seja mantido o gradiente de prótons necessário para a fosforilação oxidativa.⁴¹ A manutenção desse gradiente iônico é vital para a sobrevivência celular, com isso, todos os constituintes da matriz mitocondrial e todos os metabólitos que

cruzam a membrana mitocondrial interna são estritamente regulados por meio de canais e proteínas transportadoras altamente seletivas. A morte celular está intimamente relacionada a disfunções duradouras ou permanentes nesse mecanismo de regulação.⁴²

Da mesma forma, a permeabilidade da membrana mitocondrial externa é regulada de maneira estrita, tanto fisiologicamente como durante o mecanismo de morte celular. Durante o processo de morte celular, a permeabilidade da membrana mitocondrial externa aumenta, permitindo a liberação de proteínas solúveis que são normalmente retidas no espaço inter-membrana. Esse processo não é acidental, mas sim um fenômeno altamente controlado, com importantes consequências na sobrevivência celular.³⁹

Existem dois tipos de morte celular, a necrose celular, resultante de lesões e causas inflamatórias e outra conhecida como apoptose. Ao contrário da necrose, a morte celular programada, ou apoptose, é caracterizada pelo encolhimento da célula, condensação da cromatina com extensa fragmentação do DNA nuclear, pinocitose nuclear e extrusão de fragmentos de membrana, os corpúsculos apoptóticos, porém sem a lise da membrana plasmática. A apoptose é um processo que requer ativação de um programa genético e uma clivagem específica endonucleotídica do DNA nuclear.⁴³

A apoptose pode ocorrer por diversas vias moleculares, sendo as mais evidentes e bem caracterizadas as vias extrínseca (via de receptores de morte) e intrínseca (via mitocondrial). A via extrínseca é desencadeada

pela junção de ligantes específicos a um grupo de receptores de membrana da superfamília dos receptores de fatores de necrose tumoral (rTNF). Esta ligação é capaz de ativar a cascata das caspases.⁴⁴ Todos os membros da família rTNF possuem um subdomínio extracelular rico em cisteína, o qual permite que eles reconheçam seus ligantes. Tal fato resulta na trimerização e conseqüente ativação dos receptores de morte específicos. A sinalização a seguir é mediada pela porção citoplasmática desses receptores que contém uma seqüência de 65 aminoácidos chamada "domínio de morte" sendo, por isso, chamados de "receptores de morte celular".⁴⁵ Quando os receptores de morte celular reconhecem um ligante específico, os seus domínios de morte interagem com moléculas conhecidas como FADD/MORT-1. Essas moléculas têm a capacidade de recrutarem a caspase-8 que irá ativar a caspase-3, executando a morte por apoptose⁴⁶, ou ainda recrutar a via intrínseca para amplificar o processo de morte celular.⁴⁷

A via intrínseca pode, ainda, ser ativada por vários estímulos incluindo hipóxia, espécies reativas de oxigênio, irradiação ultravioleta ou gama, privação de fatores de crescimento e vários compostos citotóxicos, resultando na ativação de proteínas pró-apoptóticas. Estas proteínas induzem a permeabilização da membrana externa mitocondrial através da formação de canais que causam a liberação e redistribuição de pequenos íons, solutos, metabólitos e do citocromo *c* para o citosol.⁴⁸

A permeabilização da membrana mitocondrial externa é um processo complexo, considerado por muitos como o ponto de não retorno do

mecanismo de morte celular⁴⁰, e as proteínas da família Bcl-2 estão intimamente envolvidas na regulação desse processo.⁴⁹ (figura 1)

Figura 1. Via intrínseca da apoptose. Extraído de Grivicich et al., 2007.⁵⁰

A família Bcl-2 é uma família de proteínas indutoras e repressoras de morte celular e que, portanto, participam ativamente da regulação da apoptose.⁵¹ Os membros da família Bcl-2, como Bcl-2 e Bcl-x inibem a apoptose, pois previnem a liberação de citocromo c, sendo conhecidos por reguladores anti-apoptóticos. A expressão de Bcl-2 é capaz de inibir a geração de espécies reativas do oxigênio e a acidificação intracelular, bem

como estabilizar o potencial de membrana da mitocôndria.⁵² Por outro lado, Bax, Bid e Bak são proteínas pró-apoptóticas.⁴⁹

As proteínas da família Bcl-2 controlam a proliferação celular, diferenciação e morte celular programada durante o desenvolvimento cerebral normal. A Bcl-2 previne a apoptose por formar um heterodímero com a proteína pró-apoptótica Bax e protege as células da morte celular programada após a hipóxia.

As alterações morfológicas que definem a apoptose são a picnose nuclear (condensação da cromatina) e a cariorrexe (fragmentação nuclear).⁵³ A fragmentação do DNA nuclear pode ser causada por vários mecanismos, entre eles a ativação da Bax mediada pela caspase 9, que leva à ativação da caspase 3, resultando na ativação da DNase caspase ativada (CAD), reação dependente de radicais livres.

Em estudo prévio, foi relatado que a hipóxia cerebral resulta na expressão aumentada da proteína Bax no núcleo neuronal do córtex cerebral de porcos recém-nascidos. O aumento da proteína Bax está relacionado à elevação do grau de hipóxia do tecido cerebral que pode ser mensurada pela diminuição dos fosfatos de alta energia, ATP e fosfocreatina. Em adição, foi mostrado que a hipóxia resulta no aumento da caspase 9 e ativa a caspase 3 na fração citosólica do córtex cerebral.⁵⁴

Foi demonstrado, também, que a morte celular resultante de hipóxia está relacionada ao aumento da fragmentação do DNA nuclear e que o grau de fragmentação aumenta como uma função da hipóxia cerebral. Dessa

forma, a fragmentação do DNA tem sido utilizada como marcador da apoptose neuronal.⁵⁵

MATERIAL E MÉTODO

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local de realização e comissão de ética

Os experimentos com animais foram realizados no Laboratório de Investigação Médica LIM08 – Anestesiologia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) e os experimentos para avaliação da apoptose neuronal foram realizados no Laboratório de Investigação Médica LIM45 – Neurologia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

O protocolo experimental foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética para análise de projeto de pesquisa (CAPPesq 0202/08) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

4.2 Animais

Foram utilizados nesse experimento 32 porcos mestiços, jovens, com peso variando de 30 a 35 quilos provenientes de granjas suínas. Os animais foram previamente submetidos a exame clínico completo, sendo descartados aqueles portadores de qualquer alteração fisiológica.

Desses 32 animais, 8 foram utilizados durante a padronização da técnica de isolamento das frações subcelulares e 24 animais para o estudo

experimental. Todos os animais foram submetidos a jejum alimentar de 12 horas e tiveram livre acesso à água.

4.3 Anestesia

Em todos os animais, foi empregada a mesma técnica anestésica composta pela administração de midazolam^a na dose de 0,25 mg.kg⁻¹ associado à cetamina^b na dose de 5 mg.kg⁻¹ pela via muscular, como medicação pré-anestésica. Decorridos 15 minutos, a veia marginal da orelha foi cateterizada com cateter^c de calibre 20G. Uma vez estabelecido o acesso venoso, foi realizada a indução anestésica por meio da aplicação de propofol^d na dose de 5 mg.kg⁻¹ pela via endovenosa. Após a intubação orotraqueal dos animais com sonda traqueal de diâmetro apropriado, realizou-se a manutenção da anestesia através da administração de isoflurano^e em 50% de oxigênio e concentração alveolar mínima (CAM) (1,45%) em circuito circular com reinalação em aparelho de anestesia. Para o adequado controle da concentração administrada do anestésico inalatório, foi utilizado analisador de gases anestésicos que forneceu de forma contínua a concentração do mesmo no ar inspirado e expirado. Os animais foram submetidos à ventilação controlada na modalidade de pressão controlada com o intuito de se obter volume variável de 8 a 10 cmHg. Para tanto

^a Dormire - Cristália

^b Ketamin S+ Cristália

^c Abbocath Tplus – Produtos Hospitalares Abbott

^d Propovan - Cristália

^e Isoforine - Cristália

administrou-se pancurônio^f na dose de 0,3 mg.kg⁻¹ IV sendo que para avaliar a adequação da ventilação foram mensurados continuamente tanto a pressão parcial de dióxido de carbono no ar expirado com auxílio de capnógrafo do analisador de gases quanto a saturação periférica da hemoglobina por meio de oxímetro de pulso (Viridia Modelo 885 – Hewlett Packard). Os parâmetros de ventilação também foram avaliados através de um monitor de mecânica ventilatória. Durante o procedimento anestésico todos os animais receberam reposição volêmica com Ringer lactato na taxa de 5 ml.kg⁻¹.hora⁻¹.

4.4 Preparo dos Animais

Uma vez que os animais estavam em plano de anestesia adequado, foi realizado a dissecação da veia jugular externa e introduzido um cateter de artéria pulmonar^g de três vias e sensor térmico, de 110 cm de comprimento. O sistema transdutor-registrador foi preenchido com solução salina heparinizada e zerado à pressão atmosférica sendo conectado ao transdutor de pressão posicionado ao nível da linha axilar média.

Um cateter de polietileno^h de calibre 18G também foi introduzido na artéria femoral, a qual foi previamente dissecada. Este cateter foi utilizado para a retirada do sangue durante a hemodiluição.

^f Tracrium – Glaxo Wellcome

^g Swan Ganz Thermodilution and continuous SvO₂ Catheter Model 744H-7,5F – Baxter Healthcare Corporation, CA, USA

^h Cateter Venoso Angiocath 18g BD - BD

Outro cateter de polietileno de calibre 18G também foi introduzido por punção na artéria femoral contralateral e acoplado a um segundo transdutor de pressão para obtenção da pressão arterial sistêmica.

Para obtenção das pressões, utilizou-se monitor com três canais de pressão (MP50, Boblingen, Alemanha), e, do débito cardíaco, um computador de débito cardíaco (Vigilance, Edwards, Irvine, EUA).

4.5 Procedimento experimental

Após o preparo, aguardou-se 30 minutos para estabilização, e em seguida foi realizada a coleta da primeira amostra dos parâmetros hemodinâmicos, respiratórios e metabólicos, denominados de controle. Logo após foi iniciado o processo de hemodiluição. Os animais foram distribuídos em 4 grupos:

- Grupo (Controle): neste grupo os animais foram apenas anestesiados.

- Grupo (Ht 15%): os animais foram submetidos ao procedimento de hemodiluição normovolêmica aguda com utilização de solução de amido hidroxietílico (130/0,4) na proporção de 1:1 ou seja 1 ml de colóide para cada 1 ml de sangue retirado, sendo o hematócrito alvo de 15%.

- Grupo (Ht 10%): foram utilizados os mesmos procedimentos do grupo Ht 15% sendo no entanto o hematócrito alvo de 10%.

- Grupo (Hipóxia Hipóxica): os animais foram submetidos à hipóxia-hipóxica por meio da redução da fração inspirada de oxigênio (FiO_2) para (6%) resultante de mistura hipóxica de oxigênio e nitrogênio, pelo período máximo de 60 minutos. Portanto, os animais ficaram sob anestesia durante 60 minutos e em hipóxia por mais 60 minutos. Neste grupo não foi realizada a hemodiluição, e a mensuração da FiO_2 foi feita por meio de um analisador de oxigênio (Ohmeda, Louisville, USA).

Para o cálculo do volume de sangue a ser retirado (V) foi empregada a fórmula proposta por GROSS (1983):

$$V = VES \times (Hi - Hd) / Hm \text{ onde:}$$

VES = volume estimado de sangue, sendo considerados 80 ml/kg para o porco adulto; Hi = hematócrito inicial do paciente; Hd = hematócrito desejado; Hm = média entre Hi e Hd.

Foram obtidas medidas do hematócrito a cada 10 minutos para acompanhar o processo de hemodiluição.

Após a hemodiluição, os animais foram avaliados durante 90 minutos nos grupos hematócrito 10%, 15% e no grupo controle. Durante esse período, foi realizada a administração de amido hidroxietílico (130/0,4) para a manutenção da pressão arterial (até 20% do valor basal). A quantidade de fluido infundida em cada grupo foi anotada para posterior comparação. Após o período de observação e coleta dos dados, realizou-se a craniotomia do animal, para retirada de fragmento de tecido cerebral (córtex frontal e hipocampo cerebral). Após tal procedimento, foi realizada a eutanásia dos

animais pelo aumento de concentração de isoflurano (5%), seguida da administração de 10 ml de cloreto de potássio.

4.6 Parâmetros hemodinâmicos

Nos animais não anestesiados, a frequência cardíaca (FC) foi mensurada através da auscultação dos batimentos cardíacos em um minuto. Durante o decorrer da anestesia a frequência e ritmo cardíaco foram avaliados através do monitor cardíaco.

A pressão arterial foi obtida por mensuração direta através do cateter da artéria femoral acoplado ao transdutor do monitor de pressão, obtendo-se desta forma as pressões arterial média (PAM), sistólica (PAS) e diastólica (PAD).

Para a obtenção da pressão do átrio direito (PADd) a via proximal do cateter de artéria pulmonar (AP) foi conectado ao transdutor de pressão. A pressão da artéria pulmonar (PAP) foi obtida conectando a via distal do cateter de AP ao transdutor de pressão. A pressão de oclusão da artéria pulmonar (POAP) foi obtida através da insuflação do balão localizado na extremidade distal do cateter de AP.

Já o débito cardíaco (DC) e índice cardíaco (IC) foram obtidos pelo método da termodiluição. A medida foi realizada através da injeção de 10 ml de solução de glicose a 5% em temperatura de zero a cinco graus Celsius, pela luz proximal do cateter (atrial). Foram realizadas três medidas

consecutivas do DC sendo desprezada aquela cujo valor fosse discrepante (maior que 10%).⁵⁶

Os parâmetros referentes ao índice sistólico (IS), índice de resistência vascular sistêmica (IRVS), índice de resistência vascular pulmonar (IRVP), índice de consumo de oxigênio (IVO_2), índice de transporte de oxigênio (IDO_2), taxa de extração de oxigênio (TEO_2) e diferença arteriovenosa do oxigênio C(A-V) O_2 foram calculados a partir das fórmulas padrões.⁵⁷

Sangue venoso misto para a obtenção dos valores de pressão parcial de oxigênio (PvO_2) e saturação de oxigênio no sangue venoso misto (SvO_2) foi obtido por meio da extremidade distal do cateter de AP. Para a obtenção dos gases sanguíneos e eletrólitos, as amostras foram obtidas no cateter posicionado na artéria femoral direita. As amostras foram coletadas em seringas heparinizadas sendo a agulha vedada com tampa de borracha, evitando assim o contato do sangue com o ar ambiente. O exame de cada amostra foi realizado em analisador imediatamente depois de cada coleta. (ABL 555, Radiometer, Copenhagen, Dinamarca).

Os valores de hematócrito e hemoglobina foram obtidos através do sangue coletado na artéria femoral e obtidos através do analisador de gases e pH.

O débito urinário foi mensurado por meio de cateterização vesical transuretral.

4.7 Processamento do tecido

As amostras do córtex cerebral foram processadas para a extração de proteína total e das frações subcelulares (nuclear e mitocondrial). Por outro lado, o hipocampo foi processado de modo a obter apenas proteína da fração citosólica.

4.7.1 Extração de proteína total do córtex cerebral

A amostra total de tecido do córtex, cerca de 0,5g foi homogeneizada em tampão de lise contendo 1% de coquetel inibidor de protease (Sigma), 1% de NP40 (Sigma), 0,5% de desoxicolato de sódio (Sigma), 1mM de EDTA (Sigma), 1mM de EGTA (Sigma), diluídos em tampão fosfato e centrifugados (14000rpm) por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para novos tubos e armazenado a -70°C até o uso. A proteína total foi determinada pelo método de Bradford.⁵⁸

4.7.2 Técnica de isolamento das frações subcelulares (nuclear e mitocondrial) e extração das proteínas

As frações neuronais nucleares e mitocondriais foram isoladas utilizando-se o método modificado de Booth e Clark.⁵⁹ A purificação da

fração mitocondrial foi realizada por centrifugação em gradiente descontinuo de Ficoll (Sigma).

As frações nucleares e mitocondriais foram isoladas por método de diferentes etapas de centrifugação. Quatro gramas de tecido cortical frontal (figura 2) foram colocadas em um tampão de lise composto por 23mM de manitol, 7,4mM de sacarose, 0,25mM de EGTA, 0,075mM de EDTA, 0,1% de BSA e 0,5mM de HEPES. Para a primeira homogeneização, foi adicionado 0,001% de digitonina em relação ao volume total para que se tenha uma melhor lise dos tecidos. O tecido cortical foi homogeneizado em um homogeneizador de tipo (Dounce 200 μ m), em 15 volumes com 10 a 15 passagens e depois centrifugados a 850g durante um período de 15 minutos. O pellet resultante desta centrifugação foi homogeneizado novamente em 3 volumes do tampão e centrifugado a 1500g durante 12 minutos obtendo-se a fração nuclear.

Figura 2. Tecido cortical pronto para ser lavado e picotado.

Para a verificação do grau de pureza da fração nuclear, uma amostra do pellet nuclear foi corada com azul de cresil para a realização da contagem de núcleos neuronais. Foi obtido um grau de pureza em torno de 65%. Os núcleos neuronais são mostrados na figura 3.

Figura 3. Núcleos neuronais de tecido cortical. Núcleos grandes com nucléolo evidente.

Em seguida, o sobrenadante da primeira centrifugação foi adicionado ao da segunda centrifugação e foram centrifugados a 9000g durante 15 minutos. O sobrenadante obtido desta centrifugação corresponde à fração citosólica e o pellet desta mesma centrifugação foi ressuspenso em 1 volume do tampão e centrifugado a 12000g durante 15 minutos obtendo-se a fração mitocondrial. Esta fração mitocondrial foi purificada pela suspensão do sedimento em 2,5ml do tampão de isolamento, misturado com 12,5ml de solução ficoll 12% e colocado no fundo de um tubo de ultracentrifugação. Dez ml de solução ficoll 7% foi gentilmente colocado sobre ele seguido por 10 ml do meio de isolamento. O gradiente então foi centrifugado por 30 minutos a 100000g. O sedimento mitocondrial foi lavado e novamente suspenso no meio de isolamento.

A extração das proteínas nucleares e mitocondriais foi realizada de acordo com um protocolo adaptado de Mishra et al.^{43,60} As frações nucleares e mitocondriais foram homogeneizadas utilizando um tampão RIPA modificado contendo 50mM Trisma – HCl pH 7,4, 1mM EDTA, 150mM NaCl, 1% de NP40, 0,25% de desoxicolato de sódio, 1mM de PMSF, 1mM Na_3VO_4 , 1mM NaF e 1 μg de aprotina, 1 μg de pepstatina e 1 μg de leupatina. Foram centrifugadas a (14.000 rpm) por 20 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos e armazenados a -70°C até o uso. As proteínas nucleares e mitocondriais foram quantificadas pelo método de Bradford.⁵⁸

Para confirmar a pureza da fração mitocondrial, foi realizado um western blotting de laminina A, conforme a figura 4.

Figura 4. Western blot de laminina-A no extrato de proteína total, frações nuclear e mitocondrial. Nota-se ausência de marcação na fração mitocondrial demonstrando sua pureza.

4.7.3 Isolamento da fração citosólica do hipocampo

O tecido hipocampal foi homogeneizado em um homogeneizador tipo (Dounce 200µm) em 15 volumes em um meio contendo 0,32M de sacarose, 10mM trima-HCl (pH 6,8) e 1mM Mgcl₂, e em seguida centrifugados a 850g por 10 minutos. O sobrenadante foi centrifugado a 10.000g (0°C – 4°C) por 60 minutos assim obtendo a fração citosólica.⁴³ As proteínas citosólicas foram determinadas pelo método de Bradford.⁵⁸

4.8 Western blot das proteínas pro-apoptótica Bax e anti-apoptótica Bcl-x nas preparações de extração de proteína total de córtex frontal, frações nucleares e mitocondriais

As amostras das proteínas foram separadas em gel de poliacrilamida (Bio-Rad) de 12% por eletroforese. As proteínas foram transferidas em membrana de PVDF (Bio-Rad) por 1 hora a 100 V. Após 1 hora de bloqueio em leite a 5% em (TBS-T), a membrana foi incubada em temperatura ambiente por 1 hora com anticorpo anti-Bax policlonal de coelho (N-20) (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, USA) ou anti-Bcl-x monoclonal de camundongo (Millipore, Europe). Depois disso, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário (Anticorpo Anti-IgG de camundongo ou coelho com afinidade à peroxidase, Rockland Gilbertsville, PA). As membranas foram lavadas duas vezes com TBS-T e uma vez com TBS.

Após as lavagens, as membranas foram encubadas com luminol (PerkinElmer Life Science, USA) por um minuto. A membrana foi exposta ao filme de Raio-x (HyperfilmTM ECL, Amersham Biosciences, USA) para a visualização da banda de proteína. As imagens foram analisadas por meio do software ImageJ.

4.9 Western blot do Anticorpo Anti-NeuN em extração de proteína total do córtex frontal

Para a avaliação de morte neuronal, foi realizado western Blot do anticorpo Anti-NeuN, que marca exclusivamente núcleos neuronais em bandas de 46 e 48 KDa. As amostras das proteínas foram separadas em gel de poliacrilamida (Bio-Rad) de 12% por eletroforese. As proteínas foram transferidas em membrana de PVDF (Bio-Rad) por 1 hora a 100 V. Após 1 hora de bloqueio em leite a 5% em (TBS-T), a membrana foi incubada em temperatura ambiente por 1 hora com anticorpo anti-NeuN mAb A60 (imunoglobulina IgG purificada de camundongo) (Millipore, Europe). Depois disso, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário (Anticorpo Anti-IgG de camundongo com afinidade à peroxidase, Rockland Gilbertsville, PA). As membranas foram lavadas duas vezes com TBS-T e uma vez com TBS. Após as lavagens, as membranas foram encubadas com luminol (PerkinElmer Life Science, USA) por um minuto. A membrana foi exposta ao

filme de Raio-x (HyperfilmTM ECL, Amersham Biosciences, USA) para a visualização da banda de proteína.

4.10 Determinação da atividade das caspases 3 e 9 na fração citosólica do hipocampo e mitocondrial do córtex frontal

A atividade da caspase-3 nas proteínas citosólicas do hipocampo e mitocôndria do córtex frontal foi determinada em meio contendo 50 mM Trisma-HCl (pH 7.0), 0.5 mM Na-EDTA, 20% glicerol, 120 µg de proteína, 75 µM do substrato fluorogênico sintético que reconhece a seqüência da caspase-3 (DEVD-AFC). A atividade foi medida pela fluorescência da 7-amino-4-trifluorometilcumarina liberada por 5 minutos em intervalos de 30 segundos, por meio de espectrofluorometro (Spectra MAX Gemini, Molecular Devices, CA, USA) a 460 nm, usando um comprimento de onda de excitação de 380 a 37°C.⁶¹

A atividade de caspase 9 foi determinada como descrito acima, com 75 µM de LEHD-AFC com o substrato fluorogênico.

4.11 Determinação da fragmentação do DNA nuclear e mitocondrial

Para o isolamento do DNA mitocondrial e nuclear, 50µl das frações subcelulares de mitocôndria e núcleo cortical foram adicionadas a 630µl de tampão de lise (1M de Tris-HCl, pH 8.0, NaCl, 0,2M de EDTA pH 8,2), 0,5% de sulfato de dodecil e proteinase K e foram incubadas durante 30 minutos a 55°C. A extração foi realizada por meio da adição de fenol tamponado com Tris, gentilmente homogeneizado e centrifugado (14.000rpm por 15 minutos). Esse passo foi repetido uma vez. Em seguida foi adicionado fenol clorofórmio (1:1), misturado por inversão e centrifugado (14.000rpm por minutos). A fase aquosa foi adicionada de 3M de acetato de sódio (pH 6.0) e em etanol 100%, gentilmente homogeneizada e precipitada a -20°C por 30 minutos. O DNA foi centrifugado por 20 minutos a 14.000rpm. O pellet foi lavado duas vezes com etanol 70%, seco a temperatura ambiente e suspenso em 50µl de 10mM Tris (pH 8.0) e 1mM de EDTA. O DNA foi quantificado utilizando-se um espectrofotômetro (NanoDrop, ND-1000).

O DNA nuclear e mitocondrial (500ng) foi separado em um gel de agarose 1%, contendo brometo de etídio, por eletroforese.⁵⁵ A integridade do DNA foi observada por exposição à luz UV. Os géis foram fotografados usando o sistema Quantum-ST4-1000/26M. As imagens foram analisadas por meio do software ImageJ.

4.12 Delineamento do experimento

Os tempos de avaliação dos grupos foram:

- Valor basal: T0 (tempo zero) – 30 minutos após o término da instrumentação – obtenção dos valores controle e início da primeira etapa da hemodiluição
- Tempo 1 (T1): 30 minutos após T0 – término da hemodiluição – Ht 15% (grupo I) e 10% (grupo II).
- Tempo 2 (T2): 90 minutos após T0 – 60 minutos de hemodiluição (grupo I e II).
- Tempo 3 (T3): 120 minutos após T0 – 90 minutos de hemodiluição.
- Morte e retirada de fragmentos cerebrais.

Esquema do delineamento experimental:

			T0 ↓	T1 ↓	T2 ↓	T3 ↓	
Tempo	30 min	30 min	30 min	60 min	30 min	20 min	
Grupo Controle	Anestesia e preparo	Estabilização	Observação	Observação	Observação	Morte e coleta de material	
Grupo Ht 15%	Anestesia e preparo	Estabilização	HNA Ht 15%	Observação	Observação	Morte e coleta de material	
Grupo Ht 10%	Anestesia e preparo	Estabilização	HNA Ht 10%	Observação	Observação	Morte e coleta de material	
Grupo Hipóxia-Hipóxica	Anestesia e preparo	Estabilização	Observação	Hipóxia (FiO2 6%)	Morte e coleta de material	-	

4.13 Descarte dos animais

Ao término do experimento, a concentração do agente anestésico foi aumentada para 3 CAM durante 5 minutos e, então, foi realizada a administração de 10 ml de cloreto de potássio por via venosa.

Após coleta dos fragmentos de córtex cerebral frontal e hipocampo, os animais foram descartados no setor de coleta de resíduos infectantes da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

4.14 Análise estatística

Os resultados hemodinâmicos e de apoptose, foram obtidos nos diferentes tempos e grupos e foram confrontados estatisticamente por meio de provas paramétricas empregando-se o método de comparações múltiplas para análise de variância para medidas repetidas (ANOVA), seguido do teste de Tukey-Kramer quando houve diferença para a comparação dos diferentes tempos de observação de um mesmo grupo e entre grupos. O grau de significância estabelecido para os dois testes estatísticos foi de 5% ($p < 0,05$). Os testes estatísticos foram realizados em programa de computador (SigmaStat 3.11, Systat Software Inc, San Jose, CA, EUA e GraphPad Prism 5).

A randomização dos animais foi feita por meio de sorteio realizado previamente por software gerador de números aleatórios. O número de

animais em cada grupo foi estabelecido com base nos dados de trabalhos anteriores e no número de grupos e de momentos de avaliação.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação dos marcadores de apoptose

Em extrato de proteína total e da fração mitocondrial de córtex frontal, verificou-se expressão aumentada da proteína pró-apoptótica Bax no grupo hipóxia-hipóxica em relação aos demais grupos ($p < 0,05$) (Figuras 5 e 6). Os grupos controle, hematócrito 15% e 10% não foram significativamente diferentes entre si. Da mesma forma, na fração nuclear, os grupos hematócrito 15% e 10% não diferiram do grupo controle; e o grupo hipóxia-hipóxica foi diferente dos grupos controle e do hematócrito 15% ($p < 0,05$) (Figura 7).

Figura 5. Western blot representativo da expressão de proteína pró-apoptótica Bax no extrato de proteína total do córtex frontal nos grupos controle, Ht 15%, Ht 10% e hipóxia-hipóxica. (* $p < 0,05$).

Figura 6. Western blot representativo da expressão de proteína pró-apoptótica Bax na fração mitocondrial do córtex frontal nos grupos controle, Ht 15%, Ht 10% e hipóxia-hipóxica. (* $p < 0,05$).

Figura 7. Western blot representativo da expressão de proteína pró-apoptótica Bax na fração nuclear do córtex frontal nos grupos controle, Ht 15%, Ht 10% e hipóxia-hipóxica. (* $p < 0,05$).

A expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-x em extrato de proteína total e nas frações subcelulares, tanto mitocondrial como nuclear, não aumentou durante a hipóxia tecidual, permanecendo semelhante em todos os grupos (Figuras 8, 9 e 10).

Figura 8. Western blot representativo da expressão de proteína anti-apoptótica Bcl-x no extrato de proteína total do córtex frontal nos grupos controle, Ht 15%, Ht 10% e hipóxia-hipóxica.

Figura 9. Western blot representativo da expressão de proteína anti-apoptótica Bcl-x na fração mitocondrial de córtex frontal nos grupos controle, Ht 15%, Ht 10% e hipóxia-hipóxica.

Figura 10. Western blot representativo da expressão de proteína anti-apoptótica Bcl-x na fração nuclear de córtex frontal nos grupos controle, Ht 15%, Ht 10% e hipóxia-hipóxica.

No grupo hipóxia-hipóxica, observou-se presença de morte neuronal no extrato total do córtex frontal, quando comparado com os demais grupos ($p < 0,05$), tendo-se em vista que a expressão do anticorpo Anti-NeuN foi significativamente menor nesse grupo. Os grupos controle, hematócrito 15% e 10% não apresentaram diferença estatística entre si, conforme demonstrado nas figuras 11 e 12.

Figura 11. Western blot representativo da expressão de NeuN 46 kDa no extrato de proteína total de córtex frontal nos grupos controle, Ht 10%, Ht 15% e hipóxia-hipóxica. (* $p < 0,05$).

Figura 12. Western blot representativo da expressão de NeuN 48 kDa no extrato de proteína total de córtex frontal nos grupos controle, Ht 15%, Ht 10% e hipóxia-hipóxica. (* $p < 0,05$).

Em relação à atividade da caspase 9, não houve diferença estatística quando comparados os grupos controle, hematócrito 15% e 10% tanto na fração citosólica do hipocampo quanto na fração mitocondrial. Os resultados demonstram um aumento de sua atividade no grupo hipóxia-hipóxica quando comparado com os demais grupos ($p < 0,05$) (Figuras 13 e 14).

Atividade de Caspase 9

Fração Citosólica Hipocampo

Figura 13. Atividade da caspase 9 na fração citosólica do hipocampo nos grupos controle, Ht 15%, Ht 10% e hipóxia-hipóxica. (* $p < 0,05$).

Atividade de Caspase 9

Fração Mitocondrial

Figura 14. Atividade da caspase 9 na fração mitocondrial nos grupos controle, Ht 15%, Ht 10% e hipóxia-hipóxia. (* $p < 0,05$).

A atividade da caspase 3 não foi significativamente diferente quando comparados os grupos controle, hematócrito 15% e 10% tanto na fração citosólica do hipocampo quanto na fração mitocondrial. Os resultados demonstraram um aumento na sua atividade no grupo hipóxia-hipóxia quando comparado com os demais grupos ($p < 0,05$) (Figuras 15 e 16).

Figura 15. Atividade da caspase 3 na fração citosólica do hipocampo nos grupos controle, Ht 15%, Ht 10% e hipóxia-hipóxica. (* $p < 0,05$).

Figura 16. Atividade da caspase 3 na fração mitocondrial nos grupos controle, Ht 15%, Ht 10% e hipóxia-hipóxica. (* $p < 0,05$).

Representação do padrão em gel de eletroforese mostra a fragmentação do DNA mitocondrial e nuclear do córtex frontal nos grupos controle, hematócrito 15%, hematócrito 10% e do grupo hipóxia-hipóxica (Figuras 17 e 19). Observa-se que a densidade foi aumentando do grupo controle para os demais grupos, porém, apresentando maior fragmentação do DNA no grupo hipóxia-hipóxica em relação aos demais ($p < 0,05$) (Figuras 18 e 20).

Figura 17. Efeito da hipóxia na fragmentação do DNA mitocondrial no córtex cerebral. Gel representativo contendo fragmentos de DNA mitocondrial do grupo controle, Ht 15%, Ht 10% e hipóxia-hipóxica. Uma escala de DNA padrão 1-kb também é indicada.

Figura 18. Avaliação da fragmentação do DNA mitocondrial no córtex cerebral dos grupos controle, Ht 15% e Ht 10% (* $p < 0,05$).

Figura 19. Efeito da hipóxia na fragmentação do DNA nuclear no córtex cerebral. Gel representativo contendo fragmentos de DNA nuclear do grupo controle, Ht 15%, Ht 10% e do grupo hipóxia-hipóxica. Uma escala de DNA padrão 1-kb também é indicada.

Figura 20. Avaliação da fragmentação do DNA nuclear no córtex cerebral dos grupos controle, Ht 15%, Ht 10% e hipóxia-hipóxica (* $p < 0,05$).

5.2 Avaliação dos parâmetros hemodinâmicos e hemogasométricos

Os dados hemodinâmicos e hemogasométricos obtidos durante o estudo experimental, bem como os de oxigenação, estão demonstrados nas tabelas 1, 2 e 3, respectivamente.

Em relação aos parâmetros hemodinâmicos, observou-se aumento significativo no índice cardíaco dos grupos hematócrito 15% e 10% durante o início da hemodiluição (T1) ($p < 0,05$), o que perdurou por todos os momentos posteriores dentro de cada grupo e quando comparados com o grupo controle ($p < 0,05$). Os animais apresentaram aumento ($p < 0,05$) da pressão venosa central no T1 em relação ao T0 durante a hemodiluição nos grupos hematócrito 15% e 10%, havendo também diferença estatística no grupo hematócrito 10% quando comparado ao grupo controle.

O índice de resistência vascular sistêmica apresentou uma diminuição significativa ($p < 0,05$) nos tempos T1, T2 e T3 nos grupos hematócrito 10% e 15% quando comparados com o tempo basal. Houve aumento da pressão arterial sistólica (PAS) no T1 em relação ao T0 nos grupos Ht 15% e Ht 10% ($p < 0,05$). No grupo Ht 10%, a pressão arterial diastólica (PAD) foi menor nos tempos T2 e T3 em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). A pressão arterial média (PAM) foi maior no T1 quando comparada com o T0 nos grupos Ht 15% e Ht 10% e maior quando comparada com o grupo controle nesse mesmo tempo ($p < 0,05$).

Em relação aos parâmetros hemogasométricos, pode-se observar diferença estatística na concentração do nível sérico arterial de bicarbonato

(HCO_3^-) nos tempos T1 e T2 ($p < 0,05$) quando comparados ao T0 nos grupos Ht 15% e Ht 10% e também quando comparados com o grupo controle no T1 e T2 do grupo Ht 10% e no T1 do grupo Ht 15%. A concentração de potássio (K^+) apresentou redução no T1, nos grupos Ht 15% e Ht 10%, seguida de um aumento nos tempos T2 e T3 quando comparados com os tempos basais de todos os grupos ($p < 0,05$). Não houve diferença estatística nas pressões parciais de O_2 , CO_2 , saturação arterial de O_2 e lactato sérico arterial. Em relação aos parâmetros de oxigenação, observou-se redução no índice de transporte de Oxigênio nos tempos T1, T2 e T3 do grupo Ht 10% e no T2 e T3 do grupo Ht 15% ($p < 0,05$). Além disso, ambos os grupos apresentaram redução significativa nos mesmos tempos quando comparados ao grupo controle ($p < 0,05$). A taxa de extração de oxigênio apresentou aumento no grupo Ht 10%, quando comparados os tempos T1 e T3 ao T0 ($p < 0,05$) e no grupo Ht 15%, nos tempos T2 e T3 comparados também com o T0 ($p < 0,05$). Ambos os grupos (Ht 10% e Ht 15%) apresentaram taxa de extração de oxigênio significativamente superior ao grupo controle em todos os tempos observados ($p < 0,05$).

Tabela 1. Parâmetros hemodinâmicos dos animais do grupo Controle, hematócrito 15% e hematócrito 10% (média $\pm$ desvio padrão). São Paulo, 2011

Parâmetro	Grupo	Tempos				Estatística (ANOVA)
		T0	T1	T2	T3	
FC Bpm	Controle	106 $\pm$ 18	114 $\pm$ 13	123 $\pm$ 14*	127 $\pm$ 19*	Grupo x tempo p<0,001
	15%	105 $\pm$ 16	140 $\pm$ 10 ^{*a}	128 $\pm$ 15*	133 $\pm$ 18*	Tempo p<0,001
	10%	90 $\pm$ 18	245 $\pm$ 309*	125 $\pm$ 29*	125 $\pm$ 28*	Grupo 0,503
PAS MmHg	Controle	90 $\pm$ 4	94 $\pm$ 5	102 $\pm$ 9	100 $\pm$ 7	Grupo x tempo 0,036
	15%	97 $\pm$ 9	114 $\pm$ 8*	100 $\pm$ 10	99 $\pm$ 10	Tempo p<0,001
	10%	88 $\pm$ 32	116 $\pm$ 8*	102 $\pm$ 7	95 $\pm$ 12	Grupo 0,186
PAD MmHg	Controle	56 $\pm$ 6	58 $\pm$ 4	63 $\pm$ 7	63 $\pm$ 5	Grupo x tempo p<0,001
	15%	61 $\pm$ 7	67 $\pm$ 9 ^a	58 $\pm$ 8	57 $\pm$ 6	Tempo p < 0,001
	10%	59 $\pm$ 9	65 $\pm$ 8	53 $\pm$ 4 ^a	51 $\pm$ 9 ^{*a}	Grupo 0,286
PAM MmHg	Controle	69 $\pm$ 4	72 $\pm$ 4	79 $\pm$ 7*	76 $\pm$ 5	Grupo x tempo p<0,001
	15%	75 $\pm$ 7	87 $\pm$ 7 ^{*a}	75 $\pm$ 7	74 $\pm$ 7	Tempo p < 0,001
	10%	74 $\pm$ 8	86 $\pm$ 6 ^{*a}	73 $\pm$ 6	69 $\pm$ 10	Grupo 0,420
POAP MmHg	Controle	11,8 $\pm$ 1,3	12,3 $\pm$ 1,2	12,1 $\pm$ 1,4	12,5 $\pm$ 1,5	Grupo x tempo p<0,001
	15%	12,4 $\pm$ 1,3	14,3 $\pm$ 1,2 ^{*a}	12,4 $\pm$ 1,1	11,6 $\pm$ 0,9	Tempo p < 0,001
	10%	12,5 $\pm$ 1,9	15,9 $\pm$ 2,6*	13,0 $\pm$ 2,7	12,9 $\pm$ 2,5	Grupo 0,208
PVC MmHg	Controle	9 $\pm$ 2	9 $\pm$ 2	9 $\pm$ 2	9 $\pm$ 2	Grupo x tempo p < 0,01
	15%	10 $\pm$ 1	11 $\pm$ 2*	10 $\pm$ 1	10 $\pm$ 1	Tempo p < 0,001
	10%	10 $\pm$ 1	12 $\pm$ 2 ^{*a}	10 $\pm$ 1	9 $\pm$ 1	Grupo 0,278
IS ml/batiment o	Controle	39 $\pm$ 4	38 $\pm$ 4	41 $\pm$ 3	40 $\pm$ 6	Grupo x tempo p<0,02
	15%	44 $\pm$ 5	49 $\pm$ 6	55 $\pm$ 5	48 $\pm$ 7	Tempo p < 0,001
	10%	45 $\pm$ 4	52 $\pm$ 6	61 $\pm$ 12	52 $\pm$ 9	Grupo p < 0,001
TEMP. °C	Controle	37 $\pm$ 1	37 $\pm$ 1	38 $\pm$ 1	38 $\pm$ 1*	Grupo x tempo 0,945
	15%	38 $\pm$ 1	38 $\pm$ 1	38 $\pm$ 1	38 $\pm$ 1*	Tempo p < 0,001
	10%	38 $\pm$ 1	38 $\pm$ 1	38 $\pm$ 1	38 $\pm$ 1*	Grupo 0,529
Hematócrito %	Controle	32 $\pm$ 2	30 $\pm$ 3	29 $\pm$ 2*	30 $\pm$ 2*	Grupo x tempo p < 0,001
	15%	29 $\pm$ 3 ^a	13 $\pm$ 2 ^{*a}	15 $\pm$ 1 ^{*a}	16 $\pm$ 1 ^{*a}	Tempo p < 0,001
	10%	30 $\pm$ 3	10 $\pm$ 0 ^{*ab}	12 $\pm$ 1 ^{*ab}	13 $\pm$ 2 ^{*ab}	Grupo p < 0,001
EF %	Controle	29,9 $\pm$ 8,9	28,3 $\pm$ 3,4	28,8 $\pm$ 1,8	28,8 $\pm$ 3,0	Grupo x tempo p < 0,002
	15%	28,0 $\pm$ 5,1	35,3 $\pm$ 2,1 ^{*a}	32,6 $\pm$ 1,8	31,1 $\pm$ 2,5	Tempo p < 0,001
	10%	28,6 $\pm$ 5,1	33,9 $\pm$ 9,1 ^{*a}	33,0 $\pm$ 8,6 ^{*a}	32,1 $\pm$ 7,9 ^{*a}	Grupo p < 0,007
ESV m/bat./m ²	Controle	80,0 $\pm$ 22,2	93,1 $\pm$ 10,8	95,1 $\pm$ 16,9	94,1 $\pm$ 15,1	Grupo x tempo p < 0,024
	15%	102,8 $\pm$ 25,2	96,6 $\pm$ 12,6	95,5 $\pm$ 18,9	94,5 $\pm$ 17,7	Tempo 0,662
	10%	141,5 $\pm$ 128,3	143,3 $\pm$ 140,9	122,4 $\pm$ 99,8*	117,8 $\pm$ 96,4	Grupo p < 0,624

LVSWI g-m/m ² /bat.	Controle	27,4±2,8	30,3±2,5	34,0±5,5	32,8±4,6*	Grupo x tempo p < 0,001
	15%	34,3±6,3	53,5±5,5 ^a	40,0±8,3	35,9±7,6	Tempo p <0,001
	10%	32,8±6,7	57,6±9,5 ^a	41,5±7,5	38,6±9,6	Grupo p < 0,001
IC l/min./m ²	Controle	3,9±0,6	4,3±0,2	4,6±0,5	4,5±0,6	Grupo x tempo p < 0,001
	15%	4,1±0,4	7,6±0,9 ^a	6,0±1,0 ^a	5,6±0,8 ^a	Tempo p <0,001
	10%	3,6±0,8	7,9±1,5 ^a	6,5±1,4 ^a	6,1±1,0*	Grupo p < 0,001
SVRI Dn-s- m ² /cm ⁵	Controle	953,2±505,3	911,8±489,8	958,7±534,4	957,6±544,6	Grupo x tempo p < 0,001
	15%	1279,9±160,5	815,1±126*	877,9±139*	935,3±94,4*	Tempo p <0,001
	10%	1145,0±671,9	598,2±347*	589,0±319*	584,2±324*	Grupo 0,387
RVSWI g-n/m ² /bat.	Controle	4,9±0,6	5,4±0,7	5,9±1,1	5,6±1,3	Grupo x tempo p < 0,001
	15%	6,4±1,8	9,6±2,4	6,4±1,8	6,1±1,6	Tempo p <0,001
	10%	5,0±1,1	9,5±1,5 ^a	7,4±1,3*	7,5±1,4 ^a	Grupo p < 0,009

FC: frequência cardíaca; PAS: pressão arterial sistólica, PAD: pressão arterial diastólica; PAM: pressão arterial média; POAP: pressão de artéria pulmonar ocluída; PVC: pressão venosa central; IS: índice sistólico; TEMP: temperatura; Hematócrito; EF: fração de ejeção; ESV: volume sistólico final; LVSWI: índice de trabalho sistólico do ventrículo direito; IC: índice cardíaco; SVRI: índice de resistência vascular periférica; RVSWI: índice de trabalho sistólico do ventrículo esquerdo. T0: valor basal, início hemodiluição; T1: término da hemodiluição; T2: 60 minutos do término da hemodiluição; T3: 90 minutos após o término da hemodiluição; * p < 0,05 diferente de T0; ^a p < 0,05 diferente do grupo Controle; ^b p < 0,05 diferente do grupo Ht15%.

Tabela 2. Gases sanguíneos e eletrólitos dos animais do grupo Controle, hematócrito 15% e hematócrito 10% (média $\pm$ desvio padrão). São Paulo, 2011

Parâmetro	Grupo	Tempos				Estatística (ANOVA)
		T0	T1	T2	T3	
PaO ₂ mmHg	Controle	215 $\pm$ 25	217 $\pm$ 20	213 $\pm$ 22	212 $\pm$ 25	Grupo x tempo 0,129 Tempo p < 0,001 Grupo 0,913
	15%	206 $\pm$ 16	224 $\pm$ 14	204 $\pm$ 21	210 $\pm$ 22	
	10%	219 $\pm$ 25	224 $\pm$ 16	210 $\pm$ 26	206 $\pm$ 24	
PaCO ₂ mmHg	Controle	41,6 $\pm$ 2,5	40,9 $\pm$ 2,7	41,4 $\pm$ 2,2	41,7 $\pm$ 2,8	Grupo x tempo 0,269 Tempo p < 0,05 Grupo p < 0,009
	15%	43,6 $\pm$ 3	46,6 $\pm$ 2,1	45,5 $\pm$ 3,5	45,5 $\pm$ 3	
	10%	42,7 $\pm$ 3	45 $\pm$ 3	44 $\pm$ 3,5	44,7 $\pm$ 2,9	
SaO ₂ %	Controle	99,6 $\pm$ 0,1	99,6 $\pm$ 0,1	95,5 $\pm$ 0,2	95,5 $\pm$ 0,2	Grupo x tempo 0,978 Tempo p < 0,002 Grupo 0,905
	15%	99,6 $\pm$ 0,1	99,6 $\pm$ 0,1	95,5 $\pm$ 0,2	99,6 $\pm$ 0,6	
	10%	99,6 $\pm$ 0,1	99,6 $\pm$ 0,1	95,5 $\pm$ 0,2	95,5 $\pm$ 0,2	
SvO ₂ %	Controle	78,9 $\pm$ 6,3	83,3 $\pm$ 2	82,9 $\pm$ 1,8	83 $\pm$ 1,8	Grupo x tempo p < 0,019 Tempo 0,064 Grupo p < 0,004
	15%	79,2 $\pm$ 5,5	79,1 $\pm$ 1,6	74,8 $\pm$ 3,9 ^a	74,1 $\pm$ 3,3 ^a	
	10%	81,5 $\pm$ 10,4	77,3 $\pm$ 5,9	78,7 $\pm$ 10,3	71,1 $\pm$ 5,5 ^{ab}	
pH Arterial	Controle	7,444 $\pm$ 0,039	7,452 $\pm$ 0,05	7,410 $\pm$ 0,04	7,458 $\pm$ 0,05	Grupo x tempo p < 0,001 Tempo p < 0,001 Grupo 0,012
	15%	7,429 $\pm$ 0,025	7,35 $\pm$ 0,02*	7,37 $\pm$ 0,03*	7,414 $\pm$ 0,02	
	10%	7,437 $\pm$ 0,048	7,36 $\pm$ 0,04*	7,26 $\pm$ 0,05*	7,40 $\pm$ 0,03*	
HCO ₃ ⁻ mmol/L	Controle	27,7 $\pm$ 1,6	27,7 $\pm$ 1,4	28,4 $\pm$ 1,4	28,3 $\pm$ 1,3	Grupo x tempo p < 0,01 Tempo p < 0,001 Grupo 0,079
	15%	28 $\pm$ 1	25,6 $\pm$ 0,4 ^{ab}	26,7 $\pm$ 1*	27,9 $\pm$ 1,1	
	10%	28,1 $\pm$ 1,2	24,9 $\pm$ 1,8 ^{ab}	26,1 $\pm$ 1,9 ^{ab}	27,3 $\pm$ 2	
Na ⁺ mmol/L	Controle	138 $\pm$ 1	138 $\pm$ 1	137 $\pm$ 1	137 $\pm$ 2	Grupo x tempo 0,268 Tempo p < 0,001 Grupo p 0,469
	15%	138 $\pm$ 3	138 $\pm$ 3	137 $\pm$ 3	137 $\pm$ 2	
	10%	139 $\pm$ 1	139 $\pm$ 1	138 $\pm$ 1	138 $\pm$ 1	
K ⁺ mmol/L	Controle	3,8 $\pm$ 0,2	3,9 $\pm$ 0,2	4,1 $\pm$ 0,1*	4,1 $\pm$ 0,2*	Grupo x tempo p < 0,001 Tempo p < 0,001 Grupo 0,113
	15%	3,7 $\pm$ 0,2	3,4 $\pm$ 0,2*	4,1 $\pm$ 0,1*	4,1 $\pm$ 0,1*	
	10%	3,7 $\pm$ 0,1	3,4 $\pm$ 0,2*	3,9 $\pm$ 0,2*	4,1 $\pm$ 0,3*	
BE mmol/L	Controle	3,7 $\pm$ 2	3,9 $\pm$ 2,2	4,7 $\pm$ 2	4,5 $\pm$ 2	Grupo x tempo p < 0,001 Tempo p < 0,001 Grupo p 0,06
	15%	3,8 $\pm$ 1	0,5 $\pm$ 0,8 ^{ab}	2,2 $\pm$ 1,7 ^{ab}	3,6 $\pm$ 1	
	10%	4 $\pm$ 1,8	-0,4 $\pm$ 2,9 ^{ab}	1,7 $\pm$ 2,7 ^{ab}	2,8 $\pm$ 2,2*	
Lactato arterial mmol/L	Controle	1,5 $\pm$ 0,6	1,7 $\pm$ 0,6	1,5 $\pm$ 0,5	1,6 $\pm$ 0,6	Grupo x tempo 0,153 Tempo 0,320 Grupo 0,150
	15%	1,4 $\pm$ 0,3	1,2 $\pm$ 0,3	1,2 $\pm$ 0,4	1,1 $\pm$ 0,2	
	10%	1,5 $\pm$ 0,4	1,5 $\pm$ 0,4	1,5 $\pm$ 0,4	1,4 $\pm$ 0,4	

PaO₂: pressão parcial de oxigênio no sangue arterial; PaCO₂: pressão parcial de gás carbônico no sangue arterial; SaO₂: saturação de oxigênio no sangue arterial; PvO₂: pressão parcial de oxigênio no sangue venoso misto; SvO₂: saturação de oxigênio no sangue venoso misto; HCO₃⁻: bicarbonato; Na⁺: sódio sérico; K⁺: potássio sérico; BE: excesso de base; lactato T0: valor basal, início da hemodiluição; T1: término da hemodiluição; T2: 60 minutos após o término da hemodiluição; T3: 90 minutos após o término da hemodiluição; * p < 0,05 diferente de T0; valor basal ^a p < 0,05 diferente do grupo Controle.

Tabela 3. Parâmetros de oxigenação dos animais do grupo Controle, hematócrito 15% e hematócrito 10%. (média $\pm$ desvio padrão). São Paulo, 2011

Parâmetro	Grupo	Tempos				Estatística (ANOVA)
		T0	T1	T2	T3	
IDO ₂ ml.min ⁻¹ .m ²	Controle	583 $\pm$ 110	619 $\pm$ 6,2	636 $\pm$ 70	640 $\pm$ 79	Grupo x tempo p < 0,001
	15%	569 $\pm$ 89	509 $\pm$ 98 ^a	440 $\pm$ 76 ^{*a}	432 $\pm$ 61 ^{*a}	Tempo p < 0,002
	10%	524 $\pm$ 141	407 $\pm$ 72 ^{*a}	393 $\pm$ 1 ^{*a}	396 $\pm$ 82 ^{*a}	Grupo p < 0,001
IVO ₂ ml.min ⁻¹ .m ²	Controle	128 $\pm$ 20	117 $\pm$ 11	125 $\pm$ 13	124 $\pm$ 10	Grupo x tempo 0,290
	15%	130 $\pm$ 29	134 $\pm$ 21	127 $\pm$ 16	128 $\pm$ 11	Tempo 0,395
	10%	120 $\pm$ 40	124 $\pm$ 35	103 $\pm$ 40	130 $\pm$ 16	Grupo 0,481
TEO ₂ %	Controle	23,3 $\pm$ 6,1	19,2 $\pm$ 19	19,6 $\pm$ 1,7	19,4 $\pm$ 1,8	Grupo x tempo p < 0,001
	15%	23,1 $\pm$ 5,5	26,6 $\pm$ 2,2 ^a	29,4 $\pm$ 4 ^{*a}	30 $\pm$ 3,5 ^{*a}	Tempo 0,019
	10%	23,3 $\pm$ 7	29,9 $\pm$ 5,9 ^{*a}	27 $\pm$ 10,2 ^a	33,6 $\pm$ 1,4 ^{*a}	Grupo p < 0,001

DO₂I: Índice de transporte de oxigênio; VO₂I: Índice de consumo de oxigênio; TEO₂: taxa de extração de oxigênio; T0, valor basal, início da hemodiluição; T1: término da hemodiluição; T2: 60 minutos após o término da hemodiluição; T3: 90 minutos após o término da hemodiluição; * p < 0,05 diferente de T0; ^a p < 0,05 diferente do grupo Controle.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Verifica-se na literatura uma escassez de dados no que diz respeito à avaliação dos efeitos da hemodiluição normovolêmica aguda no tecido cerebral. A anemia aguda tem sido associada a distúrbios cognitivos e neurofisiológicos em pacientes saudáveis⁶² e a danos neurológicos e mortalidade aumentada em pacientes no período perioperatório, por mecanismos frequentemente indefinidos.⁶³ Entre as causas mais comuns de anemia aguda está a ressuscitação volêmica com fluidos acelulares (hemodiluição)⁶⁴, sendo que estudos experimentais sugerem o aumento de danos cerebrais causados pela limitação no aporte de oxigênio no tecido cerebral.⁶⁵

Nesse estudo avaliou-se os efeitos da anemia aguda no tecido cerebral (córtex e hipocampo) por meio da avaliação de marcadores da apoptose neuronal em diferentes compartimentos subcelulares. No presente estudo, a hemodiluição normovolêmica aguda com hematócrito alvo de 15% e 10% não levou a um aumento da expressão da proteína pró-apoptótica Bax, em relação ao grupo controle, em extrato de proteína total de córtex frontal, fração mitocondrial e no núcleo neuronal, demonstrando que a diminuição do hematócrito para esses valores não foi suficiente para levar à hipóxia tecidual cerebral e, conseqüentemente, ativação do processo de apoptose. Da mesma forma, a proteína anti-apoptótica Bcl-x manteve-se inalterada em todos os grupos estudados. A atividade das caspases 3 e 9 na fração mitocondrial do córtex frontal e na fração citosólica do hipocampo

manteve-se inalterada nos grupos Ht 10% e Ht 15%, assim como a fragmentação do DNA nuclear e mitocondrial.

As proteínas membro da família Bcl-2 desempenham um importante papel na morte celular programada.⁴³ Essas proteínas, fixadas na membrana externa da mitocôndria por um terminal-C, têm um importante impacto na função da membrana mitocondrial durante a apoptose.⁶⁶ Sabe-se que durante a morte celular programada um grande número de eventos ocorre, incluindo perda do gradiente eletroquímico (potencial de membrana) através da membrana interna da mitocôndria, desacoplamento da fosforilação oxidativa, geração de espécies reativas de oxigênio, liberação de Ca^{+2} , liberação de citocromo-c oxidase, e outras proteínas apoptogênicas do compartimento citosólico mitocondrial.⁶⁷ Níveis elevados de proteínas da família de genes Bcl-2 bloqueiam a apoptose (Bcl-2 e Bcl-x) e outras promovem-na (Bax, Bad e Bak). Os genes anti-apoptóticos da família Bcl-2 são promotores da sobrevivência celular por inibirem a ocorrência da apoptose.⁶⁸ Dentre as atuações da proteína Bcl-2, está o bloqueio da liberação de citocromo-C pela mitocôndria após estímulo apoptogênico, impedindo, portanto, a ativação das caspase.⁶⁹ A proteína Bax pode produzir heterodímeros com a Bcl-2 (Bax/Bcl-2) ou homodímeros (Bax/Bax). Dessa forma, Bcl-2 suprime a morte celular quando heterodimerizada com Bax, e por outro lado, o homodímero Bax/Bax promove a apoptose. O mecanismo de controle da apoptose pelos genes da família Bcl-2 envolve a formação de poros na membrana mitocondrial, permitindo a interação de várias proteínas envolvidas na regulação da morte celular.⁶⁸

Embora os grupos Ht 10% e Ht 15% não tenham apresentado aumento na expressão da Bax e Bcl-x, o grupo hipóxia-hipóxica, utilizado no estudo como controle positivo, apresentou um aumento da expressão da proteína proapoptótica Bax no extrato protéico do lisado total do córtex frontal, e nas frações mitocondriais e no núcleo neuronal. Esse aumento da expressão da proteína Bax ou o aumento na relação de Bax/Bcl-x deve-se à baixa fração inspirada de oxigênio (FiO_2 6%), promovendo hipóxia tecidual, e está associado a morte celular programada, o que corrobora os estudos realizados por Delivoria-Papadopoulos et al.⁷⁰

Os resultados demonstram que a hipóxia resulta em aumentado nível de proteínas pro-apoptóticas (Bax) em relação a proteínas anti-apoptóticas (Bcl-x), dessa forma aumentando a relação de proteínas pro-apoptóticas/anti-apoptóticas. Essa relação aumentada na mitocôndria pode alterar a permeabilidade da membrana mitocondrial. Ao mesmo tempo a relação aumentada de proteínas pro-apoptóticas/anti-apoptóticas pode levar à ativação mediada pelo fator-1 (Apaf-1) da pró-caspase 9 em caspase 9 que, subsequentemente, ativa a pró-caspase 3 em caspase 3, sendo essa a executora da morte celular.⁷⁰ Esse fato está de acordo com o observado nesse estudo, uma vez que a expressão, tanto da caspase 9 como da caspase 3, aumentou significativamente no grupo hipóxia-hipóxica na fração citosólica do hipocampo e na fração mitocondrial. Outros estudos experimentais apresentaram resultados semelhantes.^{43, 54, 61} No grupo controle e nos grupos hemodiluídos com hematócrito alvo de 15% e 10%,

devido à não alteração da taxa de Bax/Bcl-x, a atividade das caspases 9 e 3 permaneceu inalterada.

Os resultados do presente estudo demonstraram, ainda, um aumento da fragmentação do DNA mitocondrial e nuclear no grupo hipóxia-hipóxica em relação aos demais grupos. A hemodiluição com hematócrito alvo de 15% e 10% não aumentou a fragmentação do DNA mitocondrial e nuclear em relação ao grupo controle. Segundo Mishra et al.⁴³, o óxido nítrico gerado durante a hipóxia pode alterar a membrana mitocondrial levando a um aumento no Ca^{+2} mitocondrial, o que resulta na ativação da endonuclease Ca^{+2} dependente e na fragmentação do DNA mitocondrial. Além disso, o aumento da expressão de Bax, levando à ativação da caspase 9 pode provocar danos proteolíticos às proteínas mitocondriais. Da mesma forma, o processo da fragmentação do DNA nuclear é demonstrado em um estudo de Zanelli et al.⁷¹, no qual a hipóxia cerebral leva a uma ativação dos mecanismos de influxo do Ca^{+2} nuclear neuronal, gerando aumento da expressão do gene pro-apoptótico Bax que, por sua vez, promove a morte celular pela ativação da caspase 9 e da caspase 3 executora, que cataliza a degradação das proteínas do citoesqueleto e, subsequentemente, ativa a CAD (caspase-ativada DNase) que, então, cliva o DNA cromossômico, levando à fragmentação do DNA genômico. Além disso, o aumento do Ca^{+2} intranuclear pode ativar endonucleases dependentes do Ca^{+2} , levando à fragmentação do DNA nuclear e resultando em morte neuronal hipóxica. Em nosso estudo, pode-se observar através do gel de agarose, que a fragmentação do DNA nuclear foi maior no grupo hipóxia em relação aos

demais grupos.

De modo geral, nossos resultados demonstraram ausência de apoptose nos grupos hemodiluídos com hematócrito de 15% e 10%, esse fato está de acordo com o estudo realizado por Vovenko e Chuikin²⁷ no qual os ratos submetidos a hemodiluição com hematócrito alvo de 30%, 20% e 10% mantiveram um nível de oxigenação cerebral acima do limite hipóxico.

Além dos marcadores da apoptose já citados, foi avaliado o anticorpo Anti- NeuN, por meio de western blot em lisado total do córtex frontal, que mostrou-se diminuído no grupo hipóxia-hipóxica, mantendo-se sem diferença nos grupos controle e hemodiluídos. Mullen et al.⁷² demonstraram que o NeuN é expresso quase exclusivamente no sistema nervoso, aparece no início do desenvolvimento e persiste até a fase adulta e que sua expressão no sistema nervoso é exclusiva dos neurônios, sendo um marcador específico de núcleo neuronal. Embora em nosso estudo a avaliação do NeuN tenha sido realizada somente na extração de proteína total, foi demonstrado não haver diferença entre a avaliação do anticorpo anti-NeuN em preparados nucleares de neurônios purificados de ratos comparado com o tecido total do cérebro.⁷²

Apesar de neurônios saudáveis normalmente expressarem um intenso sinal de NeuN, tem sido demonstrado que a imunoreatividade do NeuN é reduzida em diversas condições patológicas que afetam a viabilidade neuronal, tais quais isquemia cerebral, hipóxia e trauma.⁷³ Entretanto, a perda da imunoreatividade do NeuN pode não indicar

necessariamente desintegração de neurônios, podendo ser devida à depleção da proteína NeuN ou perda de sua antigenicidade.⁷⁴

Dessa forma, como a antigenicidade do NeuN é prontamente reduzida em neurônios após lesão cerebral induzida por alterações metabólicas, a perda da imunorreatividade do NeuN não deve ser tomada como um indicador definitivo de perda neuronal.⁷⁴

A hemodiluição ativa respostas adrenérgicas compensatórias para manter a perfusão dos órgãos⁷⁵, tais como aumento do índice cardíaco, do volume de ejeção e do débito cardíaco¹², corroborando com os resultados obtidos. No homem, tanto o índice cardíaco como o volume de ejeção aumentam proporcionalmente à redução na concentração de hemoglobina até níveis muito baixos, até o ponto em que a resposta do índice cardíaco torna-se predominante.⁷⁶ Uma grande porcentagem desta resposta no débito cardíaco é direcionada ao cérebro.¹³ Então, o fluxo sanguíneo cerebral aumenta em proporção ao grau da anemia, como demonstrado em estudos clínicos⁷⁷ e laboratoriais.⁷⁸ Esses e outros mecanismos compensatórios garantem que seja mantida uma adequada tensão de oxigênio no tecido cerebral durante a hemodiluição aguda.¹⁴ Entretanto, à medida que a concentração de hemoglobina é reduzida para 3,5g/dl ou o valor de hematócrito é reduzido abaixo de 10%, o consumo de oxigênio sistêmico torna-se dependente de suprimento e pode ser observada hipóxia do tecido cortical cerebral.¹³

Os mecanismos compensatórios incluem, além do aumento do débito cardíaco, alterações na taxa de extração do oxigênio das hemácias.⁷⁹ Em

nosso estudo, houve um aumento da taxa de extração de oxigênio (TEO_2) nos grupos hemodiluídos, com diminuição do índice de transporte de oxigênio (DO_2I), sendo que o índice de consumo de oxigênio (VO_2I) permaneceu inalterado. Isso demonstra que os mecanismos compensatórios foram suficientes para manter o consumo de oxigênio nos tecidos.

Durante o período experimental, algumas dificuldades surgiram. O anticorpo Bcl-2 utilizado inicialmente para as marcações de western blotting nas frações subcelulares nucleares e mitocondriais de córtex frontal não funcionou como esperado. Várias tentativas foram realizadas durante um bom período, porém sem muito sucesso. Desta forma, houve a necessidade da compra de outro anticorpo da família do Bcl-2 conhecido como Bcl-x. Em seguida, padronizamos sua marcação e posteriormente foram realizadas suas marcações nas frações citadas acima. Durante o estudo experimental, foi observado que haveria uma grande dificuldade para realizar o isolamento das frações subcelulares de núcleo neuronal. Segundo Mishra et al.⁶⁰ e Delivoria-Papadopoulos et al.⁸⁰, o grau de pureza esperado é de 90%. A técnica descrita para o isolamento de núcleo neuronal pelos referidos autores foi realizada diversas vezes, porém sem obter o resultado esperado em relação ao grau de pureza. Por esse motivo, foi realizada a técnica descrita nesse trabalho, adaptada de Booth e Clark.⁵⁹ para obtenção de um melhor grau de pureza.

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Por meio da avaliação dos precursores da apoptose neuronal, o presente estudo demonstrou que a hemodiluição normovolemica aguda, em dois diferentes níveis de hematócrito (10 e 15%), não promoveu hipóxia e isquemia cerebral em porcos durante o período avaliado.

ANEXOS

8 ANEXOS

ANEXO A – Valores individuais de Massa Corporal (Kg) dos animais do grupo Controle e submetidos à hemodiluição com Hematócrito Ht 15% e Ht 10%. São Paulo, 2011

	Animal									
	1	2	3	4	5	6	7	8	Média	DP
Controle										
Peso	33,5	23,6	30,2	31,7	29,5	31,1	24,2	25	28,6	3,79
BSA	0,93	0,74	0,87	0,9	0,85	0,89	0,75	0,77	0,84	0,07
Ht 15%										
Peso	27	29,9	29	36,5	29,5	30,3	34	33,1	31,16	3,1
BSA	0,81	0,86	0,84	0,99	0,86	0,87	0,94	0,93	0,89	0,06
Ht 10%										
Peso	29	26	30	25,7	24,8	32	29,2	31,2	28,49	2,68
BSA	0,84	0,79	0,87	0,78	0,76	1	0,85	0,89	0,84	0,05

DP: desvio padrão

ANEXO B – Valores individuais de frequência cardíaca (bpm) dos animais do grupo Controle, e submetidos à hemodiluição com Hematócrito (Ht 15%) e Ht 10%. São Paulo, 2011

	Animal									
	1	2	3	4	5	6	7	8	Média	DP
Controle										
T0	84	106	106	92	135	91	127	104	105,6	17,7
T1	93	112	106	109	127	124	131	110	114	12,6
T2	101	114	126	136	119	142	135	113	123,3	14
T3	107	112	133	133	121	168	130	112	127	19,4
Ht 15%										
T0	104	97	118	128	86	117	82	107	104,9	16
T1	126	145	132	156	138	137	135	150	139,9	9,8
T2	117	147	122	145	105	142	126	122	128,3	15
T3	113	154	121	151	107	151	128	139	133	18,4
Ht 10%										
T0	84	90	107	72	93	125	74	78	90,4	18,1
T1	118	144	139	123	150	169	106	108	132,1	22,1
T2	106	142	135	104	152	172	99	90	125	29,4
T3	106	138	136	106	147	173	97	95	124,8	28

T0: valor basal; T1: imediatamente após a hemodiluição; T2: 60 minutos após a hemodiluição; T3: 120 minutos após a hemodiluição; DP: desvio padrão

ANEXO C – Valores individuais de pressão arterial sistólica (PAS) (mmHg) dos animais do grupo Controle, e submetidos à hemodiluição com Hematócrito Ht 15% e Ht 10%. São Paulo, 2011

	Animal									
	1	2	3	4	5	6	7	8	Média	DP
Controle										
T0	87	86	95	91	90	98	87	88	90,25	4,27
T1	87	94	103	94	88	100	93	95	94,25	5,39
T2	86	94	114	106	102	99	102	111	101,75	9,02
T3	86	96	108	98	101	105	106	97	99,63	7,07
Ht 15%										
T0	107	83	92	109	104	90	99	91	96,9	9,3
T1	124	106	102	120	111	109	114	124	113,8	8,3
T2	101	96	79	105	100	106	113	103	100,4	10
T3	101	97	79	108	97	99	113	101	99,4	9,9
Ht 10%										
T0	112	11	108	96	87	100	96	94	88	32,1
T1	120	122	126	121	103	111	109	116	116	7,7
T2	101	117	91	104	103	101	98	97	101,5	7,5
T3	90	113	105	105	98	88	83	77	94,9	12,4

T0: valor basal; T1: imediatamente após a hemodiluição, T2: 60 minutos após a hemodiluição; T3: 120 minutos após a hemodiluição; DP: desvio padrão

ANEXO D – Valores individuais de pressão arterial diastólica (PAD) (mmHg) dos animais do grupo Controle, e submetidos à hemodiluição com Hematócrito Ht 15% e Ht 10%. São Paulo, 2011

	Animal									
	1	2	3	4	5	6	7	8	Média	DP
Controle										
T0	53	50	55	58	69	58	54	54	56,4	5,7
T1	50	55	59	60	63	61	58	60	58,3	4,1
T2	51	56	68	70	62	60	69	67	62,9	6,9
T3	55	57	59	65	61	64	69	70	62,5	5,5
Ht 15%										
T0	68	56	55	72	66	56	59	57	61,1	6,6
T1	73	63	55	68	74	66	55	82	67	9,4
T2	54	53	44	58	60	69	58	64	57,5	7,5
T3	52	57	44	62	58	59	61	64	57,1	6,4
Ht 10%										
T0	70	59	71	53	49	65	51	53	58,9	8,8
T1	74	56	74	66	71	61	55	60	64,6	7,7
T2	56	56	52	52	59	52	49	45	52,6	4,4
T3	49	54	64	55	56	49	40	38	50,6	8,6

T0: valor basal; T1: imediatamente após a hemodiluição, T2: 60 minutos após a hemodiluição; T3: 120 minutos após a hemodiluição; DP: desvio padrão

ANEXO E – Valores individuais de pressão arterial média (PAM) (mmHg) dos animais do grupo Controle, e submetidos à hemodiluição com Hematócrito Ht 15% e Ht 10%. São Paulo, 2011

	Animal									
	1	2	3	4	5	6	7	8	Média	DP
Controle										
T0	65	63	69	71	75	73	69	68	69,1	3,9
T1	65	69	75	74	74	77	73	72	72,4	3,8
T2	67	69	85	85	78	77	84	83	78,5	7,2
T3	68	71	78	80	76	81	74	81	76,1	4,8
Ht 15%										
T0	82	67	71	86	81	69	70	70	74,5	7,3
T1	92	84	77	91	89	84	80	100	87,1	7,4
T2	70	72	60	79	75	81	80	79	74,5	7,1
T3	69	74	59	81	74	76	82	78	74,1	7,4
Ht 10%										
T0	85	77	84	69	64	79	66	67	73,9	8,4
T1	92	84	96	90	87	83	75	83	86,3	6,5
T2	74	81	70	73	78	77	66	65	73	5,7
T3	66	78	82	75	75	67	56	55	69,3	10

T0: valor basal; T1: imediatamente após a hemodiluição, T2: 60 minutos após a hemodiluição; T3: 120 minutos após a hemodiluição; DP: desvio padrão

ANEXO F – Valores individuais de pressão de oclusão de artéria pulmonar (POAP) (mmHg) dos animais do grupo Controle, e submetidos à hemodiluição com Hematócrito Ht 15% e Ht 10%. São Paulo, 2011

	Animal									
	1	2	3	4	5	6	7	8	Média	DP
Controle										
T0	12	11	12	14	13	11	11	10	11,8	1,3
T1	12	12	13	14	13	12	12	10	12,3	1,2
T2	12	12	12	14	14	11	12	10	12,1	1,4
T3	12	13	12	14	15	12	12	10	12,5	1,5
Ht 15%										
T0	11	12	12	15	12	13	13	11	12,38	1,3
T1	14	16	14	16	13	13	14	14	14,25	1,16
T2	12	14	12	13	11	13	13	11	12,38	1,06
T3	11	11	12	13	12	12	12	10	11,63	0,92
Ht 10%										
T0	10	13	11	12	14	12	16	12	12,5	1,9
T1	12	15	16	18	19	14	19	14	15,9	2,6
T2	10	12	12	12	14	13	19	12	13	2,7
T3	10	12	15	12	13	12	18	11	12,9	2,5

T0: valor basal; T1: imediatamente após a hemodiluição, T2: 60 minutos após a hemodiluição; T3: 120 minutos após a hemodiluição; DP: desvio padrão

ANEXO G – Valores individuais de pressão venosa central (PVC) (mmHg) dos animais do grupo Controle, e submetidos à hemodiluição com Hematócrito Ht 15% e Ht 10%. São Paulo, 2011

	Animal									
	1	2	3	4	5	6	7	8	Média	DP
Controle										
T0	9	9	9	13	9	10	8	5	9	2,2
T1	9	9	9	13	9	10	8	5	9	2,2
T2	9	9	9	13	10	10	8	5	9,1	2,2
T3	9	9	9	13	9	10	9	5	9,1	2,2
Ht 15%										
T0	9	9	8	9	9	10	10	12	9,5	1,2
T1	11	12	10	9	10	11	10	14	10,9	1,6
T2	9	10	8	11	10	11	10	12	10,1	1,2
T3	9	9	9	10	9	11	10	12	9,9	1,1
Ht 10%										
T0	8	11	9	9	10	10	10	9	9,5	0,9
T1	10	12	12	12	13	17	11	12	12,4	2,1
T2	8	10	8	9	10	10	11	11	9,6	1,2
T3	8	9	8	9	10	10	10	11	9,4	1,1

T0: valor basal; T1: imediatamente após a hemodiluição, T2: 60 minutos após a hemodiluição; T3: 120 minutos após a hemodiluição; DP: desvio padrão

ANEXO H – Valores individuais de índice sistólico (IS) (ml/bat.) dos animais do grupo Controle, e submetidos à hemodiluição com Hematócrito (Ht 15%) e Ht 10%. São Paulo, 2011

	Animal									
	1	2	3	4	5	6	7	8	Média	DP
Controle										
T0	43	37	38	41	33	36	35	45	38,5	4,1
T1	44	37	38	39	32	36	35	42	37,9	3,8
T2	44	43	38	40	38	38	39	45	40,6	2,9
T3	48	40	44	38	38	32	33	48	40,1	6,2
Ht 15%										
T0	43	48	38	44	48	38	52	41	44	5
T1	55	51	52	48	51	40	52	39	48,5	5,9
T2	54	55	50	52	65	53	60	52	55,1	5
T3	42	59	42	45	58	43	52	42	47,9	7,4
Ht 10%										
T0	48	46	48	49	43	37	43	47	45,1	4
T1	52	58	57	52	59	43	42	52	51,9	6,4
T2	69	64	61	77	58	38	55	66	61	11,5
T3	58	59	42	60	54	36	52	53	51,8	8,5

T0: valor basal; T1: imediatamente após a hemodiluição, T2: 60 minutos após a hemodiluição; T3: 120 minutos após a hemodiluição; DP: desvio padrão

ANEXO I – Valores individuais de temperatura corporal (°C) dos animais do grupo Controle, e submetidos à hemodiluição com Hematócrito (Ht 15%) e Ht 10%. São Paulo, 2011

	Animal									
	1	2	3	4	5	6	7	8	Média	DP
Controle										
T0	37,1	37,3	38,5	38	36,4	36,5	37,8	36,1	37,2	0,8
T1	37	37,3	38,3	38,2	36,5	36,4	38,2	36,7	37,3	0,8
T2	37,2	37,3	38,7	38,7	36,4	36,3	38,7	37,1	37,6	1
T3	37,3	37,4	38,7	38,5	36,4	36,4	38,8	37,4	37,6	1
Ht 15%										
T0	38,1	36,9	37,5	38	37,5	36,5	39	37,5	37,6	0,8
T1	38,3	37,7	37,5	37,9	37,5	36,4	38,2	37	37,6	0,6
T2	38,9	38,5	37,7	38,5	37,7	36,9	38,1	37,1	37,9	0,7
T3	38,9	38,9	37,4	38,8	37,9	37,3	38	37,1	38	0,7
Ht 10%										
T0	37,7	39,3	37,2	36,8	38,2	37,2	38	38	37,7	0,8
T1	36,9	38,2	37,2	36,4	38,8	37,8	38	37	37,5	0,8
T2	37,7	38,2	37,3	36,9	39,3	38,5	38	37	37,9	0,8
T3	37,9	38,3	37,3	36,8	39,4	38,8	38	37	38	0,9

T0: valor basal; T1: imediatamente após a hemodiluição, T2: 60 minutos após a hemodiluição; T3: 120 minutos após a hemodiluição; DP: desvio padrão

ANEXO J – Valores individuais de hematócrito (%) dos animais do grupo Controle, e submetidos à hemodiluição com Hematócrito (Ht 15%) e Ht 10%. São Paulo, 2011

	Animal									
	1	2	3	4	5	6	7	8	Média	DP
Controle										
T0	30	35	32	29	34	29	33	31	32	2
T1	29	34	29	27	33	26	32	27	30	3
T2	28	33	28	27	26	28	30	29	29	2
T3	28	34	30	28	27	28	31	30	30	2
Ht 15%										
T0	29	33	31	25	27	30	25	30	29	3
T1	14	14	14	14	15	10	10	14	13	2
T2	15	15	14	15	16	13	14	15	15	1
T3	16	16	15	15	17	16	14	16	16	1
Ht 10%										
T0	27	35	30	25	30	31	30	30	30	3
T1	9	9	10	10	10	10	10	10	10	0
T2	11	12	13	14	11	12	11	11	12	1
T3	11	14	16	14	11	14	11	12	13	2

T0: valor basal; T1: imediatamente após a hemodiluição, T2: 60 minutos após a hemodiluição; T3: 120 minutos após a hemodiluição; DP: desvio padrão

ANEXO L – Valores individuais de fração de ejeção (FE) (%) dos animais do grupo Controle, e submetidos à hemodiluição com Hematócrito (Ht 15%) e Ht 10%. São Paulo, 2011

	Animal									
	1	2	3	4	5	6	7	8	Média	DP
Controle										
T0	31	24	28	50	22	24	28	32	29,9	8,9
T1	34	26	27	30	24	26	27	32	28,3	3,4
T2	29	30	27	27	28	30	27	32	28,8	1,8
T3	32	26	29	26	28	26	29	34	28,8	3
Ht 15%										
T0	33	17	30	25	30	17	32	27	26,4	6,3
T1	38	35	36	31	35	35	37	34	35,1	2,1
T2	31	33	34	29	34	33	34	32	32,5	1,8
T3	31	28	33	28	34	28	33	29	30,5	2,6
Ht 10%										
T0	23	30	35	22	35	30	30	24	28,6	5,1
T1	41	36	36	39	37	34	12	36	33,9	9,1
T2	34	39	38	30	36	35	13	39	33	8,6
T3	32	37	37	31	36	31	14	39	32,1	7,9

T0: valor basal; T1: imediatamente após a hemodiluição, T2: 60 minutos após a hemodiluição; T3: 120 minutos após a hemodiluição; DP: desvio padrão

ANEXO M – Valores individuais de volume sistólico final (ESV) (ml/bat./m²) dos animais do grupo Controle, e submetidos à hemodiluição com Hematócrito (Ht 15%) e Ht 10%. São Paulo, 2011

	Animal									
	1	2	3	4	5	6	7	8	Média	DP
Controle										
T0	93	83	93	48	102	48	102	71	80	22,2
T1	88	91	97	100	100	100	100	69	93,1	10,8
T2	107	78	104	114	87	114	87	70	95,1	16,9
T3	98	91	94	115	84	115	84	72	94,1	15,1
Ht 15%										
T0	81	81	80	137	92	142	98	112	102,9	25,1
T1	85	85	88	125	100	95	98	94	96,3	12,9
T2	81	81	73	127	107	97	108	98	96,5	17,8
T3	80	80	73	123	100	105	105	97	95,4	16,7
Ht 10%										
T0	119	84	90	127	66	73	454	119	141,5	128,3
T1	85	91	93	91	86	92	491	117	143,3	140,9
T2	98	78	72	115	82	77	367	90	122,4	99,8
T3	103	80	70	94	79	76	355	85	117,8	96,4

T0: valor basal; T1: imediatamente após a hemodiluição, T2: 60 minutos após a hemodiluição; T3: 120 minutos após a hemodiluição; DP: desvio padrão

ANEXO N – Valores individuais de índice de trabalho sistólico do ventrículo esquerdo (LVSWI) (g-m/m²/bat.) dos animais do grupo Controle, e submetidos à hemodiluição com Hematócrito (Ht 15%) e Ht 10%. São Paulo, 2011

	Animal									
	1	2	3	4	5	6	7	8	Média	DP
Controle										
T0	23	24	28	29	28	28	27	32	27,4	2,8
T1	32	28	35	32	29	29	28	29	30,3	2,5
T2	33	29	45	37	30	39	30	29	34	5,8
T3	33	28	38	33	29	31	29	41	32,8	4,6
Ht 15%										
T0	37	36	27	37	43	25	39	30	34,3	6,3
T1	53	59	45	51	61	51	51	57	53,5	5,2
T2	30	39	26	42	51	46	44	42	40	8,3
T3	29	33	25	41	47	32	44	36	35,9	7,6
Ht 10%										
T0	36	36	46	29	24	33	29	29	32,8	6,7
T1	64	65	65	64	58	46	40	59	57,6	9,5
T2	46	54	34	36	50	36	36	40	41,5	7,5
T3	38	42	52	45	47	26	27	32	38,6	9,6

T0: valor basal; T1: imediatamente após a hemodiluição, T2: 60 minutos após a hemodiluição; T3: 120 minutos após a hemodiluição; DP: desvio padrão

ANEXO O – Valores individuais de índice cardíaco (IC) (L/mim./m²) dos animais do grupo Controle, e submetidos à hemodiluição com Hematócrito (Ht 15%) e Ht 10%. São Paulo, 2011

	Animal									
	1	2	3	4	5	6	7	8	Média	DP
Controle										
T0	2,7	3,5	3,8	3,4	4,5	4,5	4,3	4,3	3,9	0,6
T1	4,1	4,1	4,4	4,2	4,5	4,5	4,4	4,2	4,3	0,2
T2	4,5	4,3	5,6	5,1	4,1	4,1	4,1	4,6	4,6	0,5
T3	4,6	3,9	5,6	4,9	4,2	4,5	3,9	4,7	4,5	0,6
Ht 15%										
T0	4	4,7	3,9	4,8	4	3,8	3,5	4,2	4,1	0,4
T1	6,3	9,3	6,9	7,8	8,1	7,2	7,7	7,3	7,6	0,9
T2	4,3	7,2	4,9	6,8	6,2	7,1	6,1	5,5	6	1
T3	4,2	5,9	4,6	6,7	5,9	5,6	6	5,5	5,6	0,8
Ht 10%										
T0	3	3,7	5,2	3,1	3,3	4,6	3,1	3,1	3,6	0,8
T1	6,9	10	8,3	8,4	9,3	8,2	5,5	6,7	7,9	1,5
T2	5,6	8,2	5,9	5,6	8,8	7,1	5,5	5,1	6,5	1,4
T3	5,4	6,5	6,3	5,7	8,2	6,1	5,1	5,1	6,1	1

T0: valor basal; T1: imediatamente após a hemodiluição, T2: 60 minutos após a hemodiluição; T3: 120 minutos após a hemodiluição; DP: desvio padrão

ANEXO P – Valores individuais de índice de resistência vascular sistêmica (IRVS) ($\text{dinas.s.cm}^{-5}.\text{m}^{-2}$) dos animais do grupo Controle, e submetidos à hemodiluição com Hematócrito (Ht 15%) e Ht 10%. São Paulo, 2011

	Animal									
	1	2	3	4	5	6	7	8	Média	DP
Controle										
T0	164,2	1226	1265	1347	1181	1181	1144	117,7	953	505
T1	108,9	1184	1209	1156	1163	1163	1182	128,5	912	490
T2	104,1	1110	1080	1127	1321	1321	1471	135,5	959	534
T3	102,9	1266	986	1096	1266	1264	1552	128,2	958	545
Ht 15%										
T0	1478	998	1283	1245	1457	1227	1390	1161	1279,9	160,5
T1	1029	619	776	843	776	806	731	941	815,1	126
T2	1148	688	852	804	844	786	924	977	877,9	139,7
T3	1144	877	879	852	877	923	967	963	935,3	94,4
Ht 10%										
T0	2070	1438	120,3	155,9	1313	1212	1427	1424	1145	671,9
T1	950	576	81,2	74,1	634	701	926	843	598,2	347,5
T2	844	671	84,6	91,3	617	754	796	854	589	319,6
T3	866	855	53,6	92,8	637	746	727	696	584,2	324,6

T0: valor basal; T1: imediatamente após a hemodiluição; T2: 60 minutos após a hemodiluição; T3: 120 minutos após a hemodiluição; DP: desvio padrão

ANEXO Q – Valores individuais de índice de trabalho sistólico do ventrículo direito (RVSWI) ($\text{g-n/m}^2/\text{bat.}$) dos animais do grupo Controle, e submetidos à hemodiluição com Hematócrito (Ht 15%) e Ht 10%. São Paulo, 2011

	Animal									
	1	2	3	4	5	6	7	8	Média	DP
Controle										
T0	4	5	5	4	5	5	5	6	4,9	0,6
T1	5	5	6	4	6	6	5	6	5,4	0,7
T2	5	5	8	5	6	6	5	7	5,9	1,1
T3	5	5	8	4	6	5	5	7	5,6	1,3
Ht 15%										
T0	5	8	5	8	6	9	6	4	6,4	1,8
T1	8	13	7	12	10	8	12	7	9,6	2,4
T2	5	9	5	6	7	6	9	4	6,4	1,8
T3	5	7	5	7	8	5	8	4	6,1	1,6
Ht 10%										
T0	5	4	7	5	4	4	6	5	5	1,1
T1	10	10	11	12	9	8	8	8	9,5	1,5
T2	9	6	6	8	8	6	9	7	7,4	1,3
T3	8	7	8	9	8	5	9	6	7,5	1,4

T0: valor basal; T1: imediatamente após a hemodiluição; T2: 60 minutos após a hemodiluição; T3: 120 minutos após a hemodiluição; DP: desvio padrão

ANEXO R – Valores individuais de pH arterial dos animais do grupo Controle, e submetidos à hemodiluição com Hematócrito (Ht 15%) e Ht 10%. São Paulo, 2011

	Animal									
	1	2	3	4	5	6	7	8	Média	DP
Controle										
T0	7,391	7,449	7,492	7,436	7,451	7,385	7,474	7,473	7,444	0,039
T1	7,371	7,454	7,501	7,45	7,471	7,383	7,517	7,466	7,452	0,051
T2	7,399	7,454	7,506	7,454	7,473	7,405	7,537	7,469	7,462	0,046
T3	7,394	7,454	7,498	7,45	7,463	7,384	7,541	7,477	7,458	0,051
Ht 15%										
T0	7,407	7,477	7,392	7,434	7,425	7,433	7,431	7,432	7,429	0,025
T1	7,345	7,385	7,367	7,381	7,389	7,335	7,332	7,335	7,359	0,024
T2	7,399	7,371	7,429	7,393	7,401	7,444	7,317	7,388	7,393	0,038
T3	7,406	7,395	7,426	7,413	7,401	7,461	7,388	7,421	7,414	0,023
Ht 10%										
T0	7,46	7,351	7,443	7,433	7,403	7,453	7,436	7,518	7,437	0,048
T1	7,423	7,306	7,365	7,335	7,364	7,367	7,352	7,428	7,368	0,041
T2	7,444	7,3	7,444	7,317	7,375	7,406	7,416	7,456	7,395	0,059
T3	7,439	7,356	7,461	7,388	7,378	7,389	7,411	7,446	7,409	0,037

T0: valor basal; T1: imediatamente após a hemodiluição, T2: 60 minutos após a hemodiluição; T3: 120 minutos após a hemodiluição; DP: desvio padrão

ANEXO S – Valores individuais de PCO² arterial (mmHg) dos animais do grupo Controle, e submetidos à hemodiluição com Hematócrito (Ht 15%) e Ht 10%. São Paulo, 2011

	Animal									
	1	2	3	4	5	6	7	8	Média	DP
Controle										
T0	45,2	39,7	41,3	44,6	39	42,1	42,6	38,5	41,6	2,5
T1	45,5	39,9	40,4	43,2	39,3	42,9	38,1	38,2	40,9	2,7
T2	45	39,9	41,9	42,6	39,8	43,3	38,1	40,8	41,4	2,2
T3	45	40,3	43,2	42,9	38,8	44,9	37,4	41	41,7	2,8
Ht 15%										
T0	46,8	38,4	46,4	40,9	42,2	44,7	42,8	46,4	43,6	3
T1	49	44,7	45,6	46,3	43	46,7	48	49,1	46,6	2,1
T2	46,9	49,5	41,4	46,1	43,3	40,2	49,5	46,9	45,5	3,5
T3	47,1	47	42	46,3	43,6	41,2	49,9	47,2	45,5	3
Ht 10%										
T0	41,5	47,3	44,7	42,8	44,6	40,7	43,1	37,2	42,7	3
T1	42,2	47	46,7	48	44,2	45,2	47,5	39,3	45	3
T2	42,3	47	40,2	49,5	46	45,2	43	39	44	3,5
T3	43,9	45,2	41,2	49,9	46,8	45	44,9	40,7	44,7	2,9

T0: valor basal; T1: imediatamente após a hemodiluição, T2: 60 minutos após a hemodiluição; T3: 120 minutos após a hemodiluição; DP: desvio padrão

ANEXO T – Valores individuais de PO₂ arterial (mmHg) dos animais do grupo Controle, e submetidos à hemodiluição com Hematócrito (Ht 15%) e Ht 10%. São Paulo, 2011

	Animal									
	1	2	3	4	5	6	7	8	Média	DP
Controle										
T0	180,2	254,4	216,1	233,1	238,9	190,7	205,8	200,4	215	25
T1	191,9	247,1	221,3	230	236,8	195,4	211,1	201,9	217	20
T2	188,3	260,8	213,3	216,7	219,8	197,6	209,1	201,3	213	22
T3	185,5	265,7	205,5	225,4	218,1	193,7	199,9	205,5	212	25
Ht 15%										
T0	211,8	189	216	218,9	218,6	201,3	176,3	216,6	206	16
T1	238,5	221,3	222,3	212,2	225,4	233,6	197,5	238,5	224	14
T2	220,4	189,9	218,2	199	199,6	222,7	162,5	220,3	204	21
T3	222,6	193,6	248,7	199,4	200,4	223,3	177,5	212,6	210	22
Ht 10%										
T0	250,9	197,7	201,3	176,3	237,5	237,8	225,3	227,4	219	25
T1	239,8	199,9	233,6	197,5	230,9	231,8	221	233,6	224	16
T2	203,8	182,1	222,7	162,5	235,2	225,3	214,6	230,9	210	26
T3	204,2	185	223,3	177,5	235,1	176,9	212,4	233,8	206	24

T0: valor basal; T1: imediatamente após a hemodiluição, T2: 60 minutos após a hemodiluição; T3: 120 minutos após a hemodiluição; DP: desvio padrão

ANEXO U – Valores individuais de BE arterial (mmol/L) dos animais do grupo Controle, e submetidos à hemodiluição com Hematócrito (Ht 15%) e Ht 10%. São Paulo, 2011

	Animal									
	1	2	3	4	5	6	7	8	Média	DP
Controle										
T0	1,9	3,1	6,1	3,9	3,7	0,1	6	5	3,7	2
T1	0,6	3,6	6,3	4,1	5,1	0,9	6,2	4,2	3,9	2,2
T2	2,1	3,4	7	3,7	5,8	2,7	7,2	5,4	4,7	2
T3	2	3,5	7	3,6	4,7	2,4	7,1	5,8	4,5	2
Ht 15%										
T0	3,9	4,7	2,5	3	3	5,4	3,8	3,8	3,8	1
T1	0,3	1,2	0,3	1,7	0,7	0,4	-1	0,4	0,5	0,8
T2	3,4	2,4	2,8	2,5	1,7	3	-1,7	3,4	2,2	1,7
T3	4	3,1	2,9	4,2	1,9	5,1	3,8	3,8	3,6	1
Ht 10%										
T0	5,3	0,5	5,4	3,8	2,6	4,3	4,2	6,2	4	1,8
T1	2,8	-6,9	0,4	-1	-0,4	0,2	0,1	1,7	-0,4	2,9
T2	4,5	-3,3	3	-1,7	1,3	3,1	2,7	3,6	1,7	2,7
T3	4,9	-1,8	5,1	3,8	1,8	1,7	3,3	3,7	2,8	2,2

T0: valor basal; T1: imediatamente após a hemodiluição, T2: 60 minutos após a hemodiluição; T3: 120 minutos após a hemodiluição; DP: desvio padrão

ANEXO V – Valores individuais de HCO_3^- arterial (mmol/L) dos animais do grupo Controle, e submetidos à hemodiluição com Hematócrito (Ht 15%) e Ht 10%. São Paulo, 2011

	Animal									
	1	2	3	4	5	6	7	8	Média	DP
Controle										
T0	26,9	26,7	29,4	28,1	27,4	24,8	29,7	28,6	27,7	1,6
T1	25,6	27,2	29,5	27,9	28,7	25,8	29	27,7	27,7	1,4
T2	26,9	27	30,3	27,4	29,5	27,5	29,7	29,1	28,4	1,4
T3	26,9	27,1	30,4	27,3	28,4	27,4	29,4	29,4	28,3	1,3
Ht 15%										
T0	28,5	28,1	27,5	26,5	27	29,8	28,2	28,4	28	1
T1	25,6	25,9	25,5	26,5	25,2	25,7	25,2	25,2	25,6	0,4
T2	27,7	27,4	26,8	27	26,1	26,7	24,6	27,6	26,7	1
T3	28,3	27,4	27	28,4	26,2	28,9	29,5	27,1	27,9	1,1
Ht 10%										
T0	28,9	26	29,8	28,2	26,8	28,1	28,4	28,9	28,1	1,2
T1	27,1	21	25,7	25,2	24	25,1	25,5	25,4	24,9	1,8
T2	28,4	22,4	26,7	24,6	25,5	27,3	26,7	27	26,1	1,9
T3	28,9	23,5	28,9	29,5	26	26	27,7	27,5	27,3	2

T0: valor basal; T1: imediatamente após a hemodiluição, T2: 60 minutos após a hemodiluição; T3: 120 minutos após a hemodiluição; DP: desvio padrão

ANEXO W – Valores individuais de SaO_2 arterial (%) dos animais do grupo Controle, e submetidos à hemodiluição com Hematócrito (Ht 15%) e Ht 10%. São Paulo, 2011

	Animal									
	1	2	3	4	5	6	7	8	Média	DP
Controle										
T0	99,6	99,4	99,6	99,4	99,7	99,7	99,6	99,6	99,6	0,1
T1	99,6	99,4	99,6	99,5	99,6	99,6	99,6	99,6	99,6	0,1
T2	95,5	95,3	95,6	95,1	95,6	95,6	95,6	95,6	95,5	0,2
T3	95,5	95,4	95,7	95,4	95,6	95,3	95,6	95,6	95,5	0,2
Ht 15%										
T0	99,6	99,5	99,6	99,6	99,6	99,6	99,4	99,6	99,6	0,1
T1	99,6	99,6	99,6	99,6	99,6	99,6	99,5	99,6	99,6	0
T2	95,3	95,6	95,6	95,1	95,6	95,6	95,6	95,6	95,5	0,2
T3	99,6	99,4	99,7	99,5	99,5	99,7	99,4	99,6	99,6	0,6
Ht 10%										
T0	99,7	99,4	99,6	99,4	99,7	99,7	99,6	99,7	99,6	0,1
T1	99,7	99,4	99,6	99,5	99,6	99,6	99,6	99,7	99,6	0,1
T2	95,6	95,6	95,6	95,6	95,3	95,6	95,6	95,1	95,5	0,2
T3	95,4	95,1	95,2	95,8	95,6	95,6	95,4	95,5	95,5	0,2

T0: valor basal; T1: imediatamente após a hemodiluição, T2: 60 minutos após a hemodiluição; T3: 120 minutos após a hemodiluição; DP: desvio padrão

ANEXO X – Valores individuais de K⁺ arterial (mmol/L) dos animais do grupo Controle, e submetidos à hemodiluição com Hematócrito (Ht 15%) e Ht 10%. São Paulo, 2011

	Animal									
	1	2	3	4	5	6	7	8	Média	DP
Controle										
T0	3,7	3,8	3,9	4,1	3,8	3,5	4	3,8	3,8	0,2
T1	3,7	4	4	4,2	3,7	3,7	4,1	3,6	3,9	0,2
T2	4	3,9	4,2	4,3	4,1	4,1	4,2	4	4,1	0,1
T3	4,1	3,6	4,2	4,2	4	4	4,3	4	4,1	0,2
Ht 15%										
T0	3,9	3,9	3,4	3,8	3,9	3,6	3,7	3,7	3,7	0,2
T1	3,5	3,5	3,3	3,3	3,7	3,2	3,2	3,5	3,4	0,2
T2	4	4,7	4	3,9	4,2	3,4	4	4,2	4,1	0,1
T3	4	4,8	4,2	4	4,2	3,4	3,9	4	4,1	0,1
Ht 10%										
T0	3,7	3,9	3,6	3,7	3,6	3,5	3,8	3,9	3,7	0,1
T1	3,5	3,2	3,2	3,2	3,6	3,5	3,5	3,5	3,4	0,2
T2	4	4	3,4	4	4	4	4,1	4	3,9	0,2
T3	4,1	4,2	3,4	3,9	4	4	4,2	4,2	4,1	0,3

T0: valor basal; T1: imediatamente após a hemodiluição, T2: 60 minutos após a hemodiluição; T3: 120 minutos após a hemodiluição; DP: desvio padrão

ANEXO Y – Valores individuais de Na⁺ arterial (mmol/L) dos animais do grupo Controle, e submetidos à hemodiluição com Hematócrito (Ht 15%) e Ht 10%. São Paulo, 2011

	Animal									
	1	2	3	4	5	6	7	8	Média	DP
Controle										
T0	136	137	138	139	140	139	136	138	138	1
T1	136	137	137	138	140	138	136	138	138	1
T2	135	137	137	138	139	138	136	137	137	1
T3	135	138	137	138	139	137	135	140	137	2
Ht 15%										
T0	140	139	140	134	132	140	139	140	138	3
T1	139	139	140	135	132	138	140	139	138	3
T2	138	138	139	133	132	138	139	137	137	3
T3	138	138	138	134	132	138	139	136	137	2
Ht 10%										
T0	140	139	140	139	139	139	138	138	139	1
T1	139	140	138	140	139	138	137	137	139	1
T2	139	139	138	139	138	138	137	137	138	1
T3	138	138	138	139	138	137	137	137	138	1

T0: valor basal; T1: imediatamente após a hemodiluição, T2: 60 minutos após a hemodiluição; T3: 120 minutos após a hemodiluição; DP: desvio padrão

ANEXO Z – Valores individuais de lactato arterial (mmol/L) dos animais do grupo Controle, e submetidos à hemodiluição com Hematócrito (Ht 15%) e Ht 10%. São Paulo, 2011

	Animal									
	1	2	3	4	5	6	7	8	Média	DP
Controle										
T0	1,9	1,2	2	1,1	1,1	2,3	1,5	1	1,5	0,5
T1	2,6	1,1	2,3	2,1	1,2	1,8	1,4	0,8	1,7	0,6
T2	1,7	1	2,1	2,4	1,2	1,8	1,2	0,9	1,5	0,5
T3	1,6	1,2	2,3	2,6	1	1,9	1,5	1	1,6	0,6
Ht 15%										
T0	1,4	1,1	1,6	2	1,2	1,4	1,3	1,4	1,4	0,3
T1	1,2	1	1,3	1,7	1	1,3	0,8	1	1,2	0,3
T2	0,9	1	1	1,8	1,2	1,7	0,7	0,9	1,2	0,4
T3	0,8	1	1,1	1,5	1,1	1,3	0,9	0,9	1,1	0,2
Ht 10%										
T0	2,1	1,4	1,3	1,3	1,6	1,9	1,8	0,8	1,5	0,4
T1	1,8	2	1,3	0,8	1,7	1,6	1,4	1,1	1,5	0,4
T2	1,8	1,9	1,7	0,7	1,6	1,9	1,3	1	1,5	0,4
T3	2,1	1,6	1,3	0,9	1,5	1,9	1,1	1,1	1,4	0,4

T0: valor basal; T1: imediatamente após a hemodiluição, T2: 60 minutos após a hemodiluição; T3: 120 minutos após a hemodiluição; DP: desvio padrão

ANEXO AA – Valores individuais de saturação venosa de oxigênio SvO₂ (%) dos animais do grupo Controle, e submetidos à hemodiluição com Hematócrito (Ht 15%) e Ht 10%. São Paulo, 2011

	Animal									
	1	2	3	4	5	6	7	8	Média	DP
Controle										
T0	66,3	85,2	79,1	77,1	80	75,2	86,5	81,6	78,9	6,3
T1	82,1	85,2	82,5	82,1	87,3	82,4	81,4	83,6	83,3	2
T2	80,3	85,9	82,4	84,1	82,3	83,8	80,7	83,4	82,9	1,8
T3	83,8	82,8	84,8	83,8	81,3	83,1	79,5	84,5	83	1,8
Ht 15%										
T0	80,4	82,1	83,6	69,5	82	83,9	71,4	80,4	79,2	5,5
T1	77,4	79,5	79,1	81,7	80,7	77,4	79,6	77,4	79,1	1,6
T2	70,2	77,4	70,9	75,6	76,2	79,9	78,3	70,2	74,8	3,9
T3	70,2	74,8	70,4	77,3	76,6	77,5	75,6	70,2	74,1	3,3
Ht 10%										
T0	99,7	71,5	83,9	71,4	75,5	83,6	92,4	74,2	81,5	10,4
T1	76,2	75	77,4	79,6	72,9	76,4	90,2	70,3	77,3	5,9
T2	66,9	98,8	79,9	78,3	75,4	74,2	87,4	68,9	78,7	10,3
T3	61,5	73,4	77,5	75,6	75,3	68,9	70,9	65,7	71,1	5,5

T0: valor basal; T1: imediatamente após a hemodiluição, T2: 60 minutos após a hemodiluição; T3: 120 minutos após a hemodiluição; DP: desvio padrão

ANEXO BB – Comissão de Ética

Ref.: Memo PG/MA1/028/09 de 20/08/09

Ao

Departamento de Cirurgia

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 02.09.09 tomou conhecimento que o Protocolo de Pesquisa nº **0202/08** intitulado: **"Avaliação dos precursores da apoptose neuronal em preparados citosólicos, mitocondriais e nucleares do córtex cerebral frontal e hipocampo de porcos submetidos à hemodiluição normovolêmica aguda: estudo multidisciplinar envolvendo os laboratórios de investigação médica de anestesiologia e neurologia experimental"**, aprovado em 23.04.08 será tese de doutorado do aluno FABRÍCIO DE OLIVEIRA FRAZÍLIO, tendo como orientadora PROFA. DRA. DENISE TABACCHI FANTONI, bem como do relatório parcial do estudo.

CAPPesq, 02 de setembro de 2009.

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente da Comissão Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP
Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar - CEP 05430 010 - São Paulo - SP
Fone: 011 - 30696442 fax: 011 - 3069 6492 - e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br
sot

Divisão de Anestesia - ICF - 11/Set/2009 11:51

REFERÊNCIAS

9 REFERÊNCIAS

1. Naqash IA, Draboo MA, Lone AQ, Nengroo SH, Kirmani A and Bhat AR. Evaluation of acute normovolemic hemodilution and autotransfusion in neurosurgical patients undergoing excision of intracranial meningioma. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol*. 2011; 27: 54-8.
2. Beattie WS, Karkouti K, Wijeyesundera DN and Tait G. Risk associated with preoperative anemia in noncardiac surgery: a single-center cohort study. *Anesthesiology*. 2009; 110: 574-81.
3. Li M, Bertout JA, Ratcliffe SJ, Eckenhoff MF, Simon MC and Floyd TF. Acute anemia elicits cognitive dysfunction and evidence of cerebral cellular hypoxia in older rats with systemic hypertension. *Anesthesiology*. 2010; 113: 845-58.
4. Aach RD and Kahn RA. Post-transfusion hepatitis: current perspectives. *Ann Intern Med*. 1980; 92: 539-46.
5. Bove JR. Transfusion-associated AIDS--a cause for concern. *N Engl J Med*. 1984; 310: 115-6.
6. Souza HJB and Moitinho RF. Estratégias para redução do uso de hemoderivados em cirurgia cardiovascular. . *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2008; 23: 53-9.
7. Spiess BD. Red cell transfusions and guidelines: a work in progress. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2007; 21: 185-200.
8. Shander A. Emerging risks and outcomes of blood transfusion in surgery. *Semin Hematol*. 2004; 41: 117-24.
9. Shander A and Rijhwani TS. Acute normovolemic hemodilution. *Transfusion*. 2004; 44: 26S-34S.

10. Taniguchi FP and Martins AS. Hemodiluição, disfunção renal e cirurgia cardíaca. *Einstein*. 2009; 7: 103-7.
11. Hare GM. Anaemia and the brain. *Curr Opin Anaesthesiol*. 2004; 17: 363-9.
12. Eichelbronner O, D'Almeida M, Sielenkamper A, Sibbald WJ and Chin-Yee IH. Increasing P(50) does not improve DO(2CRIT) or systemic VO(2) in severe anemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002; 283: H92-101.
13. van Bommel J, Trouwborst A, Schwarte L, Siegemund M, Ince C and Henny Ch P. Intestinal and cerebral oxygenation during severe isovolemic hemodilution and subsequent hyperoxic ventilation in a pig model. *Anesthesiology*. 2002; 97: 660-70.
14. Ickx BE, Rigolet M and Van Der Linden PJ. Cardiovascular and metabolic response to acute normovolemic anemia. Effects of anesthesia. *Anesthesiology*. 2000; 93: 1011-6.
15. McLaren AT, Mazer CD, Zhang H, Liu E, Mok L and Hare GM. A potential role for inducible nitric oxide synthase in the cerebral response to acute hemodilution. *Can J Anaesth*. 2009; 56: 502-9.
16. Weiskopf RB, Feiner J, Hopf HW, et al. Oxygen reverses deficits of cognitive function and memory and increased heart rate induced by acute severe isovolemic anemia. *Anesthesiology*. 2002; 96: 871-7.
17. Price CC, Garvan CW and Monk TG. Type and severity of cognitive decline in older adults after noncardiac surgery. *Anesthesiology*. 2008; 108: 8-17.
18. Harris AL. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2: 38-47.
19. Reed JC. Apoptosis-based therapies. *Nat Rev Drug Discov*. 2002; 1: 111-21.

20. Gill R, Soriano M, Blomgren K, et al. Role of caspase-3 activation in cerebral ischemia-induced neurodegeneration in adult and neonatal brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2002; 22: 420-30.
21. Stehling L and Zauder HL. Acute normovolemic hemodilution. *Transfusion.* 1991; 31: 857-68.
22. Virmani S, Tempe DK, Pandey BC, et al. Acute normovolemic hemodilution is not beneficial in patients undergoing primary elective valve surgery. *Ann Card Anaesth.* 2010; 13: 34-8.
23. Lauscher P, Kertscho H, Raab L, Habler O and Meier J. Changes in heart rate variability across different degrees of acute dilutional anemia. *Minerva Anesthesiol.* 2011.
24. Blood transfusion and the anaesthetists: red cell transfusion 2. *London: The Association of Anaesthetists of Great Britain and Ireland* 2008.
25. Tse EY, Cheung WY, Ng KF and Luk KD. Reducing perioperative blood loss and allogeneic blood transfusion in patients undergoing major spine surgery. *J Bone Joint Surg Am.* 2011; 93: 1268-77.
26. Crystal GJ and Salem MR. Hemodynamic compensation during acute normovolemic hemodilution. *Anesthesiology.* 2004; 100: 1034; author reply - 5.
27. Vovenko EP and Chuikin AE. Tissue oxygen tension profiles close to brain arterioles and venules in the rat cerebral cortex during the development of acute anemia. *Neurosci Behav Physiol.* 2010; 40: 723-31.

28. Mizzi A, Tran T, Karlhoski R, Anderson A, Mangar D and Camporesi EM. Voluven, a new colloid solution. *Anesthesiol Clin*. 2011; 29: 547-55.
29. Treib J, Baron JF, Grauer MT and Strauss RG. An international view of hydroxyethyl starches. *Intensive Care Med*. 1999; 25: 258-68.
30. Chorny I, Bsorai R, Artru AA, et al. Albumin or hetastarch improves neurological outcome and decreases volume of brain tissue necrosis but not brain edema following closed-head trauma in rats. *J Neurosurg Anesthesiol*. 1999; 11: 273-81.
31. Thompson WL, Jr. Hydroxyethyl starch. *Prog Clin Biol Res*. 1978; 19: 283-92.
32. Fraga Ade O, Fantoni DT, Otsuki DA, Pasqualucci CA, Abduch MC and Junior JO. Evidence for myocardial defects under extreme acute normovolemic hemodilution with hydroxyethyl starch and lactated ringer's solution. *Shock*. 2005; 24: 388-95.
33. Otsuki DA, Fantoni DT, Margarido CB, et al. Hydroxyethyl starch is superior to lactated Ringer as a replacement fluid in a pig model of acute normovolaemic haemodilution. *Br J Anaesth*. 2007; 98: 29-37.
34. Fantoni DT, Otsuki DA, Ambrosio AM, Tamura EY and Auler JO, Jr. A comparative evaluation of inhaled halothane, isoflurane, and sevoflurane during acute normovolemic hemodilution in dogs. *Anesth Analg*. 2005; 100: 1014-9.
35. Tango HK, Schmidt AP, Mizumoto N, Lacava M, Cruz RJ, Jr. and Auler JO, Jr. Low hematocrit levels increase intracranial pressure in an animal model of cryogenic brain injury. *J Trauma*. 2009; 66: 720-6.

36. Zhuang J, Shackford SR, Schmoker JD and Pietropaoli JA, Jr. Colloid infusion after brain injury: effect on intracranial pressure, cerebral blood flow, and oxygen delivery. *Crit Care Med*. 1995; 23: 140-8.
37. Kulier A, Levin J, Moser R, et al. Impact of preoperative anemia on outcome in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery. *Circulation*. 2007; 116: 471-9.
38. Mathew JP, Mackensen GB, Phillips-Bute B, et al. Effects of extreme hemodilution during cardiac surgery on cognitive function in the elderly. *Anesthesiology*. 2007; 107: 577-84.
39. Kroemer G, Galluzzi L and Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev*. 2007; 87: 99-163.
40. Borutaite V. Mitochondria as decision-makers in cell death. *Environ Mol Mutagen*. 2010; 51: 406-16.
41. Mitchell P and Moyle J. Evidence discriminating between the chemical and the chemiosmotic mechanisms of electron transport phosphorylation. *Nature*. 1965; 208: 1205-6.
42. Zamzami N, Larochette N and Kroemer G. Mitochondrial permeability transition in apoptosis and necrosis. *Cell Death Differ*. 2005; 12 Suppl 2: 1478-80.
43. Mishra OP, Randis T, Ashraf QM and Delivoria-Papadopoulos M. Hypoxia-induced Bax and Bcl-2 protein expression, caspase-9 activation, DNA fragmentation, and lipid peroxidation in mitochondria of the cerebral cortex of newborn piglets: the role of nitric oxide. *Neuroscience*. 2006; 141: 1339-49.

44. Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X and Wang X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1999; 15: 269-90.
45. Naismith JH and Sprang SR. Modularity in the TNF-receptor family. *Trends Biochem Sci.* 1998; 23: 74-9.
46. Daniel PT, Wieder T, Sturm I and Schulze-Osthoff K. The kiss of death: promises and failures of death receptors and ligands in cancer therapy. *Leukemia.* 2001; 15: 1022-32.
47. Ott M, Norberg E, Zhivotovsky B and Orrenius S. Mitochondrial targeting of tBid/Bax: a role for the TOM complex? *Cell Death Differ.* 2009; 16: 1075-82.
48. Belizario JE, Alves J, Occhiucci JM, Garay-Malpartida M and Sesso A. A mechanistic view of mitochondrial death decision pores. *Braz J Med Biol Res.* 2007; 40: 1011-24.
49. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 2000; 407: 770-6.
50. Grivicich IR, A.; Rocha, A.B. Morte Celular por Apoptose. *Revista Brasileira de Cancerologia.* 2007; 53: 335-43.
51. Borner C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol Immunol.* 2003; 39: 615-47.
52. Zong WX and Thompson CB. Necrotic death as a cell fate. *Genes Dev.* 2006; 20: 1-15.
53. Kroemer G, El-Deiry WS, Golstein P, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ.* 2005; 12 Suppl 2: 1463-7.

-
54. Khurana P, Ashraf QM, Mishra OP and Delivoria-Papadopoulos M. Effect of hypoxia on caspase-3, -8, and -9 activity and expression in the cerebral cortex of newborn piglets. *Neurochem Res.* 2002; 27: 931-8.
 55. Akhter W, Ashraf QM, Zanelli SA, Mishra OP and Delivoria-Papadopoulos M. Effect of graded hypoxia on cerebral cortical genomic DNA fragmentation in newborn piglets. *Biol Neonate.* 2001; 79: 187-93.
 56. Araujo S. Drogas vasoativas. In: Terzi RGGA, S., (ed.). *Técnicas básicas em UTI.* 2 ed. ed. São Paulo: Manole, 1992, p. 215-37.
 57. Shoemaker WC. Diagnosis and treatment of the shock syndromes. In: SHOEMAKER WCA, S.; GRENVIK, A.; HOLBROOK, P.R.; THOMPSON, W.L. , (ed.). *Textbook of Critical Care.* 2 ed. ed. Philadelphia: Saunders Company, 1995, p. 85-102.
 58. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72: 248-54.
 59. Booth RF and Clark JB. A rapid method for the preparation of relatively pure metabolically competent synaptosomes from rat brain. *Biochem J.* 1978; 176: 365-70.
 60. Mishra OP, Zubrow AB, Ashraf QM and Delivoria-Papadopoulos M. Effect of nitric oxide synthase inhibition during post-hypoxic reoxygenation on Bax and Bcl-2 protein expression and DNA fragmentation in neuronal nuclei of newborn piglets. *Brain Res.* 2006; 1101: 20-8.

61. Parikh NA, Katsetos CD, Ashraf QM, et al. Hypoxia-induced caspase-3 activation and DNA fragmentation in cortical neurons of newborn piglets: role of nitric oxide. *Neurochem Res*. 2003; 28: 1351-7.
62. Weiskopf RB, Toy P, Hopf HW, et al. Acute isovolemic anemia impairs central processing as determined by P300 latency. *Clin Neurophysiol*. 2005; 116: 1028-32.
63. Jonas RA, Wypij D, Roth SJ, et al. The influence of hemodilution on outcome after hypothermic cardiopulmonary bypass: results of a randomized trial in infants. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2003; 126: 1765-74.
64. Briet F, Mazer CD, Tsui AK, et al. Cerebral cortical gene expression in acutely anemic rats: a microarray analysis. *Can J Anaesth*. 2009; 56: 921-34.
65. McLaren AT, Marsden PA, Mazer CD, et al. Increased expression of HIF-1 α , nNOS, and VEGF in the cerebral cortex of anemic rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007; 292: R403-14.
66. Hirsch T, Marzo I and Kroemer G. Role of the mitochondrial permeability transition pore in apoptosis. *Biosci Rep*. 1997; 17: 67-76.
67. Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR and Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science*. 1997; 275: 1132-6.
68. Vermeulen K, Berneman ZN and Van Bockstaele DR. Cell cycle and apoptosis. *Cell Prolif*. 2003; 36: 165-75.
69. Yamamoto K, Ichijo H and Korsmeyer SJ. BCL-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M. *Mol Cell Biol*. 1999; 19: 8469-78.

70. Delivoria-Papadopoulos M, Ashraf QM and Mishra OP. Effect of hypoxia on expression of apoptotic proteins in nuclear, mitochondrial and cytosolic fractions of the cerebral cortex of newborn piglets: the role of nuclear Ca^{++} - influx. *Neurochem Res*. 2008; 33: 1196-204.
71. Zanelli SA, Spandou E, Mishra OP and Delivoria-Papadopoulos M. Hypoxia modifies nuclear calcium uptake pathways in the cerebral cortex of the guinea-pig fetus. *Neuroscience*. 2005; 130: 949-55.
72. Mullen RJ, Buck CR and Smith AM. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development*. 1992; 116: 201-11.
73. Davoli MA, Fourtounis J, Tam J, et al. Immunohistochemical and biochemical assessment of caspase-3 activation and DNA fragmentation following transient focal ischemia in the rat. *Neuroscience*. 2002; 115: 125-36.
74. Unal-Cevik I, Kilinc M, Gursoy-Ozdemir Y, Gurer G and Dalkara T. Loss of NeuN immunoreactivity after cerebral ischemia does not indicate neuronal cell loss: a cautionary note. *Brain Res*. 2004; 1015: 169-74.
75. Hatcher JD, Chiu LK and Jennings DB. Anemia as a stimulus to aortic and carotid chemoreceptors in the cat. *J Appl Physiol*. 1978; 44: 696-702.
76. Weiskopf RB, Viele MK, Feiner J, et al. Human cardiovascular and metabolic response to acute, severe isovolemic anemia. *JAMA*. 1998; 279: 217-21.
77. Brown MM, Wade JP and Marshall J. Fundamental importance of arterial oxygen content in the regulation of cerebral blood flow in man. *Brain*. 1985; 108 (Pt 1): 81-93.

78. Hare GM, Mazer CD, Mak W, et al. Hemodilutional anemia is associated with increased cerebral neuronal nitric oxide synthase gene expression. *J Appl Physiol*. 2003; 94: 2058-67.
79. Fitzgerald RD, Martin CM, Dietz GE, Doig GS, Potter RF and Sibbald WJ. Transfusing red blood cells stored in citrate phosphate dextrose adenine-1 for 28 days fails to improve tissue oxygenation in rats. *Crit Care Med*. 1997; 25: 726-32.
80. Delivoria-Papadopoulos M, Ashraf QM and Mishra OP. Differential expression of apoptotic proteins following hypoxia-induced CREB phosphorylation in the cerebral cortex of newborn piglets. *Neurochem Res*. 2007; 32: 1256-63.