

Comparison of fractal dimension and Shannon entropy in myocytes from rats treated with histidine-tryptophan-glutamate and histidine-tryptophan cetoglutarate

Comparação da dimensão fractal e entropia de Shannon em miócitos de ratos submetidos à cardioplegia utilizando solução histidina-triptofano-cetoglutarato e histidina-triptofano com glutamato

Marcos Aurélio Barboza de Oliveira¹, MD; Antônio Carlos Brandi², MD; Carlos Alberto dos Santos², MD; Paulo Henrique Husseni Botelho², MD; José Luís Lasso Cortez³, MD; Moacir Fernandes de Godoy⁴, PhD; Domingo Marcolino Braile⁵, MsC, PhD

DOI: 10.5935/1678-9741.20140052

RBCCV 44205-1535

Abstract

Introduction: Solutions that cause elective cardiac arrest are constantly evolving, but the ideal compound has not yet been found. The authors compare a new cardioplegic solution with histidine-tryptophan-glutamate (Group 2) and other one with histidine-tryptophan-cetoglutarate (Group 1) in a model of isolated rat heart.

Objective: To quantify the fractal dimension and Shannon entropy in rat myocytes subjected to cardioplegia solution using histidine-tryptophan with glutamate in an experimental model, considering the caspase markers, IL-8 and KI-67.

Methods: Twenty male Wistar rats were anesthetized and heparinized. The chest was opened, the heart was withdrawn and 40 ml/kg of cardioplegia (with histidine-tryptophan-cetoglutarate or histidine-tryptophan-glutamate solution) was infused. The hearts were kept for 2 hours at 4°C in the same solution, and

thereafter placed in the Langendorff apparatus for 30 min with Ringer-Locke solution. Analyzes were performed for immunohistochemical caspase, IL-8 and KI-67.

Results: The fractal dimension and Shannon entropy were not different between groups histidine-tryptophan-glutamate and histidine-tryptophan-cetoglutarate.

Conclusion: The amount of information measured by Shannon entropy and the distribution thereof (given by fractal dimension) of the slices treated with histidine-tryptophan-cetoglutarate and histidine-tryptophan-glutamate were not different, showing that the histidine-tryptophan-glutamate solution is as good as histidine-tryptophan-cetoglutarate to preserve myocytes in isolated rat heart.

Descriptors: Heart Arrest, induced. Apoptosis. Myocardial Ischemia.

¹Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), São José do Rio Preto, SP, Brasil; Centro Universitário de Votuporanga (UNIFEV), Santa Casa Votuporanga, Votuporanga, SP, Brasil.

²Hospital de Base São José do Rio Preto. São José do Rio Preto, SP, Brasil.

³Santa Casa Votuporanga, Votuporanga, SP, Brasil.

⁴Departamento de Cardiologia e Cirurgia Cardiovascular da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), São José do Rio Preto, Brasil. Núcleo Transdisciplinar para Estudo do Caos e da Complexidade (NUTECC-CNPq), São José do Rio Preto, Brasil.

⁵Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), São José do Rio Preto, SP, Brasil.

Endereço para correspondência:

Marcos Aurélio Barboza de Oliveira

Avenida República do Líbano, 2700, casa 80 - São José do Rio Preto, SP, Brasil. CEP: 15092-440

E-mail: m_aurelio@sbccv.org.br

Trabalho realizado na Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), São José do Rio Preto, SP, Brasil.

Não houve suporte financeiro.

Abreviaturas, acrônimos & símbolos	
HTG	Histidina-triptofano-glutamato
HTK	Histidina-triptofano-cetoglutatarato
IP	Intraperitoneal

Resumo

Introdução: As soluções que provocam parada cardíaca eletiva estão em constante evolução, porém, o composto ideal ainda não foi encontrado. Os autores comparam uma nova solução cardioplégica com histidina-triptofano-glutamato (Grupo 2) com histidina-triptofano-cetoglutatarato (Grupo 1) em modelo de coração isolado de rato.

Objetivo: Quantificar a dimensão fractal e entropia de Shannon em miócitos de rato submetidos à cardioplegia utilizando solução histidina-triptofano com glutamato em modelo experimental, considerando-se os marcadores caspase, IL-8 e Ki-67.

Métodos: Vinte ratos machos de raça Wistar foram anestesiados e heparinizados. O tórax foi aberto, realizado cardiectomia

e infundido 40 ml/Kg de solução cardioplégica apropriada. Os corações foram mantidos por 2 horas na mesma solução a 4°C e, após esse período, colocados em aparato de Langendorff por 30 minutos com solução de Ringer Locke. Foram feitas análises imunohistoquímicas para caspase, IL-8 e KI-67.

Resultados: A dimensão fractal e a entropia de Shannon dos corações submetidos à parada cardíaca eletiva nos grupos 1 e 2 não foram diferentes.

Conclusão: A quantidade de informações avaliada pela entropia de Shannon e a distribuição das mesmas (dada pela dimensão fractal) nas lâminas de coração de rato submetidas à cardioplegia com solução histidina-triptofano-acetoglutatarato ou histidina-triptofano-glutamato não foram diferentes, o que mostra que a solução de histidina-triptofano-glutamato é tão boa quanto a histidina-triptofano-cetoglutatarato na preservação dos miócitos em modelo de coração isolado de rato.

Descritores: Parada Cardíaca Induzida. Apoptose. Isquemia Miocárdica.

INTRODUÇÃO

Durante a cirurgia cardíaca é usual a parada temporária do coração, permitindo ao cirurgião realizar a operação no interior das cavidades cardíacas em ambiente isento de sangue e movimento. Antes que houvesse qualquer solução que produzisse parada cardíaca segura, foi de Gibbon em 1953 o mérito de utilizar uma técnica descrita por Senning em fechamento de comunicação interatrial experimental em cães utilizando fibrilação ventricular^[1].

Em 1955, Melrose et al.^[2] introduziram o conceito de parada química usando solução contendo 2,5% de citrato de potássio, que despolariza a membrana celular e para a condução do potencial de ação. Entretanto, a concentração elevada de potássio causou necrose miocárdica focal e morte em muitos pacientes, resultando em abandono da cardioplegia hipercalemica como solução protetora por quase 20 anos. Em meados dos anos 70, cardioplegias alternativas contendo menos potássio que a de Melrose foram introduzidas com sucesso, como a solução de St. Thomas^[3], cardioplegia sanguínea de baixo volume^[4,5] e solução de histidina-triptofano-cetoglutatarato (HTK)^[6]. Apesar desses avanços, a solução de cardioplegia ideal ainda não foi desenvolvida^[7,8].

A substituição do cetoglutatarato por glutamato tem consequências ainda incertas no comportamento do músculo miocárdico, porém será um meio eficaz de avaliar indiretamente sua incorporação ao Ciclo de Krebs, retirando o piruvato da mitocôndria, evitando assim a acidose que é conhecidamente danoso tanto à célula quanto a seus mecanismos enzimáticos^[9].

Soluções cardioplégicas com baixa concentração de cálcio como o HTK podem provocar o chamado “paradoxo do

cálcio”, desestabilizando a membrana celular, o que culmina com necrose, marginação leucocitária e apoptose^[10]. Modificações histológicas provocadas por soluções cardioplégicas poderiam gerar alteração na quantidade e distribuição de informação contida na lâmina. Já é fato conhecido que alterações estruturais teciduais podem ser quantificadas por meio da dimensão fractal e entropia de Shannon^[11,12].

A análise da dimensão fractal e entropia de Shannon foram recentemente usadas em várias áreas da medicina como cardiologia, neurologia, oftalmologia e radiologia^[11,13], sendo úteis na caracterização de estruturas irregulares e complexas^[11,13,14]. Utilizando análise fractal, Arruda et al.^[11] e Douglas et al.^[12] correlacionaram grau de desdiferenciação e invasividade tumoral em câncer de próstata e grau de rejeição em tumores cardíacos, respectivamente.

O presente trabalho objetiva avaliar se a solução de estido histidina-triptofano-glutamato (HTG) é melhor que a HTK (solução padrão) por meio da dimensão fractal e entropia de Shannon em miócitos de rato submetidos, considerando-se os marcadores caspase, IL-8 e KI-67.

MÉTODOS

Após aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (autorização número 015/2012), foram utilizados 20 ratos (10 para cada grupo), machos, raça Wistar, com peso médio de 280±29 gramas.

Todos os animais receberam cuidados conforme recomendações do Committee on Care and Use of Laboratory Animals - Institute of Laboratory Animal Resources (ILAR) - National Research Council, Estados Unidos^[15].

Protocolo Experimental

Os animais foram anestesiados com injeção de 65 mg/Kg intraperitoneal (IP) de pentobarbital sódico e receberam heparinização sistêmica IP (500 UI/kg). Após a abertura do tórax, foi realizada cardiectomia. Os corações receberam solução de Ringer lactato para “lavar” a árvore coronariana e, em seguida, solução cardioplégica conforme seu grupo.

Os corações nessa fase do experimento foram divididos em dois grupos. No Grupo 1 foi utilizada solução de HTK a 4°C e, no Grupo 2, solução de histidina-triptofano-glutamato (HTG) a 4°C. A Tabela 1 mostra a composição de cada uma das soluções. Em todos os casos a infusão da cardioplegia foi feita em dose única de 40 ml/Kg na raiz da aorta, seguida por imersão do órgão na mesma solução por 2 horas a 4°C.

Após esse tempo, os corações foram colocados em sistema de Langendorff e perfundidos com solução tampão de Ringer Locke oxigenado, em normotermia e pressão constante de 100 cm H₂O, por método gravitacional durante 30 minutos. A drenagem do ventrículo direito foi realizada pela abertura da artéria pulmonar, sendo mantido intacto o átrio direito no intuito de preservar o nó sinusal^[16].

Foram inseridos três fios de marca-passo epicárdico em pontos equidistantes dos ventrículos para documentação eletrocardiográfica dos eventos cardíacos. Foi anotado o tempo de início da fibrilação ventricular e o primeiro batimento cardíaco contado a partir do início da infusão da solução de Ringer Locke.

Tabela 1. Composição das soluções utilizadas.

Substância	HTK (g/L)	HTG (g/L)
Cloreto de sódio	0,8766	0,8766
Cloreto de potássio	0,671	0,671
Cloreto de magnésio	0,8132	0,8132
Cloreto de cálcio	0,0022	0,0022
Potássio-hidrogênio-2-cetoglutarato	0,1842	---
Glutamato	---	0,1842
Histidina	27,9289	27,9289
Cloreto de histidina, H ₂ O	3,7733	3,7733
Triptofano	0,4085	0,4085
Manitol	5,4651	5,4651
Água para injeção	a 1000 ml	a 1000 ml

HTK: histidina-triptofano-cetoglutarato; HTG: histidina-triptofano-glutamato

Após 30 minutos de infusão de Ringer Locke, o experimento foi descontinuado. Os corações foram retirados do sistema de Langendorff, sendo coletados fragmentos de ápice cardíaco, que foram armazenados em tubos estéreis como Falcon contendo formol 10%, para posterior preparação histológica e imunohistoquímica.

Preparação histológica e técnica imunohistoquímica

Inicialmente, o material foi incluído em parafina, procedimento que oferece resistência permitindo seu corte em espessura de 3 µm e colocados em lâminas silanizadas. A silanização das lâminas consistiu na preparação destas com um adesivo que fixa o fragmento às lâminas impedindo seu descolamento durante o procedimento imunohistoquímico. Para tanto, estas foram imersas em acetona PA (2 minutos), solução de silano 4% diluído com acetona (2 minutos) e novamente em acetona PA (4 a 5 mergulhos). A secagem das lâminas foi realizada na estufa a 60°C.

O bloco foi preso ao micrótomo, a espessura do corte foi regulada para 3 µm e os cortes colocados em lâmina silanizada identificada e deixados na estufa a 60°C por 24 horas. As lâminas passaram pelo processo de desparafinização em xilol, seguida por hidratação em álcool absoluto I, II e III, finalizando com seis mergulhos em água corrente, incubados com 3% de peróxido de hidrogênio por 30 minutos para o bloqueio da peroxidase endógena.

A recuperação antigênica foi realizada na panela a vapor com tampão específico para cada anticorpo por 30 minutos (Tabela 2). Em seguida, as lâminas foram encobertas com solução contendo soro fetal bovino (BSA) e incubadas com o anticorpo primário.

Após essa etapa, as lâminas foram lavadas em solução PBS por 15 minutos e incubadas com kit Starr Trek Universal HRP Detection (Biocare Medical®), que consistiu no anticorpo secundário biotilado por 1 hora e no complexo estreptavidina-peroxidase por 30 minutos, seguidas de lavagem com PBS por 15 minutos. A revelação foi feita com substrato cromógeno (Betazoidchromogen DAB) do kit Starr Trek Universal HRP Detection (Biocare Medical®) de 2 a 5 minutos e a contra-coloração com hematoxilina de Harrys por 40 segundos. Os tecidos foram desidratados em álcool em grau crescente e banhados no xilol antes da montagem das lâminas em meio ERV-MOUNT (Erviagas®).

Tabela 2. Relação dos anticorpos utilizados.

Anticorpo	Especificidade	Diluição	Tampão	Laboratório
anti-KI-67	Monoclonal	1:200	Citrato pH6	Biocare Medical
anti-Caspase 3	Policlonal	1:1000	Citrato pH6	Abcam
anti-IL-8	Monoclonal	1:50	Citrato pH6	Santa Cruz

Os controles negativos das reações foram obtidos pela omissão do anticorpo primário. Foram utilizados tecido de tonsila para reações de KI-67 e caspase 3 e como controle positivo tecido de mama para reação de IL-8.

As lâminas foram fotografadas e as enzimas quantificadas pelo software AxioVision no aumento de 40X do microscópio Axioskop 2 Zeiss. Para cada amostra, foram selecionadas três regiões do tecido cardíaco.

Dimensão fractal e entropia de Shannon

As lâminas fotografadas foram então binarizadas para leitura da dimensão fractal e entropia de Shannon. Elas foram estimada pelo método Box-counting, com auxílio do programa computacional ImageJ do Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos (NIH), amplamente utilizado na literatura e disponível gratuitamente na Internet (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

Esse programa considera o Box-counting em duas dimensões, permitindo a quantificação da distribuição de pixels nesse espaço, não considerando, portanto, a textura da imagem. A influência disso é que duas imagens com a mesma distribuição dos pixels, uma binarizada e outra em níveis de cinza, possuirão a mesma DF. Com isso, a DF calculada com o ImageJ ficará sempre entre 0 e 2, não distinguindo texturas diferentes.

Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e, subsequentemente, a análises paramétrica pelo teste t de Student não pareado ou não paramétrica pelo teste de Mann-Whitney e exato de Fisher para dados categóricos. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão, ou mediana (percentil 25,75), quando necessário. Valor de $P < 0,05$ foi considerado significativo. Utilizou-se o programa de cálculos estatísticos GraphPad InStat e Prism 6.0, ambos para Windows®.

RESULTADOS

O peso médio dos animais foi 277,4 \pm 24,6 (Grupo 1) e 288 \pm 34,5 g (Grupo 2), respectivamente, não havendo diferença significativa entre os grupos ($P=0,4396$). Com relação ao volume médio de Ringer Locke coletado de seio coronário ao final de 30 minutos (363,1 \pm 177,3 e 277,4 \pm 33,7 ml, respectivamente), não houve diferença significativa entre os grupos ($P=0,1923$).

Achados durante perfusão com solução cardioplégica e Ringer Locke

Todos os corações apresentaram perfusão adequada de cardioplegia e Ringer Locke, demonstrada pela coloração clara na parede ventricular. A frequência cardíaca média após 5 minutos de perfusão (233 \pm 36 e 188 \pm 53,4 batimentos por

minuto, respectivamente) apresentou diferença significativa ($P=0,0086$). O tempo de início de fibrilação ventricular, (49 \pm 28,2 e 45 \pm 17 segundos, respectivamente) e o tempo de primeiro batimento (153 \pm 78 e 117 \pm 96,8 segundos, respectivamente) não mostraram diferença significativa ($P=0,5869$ e $P=0,187$, respectivamente).

Análise da dimensão fractal e entropia de Shannon

A dimensão fractal com a utilização do marcador caspase foi 1,59 \pm 0,09 (sem unidade) para o grupo 1 e 1,55 \pm 0,13 para o grupo 2, respectivamente ($P=0,4400$), do KI-67 1,53 \pm 0,13 e 1,54 \pm 0,18, respectivamente ($P=0,9595$) e da IL-8 de 1,52 \pm 0,15 e 1,51 \pm 0,12, respectivamente ($P=0,9164$) (Figura 1).

A entropia de Shannon com a caspase foi 0,4 \pm 0,07 bits para o grupo 1 e 0,38 \pm 0,08 bits para o grupo 2 ($P=0,5487$), do KI-67 0,36 \pm 0,1 bits e 0,37 \pm 0,13 bits, respectivamente ($P=0,9149$), e da IL-8 0,35 \pm 0,11 bits e 0,35 \pm 0,08 bits, respectivamente ($P=0,9678$) (Figura 2).

DISCUSSÃO

Apesar de ainda não ser conhecido o efeito da substituição do cetoglutarato por glutamato na solução com histidina e triptofano, o glutamato possui papel bem documentado quando colocado como constituinte de solução cardioplégica. A adição de glutamato no perfusato mantém o ATP intracelular e diminui tanto o lactato quanto o piruvato, que contribuiriam para acidose. O glutamato exógeno e seus produtos de transaminação restauram seus conteúdos normalmente diminuídos no miocárdio hipóxico, aumentam a concentração de succinato, que leva a também aumento da formação de ATP por via anaeróbica na mitocôndria, aumentando assim a resistência do miócito à isquemia^[9].

Outro processo que está intrinsecamente relacionado com lesão isquemia-reperfusão é a apoptose^[17,18]. Essas mudanças são feitas por uma família de proteases denominadas caspases^[19]. O grau de ativação das caspases é diretamente relacionado ao grau de apoptose^[20]. Em contraste com a apoptose, a necrose é um processo irreversível de morte celular em que há ruptura da membrana celular, com extravasamento do citosol ao meio extracelular, marginação leucocitária e ativação da cascata inflamatória^[20,21]. Em contraste com a morte celular os corações de mamíferos apresentam pequena capacidade proliferativa após o nascimento. Um dos marcadores utilizados para avaliar proliferação celular é o KI-67^[22]. Com esse marcador, Walsh et al.^[23] mostram que 12-23% dos cardiomiócitos fetais de ratos apresentam atividade proliferativa, passando a 1-8% até o 7º dia e praticamente indetectável a partir do 14º dia. Assim, selecionamos a análise da caspase, IL-8 e KI-67 para avaliação da apoptose, necrose proliferação celular, respectivamente.

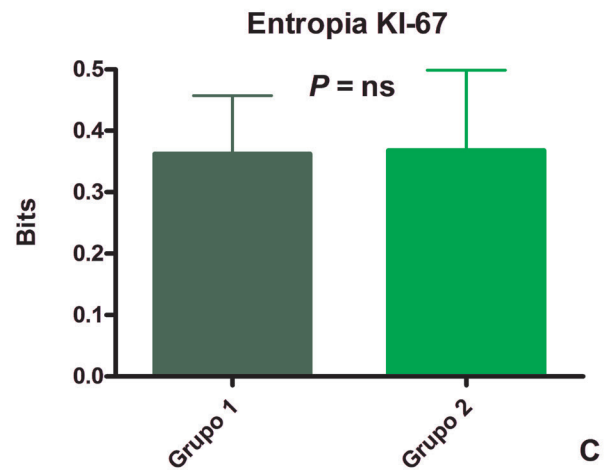
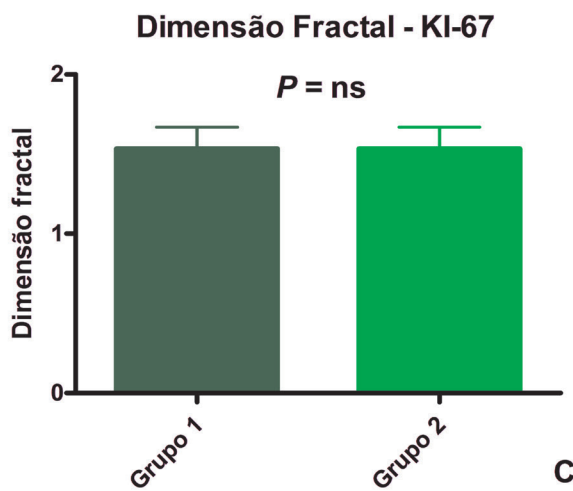
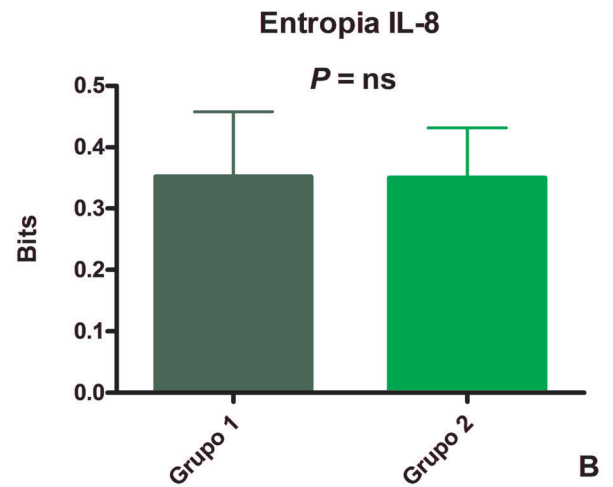
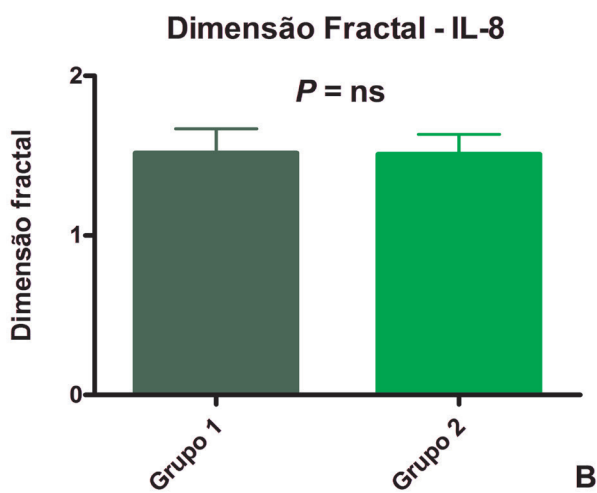
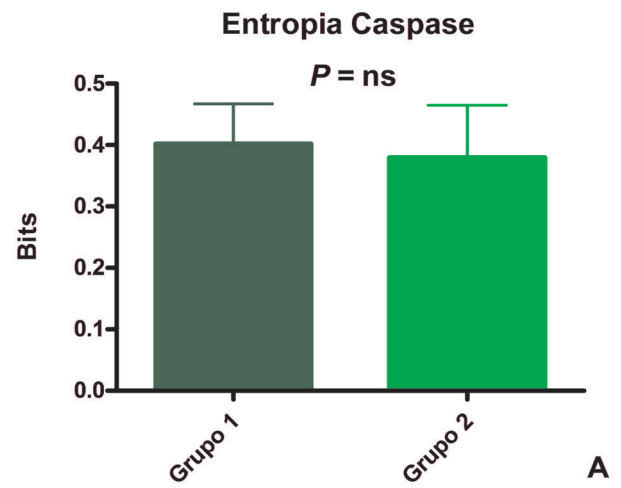
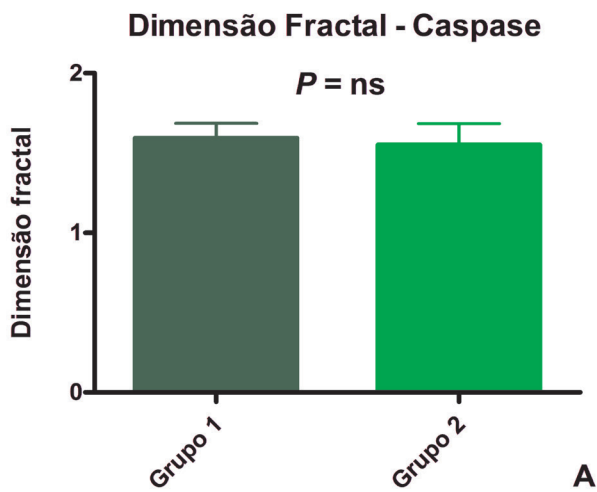


Fig. 1 - Histogramas demonstrando distribuição da dimensão fractal em: (A) caspase, (B) IL-8 e (C) KI-67. Grupo 1: solução com histidina-triptofano-cetogluturato, Grupo 2: solução com histidina-triptofano-glutamato

Fig. 2 - Histogramas demonstrando distribuição da entropia em: (A) caspase, (B) IL-8 e (C) KI-67. Grupo 1: solução com histidina-triptofano-cetogluturato, Grupo 2: solução com histidina-triptofano-glutamato

A dimensão fractal é um parâmetro útil para caracterização de estruturas complexas irregulares, mas que quando observadas matematicamente, sua análise denota figuras regulares com característica de autossimilaridade, ou seja, assemelham-se a elas mesmas quando observadas em diferentes escalas de tamanho^[24].

A dimensão fractal do objeto conta o número efetivo de graus de liberdade no sistema dinâmico e, portanto, quantifica a sua complexidade. Assim, infere-se que imagens evidenciando maior dimensão fractal sejam, conseqüentemente, mais complexas. Não se pode, porém, apenas pelo aspecto visual, quantificar essa complexidade. A dimensão fractal viria então sanar essa dificuldade ao adicionar um valor numérico^[12].

O tamanho das caixas para cálculo da dimensão fractal no método Box-counting foi padronizado em 4, 8, 16, 32 e 64 pixels. Sabe-se que o tamanho do pixel depende do grau de resolução utilizado. Como comenta Tambasco et al.^[24], o tamanho da caixa utilizado deve guardar uma certa relação com a estrutura estudada, pois pode ser tão pequeno que, na verdade, esteja avaliando subcomponentes da estrutura ou tão grande que, na verdade, estariam sendo incluídos na medição componentes dos arredores da estrutura de interesse e não a estrutura em si. Esses valores, no entanto, são os valores padrão utilizados na literatura e, portanto, provavelmente não causaram interferência nos resultados^[12].

Em nosso estudo, não houve diferença significativa da dimensão fractal entre os grupos. Dessa maneira, consideramos que a distribuição das informações contidas nas lâminas dos corações tratados com as soluções HTK ou HTG não foram diferentes.

Uma contribuição importante na Teoria da Informação introduzida por CE Shannon em 1948 foi o conceito de Entropia como sendo a quantidade de informação em um sistema^[25]. Vale ressaltar que não se deve confundir “entropia estado” da Termodinâmica com “entropia conceito” da Teoria da Informação^[26].

Segundo Shannon, se X é o conjunto de todas as mensagens de x , e $p(x)$ é a probabilidade (variando de 0 a 1) de uma mensagem x , então a entropia de X será^[26]:

$$H(X) = - \sum_{x \in X} p(x) \log p(x)$$

A entropia de Shannon quantifica o grau de “incerteza” ou grau de “complexidade” de uma informação. Por essa formulação fica fácil entender que, se a probabilidade de ocorrência de um determinado fato é de 100%, ou seja, se $P=1$ (ausência de incerteza), então a entropia contida na mensagem será zero ($\log 1 = \text{zero}$)^[26].

Considerando que uma imagem é o resultado de um processo estocástico, no qual a probabilidade p_i do cálculo da entropia de Shannon corresponderia à probabilidade de um

pixel apresentar uma determinada cor ou intensidade de cinza (variando de 0 a 255). Essa probabilidade de cada intensidade de cinza pode ser obtida facilmente pela construção de um histograma de frequências^[26].

Entropia zero de uma imagem é obtida quando todos os pixels se apresentam com a mesma cor ou mesma intensidade de cinza (probabilidade 100%, ou seja 1; $\log 1=0$). Por outro lado, a máxima entropia ocorreria quando a imagem contivesse a mesma quantidade de pixels para cada uma das intensidades presentes. Assim, demonstramos que a entropia não está relacionada com a disposição espacial da informação. Duas imagens podem possuir igual quantidade de pixels com a mesma intensidade e, portanto a entropia total seria a mesma, porém, distribuídos espacialmente de maneira diferente^[26].

Em nosso estudo, não houve diferença significativa entre a entropia de Shannon entre os grupos. Dessa maneira, consideramos que as informações contidas nas lâminas dos corações tratados com as soluções HTK ou HTG não foram diferentes.

A literatura mostra vários trabalhos em que há diferença estatística entre grupos avaliados com dimensão fractal ou entropia de Shannon, chamando a atenção do leitor do seu caráter imageológico discriminativo, mas não apresenta qualquer relato da relevância quando os resultados encontrados não alcançam significância estatística, como o que ocorreu em nosso trabalho. A interpretação dos resultados deste estudo é que o grupo HTG não alterou a quantidade ou a distribuição da informação imageológica dos corações de rato quando comparados aos tratados com HTK.

A entropia de Shannon e a dimensão fractal quantificam a distribuição e o grau de complexidade da imagem, respectivamente. Assim, essa técnica não é comparável com o Western-Blot ou PCR, já que essas quantificam o valor total das proteínas estudadas e não sua distribuição ou seu grau de complexidade no tecido.

CONCLUSÃO

A quantidade e distribuição das informações avaliadas pela entropia de Shannon e dimensão fractal nas lâminas de coração de rato submetidas à cardioplegia com soluções HTK ou HTG não foram diferentes, o que mostra que a solução de HTG é tão boa quanto a HTK na preservação dos miócitos em modelo de coração isolado de rato.

Papéis & responsabilidades dos autores

MABO	Autor principal
ACB	Confecção dos gráficos
CAS	Confecção dos gráficos
PHHB	Manipulação dos animais
JLLC	Manipulação dos animais
MFG	Coorientador e ajuda na redação final
DMB	Orientador e ajuda na redação final

REFERÊNCIAS

1. Miller BJ, Gibbon JH, Jr., Greco VF, Smith BA, Cohn CH, Allbritten FF, Jr. The production and repair of interatrial septal defects under direct vision with the assistance of an extracorporeal pump-oxygenator circuit. *J Thorac Surg.* 1953;26(6):598-616.
2. Melrose DG, Dreyer B, Bentall HH, Baker JB. Elective cardiac arrest. *Lancet.* 1955;266(6879):21-2.
3. Fallouh HB, Kentish JC, Chambers DJ. Targeting for cardioplegia: arresting agents and their safety. *Curr Opin Pharmacol.* 2009;9(2):220-6.
4. Braile DM. Cardioplegia isotérmica anterógrada retrógrada de baixo volume. São José do Rio Preto, 1997. 27p.
5. Lima-Oliveira APM, Azevedo-Oliveira MTV, Taboga SR, Godoy MF, Braile DM. Cardioplegia utilizando baixo volume de agentes cardioplégicos: estudo morfológico em coração isolado de coelhos. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 2003;18(3):227-34.
6. Bretschneider HJ. Survival time and recuperative time of the heart in normothermia and hypothermia. *Verh Dtsch Ges Kreislaufforsch.* 1964;30:11-34.
7. Scrascia G, Guida P, Rotunno C, De Palo M, Mastro F, Pignatelli A, et al. Myocardial protection during aortic surgery: comparison between Bretschneider-HTK and cold blood cardioplegia. *Perfusion.* 2011;26(5):427-33.
8. Holper K, Meisner H, Hähnel C, Massoudy P. Technical refinements in myocardial protection: infants-adults. *Thorac Cardiovasc Surg.* 1998;46 Suppl 2 292-5; discussion 6-7.
9. Pisarenko OI, Solomatina ES, Ivanov VE, Studneva IM, Kapelko VI, Smirnov VN. On the mechanism of enhanced ATP formation in hypoxic myocardium caused by glutamic acid. *Basic Res Cardiol.* 1985;80(2):126-34.
10. Rebeyka IM, Axford-Gatley RA, Bush BG, del Nido PJ, Mickle DA, Romaschin AD, et al. Calcium paradox in an in vivo model of multidose cardioplegia and moderate hypothermia. Prevention with diltiazem or trace calcium levels. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1990;99(3):475-83.
11. Arruda PFF, Gatti M, Facio Jr FN, Arruda JGF, Moreira RD, Murta LO, et al. Quantification of fractal dimension and Shannon's entropy in histological diagnosis of prostate cancer. *BMC Clin Pathol.* 2013;13:6.
12. Moreira RD, Moriel AR, Murta Junior LO, Neves LA, Godoy MF. Fractal dimension in quantifying the degree of myocardial cellular rejection after cardiac transplantation. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 2011;26(2):155-63.
13. Keipes M, Ries F, Dicato M. Of the British coastline and the interest of fractals in medicine. *Biomed Pharmacother.* 1993;47(9):409-15.
14. Karperien A, Jelinek HF, Leandro JJ, Soares JV, Cesar Jr RM, Luckie A. Automated detection of proliferative retinopathy in clinical practice. *Clin Ophthalmol.* 2008;2(1):109-22.
15. Committee on Care and Use of Laboratory Animals - Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences, National Research Council. Guide for the care and use of laboratory animals. 8th ed. Washington: National Academies Press; 2010. 211p.
16. Lahaye Sle D, Gratas-Delamarche A, Malardé L, Vincent S, Zguira MS, Morel SL, et al. Intense exercise training induces adaptation in expression and responsiveness of cardiac β -adrenoceptors in diabetic rats. *Cardiovasc Diabetol.* 2010;9:72.
17. Xu YJ, Saini HK, Zhang M, Elimban V, Dhalla NS. MAPK activation and apoptotic alterations in hearts subjected to calcium paradox are attenuated by taurine. *Cardiovasc Res.* 2006;72(1):163-74.
18. Fischer UM, Cox Jr CS, Laine GA, Mehlhorn U, Bloch W, Allen SJ. Induction of cardioplegic arrest immediately activates the myocardial apoptosis signal pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;292(3):H1630-3.
19. Pirnia F, Schneider E, Betticher DC, Borner MM. Mitomycin C induces apoptosis and caspase-8 and -9 processing through a caspase-3 and Fas-independent pathway. *Cell Death Differ.* 2002;9(9):905-14.
20. Lee S, Huang CS, Kawamura T, Shigemura N, Stolz DB, Billiar TR, et al. Superior myocardial preservation with HTK solution over Celsior in rat hearts with prolonged cold ischemia. *Surgery.* 2010;148(2):463-73.
21. Anselmi A, Abbate A, Girola F, Nasso G, Biondi-Zoccai GG, Possati G, et al. Myocardial ischemia, stunning, inflammation, and apoptosis during cardiac surgery: a review of evidence. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2004;25(3):304-11.
22. Lee Y. To proliferate or not to proliferate. *Cardiovasc Res.* 2010;86(3):347-8.
23. Walsh S, Pontén A, Fleischmann BK, Jovinge S. Cardiomyocyte cell cycle control and growth estimation in vivo: an analysis based on cardiomyocyte nuclei. *Cardiovasc Res.* 2010;86(3):365-73.
24. Tambasco M, Costello BM, Kouznetsov A, Yau A, Magliocco AM. Quantifying the architectural complexity of microscopic images of histology specimens. *Micron.* 2009;40(4):486-94.
25. Shannon CE. 1948. A Mathematical Theory of Communication [Acesso 2/12/2013]. <http://archive.org/details/bellssystemtechni27amerrich>
26. Arruda PFF. Quantificação da dimensão fractal e entropia de Shannon no diagnóstico histológico do câncer de próstata [Tese de doutorado]. São José do Rio Preto: FAMERP: Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto; 2011. 80p.