

Karlos Alexandre de Sousa Vilarinho

***A ERITROPOIETINA PROTEGE A FUNÇÃO SISTÓLICA DE
CORAÇÕES NEONATAIS SUBMETIDOS A ISQUEMIA E
REPERFUSÃO REGIONAL – TRABALHO EXPERIMENTAL
EM SUÍNOS***

CAMPINAS

UNICAMP

2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

**A ERITROPOIETINA PROTEGE A FUNÇÃO SISTÓLICA DE CORAÇÕES
NEONATAIS SUBMETIDOS A ISQUEMIA E REPERFUSÃO REGIONAL –
TRABALHO EXPERIMENTAL EM SUÍNOS**

Karlos Alexandre de Sousa Vilarinho

Tese de Doutorado apresentado à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor
em Ciências. Sob orientação do Prof.Dr. Orlando
Petrucci Junior.

CAMPINAS

UNICAMP

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

V71e	<p>Vilarinho, Karlos Alexandre de Sousa, 1976 - A eritropoietina protege a função sistólica de corações neonatais submetidos a isquemia e reperfusão regional – trabalho experimental em suínos / Karlos Alexandre de Sousa Vilarinho. -- Campinas, SP : [s.n.], 2012.</p> <p>Orientador : Orlando Petrucci Junior. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.</p> <p>1. Reperfusão miocárdica. 2. Peptídeos e proteínas de sinalização intracelular. 3. Precondicionamento miocárdico. 4. Contração miocárdica. I. Petrucci Junior, Orlando. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.</p>
------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Erythropoietin protects the systolic function of neonatal hearts against ischaemia/reperfusion injury.

Palavras-chave em inglês:

Myocardial reperfusion

Intracellular signalling peptides and proteins

Ischemic preconditioning myocardial

Myocardial contraction

Área de concentração: Fisiopatologia Cirúrgica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora:

Orlando Petrucci Junior [Orientador]

Andrei Carvalho Sposito

Mário José Abdalla Saad

Leonardo Antônio Mamede Zornoff

Francisco Rafael Martins Laurindo

Data da defesa: 29-04-2012

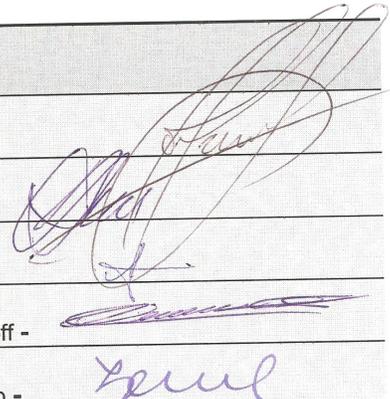
Programa de Pós-Graduação: Ciências

Banca Examinadora da Defesa de Doutorado
Karlos Alexandre de Sousa Vilarinho

Orientador: Prof. Dr. Orlando Petrucci Junior

Membros:

1. Prof(a). Dr(a). Orlando Petrucci Junior -
2. Prof(a). Dr(a). Andrei Carvalho Sposito -
3. Prof(a). Dr(a). Mario Jose Abdalla Saad -
4. Prof(a). Dr(a). Leonardo Antonio Mamede Zornoff -
5. Prof(a). Dr(a). Francisco Rafael Martins Laurindo -



Curso de Pós-Graduação em Ciências da Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.

Data: 19/04/2012

DEDICATÓRIA

“Existem apenas duas maneiras de ver a vida. Uma é pensar que não existem milagres e outra é pensar que tudo é um milagre”

(Albert Einstein)

A DEUS

Ao meu pai Joaquim, exemplo de pai, cidadão, homem, marido.
Sempre meu Norte.

A minha mãe Maria, sempre em busca de novos desafios e conquistas, exemplo de perseverança e obstinação.

“Apenas vos falta um ser, e tudo está despovoado...”

(Lamartine)

“Para mim, a definição perfeita do amor é você”

(Hugo Félix)

A minha esposa Maria Cristina, mulher em sua totalidade. Esposa dedicada, mãe exemplar, filha amorosa, profissional competente, sem a qual jamais serei completo.

“Quando eu disse ao caroço de laranja que dentro dele dormia um laranjal inteirinho, ele me olhou estupidamente incrédulo”

(Hérmogenes, Mergulho na Paz)

A meu filho Miguel, amoroso, arteiro, que me enche de alegrias e

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Orlando Petrucci Jr, meu orientador. Grande entusiasta da pesquisa acadêmica, em quem me inspiro como exemplo de pai dedicado, profissional exemplar, professor verdadeiramente interessado no crescer de seus muitos pupilos. A quem meu pai, sabiamente, confiou a minha formação e orientação. Meu padrinho de casamento, amigo, companheiro, sempre me estimulando para novos desafios e conquistas. Todos os elogios e agradecimentos serão insuficientes para expressar verdadeiramente minha gratidão e admiração.

Ao Prof. Dr. Reinaldo Wilson Vieira, verdadeiro líder e professor, em quem me espelho e confio de maneira irrestrita. ‘Paizão’ da nossa equipe, sempre nos aconselhando tanto no âmbito profissional quanto pessoal. Pela pessoa e pelo profissional, estamos sempre buscando sua presença e companheirismo.

Ao Prof. Dr. Pedro Paulo, profissional competente, médico dedicado, cirurgião habilidoso, a quem devo grande parte de minha formação profissional e pessoal.

Ao Dr. Lindemberg, grande médico e cirurgião, a quem devo grandes ensinamentos. É com admiração que observo todo seu entusiasmo em ensinar e difundir conhecimento com os mais jovens.

À Dra Elaine Soraya, companheira de todas as batalhas. Exemplo de perseverança e dedicação ao paciente. Incansável, agora no grande e apaixonante desafio de ser mãe e profissional, com a certeza de que cumprirá todos os seus papéis de maneira exemplar.

Ao Dr Carlos Lavagnoli, médico e cirurgião empenhado, habilidoso, obstinado, incansável. Exemplo de dedicação ao paciente e retidão de caráter. Companheiro de longas discussões profissionais e pessoais.

A Srta. Ana Cristina e ao Sr William, biólogos do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental, e ao Sr Benetido e Sr Miguel, com os quais sempre aprendo e reaprendo. Profissionais sempre dispostos a resolver todos os empecilhos para realização diária dos experimentos, de quem sempre obtive apoio nos momentos de desânimo e dificuldades não resolvidas, sempre me lembrando que pesquisa experimental não é “certezal”.

Ao Prof. Dr. Mário Saad, que gentilmente cedeu seu laboratório, onde foi realizada grande parte deste trabalho, e que tem nos apoiado de maneira irrestrita e estimulante em nosso crescimento como pesquisadores. Minha gratidão e admiração.

A Dioze, biomédica, que em meio às suas muitas e importantes atividades, sempre encontrou espaço e tempo para nos ensinar e discutir nossas dificuldades e achados, sempre de maneira simpática e sorridente.

Aos perfusionistas Nilson e Márcio, profissionais de grande competência e humildade, que com o seu bom humor ajudam a aliviar o peso de nossa labuta diária.

Às instrumentadoras Dalva, Lídia, Renata e Lidiane, companheiras do dia-a-dia, sempre com bom humor e dedicação, que junto com a equipe de perfusão quase transformam nossas cirurgias em momentos de confraternização.

A biomédica Anali, de quem tenho acompanhado seu crescimento profissional e acadêmico, e com quem compartilho as dificuldades e os deleites da pesquisa.

A farmacêutica Cristina, grata surpresa pela sua competência e humor.

SUMÁRIO

RESUMO	xxix
ABSTRACT	xxxiii
INTRODUÇÃO	37
OBJETIVOS	45
MATERIAL E MÉTODOS.....	49
RESULTADOS.....	61
DISCUSSÃO	85
CONCLUSÃO	99
BIBLIOGRAFIA	103
ANEXOS	111

LISTA DE ABREVIATURAS:

°C – graus centígrados

Akt – proteína quinase B

Bcl-2 – proteínas do linfoma de células B

bpm – batimentos por minuto

CEEA – Comissão de Ética em Experimentação Animal

CFU-E – unidades formadores de colônia eritropoiéticas

d - dia

DC – débito cardíaco

DDF – diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo

dP/dt – primeira derivada temporal da pressão ventricular esquerda

DSF – diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo

EDPVR – relação pressão volume diastólica final do ventrículo esquerdo

E_{max} – elastância máxima do ventrículo esquerdo

eNOS – óxido nítrico sintase endotelial

EPO_r – receptor de membrana da eritropoietina

EPO_{rh} – eritropoietina recombinante humana

ERK – quinase reguladora de sinal extracelular

FC – frequência cardíaca

GSK-3B – glicogênio sintase quinase 3B

h – hora

IAMCSST – infarto agudo do miocárdio com supradesnivelamento do segmento ST

JAK2 – janus quinase 2

kDa – kiloDalton

Kg – kilograma

min - minuto

mL - mililitro

mPTP – poros transitórios de permeabilidade mitocondrial

PI3K – fosfatidilinositol-3-quinase

PKC – proteína quinase C

PKC- γ – isoforma ípsilon da proteína quinase C

PSRW – trabalho sistólico pré-recrutável do ventrículo esquerdo

RISK – quinases salvadoras da lesão de reperfusão

rpm – rotações por minuto

SH2 – domínios Src homólogos 2

STAT – proteína transdutora de sinal e ativadora de transcrição

TAU – constante do tempo de relaxamento isovolumétrico do ventrículo esquerdo

UI – unidade internacional

V - volt

VDF – volume diastólico final do ventrículo esquerdo

VE – ventrículo esquerdo

VS – volume sistólico do ventrículo esquerdo

VSF – volume sistólico final do ventrículo esquerdo

μ g – microgramas

μ L - microlitros

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Esquema representativo do receptor da eritropoietina e seus principais mediadores intracelulares JAK, ERK, Akt e STAT. EPO - eritropoietina..... 41
- Figura 2 – Esquema representativo da via RISK e seus principais mediadores intracelulares, levando a uma melhor sobrevivência celular. 43
- Figura 3 – Foto representativa do coração monitorizado. A – Cristais sonomicrométricos. B – Catéter Millar. C – Torniquete em veia cava inferior. D – Torniquete na artéria coronária interventricular anterior. 52
- Figura 4 – Régua de tempo do experimento, com as avaliações hemodinâmicas realizadas. 54
- Figura 5 – Tela do programa Sonosoft. A esquerda, de cima para baixo, as curvas de distância entre os cristais sonomicrométricos, da pressão intraventricular esquerda e do volume ventricular esquerdo. A direita e em cima as curvas de pressão-volume do ventrículo esquerdo. Durante este traçado foi realizado a oclusão da veia cava inferior para variação de pré-carga..... 56
- Figura 6 – Esquema representativo da curva de pressão e volume do ventrículo esquerdo. 56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Peso Em Quilogramas E Idade Em Dias.	63
Tabela 2 - Frequência Cardíaca (Fc) Em Batimentos Por Minuto (Bpm), Débito Cardíaco (Dc) Em Mililitros Por Minutos (Ml/Min) E Volume Sistólico Do Ventrículo Esquerdo (Vs) Em Microlitros (Ml)	64
Tabela 3 – Diâmetros Sistólico (Dsf) E Diastólico (Ddf) Finais Do Ve (Em Mm) E Volumes Sistólico (Vsf) E Diastólico Finais(Vdf) Do Ve (Em Ml).....	66

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 – dP/dt máxima, em mmhg/s, expressos como média e erro padrão da média. Pré isquemia – antes da isquemia. 45 min – 45 minutos de isquemia. 30 min, 60 min e 90 min – 30, 60 e 90 minutos de reperfusão, respectivamente. (‡) $p < 0,05$ quando comparado os grupos epo24 e o grupo controle usando teste *post-hoc* de Bonferroni. (*) $p < 0,05$ quando comparado os grupos EPO e o grupo Controle usando teste *post-hoc* de Bonferroni. 68
- Gráfico 2 – Elastância máxima, em ângulo da regressão linear. Pré isquemia – antes da isquemia. 45 min – 45 minutos de isquemia. 30 min, 60 min e 90 min – 30, 60 e 90 minutos de reperfusão, respectivamente. (‡) $p < 0,05$ quando comparado os grupos EPO24 e o grupo Controle usando teste *post-hoc* de Bonferroni. (*) $p < 0,05$ quando comparado os grupos EPO e o grupo Controle usando teste *post-hoc* de Bonferroni.69
- Gráfico 3 - Trabalho sistólico pré-recrutável, em ângulo da regressão linear. Pré isquemia – antes da isquemia. 45 min – 45 minutos de isquemia. 30 min, 60 min e 90 min – 30, 60 e 90 minutos de reperfusão, respectivamente. (‡) $p < 0,05$ quando comparado os grupos EPO24 e o grupo Controle usando teste *post-hoc* de Bonferroni. (*) $p < 0,05$ quando comparado os grupos EPO e o grupo Controle usando teste *post-hoc* de Bonferroni.70
- Gráfico 4 – dP/dt mínima, em mmhg/s, expressos como média e erro padrão da média pré isquemia – antes da isquemia. 45 min – 45 minutos de isquemia. 30 min, 60 min e 90 min – 30, 60 e 90 minutos de reperfusão, respectivamente..... 71
- Gráfico 5 – TAU, em msec, expressos como média e erro padrão da média. Pré isquemia – antes da isquemia. 45 min – 45 minutos de isquemia. 30 min, 60 min e 90 min – 30, 60 e 90 minutos de reperfusão, respectivamente. 72
- Gráfico 6 - ERPVR, expressos como média e erro padrão da média. Pré isquemia – antes da isquemia. 45 min – 45 minutos de isquemia. 30 min, 60 min e 90 min – 30, 60 e 90 minutos de reperfusão, respectivamente..... 73
- Gráfico 7 – Expressão da p-Akt, expressa como média e erro padrão da média. 74
- Gráfico 8 – Expressão da p-ERK 1/2, expressa como média e erro padrão da média.75
- Gráfico 9 – Expressão da p-JAK, expressa como média e erro padrão da média. 76
- Gráfico 10 – Expressão da BAD, expressa como média e erro padrão da média. 78

Gráfico 11 – Expressão da BAX, expressa como média e erro padrão da média.	79
Gráfico 12 – Expressão da BCL, expressa como média e erro padrão da média.	80
Gráfico 13 - Expressão da Caspase 8, expressa como média e erro padrão da média.	78
Gráfico 14 – Expressão da p-STAT3, expressa como média e erro padrão da média.	82

RESUMO

RESUMO:

As lesões de isquemia e reperfusão miocárdica continuam sendo um desafio ao cirurgião cardíaco. A eritropoietina tem demonstrado efeito protetor contra lesões por isquemia e/ou reperfusão em corações adultos. Seu papel em corações neonatais ainda não foi esclarecido. Objetivo: avaliar o uso da eritropoietina em corações neonatais submetidos a isquemia e reperfusão. Material e métodos: suínos neonatos foram divididos em grupos de acordo com o momento da administração da eritropoietina (EPO- administrada três minutos antes da isquemia; EPO24- administrada 24 horas antes da isquemia; Controle- não recebeu eritropoietina) e submetidos a 45 minutos de isquemia miocárdica por oclusão da art. interventricular anterior e 90 minutos de reperfusão e avaliados índices de contratilidade derivados de curvas de volume vs. pressão obtidas por meio de cristais sonomicrométricos e pressão intraventricular. As vias da Akt e ERK $\frac{1}{2}$ foram avaliados por western blot. Resultados: os grupos foram semelhantes na avaliação antes da isquemia. Não observamos diferenças entre os grupos em relação a frequência cardíaca, débito cardíaco e volume sistólico do ventrículo esquerdo. Observamos melhora da elastância máxima no grupo EPO aos 60 e 90 minutos de reperfusão, e melhora do trabalho sistólico pré-recrutável e da dP/dt máxima nos dois grupos que receberam eritropoietina ao final da isquemia e durante toda a reperfusão. Não houve diferença entre os grupos nos índices de função diastólica. A eritropoietina promoveu fosforilação da Akt, mas não da ERK, e menor expressão de proteínas pró-apoptóticas. Conclusão: A eritropoietina protegeu a função sistólica do ventrículo esquerdo de corações neonatais submetidos a isquemia e reperfusão. Este resultado foi provavelmente mediado por ativação da via Akt.

ABSTRACT

ABSTRACT:

Background: The effect of erythropoietin (EPOT) on neonatal hearts is not well understood. The current hypothesis is that erythropoietin has protective effects against ischemia-reperfusion when administered prior to ischemia induction. Methods: Systolic and diastolic indices, as well as the Akt and extracellular regulated kinase (ERK) signaling pathways, were studied in vivo using a neonatal pig heart model. Regional ischemia was induced for 45 min by ligation of the left anterior descending artery, followed by 90 min of reperfusion. The treatment groups consisted of: 1) untreated controls, 2) treatment with erythropoietin 3 min prior to ischemia, and 3) treatment with erythropoietin 24 h before ischemia. Sophisticated myocardial contractility indices were assessed by pressure/volume loops of the left ventricle. The Akt and ERK pathways were evaluated via western blot.

Results: Elastance was found to be higher in the group receiving erythropoietin 3 min prior to ischemia. In addition, preload recruitable stroke work was higher for both groups receiving erythropoietin prior to ischemia when compared to controls. The time constant of the isovolumic relaxation and end diastolic pressure volume relationship did not differ between the three groups after 90 min of reperfusion. Furthermore, erythropoietin treatment enhanced phosphorylation of Akt, but not ERK, and erythropoietin treated animals showed lower levels of apoptosis-related proteins. Conclusions: Erythropoietin had a protective effect on neonatal systolic function after ischemia/reperfusion injury, but no effect on diastolic function. This cardioprotective effect might be mediated by activation of the Akt pathway.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO:

Apesar dos avanços na cirurgia cardíaca, a proteção contra lesões decorrentes de isquemia e reperfusão miocárdica ainda continuam sendo um desafio ao cirurgião cardíaco. Portanto, novas estratégias dirigidas para a prevenção e/ou limitação da lesão decorrente de isquemia e reperfusão são necessárias.

A eritropoietina é um hormônio glicoproteico de 34 kDa, e um membro da família das citocinas, sendo identificada pelo seu papel crítico em promover a diferenciação e sobrevivência dos eritrócitos (1). A eritropoietina é o único fator hematopoiético a ser regulado pela hipóxia (2), funcionando como mediador primário de uma resposta geral protetora a isquemia tecidual, para a manutenção da oxigenação tissular adequada através de ajustes da massa de células vermelhas circulantes através do *feedback* hormonal, controlando um sistema que inclui os rins e a medula óssea (3). Estudos prévios têm demonstrado que os alvos principais da eritropoietina são as células progenitoras tardias da linhagem eritropoiética, principalmente as unidades formadoras de colônias (CFU-E) (4, 5), com a eritropoietina tendo importante papel no resgate da apoptose, manutenção da proliferação e síntese de proteínas específicas da linhagem eritróide nas CFU-E (2). Após esse estágio da linhagem eritropoiética, há uma redução gradual no número de receptores, que estão ausentes em reticulócitos e eritrócitos. Devido às baixas concentrações da eritropoietina circulante e da dificuldade em isolar o hormônio produzido naturalmente, o estudo do receptor da eritropoietina (EPOr) só teve início após a clonagem do gene da eritropoietina e a produção do hormônio recombinante em 1985 (6, 7).

Mais recentemente tem sido observado que a eritropoietina e o receptor da eritropoietina também tem expressão em outros tecidos e órgãos, incluindo o cérebro e o

coração (8). A importância desses achados tem sido comprovada por experimentos de *Knockout* dirigidos para os genes da eritropoietina e do receptor da eritropoietina. Esses genótipos (sem o gene da eritropoietina e/ou receptor da eritropoietina) são letais na fase embrionária devido a aplasia eritrocitária associada a anomalias do sistema nervoso central (9) e do sistema circulatório (10). Wu et al (10) demonstraram que ratos geneticamente modificados para a não produção da eritropoietina ou a não expressão do receptor da eritropoietina morreram no décimo quarto dia de vida gestacional devido alterações cardíacas associadas à menor massa eritrocitária e à menor massa hepática.

Estudos demonstraram um efeito protetor da eritropoietina no cérebro, onde a administração local de eritropoietina recombinante humana (EPOrh) previniu a morte neuronal induzida por isquemia (11, 12). Sadamoto et al (11) mostraram que a infusão local pós-isquêmica de eritropoietina é capaz de diminuir as alterações clínicas e diminuir a degeneração talâmica secundária a isquemia cerebral induzida por oclusão permanente da artéria cerebral média esquerda. Em outros modelos experimentais, a eritropoietina recombinante humana também foi efetiva contra lesões do sistema nervoso central decorrentes de inflamação (13).

Em 2003 foi demonstrado pela primeira vez que a eritropoietina também podia proteger o coração contra lesões decorrentes da isquemia ou da isquemia/reperfusão (1, 14-16). Moon et al (14) demonstraram que a administração de eritropoietina recombinante humana intraperitoneal em ratos logo após a ligadura da artéria interventricular anterior é capaz não apenas de reduzir a área de infarto, como de converter isso em melhora de função ventricular sistólica no seguimento de oito semanas. Tramontano et al (16) demonstraram redução da incidência da apoptose em células miocárdicas neonatais

submetidas a hipóxia. Esse achado foi reproduzido no modelo *in vivo*, com corações isolados submetidos a isquemia, onde também foi observado redução do número de células apoptóticas no grupo que recebeu eritropoietina antes da isquemia. Estudos recentes tem demonstrado que o efeito benéfico da eritropoietina acontece mesmo quando sua administração é retardada em até 24 horas após a reperfusão miocárdica em modelos de isquemia/reperfusão (17) ou até 12 horas após isquemia em modelos de ligadura permanente de artérias coronárias (18).

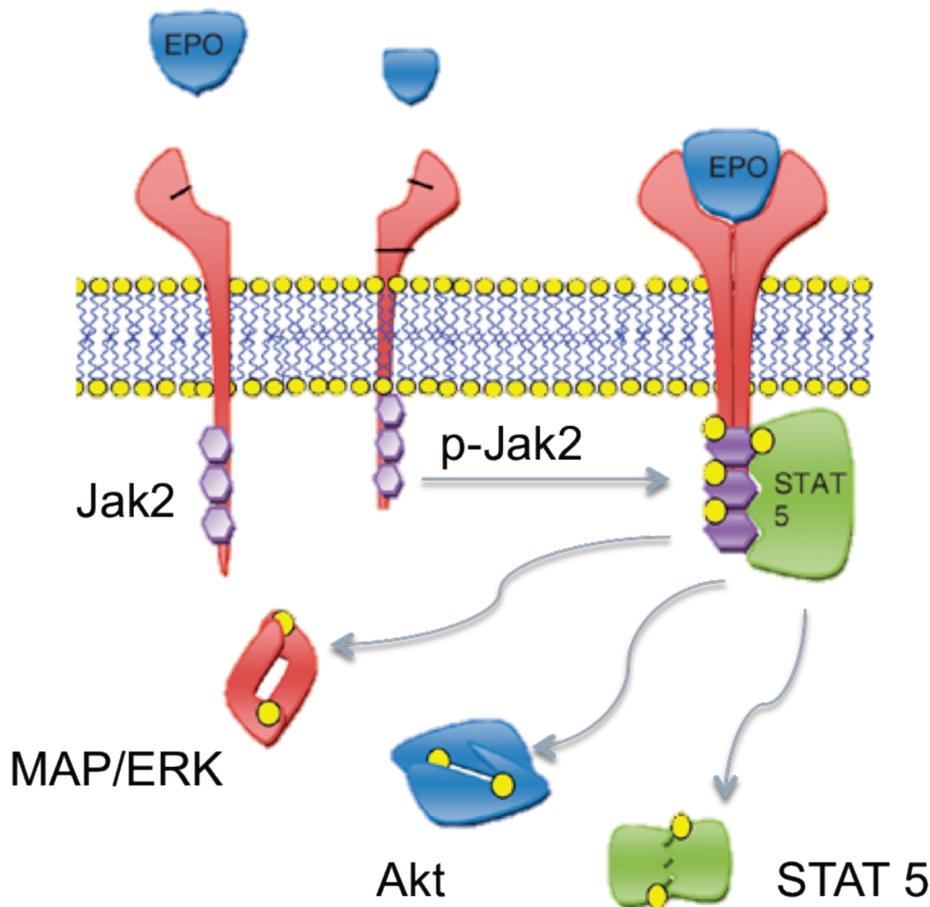


Figura 1 - Esquema representativo do receptor da eritropoietina e seus principais mediadores intracelulares JAK, ERK, Akt e STAT. EPO - Eritropoietina

Enquanto a via de sinalização intracelular da eritropoietina nas células eritróides já foi bem caracterizada (19), a via de sinalização no tecido cardíaco ainda tem seu conhecimento fragmentado. Objetivando minimizar a lesão de isquemia/reperfusão, a via das quinases salvadoras da lesão de reperfusão (RISK) tem recebido atenção em particular (20). Essa via inclui várias quinases pró-sobrevida celular, como a quinase reguladora de sinal extracelular 1/2 (ERK 1/2) e a fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K), que por sua vez fosforila a proteína Akt (ou proteína quinase B (PKB)). Há evidências de que a ativação da via RISK no momento da reperfusão leva a uma redução da apoptose e da área de infarto em até 50% (21-23). A ativação da via PI3K/Akt controla a apoptose por várias vias, incluindo a inibição das proteínas pró-apoptóticas BAD e BAX da família Bcl-2, a inibição da ativação da via das caspases e a inibição da abertura dos poros transitórios de permeabilidade mitocondriais (mPTP) na reperfusão (20). O mPTP é um canal de alta condutância não específico que se forma na membrana mitocondrial interna nos primeiros minutos da reperfusão e tem se mostrado como um mediador crucial na morte celular (24). Em cardiomiócitos isolados, a eritropoietina é capaz de induzir uma fosforilação rápida da Akt e da ERK 1/2, mas o efeito antiapoptótico da eritropoietina parece ser dependente apenas da ativação da Akt, pois é eliminado pela inibição farmacológica da PI3K (15, 16), mas não pela inibição farmacológica da ERK (15, 25). Entretanto, outros trabalhos sugerem que a bloqueio da ERK 1/2 pode inibir o efeito cardioprotetor da eritropoietina quando esta é administrada no momento da reperfusão (26-28), mas não quando a eritropoietina é administrada antes da isquemia (29). Em adição, tem sido reportado também ativação da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) (26), Janus quinase 2 (JAK2) (27, 30-32), transdutora de sinal e ativadora de transcrição 3 e 5 (STAT3 e STAT5) (31-33), e glicogênio sintase quinase-3B (GSK-3B) (32, 33), assim como a translocação da isoforma

ipsilon da proteína quinase C (PKC- γ) do citosol para a fração particulada (32, 34). Finalmente, em cardiomiócitos isolados de ratos a administração de eritropoietina resultou em aumento Akt-dependente da expressão e fosforilação da eNOS, com o efeito antiapoptótico da eritropoietina sendo abolido pela inibição farmacológica da eNOS (35).

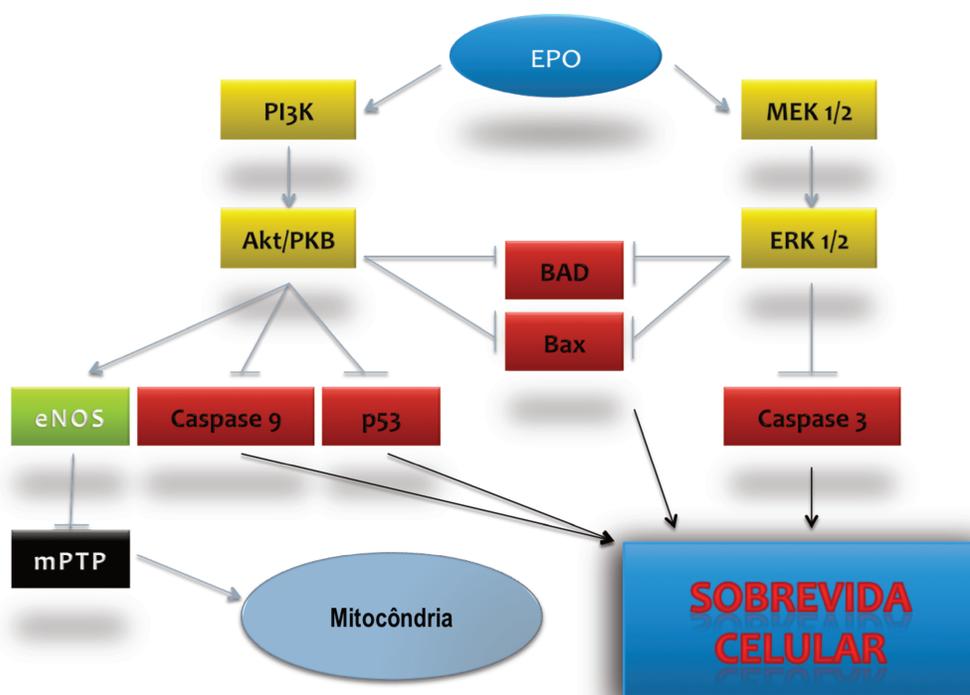


Figura 2 – Esquema representativo da via RISK e seus principais mediadores intracelulares, levando a uma melhor sobrevivência celular.

Em conclusão, há evidências de que o efeito cardioprotetor da eritropoietina contra a lesão de isquemia/reperfusão requer a ativação de quinases pertencentes à via RISK na reperfusão, incluindo a Akt e ERK 1/2, em corações adultos normais, em modelos experimentais.

Em corações neonatais o efeito da eritropoietina ainda é pouco estudado. Estudos com mioblastos (15) e células miocárdicas neonatais de ratos (16) submetidas a anóxia demonstraram redução da apoptose e ativação da via RISK quando foi administrado

eritropoietina. Entretanto, não temos conhecimentos de estudos na literatura correlacionando função ventricular esquerda e a eventual proteção oferecida pela administração de eritropoietina em corações neonatais submetidos a isquemia e reperfusão. Neste estudo trabalhamos com a hipótese que a eritropoietina pode promover proteção miocárdica após isquemia e reperfusão regional em modelo agudo utilizando suínos considerados neonatos.

OBJETIVOS

OBJETIVOS:

Avaliar o uso da eritropoietina em corações de suínos neonatais submetidos à isquemia e reperfusão miocárdica regional.

Avaliar a expressão de proteínas da via RISK com uso da eritropoietina em corações de suínos neonatais submetidos à isquemia e reperfusão miocárdica regional.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS:

Esse trabalho foi realizado no Laboratório de Isquemia e Reperusão Miocárdica do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas. O protocolo de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal – CEEA – Instituto de Biologia – Universidade Estadual de Campinas, com o protocolo de número 1852-1.

Foram utilizados suínos da linhagem doméstica *Large-White* com idade entre dois e cinco dias de vida, machos, sem problemas ao nascimento. Os animais foram aleatoriamente divididos em três grupos, cego ao pesquisador.

Foram realizados um total de 30 experimentos, com os animais distribuídos entre os grupos da seguinte maneira:

- Grupo Controle: 11 animais
- Grupo EPO: 10 animais
- Grupo EPO24: 9 animais

Os animais foram submetidos a anestesia geral, com indução com quetamina 20mg/kg via intramuscular associado com tiopental 25mg/Kg via intravenosa. Após indução anestésica, os animais foram colocados em decúbito dorsal horizontal com restrição dos membros. Foram submetidos a cervicotomia transversa e traqueostomia, com ventilação mecânica com ventilador Harvard (Harvard Apparatus modelo 613), seguido de dissecação e cateterização de veia jugular interna direita para administração de fluidos (15 ml/kg/h de solução de cloreto de sódio a 0,9%) e medicações. Foi realizada a seguir esternotomia mediana longitudinal e pericardiotomia, passado fio de algodão 2.0 em volta

da veia cava inferior, fixados cristais sonomicrométricos de 2 mm nas seguintes posições do ventrículo esquerdo: parede anterior, parede posterior, base e ápice. Estes cristais foram conectados a sistema sincronizador TRX6 (Sonometrics, London, Ontário – Canadá) para mensuração do volume ventricular considerando o ventrículo de formato elipsoide. Na cavidade ventricular esquerda foi inserido pelo ápex cateter para mensuração da pressão ventricular de alta fidelidade modelo 524 (Millar Instruments, Texas, Estados Unidos). Após a captura dos sinais, estes foram analisados utilizando o software CardioSoft 3.1.2 (Sonometrics, London, Ontário – Canadá)(figura 3). Os animais foram então anticoagulados com heparina na dose de 500UI.

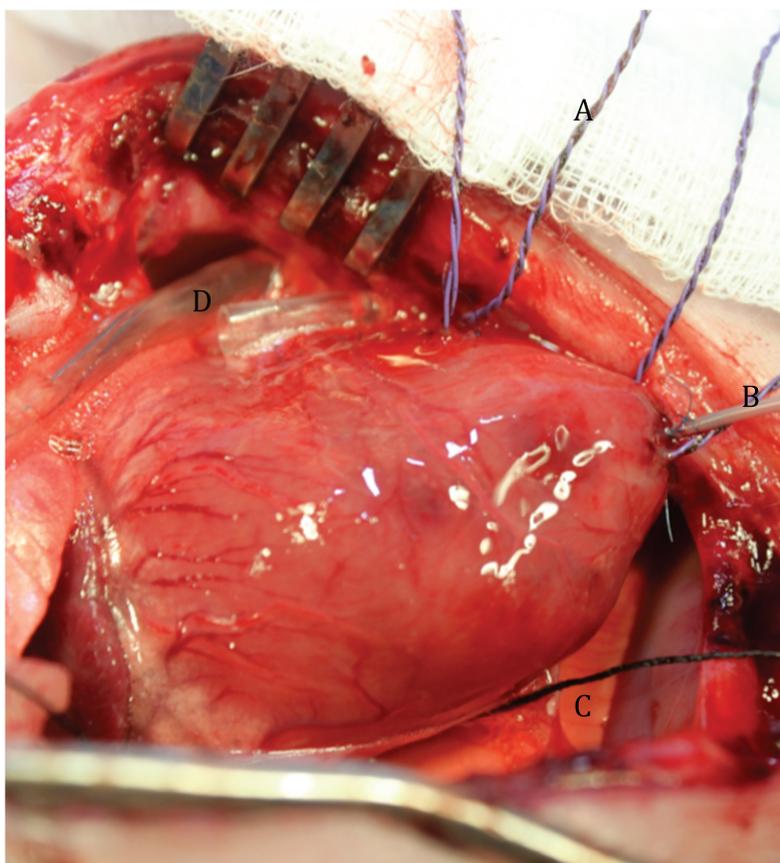


Figura 3 – Foto representativa do coração monitorizado. A – Cristais sonomicrométricos. B – Catéter Millar. C – Tourniquete na veia cava inferior. D – Tourniquete na artéria coronária interventricular anterior.

Os animais foram divididos em três grupos:

Grupo EPO – recebeu eritropoetina recombinante humana na dose de 1000UI/Kg três minutos antes do início da isquemia miocárdica.

Grupo EPO24h – recebeu eritropoietina recombinante humana na dose de 1000UI/Kg 24 horas antes do início da isquemia miocárdica.

Grupo Controle – recebeu solução de cloreto de sódio a 0,9% no volume de 0,1mL/Kg três minutos antes do início da isquemia miocárdica.

Os animais foram submetidos a avaliação hemodinâmica por meio de variação da pré-carga cardíaca por oclusão da veia cava inferior, sendo considerado os valores iniciais como valores basais (tempo Pré). Após a realização desta análise, os animais receberam eritropoietina (Janssen-Cilag, São José dos Campos, SP, Brasil) ou placebo, e após três minutos foi realizado a oclusão da artéria interventricular anterior no seu terço proximal por meio de torniquete, promovendo a isquemia miocárdica com duração de 45 minutos. Neste momento foi realizado nova avaliação hemodinâmica (tempo 45 min), sendo então liberado o torniquete da artéria interventricular anterior, promovendo a reperfusão miocárdica, com intervalo de observação de 90 minutos, período durante o qual foram realizadas avaliações hemodinâmicas a cada 30 minutos (tempos 30min, 60min e 90min), conforme demonstrado na figura 4.

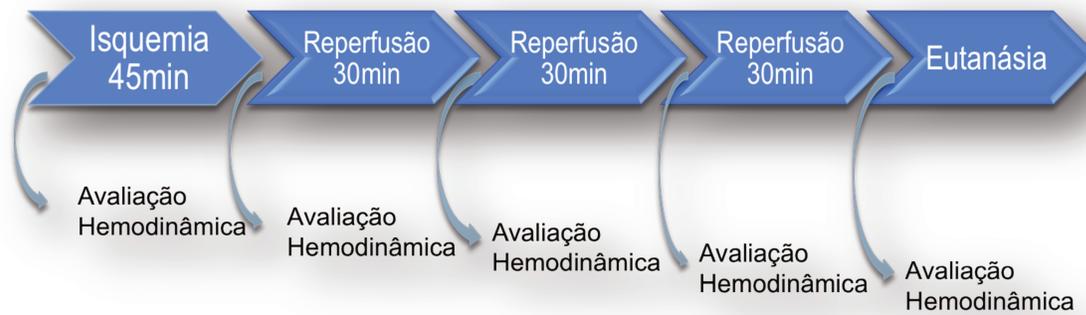


Figura 4 – Régua de tempo do experimento, com as avaliações hemodinâmicas realizadas.

Cada avaliação hemodinâmica consistiu na construção de curvas de pressão-volume ventricular esquerdo, baseadas nos dados obtidos pelos cristais sonomicrométricos, que permitem a obtenção do volume ventricular esquerdo, e do transdutor de pressão, com medidas da pressão intraventricular esquerda com variação da pré carga ventricular por meio da oclusão temporária da veia cava inferior. Esses dados foram posteriormente analisados com auxílio do software CardioSoft 3.1.2 (Sonometrics Corporation, Ontario, Canadá), fornecendo os seguintes parâmetros:

- Diâmetro sistólico final do VE (DSF)
- Diâmetro diastólico final do VE (DDF)
- Volume sistólico final do VE (VSF)
- Volume diastólico final do VE (VDF)
- Primeira derivada temporal da pressão ventricular máxima ($dP/dt \text{ max}$)
- Primeira derivada temporal da pressão ventricular mínima ($dP/dt \text{ min}$)

- Freqüência cardíaca (FC) – em batimentos por minuto (bpm)
- Volume sistólico do VE (VS) – diferença entre o volume diastólico e sistólico finais do VE, em cada ciclo cardíaco ($VS=VDF-VSF$)
- Débito cardíaco (DC) – calculado pelo produto da freqüência cardíaca instantânea e o volume ejetado, em cada ciclo cardíaco ($DC=VS \times FC$)
- Tempo de relaxamento isovolumétrico (τ) (TAU) - constante do tempo de relaxamento isovolumétrico. Calculado com a fórmula $LVP(t) = LVP0^{(-t/\tau)} + P_{asym}$ onde: $LVP(t)$ é a pressão do ventrículo esquerdo no tempo t , $LVP0$ é a pressão ventricular no final da sístole e P_{asym} é a pressão escolhida pelo usuário, que foi fixada em 5 mmHg, neste trabalho
- Elastância máxima (E_{max}) – relação linear entre o volume sistólico final e pressão sistólica no final da sístole, obtidos pelas curvas de pressão-volume do ventrículo esquerdo medidas com alteração da pré-carga, e expressa pela angulação dessa regressão linear
- Trabalho Sistólico Pré-recrutável (PRSW) – relação linear entre trabalho sistólico e diâmetro diastólico final, obtidos pelas curvas de pressão-volume do ventrículo esquerdo medidas com alteração da pré-carga, expresso pela angulação dessa regressão linear
- Relação entre volume diastólico final e pressão diastólica final (EDPVR) – relação exponencial entre a pressão e o volume ventricular esquerdo no final da diástole. Permitir mensurar a “rigidez” do ventrículo

Ao final dos 90 minutos de reperfusão, o animal foi sacrificado com a administração de tiopental sódico e cloreto de potássio. Após o sacrifício do animal, foi feita a rápida retirada do coração, com preservação apenas do ventrículo esquerdo, sendo separado o ápice do ventrículo esquerdo para posterior análise. Esse segmento foi armazenado imediatamente em nitrogênio líquido e posteriormente transferido para armazenamento a -80° C. Estes segmentos de miocárdio foram avaliados por método de Western-Blot quanto a expressão das seguintes proteínas:

- ERK (Santa Cruz Biotechnology, Inc., cod. sc-93)
- JAK2 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., cod. sc-278)
- STAT 3 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., cod. sc-483)
- eNOS (Santa Cruz Biotechnology, Inc., cod. sc-654)
- BAD (Santa Cruz Biotechnology, Inc., cod. sc-943)
- BAX (Santa Cruz Biotechnology, Inc., cod. sc-493)
- Bcl2 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., cod. sc-492)
- Caspase 8 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., cod. sc-5263)
- p-Akt Ser473 (Cell Signalling Technology, Inc., Cod 9271)
- p-JAK2 (Abcam, Cod 68268)
- p-ERK (E-4) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., cod. sc-7363)
- p-BAD (Ser112) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., cod. sc-

101640)

- P-STAT3 (Ser727) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., cod. sc-8001)
- P-Bcl-2 (Ser-70) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., cod. sc-21864)

A técnica de Western Blot é um método de bioquímica para detectar proteínas em um extrato de tecido biológico. As amostras de tecidos congelados a -80°C foram maceradas por força mecânica, processo durante o qual as amostras foram mantidas resfriadas com uso de nitrogênio líquido. Os tecidos, após a maceração, foram adicionados a igual volume de solução tampão e homogeneizados, e adicionado Triton x100 10% (Sigma, catálogo 9002-93-1) em volume correspondente a 10% da solução tampão. A solução resultante foi deixada em repouso por 40 minutos e centrifugada a 12.000 rpm na temperatura de 4°C . O passo seguinte do processo foi a quantificação da proteína presente no sobrenadante de cada amostra, realizada por leitura de espectrofotometria (540λ), sendo utilizada o kit Prot^{AL} (Labcenter), com leitura das amostras em triplicata. Com o resultado da espectrofotometria, foi feito o cálculo da concentração proteica. O volume das amostras a ser aplicado foi baseada na quantidade de 125 μg de proteína. Após a leitura, as amostras foram armazenadas a temperatura de -80°C até a realização do Western-blot.

Para a realização do Western-blot, as amostras (125 μg de proteína) foram colocadas em géis para separação por eletroforese. Esses géis foram preparados em diferentes concentrações, de acordo com o peso da proteína a ser avaliada.

As amostras foram colocadas em sistema para eletroforese de proteínas em gel (BIO-RAD, Philadelphia, PA, Estados Unidos) preenchidos com solução tampão de corrida, com voltagem de 60V até passagem das amostras pelo gel de separação. Após isso

a voltagem foi gradualmente sendo aumentada até 120V, por tempo suficiente para que houvesse adequada separação das proteínas. Esse tempo foi variável, de acordo com o peso da proteína que estava sendo avaliado. Após a corrida, foi feita a transferência das proteínas para membrana de nitrocelulose.

Após o término da transferência, a membrana foi retirada e colocada em recipiente com solução bloqueadora por 90 a 120 minutos, em mesa agitadora a 50rpm. A membrana foi lavada com solução basal. O anticorpo primário foi adicionado na quantidade de 10 µl, conforme orientação do fabricante, e mantido em mesa agitadora *overnight*. Após a incubação com o anticorpo primário, a membrana foi lavada com solução basal e incubada com solução de peroxidase, adicionado de 1,3 µl da solução de anticorpo secundário (com especificidade para rato ou coelho, de acordo com a especificidade do anticorpo primário), e deixada em agitação por 90 a 120 minutos, em temperatura ambiente.

Para revelação, foi retirado a solução basal dos recipientes e adicionado 2ml da solução de quimioluminescência, com agitação manual por um minuto. Após isso, a membrana de nitrocelulose foi transferida para o cassete de revelação com plástico e inserido filme radiológico.

Após a revelação dos filmes, os mesmos foram digitalizados para leitura de densidade óptica por meio do programa ImageJ versão 1.44 (National Institute of Health, Estados Unidos). Os resultados da densidade óptica foram analisados em programa estatístico descrito na seção de análise estatística.

A descrição detalhada da técnica e composição das soluções utilizadas está descrita no anexo 2.

Análise Estatística:

As variáveis contínuas foram expressas como média e desvio padrão. Todas as amostras foram testadas para normalidade com o teste de Shapiro-Wilk. Para a comparação entre os grupos de medidas não seriadas foi utilizado o teste de análise de variância (ANOVA) ou o teste de Kruskal-Wallis onde fosse necessário.

Para a comparação das variáveis com medidas repetidas foi utilizado o teste de análise de variância para medidas repetidas (ANOVA) e o pós teste de Bonferroni para medidas repetidas para se detectar onde as diferenças ocorreram.

Os gráficos e a análise estatística foram feitos com o software Graphpad Prism (Graphpad, Califórnia, Estados Unidos). Foi considerado o $P < 0,05$ como significativo.

RESULTADOS

RESULTADOS:

Os grupos foram semelhantes quanto a idade e peso dos animais, conforme a tabela abaixo:

Tabela 1 – Peso em quilogramas e Idade em dias.

	Controle	EPO	EPO24	<i>p</i>
Peso (Kg)	1,56±0,11	1,62±0,11	1,56±0,10	0,43
Idade (dias)	2,45±0,68	2,70±0,67	2,66±0,70	0,67

Valores expressos em média e desvio padrão. Análise utilizando ANOVA

Para avaliação hemodinâmica dos animais, utilizamos os seguintes parâmetros:

- Frequência cardíaca, em batimentos por minuto
- Volume sistólico do ventrículo esquerdo, em microlitros
- Débito cardíaco, em ml/min

Não encontramos diferenças entre os grupos, em nenhum destes parâmetros avaliados, conforme demonstrado na tabela a seguir:

Tabela 2 - Frequência cardíaca (FC) em batimentos por minuto (bpm), débito cardíaco (DC) em mililitros por minutos (ml/min) e volume sistólico do ventrículo esquerdo (VS) em microlitros (μ L).

	Controle	EPO	EPO24	P(*)
FC (bpm)				0,94
Pré	109 \pm 18	108 \pm 15	117 \pm 27	
45 min	103 \pm 19	101 \pm 18	108 \pm 13	
30 min	99 \pm 19	94 \pm 17	96 \pm 13	
60 min	99 \pm 24	97 \pm 21	90 \pm 16	
90 min	100 \pm 34	102 \pm 25	86 \pm 18	
DC (ml/min)				0,51
Pré	99 \pm 47	90 \pm 57	134 \pm 34	
45 min	67 \pm 44	63 \pm 44	64 \pm 31	
30 min	74 \pm 50	65 \pm 39	83 \pm 33	
60 min	79 \pm 48	62 \pm 36	85 \pm 35	
90 min	77 \pm 42	59 \pm 37	78 \pm 31	
VS (μ L)				0,97
Pré	434 \pm 391	282 \pm 320	88 \pm 260	
45 min	519 \pm 383	373 \pm 316	547 \pm 414	
30 min	387 \pm 375	359 \pm 335	703 \pm 331	
60 min	328 \pm 326	538 \pm 361	426 \pm 441	
90 min	448 \pm 370	489 \pm 333	394 \pm 406	

Valores expressos em média e desvio padrão. Pré – Antes da isquemia. 45 min – 45 min de isquemia. 30 min, 60 min e 90 min – 30min, 60min e 90min de reperfusão, respectivamente. (*) valor de P para diferença intergrupo utilizando ANOVA para medidas repetidas.

Para análise da morfologia do ventrículo esquerdo, analisamos os seguintes parâmetros:

- Diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo
- Diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo
- Volume sistólico final do ventrículo esquerdo
- Volume diastólico final do ventrículo esquerdo

Quando esses parâmetros foram avaliados e feito as comparações entre os grupos, não encontramos diferenças entre os grupos em nenhum dos momentos avaliados, conforme demonstrado na tabela 3.

Tabela 3 – Diâmetros sistólico (DSF) e diastólico (DDF) finais do VE (em mm) e volumes sistólico (VSF) e diastólico finais(VDF) do VE (em ml).

	Controle	EPO	EPO24	P (*)
DSF (mm)				0,47
Pré	16,0±2,88	14,8±3,16	15,5±1,05	
45 min	16,9±2,94	16,0±3,31	16,9±1,51	
30 min	16,5±2,71	15,1±2,86	16,3±1,16	
60 min	16,4±3,01	14,9±2,85	16,1±1,19	
90 min	16,5±2,90	14,8±2,81	16,1±1,21	
DDF (mm)				0,46
Pré	18,0±2,93	16,9±3,55	17,9±0,93	
45 min	18,4±2,77	17,4±3,53	18,2±1,54	
30 min	18,2±2,80	16,8±3,13	18,0±0,99	
60 min	18,1±3,14	16,5±3,04	17,9±1,10	
90 min	18,2±2,95	16,3±2,98	17,9±1,17	
VSF (ml)				0,39
45 min	2,8±1,31	2,5±1,19	3,1±0,94	
30 min	3,3±1,35	3,1±1,38	3,6±1,03	
60 min	3,1±1,35	2,6±1,12	3,5±1,17	
90 min	3,0±1,44	2,6±1,01	3,4±1,14	
45 min	3,1±1,46	2,4±1,02	3,4±1,16	
VDF (ml)				0,37
Pré	3,9±1,54	3,7±1,72	4,5±1,31	
45 min	4,2±1,49	3,9±1,69	4,4±1,27	
30 min	4,0±1,57	3,5±1,43	4,6±1,48	
60 min	3,9±1,70	3,4±1,26	4,5±1,44	
90 min	4,0±1,66	3,23±1,26	4,5±1,45	

Valores expressos em média e desvio padrão. Pré – Antes da isquemia. 45 min – 45 min de isquemia. 30 min, 60 min e 90 min – 30min, 60min e 90min de reperfusão, respectivamente. (*) valor de P para diferença intergrupo utilizando ANOVA para medidas repetidas.

Para análise da função sistólica do ventrículo esquerdo, foram analisados os seguintes parâmetros:

- dP/dt máxima
- Elastância máxima
- Trabalho sistólico pré-recrutável

Quando analisamos as medidas de dP/dt máxima, observamos diferenças entre os grupos EPO24 e o grupo EPO em relação ao controle ao final dos 45 minutos de isquemia e durante todo o período de reperfusão. Não observamos diferenças entre os dois grupos que receberam eritropoietina (gráfico 1).

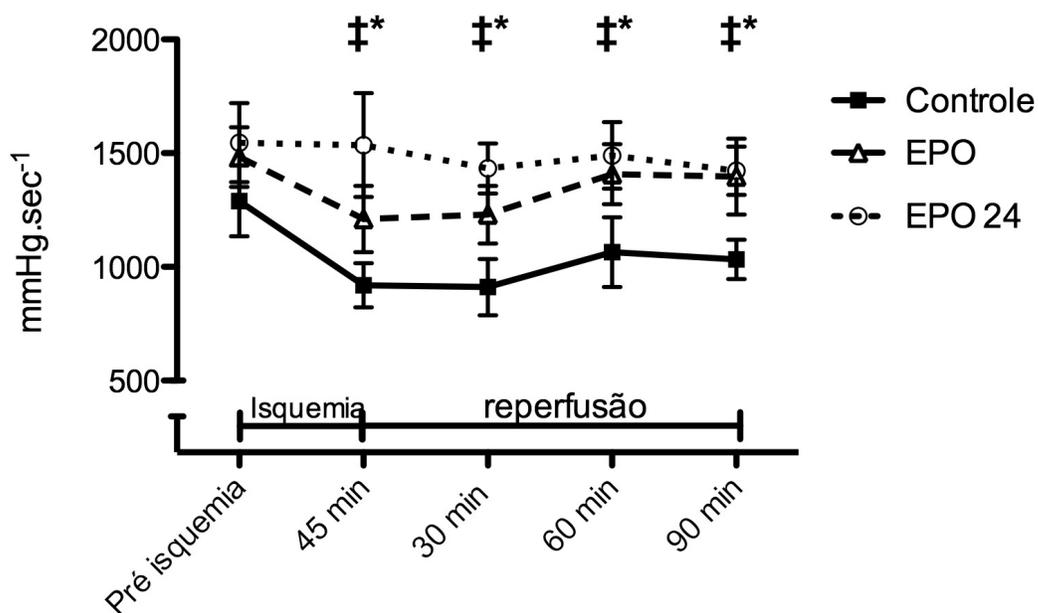


Gráfico 1 – dP/dt máxima, em mmHg/s, expressos como média e erro padrão da média. Pré isquemia – Antes da isquemia. 45 min – 45 minutos de isquemia. 30 min, 60 min e 90 min – 30, 60 e 90 minutos de reperfusão, respectivamente. (‡) $p < 0,05$ quando comparado os grupos EPO24 e o grupo Controle usando teste *post-hoc* de Bonferroni. (*) $p < 0,05$ quando comparado os grupos EPO e o grupo Controle usando teste *post-hoc* de Bonferroni.

Quando analisamos a elastância máxima, encontramos diferenças entre os grupos EPO e o grupo controle aos 60 e 90 minutos de reperfusão, e entre os grupos EPO24 e o grupo controle aos 60 minutos de reperfusão. Não encontramos diferenças entre os grupos EPO e EPO24 em nenhum dos momentos avaliados (gráfico 2).

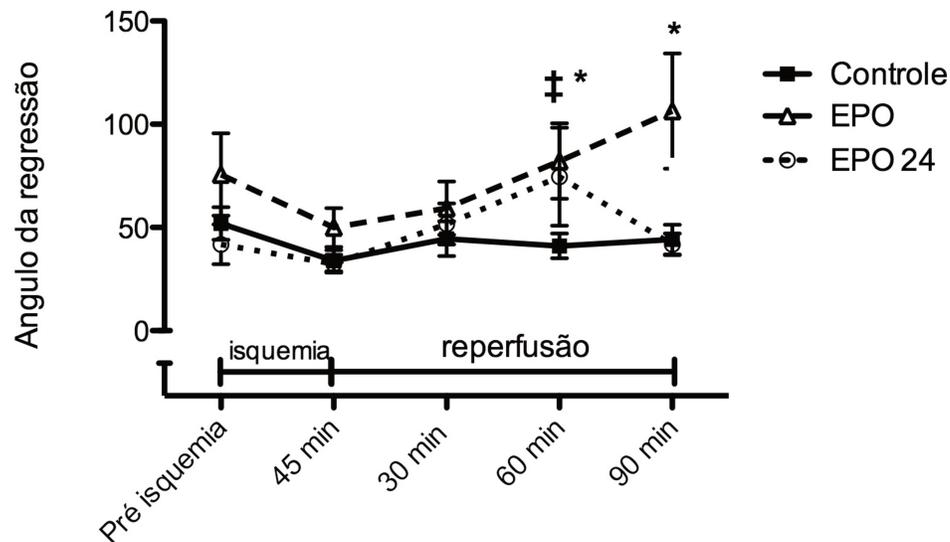


Gráfico 2 – Elastância máxima, em ângulo da regressão linear. Pré isquemia – Antes da isquemia. 45 min – 45 minutos de isquemia. 30 min, 60 min e 90 min – 30, 60 e 90 minutos de reperfusão, respectivamente. (‡) $p < 0,05$ quando comparado os grupos EPO24 e o grupo Controle usando teste *post-hoc* de Bonferroni. (*) $p < 0,05$ quando comparado os grupos EPO e o grupo Controle usando teste *post-hoc* de Bonferroni.

O trabalho sistólico pré-recrutável (PSRW) mostrou-se maior quando comparado os dois grupos que receberam a eritropoietina ao grupo controle ao final de 45 minutos de isquemia e durante todo o período de reperfusão. Não observamos diferenças entre os dois grupos que receberam a eritropoietina neste mesmo período. (gráfico 3).

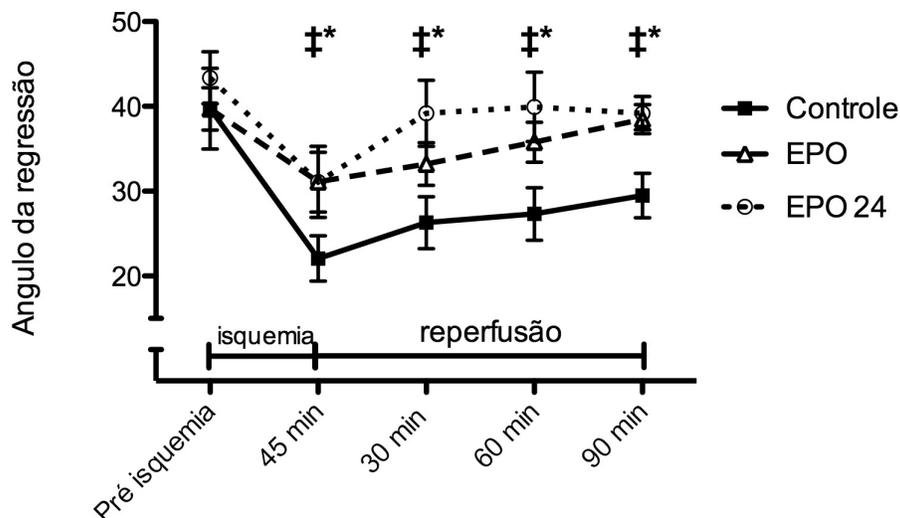


Gráfico 3 - Trabalho sistólico pré-recrutável, em ângulo da regressão linear. Pré isquemia - Antes da isquemia. 45 min - 45 minutos de isquemia. 30 min, 60 min e 90 min - 30, 60 e 90 minutos de reperfusão, respectivamente. (‡) $p < 0,05$ quando comparado os grupos EPO24 e o grupo Controle usando teste *post-hoc* de Bonferroni. (*) $p < 0,05$ quando comparado os grupos EPO e o grupo Controle usando teste *post-hoc* de Bonferroni.

Para avaliação da função diastólica do ventrículo esquerdo, utilizamos os seguintes parâmetros:

- dP/dt mínima
- Constante de relaxamento isovolumétrico (TAU)
- Relação pressão volume diastólica final

Quando avaliamos a dP/dt mínima não observamos diferenças entre os grupos em nenhum dos momentos analisados, conforme demonstrado gráfico 4.

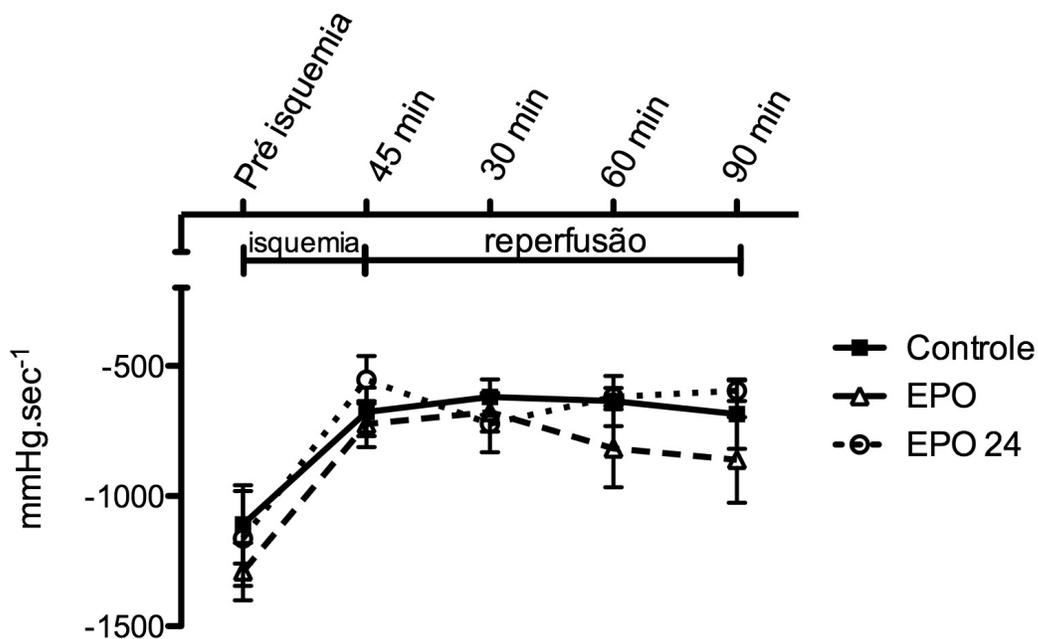


Gráfico 4 – dP/dt mínima, em mmHg/s, expressos como média e erro padrão da média Pré isquemia – Antes da isquemia. 45 min – 45 minutos de isquemia. 30 min, 60 min e 90 min – 30, 60 e 90 minutos de reperfusão, respectivamente.

A TAU mostrou-se semelhante nos três grupos durante o todo o protocolo de estudo (gráfico 5).

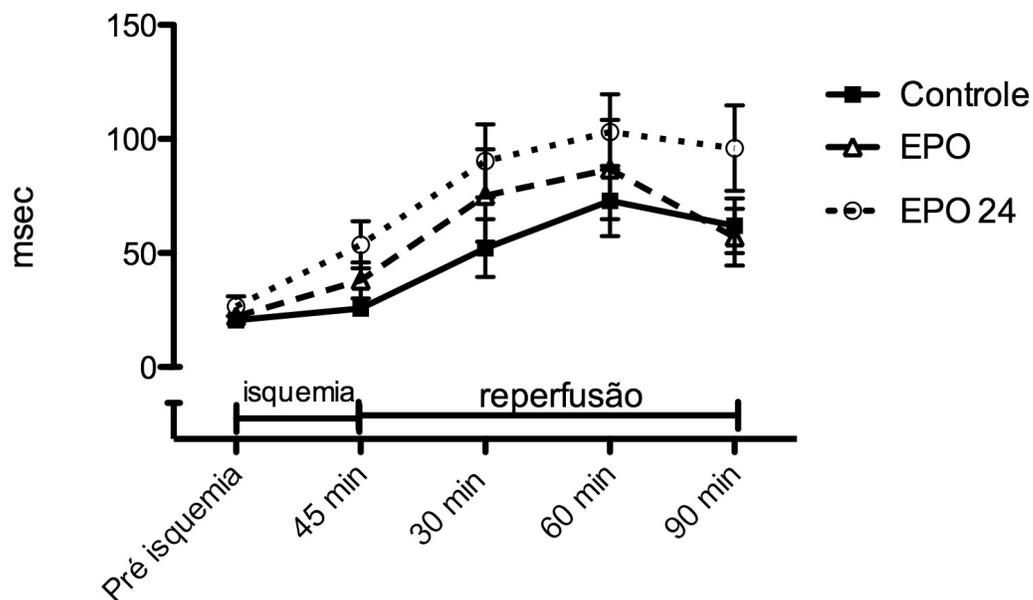


Gráfico 5 – TAU, em msec, expressos como média e erro padrão da média. Pré isquemia – Antes da isquemia. 45 min – 45 minutos de isquemia. 30 min, 60 min e 90 min – 30, 60 e 90 minutos de reperfusão, respectivamente.

Quando observamos a EDPVR não encontramos diferença entre os grupos em nenhum dos momentos avaliados, conforme demonstrado no gráfico gráfico 6.

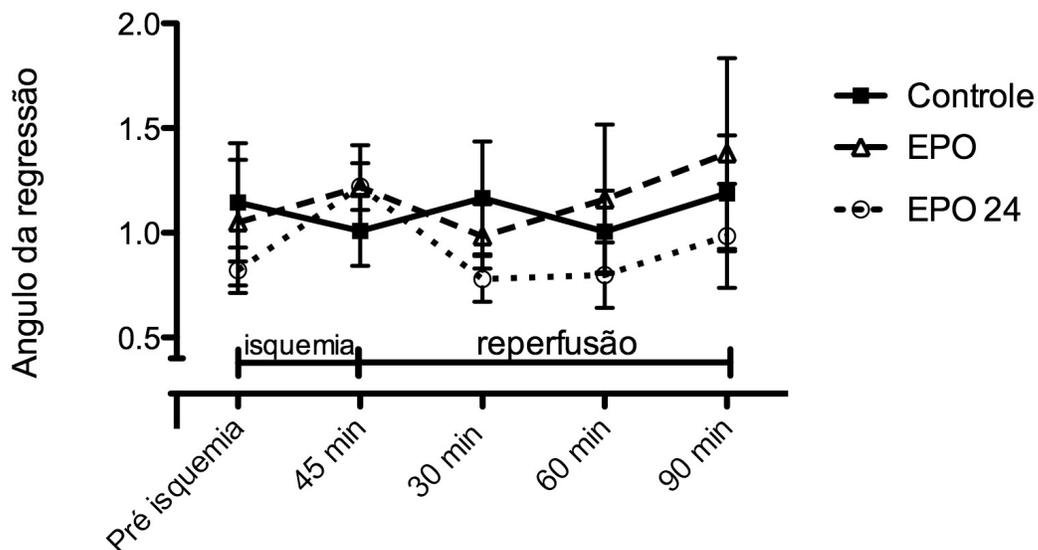


Gráfico 6 - EDPVR, expressos como média e erro padrão da média. Pré isquemia – Antes da isquemia. 45 min – 45 minutos de isquemia. 30 min, 60 min e 90 min – 30, 60 e 90 minutos de reperfusão, respectivamente.

A análise densitométrica das expressões protéicas por meio do Western Blot mostrou maior fosforilação da proteína Akt (p-Akt) normalizada pela Akt no grupo EPO quando comparados com o grupo EPO24 e grupo Controle. Não encontramos diferenças entres os grupos EPO24 e Controle, conforme demonstrado no gráfico abaixo.

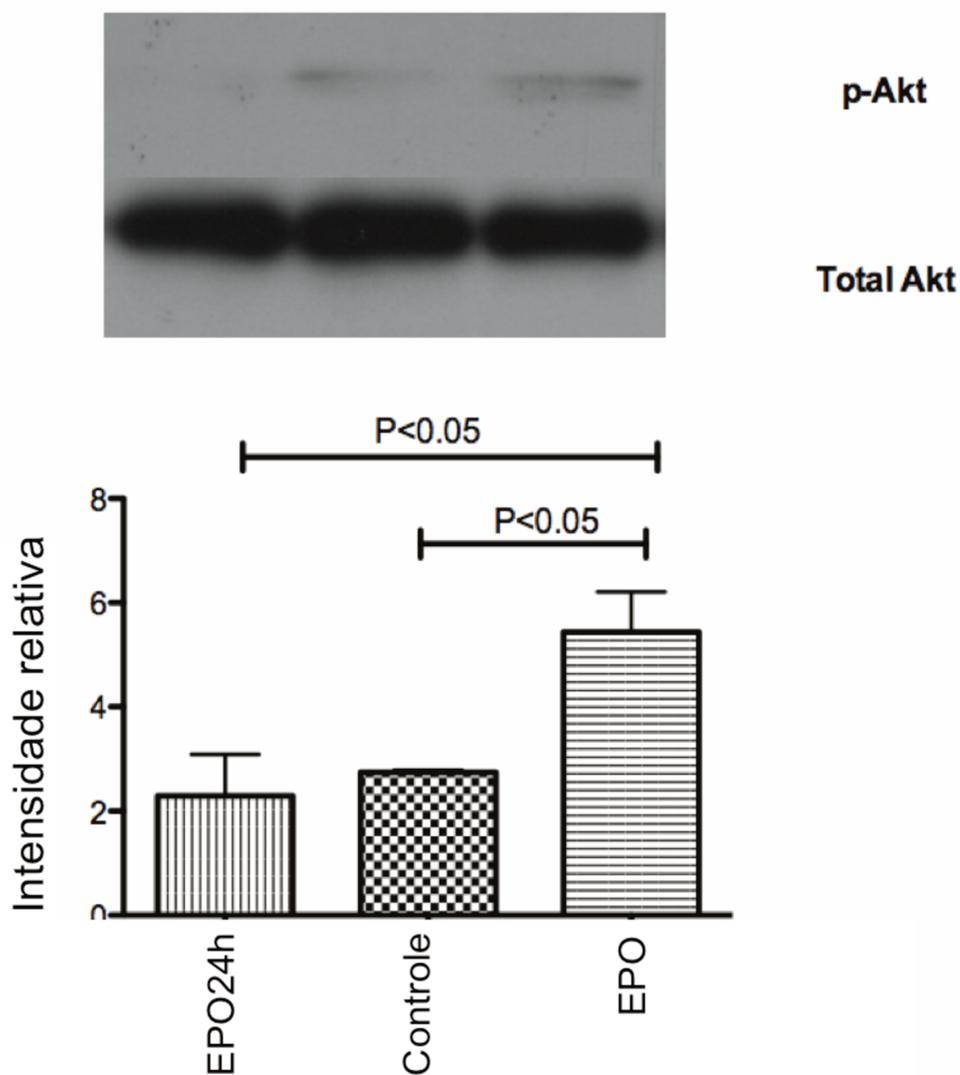


Gráfico 7 – Expressão da p-Akt, expressa como média e erro padrão da média.

Não encontramos diferenças na expressão das proteínas ERK 1/2 fosforiladas (p-ERK 1/2), quando normalizadas pela expressão da ERK 1/2, entre os grupos.

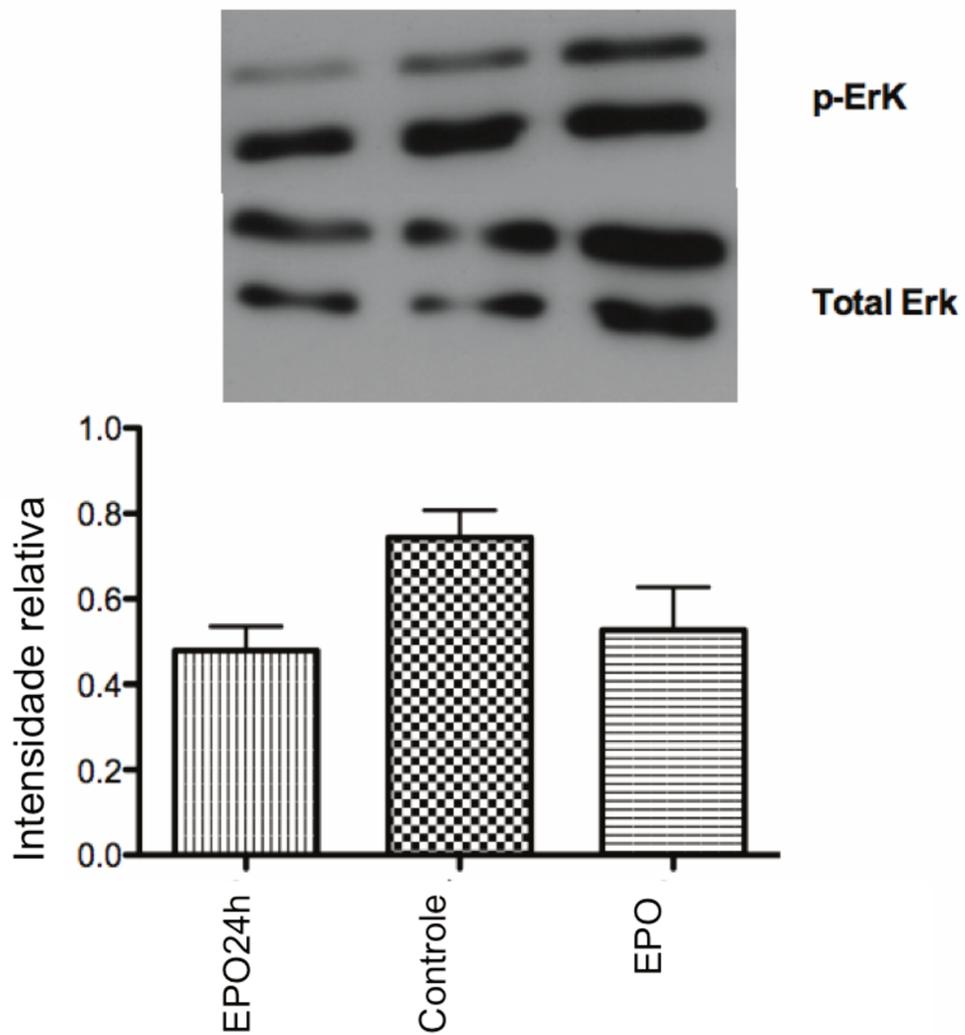


Gráfico 8 – Expressão da p-ERK 1/2, expressa como média e erro padrão da média.

Não encontramos diferenças entre os grupos quando comparamos a expressão da proteína JAK fosforilada (p-JAK), normalizada pela expressão da proteína JAK, conforme demonstrado no gráfico abaixo.

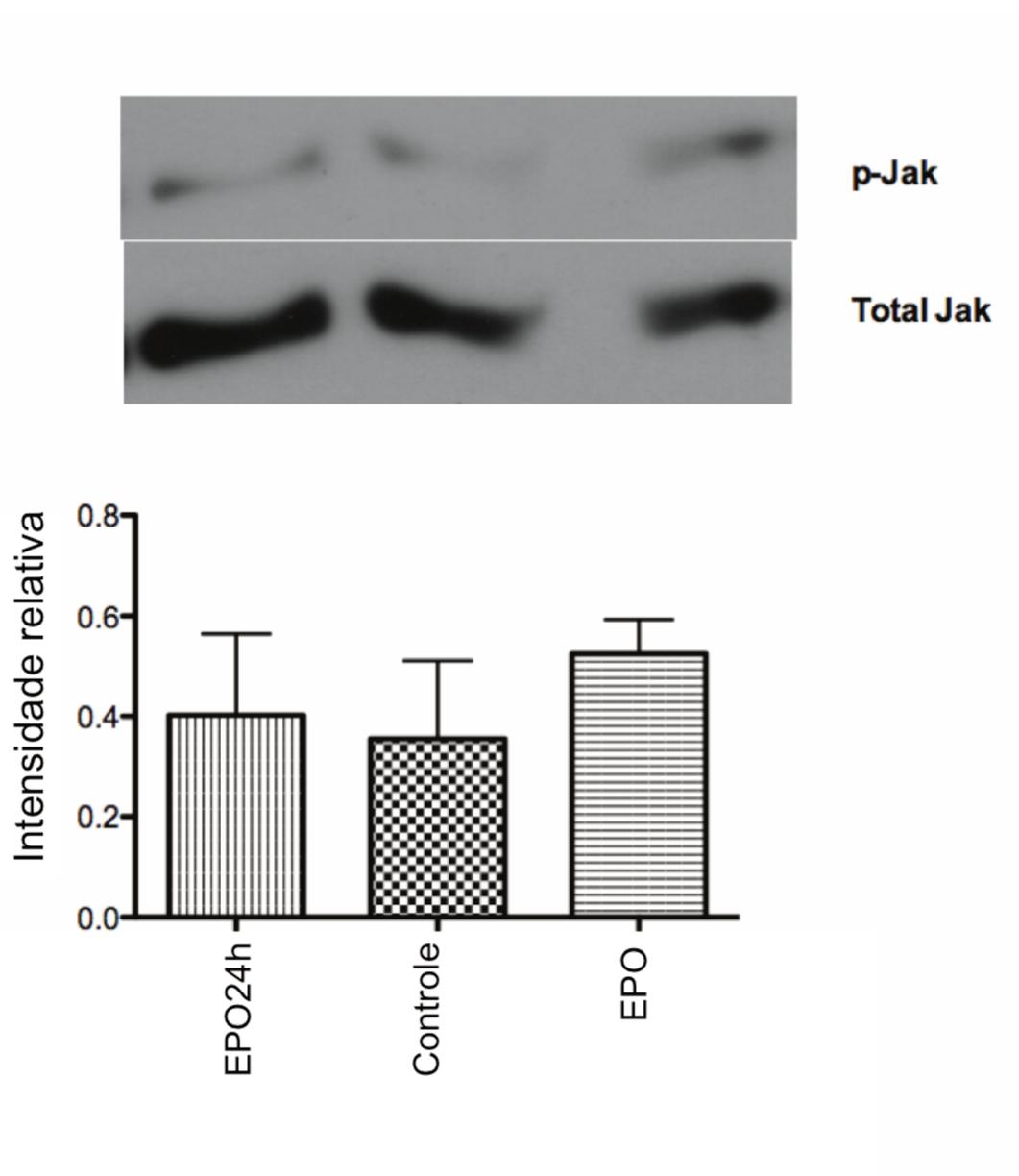


Gráfico 9 – Expressão da p-JAK, expressa como média e erro padrão da média.

Quando analisamos a expressão das proteínas BAD, BAX e Bcl, enzimas responsáveis pelo balanço pró e anti-apoptótico, encontramos uma maior expressão das proteínas BAX (pró-apoptótica) e Bcl (anti-apoptótica) no grupo EPO3, quando comparado com os grupos EPO24 e Controle. Não encontramos diferenças entre os grupos EPO24 e Controle, conforme demonstrado no gráfico abaixo. Não encontramos diferenças entre os grupos quando analisamos a expressão da proteína BAD fosforilada (p-BAD) normalizada pela expressão da proteína BAD.

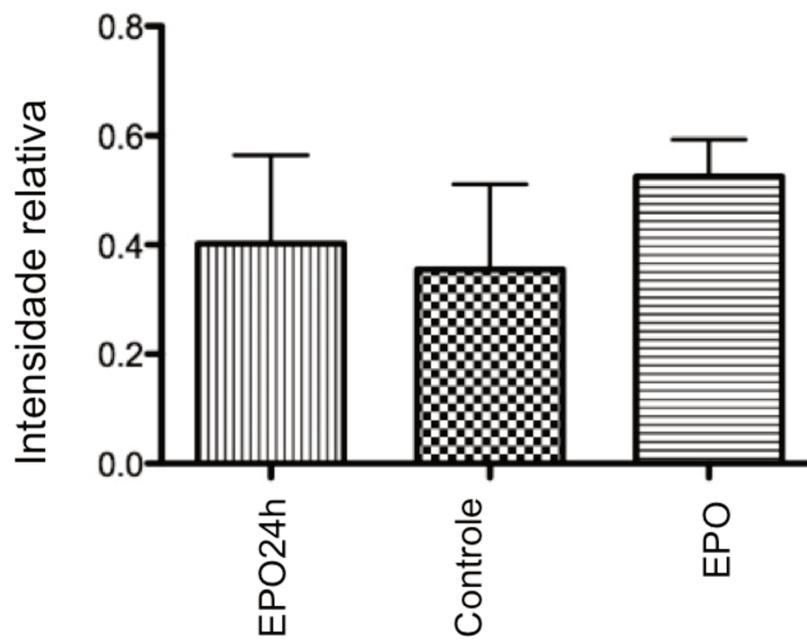
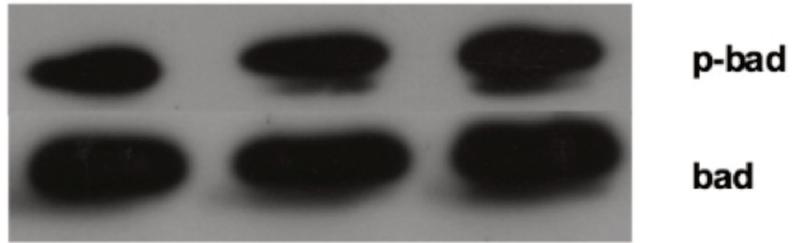


Gráfico 10 – Expressão da BAD, expressa como média e erro padrão da média.

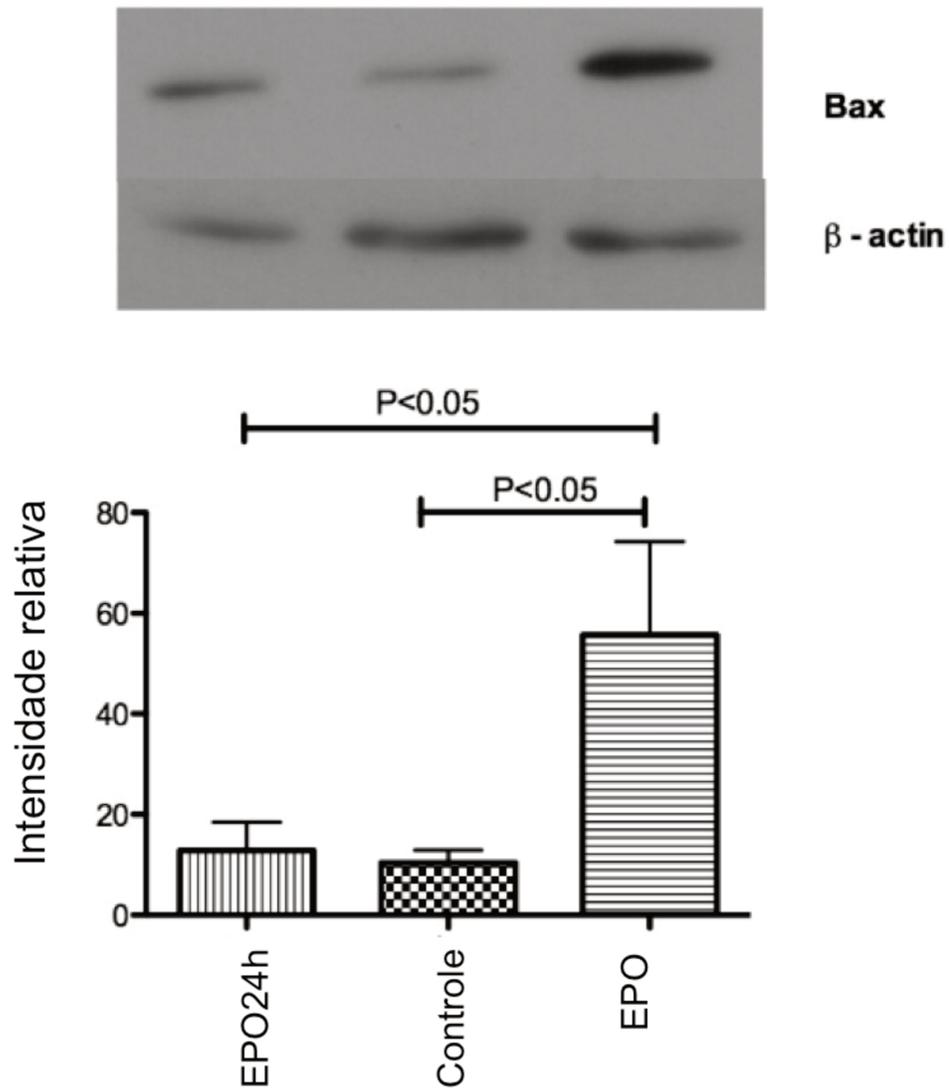


Gráfico 11 – Expressão da BAX, expressa como média e erro padrão da média.

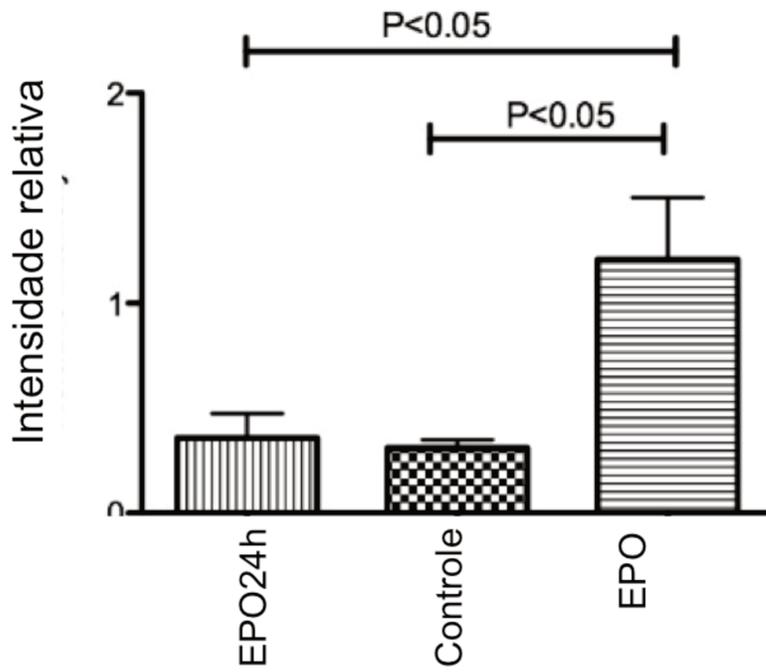
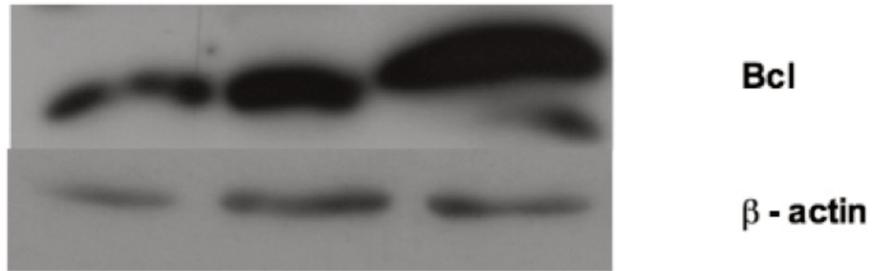


Gráfico 12 – Expressão da Bcl, expressa como média e erro padrão da média.

A proteína Caspase 8 teve menor expressão nos grupos EPO e EPO24, na comparação com o grupo Controle, conforme demonstrado no gráfico abaixo.

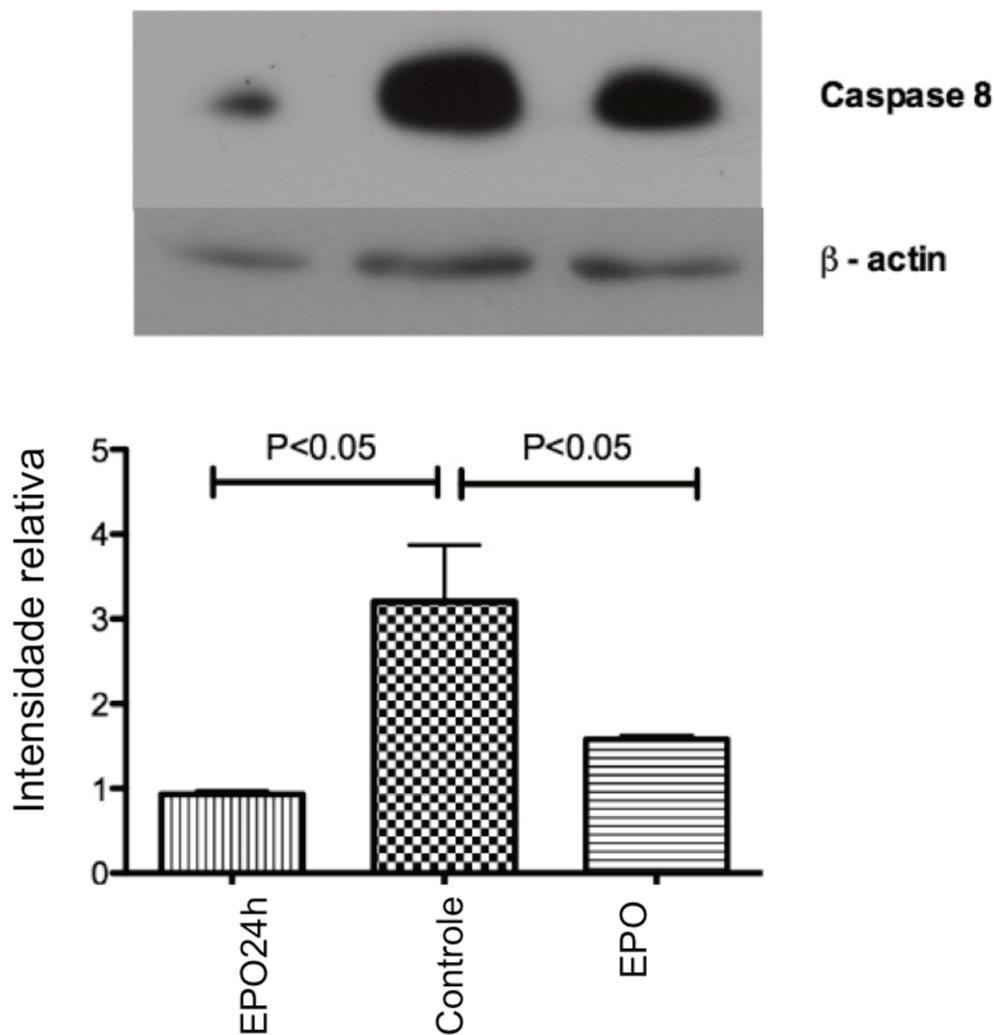


Gráfico 13 – Expressão da Caspase 8, expressa como média e erro padrão da média.

Quando analisamos a fosforilação da proteína STAT3 (p-STAT3) normalizada pela expressão da proteína STAT3 não encontramos diferenças entre os grupos avaliados, conforme demonstrado no gráfico abaixo.

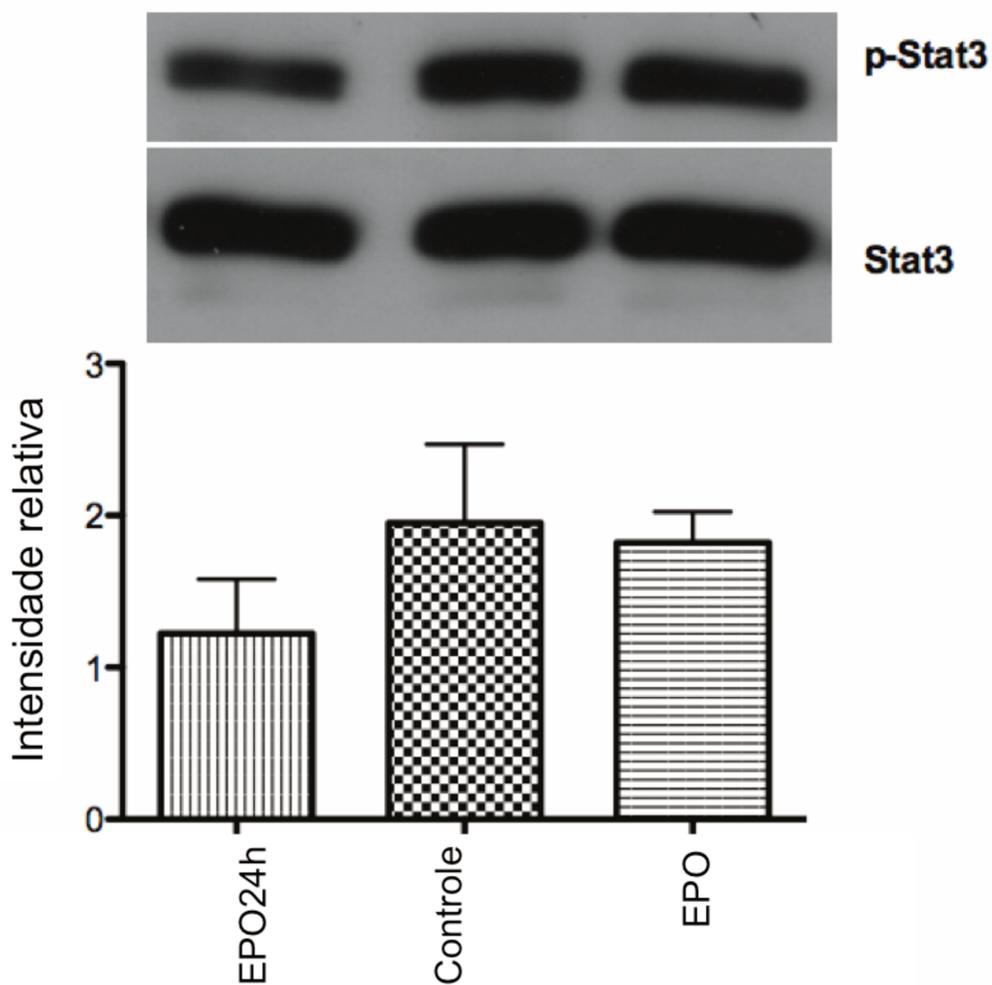


Gráfico 14 – Expressão da p-STAT3, expressa como média e erro padrão da média.

A proteína eNOS, encontramos uma maior expressão no grupo EPO quando comparado com os grupos EPO24 e Controle. Não encontramos diferenças entre os grupos EPO24 e Controle, conforme demonstrado no gráfico abaixo.

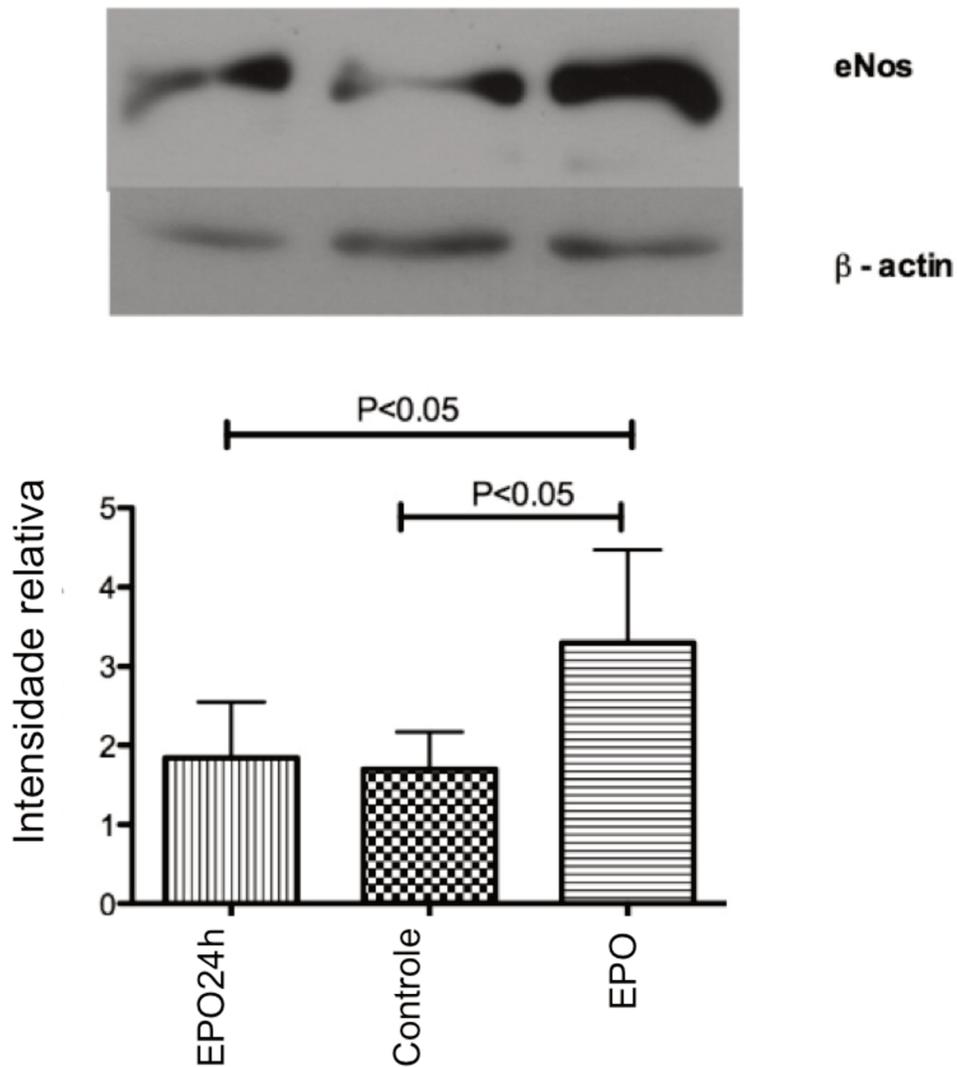


Gráfico 15 – Expressão da eNOS, expressa como média e erro padrão da média.

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO:

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar o papel da eritropoietina em proteger o coração neonatal contra lesão de isquemia e reperfusão.

Encontramos melhor contratilidade nos corações que receberam eritropoietina, após a isquemia e reperfusão, baseado nos melhores índices de contratilidade. Entretanto, não houve melhora de outros parâmetros hemodinâmicos avaliados. Não observamos diferenças na função diastólica entre os grupos que receberam eritropoietina e o grupo controle. Encontramos uma ativação da via RISK por meio da fosforilação da Akt no grupo que recebeu eritropoietina três minutos antes da isquemia, e menor expressão da Caspase 8 nos dois grupos que receberam eritropoietina, quando comparados com o grupo controle, assim como aumento da expressão da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) no grupo que recebeu eritropoietina três minutos antes da isquemia quando comparados aos outros dois grupos.

Moon demonstrou que a administração de eritropoietina logo após a ligadura da coronária interventricular anterior em ratos é capaz de inibir o remodelamento cardíaco, o número de células apoptóticas e a área de infarto, em seguimento de 8 semanas após o infarto do miocárdio (14). A apoptose é um dos principais mecanismos de perda celular após reperfusão, sendo considerado um marcador de lesão por reperfusão (36).

Quase simultaneamente, Calvillo et al, em trabalho experimental, demonstraram benefício da adição de eritropoietina em cultura de células miocárdicas submetidas a hipóxia prolongada, com redução de 50% do número de células apoptóticas. No mesmo trabalho, os autores avaliaram o uso de eritropoietina em ratos submetidos a isquemia miocárdica de 30 minutos e reperfusão por sete dias. O grupo que recebeu

eritropoietina antes da isquemia (24 horas e 30 minutos antes da isquemia), apresentou menor perda de células miocárdicas comparado com o controle, com menor remodelamento cardíaco após sete dias de seguimento. No grupo que recebeu eritropoietina no início da reperfusão miocárdica, os achados em relação ao remodelamento cardíaco foram semelhantes ao grupo controle(1).

Parsa et al avaliaram a utilização da eritropoietina, em diferentes momentos e doses, em relação a isquemia e reperfusão. Este estudo demonstrou que baixas doses de eritropoietina (1000UI) 12 horas antes da isquemia são semelhantes a altas doses de eritropoietina (5000UI) logo após a isquemia, e que mesmo altas doses de eritropoietina (5000UI) logo após a reperfusão têm pouco benefício em relação ao grupo controle, considerando a função ventricular, mas mantêm benefícios em relação à redução da área de infarto e à redução da apoptose (31). Para avaliar a menor dose efetiva de eritropoietina correlacionada ao tempo de administração, Moon et al usaram doses variadas de eritropoietina e em tempos diversos após a ligadura da artéria interventricular anterior. Moon et al demonstraram que a administração de doses de eritropoietina logo após a ligadura da artéria interventricular anterior são igualmente efetivas na proteção miocárdica entre 150 e 3000 UI/kg. Entretanto, a dose de 150 UI só é efetiva quando administrada até quatro horas após a indução do infarto agudo do miocárdio enquanto a dose de 3000 UI é efetiva até 12 horas após a indução do infarto agudo do miocárdio (18). A dose utilizada no nosso estudo foi de 1000 UI/kg, e, baseada neste estudo, seria efetiva tanto se administrada no período pré-isquêmico quanto até, pelo menos, quatro horas após a ligadura da artéria coronária interventricular anterior.

Outro mecanismo proposto para melhora hemodinâmica é a neovascularização promovida pela eritropoietina. Em trabalho com ratos submetidos a isquemia miocárdica, foi demonstrado que a administração de eritropoietina quando iniciada após três semanas do infarto e mantida cronicamente por seis semanas não reduz a área de infarto, mas está associada a melhora hemodinâmica quando comparada com o grupo controle, e essa melhora é acompanhada de aumento da neovascularização local (37).

Rafiee et al, em trabalho com corações de coelhos com dez dias de idade submetidos a isquemia global seguida de reperfusão, em modelo de coração isolado, encontraram melhora dos parâmetros de contratilidade ventricular quando o coração foi perfundido com eritropoietina 15 minutos antes da isquemia, mas não quando o coração foi perfundido com eritropoietina cinco minutos antes da isquemia, mostrando, mais uma vez, a correlação entre dose e tempo da administração da eritropoietina e o efeito protetor da mesma na isquemia e reperfusão miocárdica (32). Neste trabalho, o coração foi perfundido com eritropoietina, enquanto no nosso trabalho a eritropoietina foi administrada por via endovenosa. Além disso, no presente estudo, utilizamos parâmetros de função ventricular mais sofisticados e relativamente independentes de pré-carga e pós-carga, o que pode explicar os diferentes achados entre os trabalhos, nos grupos que receberam eritropoietina com tempo menor de cinco minutos antes da isquemia. Outra explicação possível, é a diferença de idade dos corações avaliados, que no nosso trabalho foram corações neonatais e no estudo de Rafiee et al foram utilizados corações infantis.

Um dos poucos trabalhos que avaliaram eritropoietina e contratilidade miocárdica utilizando a mesma metodologia de avaliação da contratilidade que nós utilizamos no presente trabalho foi realizado por Prunier et al (38). Os autores avaliaram a

utilização de eritropoietina em modelo de isquemia e reperfusão miocárdica em ratos, com a utilização de eritropoietina, iniciada no sétimo dia pós-infarto e mantida semanalmente por 8 semanas. Os autores encontraram alterações de contratilidade cardíaca (E_{max}, PSRW) e da morfometria do ventrículo esquerdo em relação ao grupo controle quando foi administrado uma dose de eritropoietina capaz de aumentar a densidade capilar na área marginal ao infarto miocárdico e capaz de mobilizar células progenitoras endoteliais confirmando outros mecanismos protetores da eritropoietina que não apenas a ativação da via RISK, que foi a via estudada no nosso trabalho.

A função do ventrículo esquerdo como “bomba” está relacionada não apenas a função contrátil do miocárdio, mas também à pré-carga e pós-carga, que juntas interferem no volume sistólico do ventrículo esquerdo. Vários índices foram propostos como medidas de função contrátil do ventrículo esquerdo, idealmente independentes da influência da pré e da pós-carga (39). Utilizamos os índices de dP/dt máxima, elastância máxima e trabalho sistólico pré-recrutável.

A dP/dt máxima é a taxa máxima de aumento da pressão intraventricular esquerda, sendo pouco influenciada pela pós-carga. É, entretanto, sensível a mudanças na pré-carga, e sensível a mudanças agudas da contratilidade miocárdica(40). A elastância máxima é a regressão linear da relação pressão-volume do ventrículo esquerdo ao final da sístole (no nosso trabalho definido como o momento de elastância máxima) obtidos com variação da pré-carga, sendo descrito como ângulo da regressão linear (41). A elastância máxima, dentro dos parâmetros fisiológicos, é independente da pré-carga e da pós-carga (42). O trabalho sistólico pré-recrutável é a regressão linear da relação entre o trabalho sistólico e o volume diastólico final do ventrículo esquerdo, obtidos como variação da pré-

carga, sendo descrito como ângulo desta regressão, também sendo proposto como índice de contratilidade do ventrículo esquerdo independente da pré e da pós-carga (43). Essas medidas nos permitem fazer uma avaliação mais acurada da função contrátil do ventrículo esquerdo.

Não encontramos trabalhos onde foi feita avaliação da função diastólica do ventrículo esquerdo, com protocolos semelhantes ao que usamos neste trabalho. Quando avaliados parâmetros mais precisos e confiáveis da função diastólica do ventrículo esquerdo, que foram a dp/dT mínima, a TAU e o EDPVR não encontramos diferenças entre os grupos em nenhum dos momentos avaliados.

De uma maneira geral, a maioria dos trabalhos que avaliaram o uso da eritropoietina em modelos de isquemia ou de isquemia e reperfusão encontraram efeito protetor da eritropoietina, em momentos variados e com diferentes protocolos de administração, com uma clara dependência dose-efeito, e com diferentes mecanismos propostos para a ação protetora de eritropoietina.

A principal via intracelular pela qual a eritropoietina exerce seu fator protetor é a via RISK (Reperfusion Injury Salvage Kinases) que tem como mediadores principais a PI3K/Akt e a ERK. A principal via é a Akt, com vários trabalhos mostrando que o bloqueio desta via foi capaz de abolir o efeito protetor da eritropoietina, com um papel ainda controverso do papel da fosforilação da ERK na proteção miocárdica(44, 45).

A eritropoietina estimula a rápida fosforilação de tirosina de uma série de proteínas. O primeiro passo é a ativação da tirosina quinase JAK2, que está constitutivamente associada ao receptor da eritropoietina. Após a estimulação com eritropoietina. Oito tirosinas localizadas no domínio citoplasmático do receptor da

eritropoietina são fosforiladas, e servem como sítios para várias proteínas intracelulares com domínios Src homólogos 2 (SH2). Após a ligação, essas proteínas são fosforiladas e ativadas, participando da sinalização intracelular, como a via Ras/MAP e a via PI3K/Akt. Outro grupo de proteínas intracelulares que tem papel importante na sinalização intracelular da eritropoietina são as participantes da via STAT (*signal transducer and activator of transcription*), notoriamente as proteínas STAT5 e STAT3(2, 46).

Cai et al, em 2003, demonstraram que a eritropoietina exerce um efeito protetor em corações adultos isolados submetidos a isquemia e reperfusão, que era abolido quando administrado conjuntamente com wortmannin, um inibidor da PI3K, demonstrando que o efeito protetor da eritropoietina é efetuado através da ativação da via RISK pela PI3K/Akt(44).

Parsa et al demonstraram, com o uso de células mioblásticas (H9c2), que a eritropoietina levava a fosforilação da Akt, da ERK e da JAK1 em até 60 minutos após a administração da eritropoietina. A fosforilação da STAT3 teve um pico da ativação após dez minutos da infusão da eritropoietina, mas com 30 minutos já não era observada ativação desde mediador, demonstrando que a eritropoietina ativava a via RISK, mas que certos mediadores poderiam ficar fosforilados por períodos relativamente curtos de tempo (15). Esses mesmos autores demonstraram que a eritropoietina era capaz de fosforilar os mediadores Akt, ERK, STAT 3, STAT 5 e JAK2, em corações de coelhos adultos, de maneira robusta quando comparado ao grupo controle, porém de maneira menos evidente que nos animais submetidos apenas a isquemia e reperfusão (31). No nosso trabalho, não encontramos fosforilação da Akt no grupo que recebeu eritropoietina 24 horas antes da

isquemia, o que poderia ser explicado pelo longo intervalo entre a administração da eritropoietina e a coleta do material.

Em corações normais adultos, o principal mediador parece ser a via PI3K/Akt, já que, como citado anteriormente, a eritropoietina é capaz de ativar a fosforilação desse mediador, e o seu bloqueio é capaz de abolir o efeito protetor da eritropoietina nestes corações submetidos a isquemia ou a isquemia e reperfusão, enquanto o bloqueio da via ERK 1/2 interfere na ação da eritropoietina (44, 45). Outros trabalhos, entretanto, mostraram que a via ERK também é importante na proteção exercida pela eritropoietina no miocárdio submetido a isquemia e reperfusão. Em trabalho com corações isolados de ratos adultos, Bullard et al demonstraram que o bloqueio da PI3K/Akt ou da ERK 1/2 são capazes de prevenir a proteção oferecida pela eritropoietina, quando administrada antes da reperfusão(26). Em outro trabalho, Miki et al demonstraram que em corações de ratos com remodelamento cardíaco pós-isquêmico submetidos a isquemia e reperfusão, existe um prejuízo da via Akt/PI3K, que é compensada pela via ERK, que torna-se a principal via de ativação da via RISK nestes corações(29). Do nosso conhecimento, não há trabalhos que avaliam as vias intracelulares em modelos *in vivo* com corações neonatais submetidos a isquemia e reperfusão.

Rafiee et al (32), em trabalho com corações isolados de coelhos infantis, submetidos a isquemia e reperfusão globais, pesquisaram o uso da eritropoietina quando administrada cinco ou quinze minutos antes da isquemia. Neste trabalho, só houve cardioproteção quando a eritropoietina foi administrada 15 minutos antes da isquemia, mas não quando administrada cinco minutos antes da isquemia, o que difere de outros trabalhos da literatura, que mostram melhora da função ventricular quando a eritropoietina é

administrada imediatamente antes da isquemia(18). Esse trabalho também difere do nosso, onde encontramos melhora dos índices de contratilidade no grupo que recebeu eritropoietina três minutos antes da isquemia. Estes autores ainda demonstraram que a eritropoietina ativa várias vias intracelulares. Os autores analisaram a ativação de STAT3 e STAT5A, com demonstração de maior fosforilação destas proteínas nos grupos que receberam eritropoietina, e abolição do efeito protetor da eritropoietina quando administrado um bloqueador da fosforilação destas dois mediadores. Da mesma maneira, houve um maior ativação da Akt no grupo que recebeu eritropoietina, com abolição do efeito protetor da eritropoietina quando administrado um bloqueador da PI3K, wortmannin. Entretanto, quando administrado wortmannin no grupo que não recebeu eritropoietina, não houve mudanças em relação ao grupo controle, demonstrando, que possivelmente, essa via não foi ativada apenas pela isquemia e reperfusão. Esse é o mesmo comportamento de outros mediadores analisados neste trabalho, como ERK 1/2, p38 MAPK e PKC. Esse achados diferem daqueles achados em outros trabalhos, onde há uma sobreposição das vias ativadas pela eritropoietina e pela isquemia apenas(22).

A PI3K/Akt parece ser o mediador principal da cardioproteção exercida pela eritropoietina em corações adultos normais submetidos a isquemia ou a isquemia e reperfusão. Entretanto, em corações de coelhos com remodelamento cardíaco pós-isquêmico, a eritropoietina continua a exercer um efeito protetor contra isquemia e reperfusão, porém com a ERK 1/2 como mediador principal. Miki et al (30) demonstraram que o bloqueio da PI3K aboliu o efeito da eritropoietina em corações normais mas não em corações com remodelamento pós-infarto. Entretanto, os autores encontraram ativação de mediadores a jusante da via RISK ativados, mostrando que em corações remodelados deve

haver um mecanismo compensador. Em outro trabalho(29), Miki et al demonstraram que o provável mecanismo compensador é a ativação da ERK 1/2, pois o bloqueio desse mediador foi capaz de prevenir o efeito protetor da eritropoietina em corações de coelhos com remodelamento pós-infarto, onde o bloqueio da via PI3K/Akt não interferiu na ação da eritropoietina.

Outros mediadores da via RISK, abaixo da ERK e da PI3K/Akt, estão envolvidos na proteção oferecida pela eritropoietina e pelo condicionamento pré-isquêmico.

Os efetores finais da via RISK, independente dos seus mediadores iniciais, parecem ser a ativação da eNOS(35, 47), com redução da abertura do mPTP(20, 48) e a redução da apoptose(32, 35) através da inibição das caspases. O bloqueio da eNOS foi capaz de abolir o efeito protetor da eritropoietina quando a mesma foi administrada de maneira aguda ou crônica(49), e em corações normais ou com remodelamento pós-isquêmico(30). No nosso trabalho, encontramos maior expressão da eNOS no grupo que recebeu eritropoietina três minutos antes da isquemia miocárdica, mas não no grupo que recebeu eritropoietina 24 horas antes da isquemia.

Vários artigos prévios demonstraram que a administração da eritropoietina está ligada a um menor número de células apoptóticas após a indução de isquemia e reperfusão do miocárdio(1, 14, 15, 32). Em relação a apoptose, encontramos um aumento da expressão das proteínas Bcl-2 e Bax, proteínas respectivamente anti-apoptótica e pré-apoptótica, no grupo que recebeu eritropoietina três minutos antes da isquemia, quando comparada aos outros dois grupos. O balanço das proteínas pré e anti-apoptóticas é um dos fatores que influencia a maior incidência ou não da apoptose. Encontramos ainda uma menor expressão da caspase 8 nos dois grupos que receberam eritropoietina, quando comparados ao grupo

controle. A caspase 8 é uma das proteínas iniciais da cadeia de efetivação da apoptose. Isso pode ser um indicativo de que ocorra uma menor incidência da apoptose com administração da eritropoietina, neste trabalho, o que poderia justificar em parte a melhora dos índices de contratilidade encontrados nos grupos que receberam eritropoietina.

Poucos trabalhos na literatura utilizaram outras espécies de animais que não fossem roedores. Hirata et al, em trabalhos com cães, demonstraram que a eritropoietina administrada imediatamente após a reperfusão, após 90 minutos de isquemia regional, é capaz de reduzir a incidência de arritmias letais, a área de infarto e o número de células apoptóticas(45).

Em outro trabalho com suínos adultos, os animais foram submetidos a 60 minutos de isquemia e avaliados após duas semanas de reperfusão. Os animais receberam darbapoeitina, um análogo da eritropoietina, administrado no momento da reperfusão. Neste estudo não houve redução da área de infarto, mas houve redução da fibrose intersticial e aumento da área capilar média no miocárdio não infartado, o que resultou em melhora da movimentação segmentar do ventrículo esquerdo avaliado por ecocardiografia(50). Entretanto, os autores não utilizaram outros parâmetros de função ventricular esquerda.

Em suínos, trabalhos prévios já demonstraram que a eritropoietina recombinante humana é efetiva em relação ao seu papel hematopoiético(51) e resposta biológica endotelial(52). Em trabalho com suínos adultos submetidos a isquemia e reperfusão miocárdica, os animais que receberam eritropoietina 90 minutos ou 24 horas antes do início da isquemia não apresentaram redução da área de infarto em relação ao grupo controle, quando esta foi avaliada por método de imagem (SPECT) ou por método

histopatológico(53). Entretanto, os autores encontraram um aumento da pressão média da artéria pulmonar nos dois grupos que receberam eritropoietina, aos 45 minutos de isquemia e aos 60 minutos de reperfusão. Da mesma maneira, os autores encontraram aumento da dP/dT máxima do ventrículo esquerdo aos 45 minutos de isquemia e aos 60 minutos de reperfusão do miocárdio, o que demonstra uma melhora da função sistólica do ventrículo esquerdo. No nosso trabalho encontramos resultados semelhantes, entretanto com o uso de métodos mais sofisticados de avaliação do função contrátil do ventrículo esquerdo. Encontramos uma melhora dos índices de contratilidade de ventrículo esquerdo, mas não encontramos alterações nos parâmetros hemodinâmicos entre os grupos, nos momentos avaliados.

A eritropoietina já foi avaliada em trabalhos clínicos, com seres humanos adultos, em quadros de isquemia e reperfusão miocárdica. Inicialmente, Lipsic et al (54) em trabalho piloto, avaliaram o uso de uma dose única de darbapoeitina em pacientes com infarto agudo do miocárdio com supradesnivelamento do segmento ST (IAMCSST) antes de angioplastia coronariana primária. Os autores não encontraram diferenças entre os grupos, em relação a função ventricular esquerda, mas apenas um aumento das células progenitoras eritropoiéticas. Em outro estudo clínico, com pacientes com IAMCSST, os pacientes receberam eritropoietina após a angioplastia com sucesso. Neste trabalho, não houve diferença entre os grupos após seis semanas em relação a função ventricular esquerda, mas um menor número de eventos adversos no grupo que recebeu eritropoietina, principalmente às custas de insuficiência cardíaca. Neste trabalho, o grupo controle, com o tratamento eficaz do IAMCSST apresentava apenas uma leve redução da fração de ejeção

do ventrículo esquerdo (53%), o que pode ter diminuído o benefício da administração da eritropoietina quando os grupos foram comparados(55).

Najjar et al (56) em trabalho prospectivo com administração de eritropoietina no momento da angioplastia coronariana primária em pacientes com IAMCSST, não encontraram diferenças entre os grupos em relação ao tamanho do infarto ou a função ventricular esquerda, medidas com uso de ressonância magnética. Entretanto, encontraram um maior número de eventos adversos no grupo que recebeu eritropoietina. Neste estudo, a área de infarto média foi menor, se comparada com trabalho experimentais, e a eritropoietina foi administrada com pelo menos seis horas de intervalo após o início dos sintomas, e portanto da isquemia, o pode explicar a ausência de resultados positivos.

Limitações do Estudo:

Não há trabalhos clínicos com o uso de eritropoietina em corações neonatais. Podemos observar que não há diferenças estatísticas em relação aos parâmetros hemodinâmicos quando comparados os tempos pré-isquemia e 90 minutos de reperfusão. Isso nos leva a considerar que talvez o tempo ou a extensão da isquemia não tenham sido suficientes para provocarem lesões extensas no ventrículo esquerdo, levando a uma redução do potencial efeito benéfico da administração da eritropoietina. Além disso não avaliamos a extensão histopatológica da isquemia, que poderia evidenciar a presença ou não de áreas isquêmicas, e servir como parâmetro para aférese da extensão da lesão isquêmica no miocárdio.

CONCLUSÃO

CONCLUSÃO:

A eritropoietina foi capaz de proteger o coração neonatal, evidenciado pela melhora dos índices de função sistólica do ventrículo esquerdo, em relação ao grupo controle.

Não houve melhora dos índices de função diastólica do ventrículo esquerdo com o uso da eritropoietina, em relação ao grupo controle.

A proteção decorrente da eritropoietina é provavelmente pela fosforilação da Akt.

Houve diminuição da expressão da proteína Caspase 8 nos dois grupos que receberam eritropoietina, com uma provável redução da apoptose nestes grupos, quando comparado com o grupo controle.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA:

1. Calvillo L, Latini R, Kajstura J, Leri A, Anversa P, Ghezzi P, et al. Recombinant human erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury and promotes beneficial remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Apr 15;100(8):4802-6.
2. Lacombe C, Mayeux P. The molecular biology of erythropoietin. *Nephrol Dial Transplant*. 1999;14 Suppl 2:22-8.
3. Jelkmann W, Metzner E. Erythropoietin in the control of red cell production. *Ann Anat*. 1996 Oct;178(5):391-403.
4. Gregory CJ, Eaves AC. Three stages of erythropoietic progenitor cell differentiation distinguished by a number of physical and biologic properties. *Blood*. 1978 Mar;51(3):527-37.
5. Gregory CJ, Eaves AC. Human marrow cells capable of erythropoietic differentiation in vitro: definition of three erythroid colony responses. *Blood*. 1977 Jun;49(6):855-64.
6. Lin CS, Lim SK, D'Agati V, Costantini F. Differential effects of an erythropoietin receptor gene disruption on primitive and definitive erythropoiesis. *Genes Dev*. 1996 Jan 15;10(2):154-64.
7. Jacobs K, Shoemaker C, Rudersdorf R, Neill SD, Kaufman RJ, Mufson A, et al. Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature*. 1985 Feb 28-Mar 6;313(6005):806-10.
8. Masuda S, Nagao M, Sasaki R. Erythropoietic, neurotrophic, and angiogenic functions of erythropoietin and regulation of erythropoietin production. *Int J Hematol*. 1999 Jul;70(1):1-6.
9. Yu X, Shacka JJ, Eells JB, Suarez-Quian C, Przygodzki RM, Beleslin-Cokic B, et al. Erythropoietin receptor signalling is required for normal brain development. *Development*. 2002 Jan;129(2):505-16.
10. Wu H, Lee SH, Gao J, Liu X, Iruela-Arispe ML. Inactivation of erythropoietin leads to defects in cardiac morphogenesis. *Development*. 1999 Aug;126(16):3597-605.
11. Sadamoto Y, Igase K, Sakanaka M, Sato K, Otsuka H, Sakaki S, et al. Erythropoietin prevents place navigation disability and cortical infarction in rats with permanent occlusion of the middle cerebral artery. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998 Dec 9;253(1):26-32.
12. Bernaudin M, Marti HH, Roussel S, Divoux D, Nouvelot A, MacKenzie ET, et al. A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1999 Jun;19(6):643-51.
13. Agnello D, Bigini P, Villa P, Mennini T, Cerami A, Brines ML, et al. Erythropoietin exerts an anti-inflammatory effect on the CNS in a model of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Res*. 2002 Oct 11;952(1):128-34.

14. Moon C, Krawczyk M, Ahn D, Ahmet I, Paik D, Lakatta EG, et al. Erythropoietin reduces myocardial infarction and left ventricular functional decline after coronary artery ligation in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Sep 30;100(20):11612-7.
15. Parsa CJ, Matsumoto A, Kim J, Riel RU, Pascal LS, Walton GB, et al. A novel protective effect of erythropoietin in the infarcted heart. *J Clin Invest*. 2003 Oct;112(7):999-1007.
16. Tramontano AF, Muniyappa R, Black AD, Blendea MC, Cohen I, Deng L, et al. Erythropoietin protects cardiac myocytes from hypoxia-induced apoptosis through an Akt-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 Sep 5;308(4):990-4.
17. Gao E, Boucher M, Chuprun JK, Zhou RH, Eckhart AD, Koch WJ. Darbepoetin alfa, a long-acting erythropoietin analog, offers novel and delayed cardioprotection for the ischemic heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007 Jul;293(1):H60-8.
18. Moon C, Krawczyk M, Paik D, Lakatta EG, Talan MI. Cardioprotection by recombinant human erythropoietin following acute experimental myocardial infarction: dose response and therapeutic window. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2005 Aug;19(4):243-50.
19. Richmond TD, Chohan M, Barber DL. Turning cells red: signal transduction mediated by erythropoietin. *Trends Cell Biol*. 2005 Mar;15(3):146-55.
20. Hausenloy DJ, Yellon DM. New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway. *Cardiovasc Res*. 2004 Feb 15;61(3):448-60.
21. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med*. 2007 Sep 13;357(11):1121-35.
22. Hausenloy DJ, Tsang A, Mocanu MM, Yellon DM. Ischemic preconditioning protects by activating prosurvival kinases at reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005 Feb;288(2):H971-6.
23. Solenkova NV, Solodushko V, Cohen MV, Downey JM. Endogenous adenosine protects preconditioned heart during early minutes of reperfusion by activating Akt. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006 Jan;290(1):H441-9.
24. Hausenloy DJ, Ong SB, Yellon DM. The mitochondrial permeability transition pore as a target for preconditioning and postconditioning. *Basic Res Cardiol*. 2009 Mar;104(2):189-202.
25. Fu P, Arcasoy MO. Erythropoietin protects cardiac myocytes against anthracycline-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Mar 9;354(2):372-8.
26. Bullard AJ, Govewalla P, Yellon DM. Erythropoietin protects the myocardium against reperfusion injury in vitro and in vivo. *Basic Res Cardiol*. 2005 Sep;100(5):397-403.

27. Chan CY, Chen YS, Lee HH, Huang HS, Lai YL, Chen CF, et al. Erythropoietin protects post-ischemic hearts by preventing extracellular matrix degradation: role of Jak2-ERK pathway. *Life Sci.* 2007 Aug 9;81(9):717-23.
28. Baker JE, Kozik D, Hsu AK, Fu X, Tweddell JS, Gross GJ. Darbepoetin alfa protects the rat heart against infarction: dose-response, phase of action, and mechanisms. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2007 Jun;49(6):337-45.
29. Miki T, Miura T, Tanno M, Nishihara M, Naitoh K, Sato T, et al. Impairment of cardioprotective PI3K-Akt signaling by post-infarct ventricular remodeling is compensated by an ERK-mediated pathway. *Basic Res Cardiol.* 2007 Mar;102(2):163-70.
30. Miki T, Miura T, Yano T, Takahashi A, Sakamoto J, Tanno M, et al. Alteration in erythropoietin-induced cardioprotective signaling by postinfarct ventricular remodeling. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006 Apr;317(1):68-75.
31. Parsa CJ, Kim J, Riel RU, Pascal LS, Thompson RB, Petrofski JA, et al. Cardioprotective effects of erythropoietin in the reperfused ischemic heart: a potential role for cardiac fibroblasts. *J Biol Chem.* 2004 May 14;279(20):20655-62.
32. Rafiee P, Shi Y, Su J, Pritchard KA, Jr., Tweddell JS, Baker JE. Erythropoietin protects the infant heart against ischemia-reperfusion injury by triggering multiple signaling pathways. *Basic Res Cardiol.* 2005 May;100(3):187-97.
33. Nishihara M, Miura T, Miki T, Sakamoto J, Tanno M, Kobayashi H, et al. Erythropoietin affords additional cardioprotection to preconditioned hearts by enhanced phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 beta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006 Aug;291(2):H748-55.
34. Hanlon PR, Fu P, Wright GL, Steenbergen C, Arcasoy MO, Murphy E. Mechanisms of erythropoietin-mediated cardioprotection during ischemia-reperfusion injury: role of protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase signaling. *FASEB J.* 2005 Aug;19(10):1323-5.
35. Burger D, Lei M, Geoghegan-Morphet N, Lu X, Xenocostas A, Feng Q. Erythropoietin protects cardiomyocytes from apoptosis via up-regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Cardiovasc Res.* 2006 Oct 1;72(1):51-9.
36. Gottlieb RA, Burleson KO, Kloner RA, Babior BM, Engler RL. Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J Clin Invest.* 1994 Oct;94(4):1621-8.
37. van der Meer P, Lipsic E, Henning RH, Boddeus K, van der Velden J, Voors AA, et al. Erythropoietin induces neovascularization and improves cardiac function in rats with heart failure after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2005 Jul 5;46(1):125-33.
38. Prunier F, Pfister O, Hadri L, Liang L, Del Monte F, Liao R, et al. Delayed erythropoietin therapy reduces post-MI cardiac remodeling only at a dose that mobilizes endothelial progenitor cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007 Jan;292(1):H522-9.

39. Carabello BA. Evolution of the study of left ventricular function: everything old is new again. *Circulation*. 2002 Jun 11;105(23):2701-3.
40. Little WC. The left ventricular dP/dtmax-end-diastolic volume relation in closed-chest dogs. *Circ Res*. 1985 Jun;56(6):808-15.
41. Sagawa K. The ventricular pressure-volume diagram revisited. *Circ Res*. 1978 Nov;43(5):677-87.
42. Kass DA, Maughan WL. From 'Emax' to pressure-volume relations: a broader view. *Circulation*. 1988 Jun;77(6):1203-12.
43. Glower DD, Spratt JA, Snow ND, Kabas JS, Davis JW, Olsen CO, et al. Linearity of the Frank-Starling relationship in the intact heart: the concept of preload recruitable stroke work. *Circulation*. 1985 May;71(5):994-1009.
44. Cai Z, Semenza GL. Phosphatidylinositol-3-kinase signaling is required for erythropoietin-mediated acute protection against myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation*. 2004 May 4;109(17):2050-3.
45. Hirata A, Minamino T, Asanuma H, Sanada S, Fujita M, Tsukamoto O, et al. Erythropoietin just before reperfusion reduces both lethal arrhythmias and infarct size via the phosphatidylinositol-3 kinase-dependent pathway in canine hearts. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2005 Jan;19(1):33-40.
46. Fisher JW. Erythropoietin: physiology and pharmacology update. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2003 Jan;228(1):1-14.
47. Nandagopal K, Dawson TM, Dawson VL. Critical role for nitric oxide signaling in cardiac and neuronal ischemic preconditioning and tolerance. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001 May;297(2):474-8.
48. Nishihara M, Miura T, Miki T, Tanno M, Yano T, Naitoh K, et al. Modulation of the mitochondrial permeability transition pore complex in GSK-3beta-mediated myocardial protection. *J Mol Cell Cardiol*. 2007 Nov;43(5):564-70.
49. Bullard AJ, Yellon DM. Chronic erythropoietin treatment limits infarct-size in the myocardium in vitro. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2005 Oct;19(5):333-6.
50. Toma C, Letts DP, Tanabe M, Gorcsan J, 3rd, Counihan PJ. Positive effect of darbepoetin on peri-infarction remodeling in a porcine model of myocardial ischemia-reperfusion. *J Mol Cell Cardiol*. 2007 Aug;43(2):130-6.
51. Emery DW, Sachs DH, LeGuern C. Culture and characterization of hematopoietic progenitor cells from miniature swine. *Exp Hematol*. 1996 Jul;24(8):927-35.
52. Vogel V, Kramer HJ, Backer A, Meyer-Lehnert H, Jelkmann W, Fandrey J. Effects of erythropoietin on endothelin-1 synthesis and the cellular calcium messenger system in vascular endothelial cells. *Am J Hypertens*. 1997 Mar;10(3):289-96.
53. Kristensen J, Maeng M, Rehling M, Berg JS, Mortensen UM, Nielsen SS, et al. Lack of acute cardioprotective effect from preischemic erythropoietin administration

in a porcine coronary occlusion model. *Clin Physiol Funct Imaging*. 2005 Sep;25(5):305-10.

54. Lipsic E, van der Meer P, Voors AA, Westenbrink BD, van den Heuvel AF, de Boer HC, et al. A single bolus of a long-acting erythropoietin analogue darbepoetin alfa in patients with acute myocardial infarction: a randomized feasibility and safety study. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2006 Apr;20(2):135-41.

55. Voors AA, Belonje AM, Zijlstra F, Hillege HL, Anker SD, Slart RH, et al. A single dose of erythropoietin in ST-elevation myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2010 Nov;31(21):2593-600.

56. Najjar SS, Rao SV, Melloni C, Raman SV, Povsic TJ, Melton L, et al. Intravenous erythropoietin in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: REVEAL: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2011 May 11;305(18):1863-72.

ANEXOS

Anexo 1 – Comitê de Ética na Experimentação Animal - UNICAMP



CEEA/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA/Unicamp

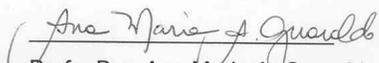
CERTIFICADO

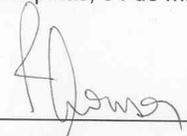
Certificamos que o Protocolo nº 1852-1, sobre "Redução da disfunção miocárdica com o uso de eritropoetina em modelo de isquemia/reperfusão miocárdica neonatal", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Orlando Petrucci Jr. / Karlos Alexandre de Souza Vilarinho, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em 04 de maio de 2009.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1852-1, entitled "Reduction of myocardial dysfunction with erythropoietin (EPO) in ischemic/reperfusion neonatal model", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on May 4, 2009.

Campinas, 04 de maio de 2009.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEEA – Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>

Anexo 2- Descrição da técnica de Western Blot e composição das soluções utilizadas

1. Extração

Preparar o tampão de extração no gelo, na hora do experimento.

Tampão de extração (para 25ml):

Pesar os sais. Em um falcon, acrescentar o EDTA e o Tris base. Colocar os sais. Dissolver o PMSF em álcool e depois acrescentar ao falcon. Acrescentar a aprotinina e completar para 25ml com água destilada.

EDTA 10mM	1,25ml do 200mM
Tris Base 100mM	2,5ml do 1M
Pirofosfato de Na 10mM	0,1125g
Fluoreto de Na 100mM	0,105g
Ortovanadato de Na 100mM	0,04725g
PMSF 2mM	0,009g em 1ml de álcool etílico
Aprotinina 0.1mg/ml (geladeira)	200µl (Trasylol)
Água destilada	Completar 25ml

Separar o material necessário: material cirúrgico, caixa de gelo, homogeneizador (Politron) e tubos identificados.

O tampão de extração deve ser mantido no gelo antes e após a extração.

Acrescentar aos tubos o volume de tampão de acordo com seu protocolo e com a quantidade de material a ser homogeneizado.

Sacrificar o animal e dissecar o tecido de interesse de maneira rápida e colocar no respectivo tubo. Homogeneizar por 15 a 20 segundos e voltar para o gelo. Para *pool*, homogeneizar cada tubo, após todo o material ter sido extraído.

Terminada a extração, adicionar a cada amostra 10% do volume utilizado de *Triton x-100* 10% e agitar. Deixar em repouso no gelo por 40 minutos. Centrifugar a 4°C por 40 minutos a 12000rpm.

2. Dosagem

Ligar o espectrofotômetro ou Elisa.

No espectrofotômetro: Identificar os tubos e colocar 1ml de reagente Biureto (reagente azul do kit Prot^{AL} da Labcenter). Preparar as amostras e o padrão em triplicata, pipetando 20µl do sobrenadante e do padrão. Vortexar e descansar por 15 minutos. Ler em 540λ e zerar o aparelho com o branco. O reagente Biureto deve ser descartado como resíduo.

No Elisa: Pipetar 200µl de biureto e 3µl de amostra em triplicata. Não esquecer do branco e do padrão. Deixar descansar no escuro (papel alumínio) por 15 minutos e ler em 540λ.

Após a leitura calcula-se a concentração protéica.

A concentração protéica vai indicar o volume de amostra a ser aplicada em cada pocinho do gel. No geral, usam-se para gel de 2mm de espessura, 250µg, e para gel de 1,5mm de espessura, 185 a 200µg, dependendo do tecido a ser analisado.

$$\frac{250\mu\text{g (quantidade de proteína aplicada)}}{\text{fator}} = X \text{ 1,25 (diluição)} = N$$

$$\frac{N}{\text{ABS}} = \text{ET}$$

Concentração = fator X absorvância lida

Fator (constante)= concentração conhecida : absorvância lida

Após a leitura, as amostras devem ser armazenadas.

Para cada 400µl de sobrenadante, 100µl de tampão de Laemmli + DTT.

Para cada 100µl de tampão de Laemmli, 0,015g de DTT 200mM (freezer). A solução estoque deve ser aquecida antes de preparar o tampão Laemmli. Como o Laemmli + DTT espuma, é recomendado preparar sempre um pouco mais, pois sempre perdemos um pouco do tampão na espuma.

Tampão de Laemmli (estoque):

Azul de bromofenol 0,1%	2ml
Fosfato de Na 1M, pH 7,0	1ml

Glicerol 50%	10ml (colocar do puro)
SDS 10%	2g
Água destilada	Completar para 20 ml

As amostras devem ser colocadas em água fervente por 5 minutos e congeladas em freezer -80°C.

3. Gel

Limpar os vidros do gel com água e gaze. Montar os vidros nas casas.

O gel deve ser preparado de acordo com o peso da proteína estudada. Quanto maior a concentração do gel, menor o peso da proteína.

- Gel de 6,5% - de 120kDa para cima;
- Gel de 8% - 100kDa a 180kDa;
- Gel de 10% - 60kDa a 100kDa;
- Gel de 12% - 30kDa a 60kDa;
- Gel de 15% - de 30kDa para baixo.

A poliacrilamida líquida ou em pó é neurotóxica, portanto, use luvas.

Preparar primeiro o gel *Resolving* (Separador). Usar um falcon para cada concentração do gel.

Diluir o APS (higroscópico) na hora. Acrescente o APS apenas no momento em que for colocar o gel no vidro. Tire as bolhas, com a ajuda de uma agulha. Espere polimerizar.

Em seguida prepare o gel *Stacking* (Concentrador). Complete as casinhas e coloque o pente. Espere polimerizar.

Retire os pentes com cuidado e confira os pocinhos com a agulha, retirando excessos de gel.

Caso vá correr o gel no dia seguinte, envolva-o em papel e guarde em geladeira.

Protocolo para preparação de 2 géis com 1,5mm de espessura:

Resolving 6.5%

	<i>Resolving</i>	<i>Stacking</i> (para 4 géis)
Água destilada	3,32ml	4,2ml
Glicerol	1,8ml	-----
Tampão	9,0ml	5,6ml
Acrilamida 40%	2,8ml	1,25ml
Temed	25µl	25µl
APS 10% (0.2g/2ml) colocar por último	270µl	270µl

Resolving 8%

	<i>Resolving</i>	<i>Stacking</i> (para 4 géis)
Água destilada	2,7ml	4,2ml
Glicerol	1,8ml	-----
Tampão	9,0ml	5,6ml
Acrilamida 40%	3,5ml	1,25ml
Temed	25µl	25µl
APS 10% (0.2g/2ml) colocar por último	270µl	270µl

Resolving 10%

	<i>Resolving</i>	<i>Stacking</i> (para 4 géis)
Água destilada	1,9ml	4,2ml
Glicerol	1,8ml	-----
Tampão	9,0ml	5,6ml
Acrilamida 40%	4,25ml	1,25ml
Temed	25µl	25µl
APS 10% (0.2g/2ml) colocar por último	270µl	270µl

Resolving 12%

	<i>Resolving</i>	<i>Stacking</i> (para 4 géis)
Água destilada	1,07ml	4,2ml
Glicerol	1,8ml	-----
Tampão	9,0ml	5,6ml
Acrilamida 40%	5,05ml	1,25ml
Temed	25µl	25µl
APS 10% (0.2g/2ml) colocar por último	270µl	270µl

Resolving 15%

	<i>Resolving</i>	<i>Stacking</i> (para 4 géis)
Água destilada	-----	4,2ml
Glicerol	1,8ml	-----
Tampão	9,0ml	5,6ml
Acrilamida 40%	6,3ml	1,25ml
Temed	25 μ l	25 μ l
APS 10% (0.2g/2ml) colocar por último	270 μ l	270 μ l

Tampão para o gel *Resolving*, pH 8,9:

EDTA 4mM	40ml do 200mM
SDS 2%	40ml do 10%
Tris base 750mM	181,6g
Água destilada	Completar para 2 litros

Tampão para o gel *Stacking*:

EDTA 4mM	40ml do 200mM
SDS 2%	40ml do 10%
Tris base 50mM	12,1g
Água destilada	Completar para 2 litros

Ajusta-se o pH para 6,7 com H₃PO₄ (ácido ortofosfórico).

Solução estoque de Acrilamida 40%:

1. usar luvas e máscara;
2. Acrilamida __ 750g
BisAcrilamida __ 20g
3. Colocar a acrilamida aos poucos em 1400ml de água destilada;
4. Depois de colocada toda a acrilamida, colocar a BisAcrilamida;
5. Completar para 2 litros com água destilada;

6. Filtrar;
7. Manter estoque na geladeira.

Antes de serem aplicadas ao gel, as amostras devem ser colocadas em água fervente por 5 minutos.

Montar as cubas com o vidro menor para dentro.

Preencher as cubas com 800ml de tampão de corrida 1x (200ml do tampão de corrida 4x + 600ml de água destilada).

Tampão de corrida 4x (geladeira):

Começar com 1500ml de água, dissolver e completar para 2 litros.

Seguir a ordem	{	Tris base 200mM	48,45g
		Glicina 1,52M	228g
		EDTA 7,18mM	5,35g
		SDS 0,4%	8g
		Água destilada	Completar
		para 2 litros	

Retirar os pentes.

Aplicar nos dois géis, proteínas com mais ou menos o mesmo peso molecular. Aplicar o padrão no primeiro ou no último pocinho do gel e aplicar as amostras. Não esqueça de fazer o mapa do gel, para não perder a localização das amostras.

Quando for usar apenas um gel em uma cuba, balancear a cuba com o plástico fornecido pela BioRad ou com um vidro vazio.

Marcar as cubas com a porcentagem do gel e a proteína a ser estudada, para não confundir com as outras cubas.

Antes de ligar a fonte, verificar se os cabos estão ligados na cor correta, preto com preto e vermelho com vermelho.

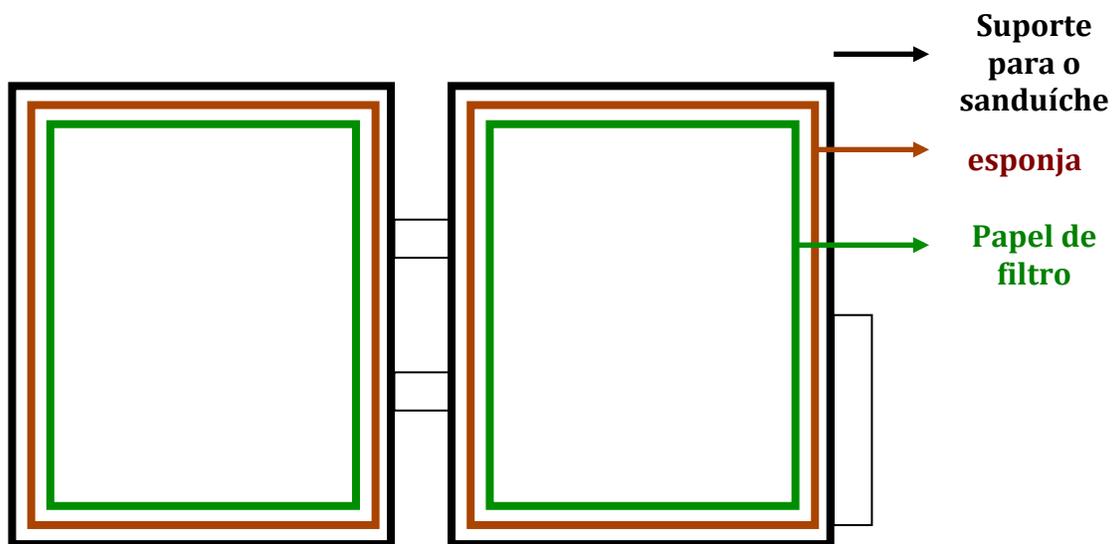
Para se certificar de que a fonte está funcionando, verifique a formação de bolhas no tampão de corrida. Inicie a corrida com uma voltagem baixa (40 a 60V). Após a

passagem das amostras pelo *Stacking*, aumentar a voltagem gradualmente para 120V. A corrida leva de 2 a 3 horas, dependendo do peso molecular da proteína. Se for deixar *overnight*, usar 12V.

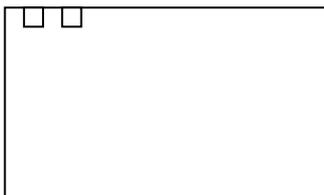
4. Transferência

Pode-se iniciar a transferência quando o corante (linha azul) cair através do tampão de corrida até o final. Dependendo da altura da proteína a ser analisada no gel, optar por deixar cair mais ou menos.

Preparar os sanduíches e as cubas de transferência. Colocar nos sanduíches as esponjas e os papéis de filtro.



Cortar as membranas de nitrocelulose. Fazer a marcação das membranas de nitrocelulose com cortes, para identificá-las de acordo com a proteína estudada. Manusear as membranas de nitrocelulose com luvas e pinça.



Colocar em um recipiente o tampão de transferência.

Tampão de transferência (geladeira):

Dissolver o Tris, a glicina e o SDS em 1200ml de água destilada.
Acrescentar o metanol e completar com água para 2 litros.

Tris base 25mM	6,05g
Glicina 192mM	28,82g
Metanol 20%	400ml
SDS 0,02%	0,4g
Água destilada	Completar para 2 litros

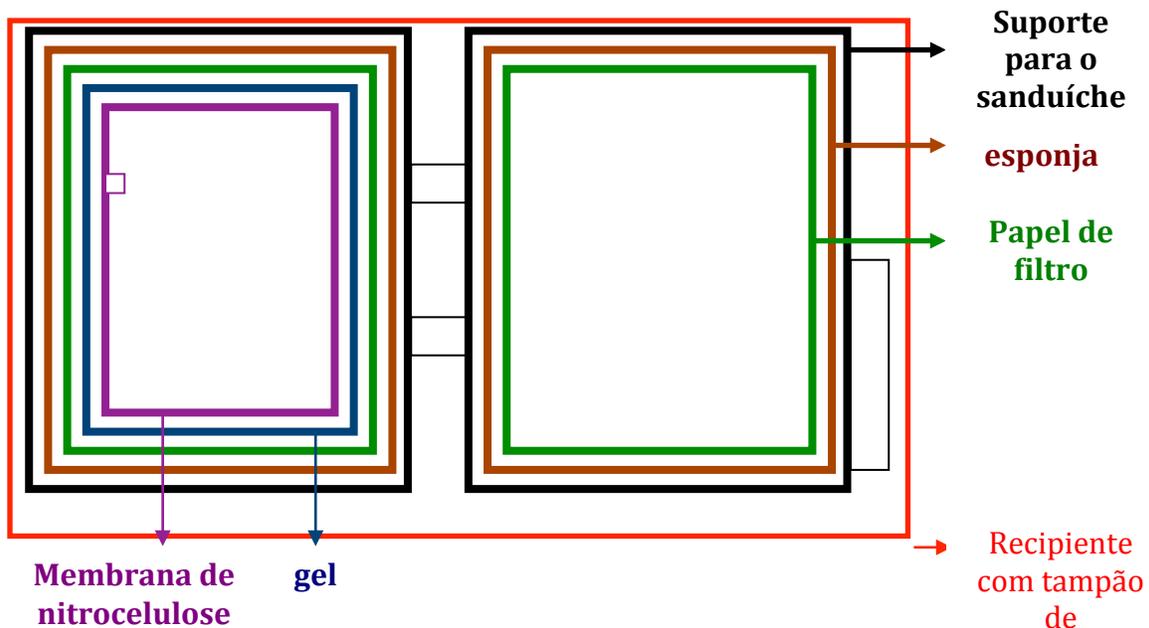
Umedecer o sanduíche e a membrana de nitrocelulose (5 minutos antes de ser usada) no tampão de transferência.

Desligar a fonte e desprezar o tampão de corrida. O tampão de corrida pode ser reaproveitado uma vez. Lavar todo o material apenas com água, sem sabão.

Cuidado para não confundir os géis na hora da transferência. Abrir os vidros com cuidado. Cortar a porção *Stacking* com o próprio vidro. Passar o gel para o papel

filtro do sanduíche mergulhado no tampão de transferência. A parte de baixo para cima e a parte onde estava o *Stacking* para baixo.

Por cima do gel, colocar a membrana de nitrocelulose, com a marcação do lado do marcador e para baixo.



Retirar as bolhas ainda no tampão de transferência. Cuidado para não quebrar o gel. Fechar o sanduíche.

Colocar o sanduíche na cuba encaixando a parte preta do lado preto. Lavar a cuba para tirar o tampão de corrida e colocar um pouco de tampão de transferência. Colocar o gelo e completar com mais tampão de transferência.

Transferir em 120V por 2 horas.

Durante a transferência, a voltagem pode diminuir. Troque o gelo com frequência, para manter a voltagem a 120V.

Após o término da transferência, desligar a fonte e retirar os sanduíches.

Retirar a membrana com uma pinça e colocar em caixinha com solução bloqueadora por 1,5 hora a 2 horas ou *overnight* na geladeira, em mesa agitadora a 50rpm.

Solução bloqueadora (por membrana):

Solução basal	10ml
Leite em pó desnatado	0,5g
*azida sódica 0,02% *só colocar quando for deixar <i>overnight</i>	0,002g

Solução basal (geladeira):

Primeiro dissolver os sais para depois acrescentar o Tween 20.

Tris base	20ml do 1M, pH 7,5
NaCl	60ml do 5M
Tween 20	1000µl
Água destilada	Completar para 2 litros

Lavar com solução basal por 3 vezes de 10 minutos na mesa agitadora.

Deixar *overnight* em solução com anticorpo, na geladeira e com agitação ou por 3 horas a temperatura ambiente.

Solução para anticorpo (por membrana):

Solução basal	10ml
BSA	0,3g
*azida sódica *só colocar quando for deixar <i>overnight</i>	0,002g

Pipetar em cada caixinha 10 μ l do anticorpo a ser estudado. A solução com anticorpo pode ser reutilizada e guardada. É necessário dar uma recarga com 3 μ l de anticorpo quando for reutilizá-la.

No dia seguinte, lavar as membranas em solução basal por 3 vezes de 10 minutos.

Preparar a solução de peroxidase rabbit, mouse ou goat de acordo com o kit de quimio (anticorpo secundário).

Solução de peroxidase:

Solução basal	10ml
Leite em pó desnatado	0,3g

Retirar a solução basal das caixinhas e colocá-las de cabeça para baixo para retirar o excesso da solução basal. Pipetar em cada caixinha 1,3 μ l de peroxidase recomendada para cada anticorpo. Deixar por 1,5 hora a 2 horas em agitação a temperatura ambiente.

Lavar em solução basal por 3 vezes de 10 minutos.

5. **Revelação** (em sala escura)

A meia luz, retirar a solução basal das caixinhas e colocá-las de cabeça para baixo para retirar o excesso da solução basal e pipetar 2 ml da solução de químico. Agitar manualmente por 1 minuto. Transferi-las para o cassete com plástico e retirar as bolhas com auxílio de gaze.

No escuro, expor o filme. Tentar vários tempos de exposição (30 segundos, 1 minuto, 10 minutos, 12 horas...)

Revelar o filme em solução de revelação até aparecerem as bandas, por aproximadamente 1 minuto.

Lavar em água destilada, com leve agitação por 1 minuto.

Fixar em solução de fixação por 1 minuto e lavar novamente em água destilada por 1 minuto. Pendurar o filme para secar.

As soluções de revelação e fixação devem ser diluídas como indicado pelo fabricante. Tais soluções podem ser reutilizadas enquanto não estiverem sujas.

Após a revelação, secar as membranas e guardar em geladeira.

Soluções estoque:

Tris base 1M, pH 7,5 (PM= 121,1)

60,55g para 500ml de água destilada.

EDTA 200mM, pH 7,0 (PM= 372,24)

18,61g para 250ml de água destilada.

NaCl 5M (PM= 58,44)

146,1g para 500ml de água destilada.

