José Carlos Faes da Silva

**Estudo da congestão venosa após amputação subtotal de membro de
ratos: efeito protetor do alopurinol, vitamina c, tirofiban ou heparina na
isquemia secundária**

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

Programa de: Clínica Cirúrgica

Orientador: Prof. Dr. Marcus Castro Ferreira

São Paulo
2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Silva, José Carlos Faes da

Estudo da congestão venosa após amputação subtotal de membro de ratos :
efeito protetor do alopurinol, vitamina C, tirofiban ou heparina na isquemia
secundária / José Carlos Faes da Silva. -- São Paulo, 2013.

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

Programa de Clínica Cirúrgica.

Orientador: Marcus Castro Ferreira.

Descritores: 1.Reimplante 2.Trombose venosa 3.Isquemia quente
4.Reperusão 5.Alopurinol 6.Vitamina C 7.Tirofiban 8.Heparina 9.Ratos Wistar

USP/FM/DBD-460/13

MEDICINA

USP

“Entregar muito de si mesmo; saber que, pelo menos a vida de uma pessoa foi mais fácil porque pudemos ajudá-la. Isso é ter triunfado”

Ralph W. Emerson

Dedicatória

Aos meus pais, **JOSÉ CARLOS E MARIA APARECIDA**, à minha irmã **MARIA CLAUDIA**, à minha esposa **MARIANA**, e a minha filha **CAROLINA**, que esta chegando; **minha Família**, por todo amor e o carinho recebidos, impossível recompensa-los.

Agradecimientos

PROFESSOR Marcus Castro Ferreira, meu orientador. Professor com letra maiúscula mesmo, incansável dedicação ao ensino e a pesquisa; tem posição singular no desenvolvimento da cirurgia plástica, com toda a minha admiração e respeito.

Aos meus Professores acadêmicos, responsáveis pela minha formação medica na CASA DE ARNALDO, também conhecida como Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Aos meus Professores responsáveis pela minha formação cirúrgica, dos anos como residente da Cirurgia Geral e Cirurgia Plástica do Hospital das Clinicas da FMUSP

Aos Amigos da Turma 84, Panela de internato e Companheiros de residência medica.

Ao Dr. Mauricio Jacomini Verotti, eterno amigo, companheiro nos momentos mais difíceis da vida acadêmica.

Ao Dr. Fernando Giovaneti Morano, cirurgião plástico que me seduziu para a cirurgia plástica com uma úlcera de pressão operada no instituto de ortopedia.

Ao Dr. Luis Henrique Ishida e Dr. Alexandre Munhoz, que me aceitaram na Liga de Cirurgia Plástica e tiveram paciência de me ensinar a base dos meus conhecimentos anatômicos em cirurgia plástica muitos sábados no SVO.

Ao Prof Dr. Marcelo Sacramento Cunha, que me levou ao caminho da pesquisa, iniciando esse projeto que origina mais um fruto. Dias e noites operando ratos e construindo um grande respeito e admiração, científica e pessoal, cercado de valores da mais alta estima.

Ao Prof Dr. Dov Charles Goldenberg exemplos de dedicação acadêmica, profissional e pessoal, centrado na ética e no respeito, os quais me espelho na minha carreira profissional.

Ao Prof Dr. Jose Carlos de Faria, as vezes confundidos pelos nomes quase iguais, despertou meu desejo pela microcirurgia ainda no internato, grande admiração das tuas habilidades técnicas, as quais tento a cada dia me aproximar.

Dr. Paulo Tuma Jr, Dr. Hugo Nakamoto e Dr. Dimas Milchelsky, sempre dispostos, colaboraram muito com minha formação.

Dr. Fernando Nalesso Aguiar, grande amizade construída nos gramados da Associação Atlética Acadêmica Oswaldo Cruz, me ajudou de forma imprescindível na avaliação histológica deste estudo, engrandecendo minha pesquisa.

Dr. Julio Gringlas de Carvalho, amigo para todas as horas, sempre me apoiando e compartilhando minhas dificuldades.

Dr. Rafael Zacarias Batista, pela amizade construída nos últimos 5 anos e a grande confiança compartilhada; muitos projetos pela frente.

Dr. Alfredo Carrieri e Dr. Murilo Fraga, cirurgiões de estimada habilidade, os quais tenho grande prazer de dividir o campo cirúrgico.

Ao meu grande amigo, quase irmão, Daniel Ivanov e sua ajuda sempre.

Aos funcionários do Laboratório de Microcirurgia e Cirurgia Plástica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (LIM04)

À Sra. Eliane, por todo seu empenho a qualquer momento nestes meus anos de pós-graduação.

Sumário

Lista de figuras	
Lista de gráficos	
Lista de tabelas	
Lista de abreviaturas	
Lista de símbolos	
Resumo	
Summary	
1 INTRODUÇÃO	1
Fisiopatologia de isquemia/reperfusão	6
Terapias protetora	16
Agentes antioxidantes e quelantes dos radicais livres de oxigênio	18
a - Vitamina C	18
b – Alopurinol	19
Soluções de preservação	20
Pré-condicionamento e pós-condicionamento	21
Anticoagulação	22
Trombólise	25
 2 OBJETIVO	 28
3 MATERIAL E MÉTODO	30
- Animais	31
- Procedimento Cirúrgico	32
- Análise Histológica	43
- Estatística	46
4 RESULTADOS	47
5 DISCUSSÃO	57
6 CONCLUSÃO	80
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

Lista de figuras

Foto 1 – Marcação cirúrgica	32
Foto 2 – Incisão inguinal direta	33
Foto 3 – Eletrocoagulação dos vasos epigástricos direito	34
Foto 4 – Dissecção dos vasos femorais direito	34
Foto 5 – Secção muscular	35
Foto 6 – Identificação do nervo ciático	35
Foto 7a – Amputação subtotal	36
Foto 7b – Amputação subtotal	36
Foto 8 – Sutura da musculatura	37
Foto 9 – Dissecção dos vasos epigástricos esquerdo	38
Foto10 – Manobra do ordenhamento	39
Foto 11 – Manobra do ordenhamento	39
Foto 12 – Manobra do ordenhamento	39
Foto 13 – Posicionamento do clampe microvascular(artéria e veia)	39
Foto 14 – Infusão da solução na veia epigástrica superficial esquerda	40
Foto 15 – Posicionamento do clampe na veia femoral direita	42
Foto 16 – Avaliação Histológica; HE 20X	44
Foto 17 – Avaliação histológica; HE 20X	46

Lista de Gráficos

Gráfico 1 – Boxplot do percentual de lesão por grupo	49
Gráfico 2 – Densidade suavizada do percentual de lesão por grupo	50
Gráfico 3 – Boxplot do escore de edema por grupo gráfico	53
Gráfico 4 – Densidade suavizado do escore de edema por grupo	54
Gráfico 5 – Boxplot do escore de sangue por grupo	56
Gráfico 6 – Densidade suavizado do escore de sangue por grupo	56

Lista de tabelas

Tabela 1 – Medidas do percentual de lesão celular	48
Tabela 2 – Coeficientes do ANOVA para percentual de lesão	49
Tabela 2.1 – Comparações múltiplas da regressão linear para percentual de lesão	51
Tabela 3 – Medidas resumo do escore de edema	52
Tabela 4 – Coeficiente do ANOVA para escore de edema	53
Tabela 5 – Medidas resumo do escore de sangramento	55
Tabela 6 – Coeficiente do ANOVA para escore de sangue	55

Lista de Abreviaturas

d.C.	depois de Cristo
EUA	Estados Unidos da América
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
ATP	Adenosina Trifosfato
pH	“potencial hidrogênico”
RLO	Radicais Livres de Oxigênio
I/R	Isquemia/Reperfusão
PMN	Polimorfonucleares
NO	Oxido Nítrico
NADPH	Nicotimida adenina dinucleotideo fostato
DNA	ácido desoxirribonucléico
ADP	adenosina difosfato
AMP	adenosina monofosfato
XO	xantina oxidase
MPO	mieloperoxidase
TTPA	tempo de tromboplastia parcialmente ativada
GPIIb/IIIa	glicoproteína IIb / IIIa
rt-PA	“recombinant tissue plasminogen activator”
LIM	laboratório de investigacao médica
HE	hematoxilina-eosina

Lista de símbolos

Ca^{2+}	Cálcio
O^{2-}	ânio superóxido
O^2	oxigênio molecular
H^2O^2	peróxido de hidrogênio
Fe	ferro
OH	hidróxido
HOCl	ácido hipocloroso
Cl^-	cloro
H^+	hidrogênio
U/ml	unidades por mililitros
mg/ml	miligramas por mililitros
mg/kg	miligramas por kilogramas
NaCl	Cloreto de Sódio
%	porcentagem
øC	graus Celsius
ml	mililitros
N	normal
p	nível significância (estatística)
<	menor
U	Unidade
ml	mililitros

Resumo

SILVA, J.C.F. Estudo da congestão venosa após amputação subtotal de membros de ratos: Efeito protetor do Alopurinol, Vitamina C, Tirofiban ou Heparina na isquemia secundária. Tese (Doutorado) São Paulo, 2013 – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

A trombose venosa é a principal complicação da microcirurgia vascular e a intervenção precoce é necessária para o salvamento dos retalhos, com índices de sucesso de apenas 50% das revisões cirúrgicas; trombose da microcirculação, produção de radicais livres de oxigênio (RLO) e edema são os elementos principais da lesão de isquemia/reperfusão (I/R), e o planejamento das terapias protetoras tem como objetivo amenizar estas alterações. Os fármacos antioxidantes, antiagregantes plaquetários e anticoagulantes são utilizados no controle da lesão de I/R em diferentes órgãos. Neste estudo, em modelo de amputação subtotal de membro posterior de rato submetido a isquemia global primária, foi testado o efeito protetor dos fármacos alopurinol, heparina, tirofiban ou vitamina C durante a isquemia secundária pós congestão venosa. Foram operados 100 ratos, que após isquemia global de 90 minutos, foram divididos em cinco grupos de 20 animais recebendo uma das respectivas drogas na veia femoral contra-lateral: 1ml de solução fisiológica 0,9% no grupo controle (GC), 1ml de alopurinol 45mg/kg no grupo experimental 1 (G1), 1ml de heparina 200UI/kg no grupo experimental 2 (G2), 1ml de tirofiban 50 µg /ml no grupo experimental 3 (G3) e 1 ml de vitamina C 100mg/kg no grupo experimental 4 (G4); o clampe foi então retirado do feixe vascular e se iniciou a reperfusão de 60 minutos; a colocação do clampe vascular apenas na veia femoral direita iniciou a congestão venosa (isquemia secundária) do membro por 90 minutos seguido de outra reperfusão de 60 minutos; O músculo gastrocnêmio foi

dissecado e retirado para análise histológica e os animais sacrificados por injeção letal. Foram estudados a porcentagem de viabilidade celular muscular, o edema e o extravasamento de hemácias. A porcentagem de lesão celular do músculo do grupo controle foi 54,6% ($\pm 10,6$), do G1 31,5% ($\pm 13,6$), do G2 24,7% ($\pm 11,7$), do G3 24,6% ($\pm 8,6$) e do G4 21,3% ($\pm 8,6$). Os grupos foram comparados por modelo de comparação múltiplas one way-ANOVA e post-hoc Tukey com significância de $p < 0,05$. A porcentagem de lesão celular foi menor para os grupos G1, G2, G3 e G4 quando comparados ao GC ($p < 0,001$), e quando comparados os grupos experimentais entre si, apenas o G4 (vitamina C) foi menor estatisticamente que G1(alopurinol) ($p < 0,029$). A utilização individual dos fármacos alopurinol, heparina ,tirofiban e vitamina C mostraram efeito protetor na congestão venosa secundaria a isquemia global primária, e a vitamina C foi mais efetiva nesta ação que o alopurinol quando comparados os antioxidantes entre si. Quando avaliado o edema, apenas os antioxidantes tiveram índices menores estatisticamente que o GC, enquanto que todos os fármacos diminuíram o extravasamento de hemácias comparados com o grupo controle ($p < 0,001$).

Summary

SILVA,J.C.F. Study of venous congestion after partial limb amputantion in rats: Protective effects of Allopurinol, Vitamin C, Tirofiban or Heparin in secondary ischemia. Tese (Doutorado) Sao Paulo, 2013 – Faculdade de Medicina da Universidade de Sao Paulo.

Venous thrombosis is the main complication of vascular microsurgery an early intervention is mandatory to rescue the flap, with a success rate of only 50% of surgical revisions; microcirculation thrombosis, oxygen free radicals production and edema are the main elements of ischemia/reperfusion (I/R) injury, and protective therapies aim to mitigate these changes. Antioxidants, antiplatelets and anticoagulants are used in different organs to control this injury. In this study, in a partial hind limb amputation model submitted to global ischemia, it was tested the protective effect of Allopurinol, Heparin, Tirofiban or Vitamin C during secondary ischemia after venous congestion. A hundred rats divided in five groups of 20 animals each were operated; after global ischemia of 90 minutes each group was injected into the contra lateral femoral vein one of the following solutions: 1 ml of saline solution NaCl 0,9% - control group (CG); 1ml of Allopurinol 45mg/kg - experimental group 1 (G1); 1ml of Heparin 200 UI/kg - experimental group 2 (G2); 1ml of Tirofiban 50 µg /ml - experimental group 3 (G3); 1ml of Vitamin C 100mg/kg - experimental group 4 (G4). Sixty minutes of limb reperfusion was performed, and a secondary period of limb ischemia started with the clamping of the femoral vein only (limb congestion) which lasted for 90 minutes (secondary ischemia). After that, the vein clamp was removed and a 60 minute reperfusion period was observed; at the end of the second reperfusion period, the right gastrocnemius muscle was removed and fixed in 10% formaldehyde, animals were euthanized with a lethal dose of Pentobarbital.

Muscle fibers were scored as uninjured or injured based on the morphology of individual fibers; interstitial edema and bleeding were graded on a four-point scale. The control group had more damaged muscle cells $54.6 \pm 10.6\%$ when compared to allopurinol $31.5 \pm 13.6\%$, heparin $24.7 \pm 11.7\%$, tirofiban $24.6 \pm 8.6\%$ and Vitamin C $21.3 \pm 8.6\%$ all reached statistical significance ($p < 0.001$); among the experimental groups, vitamin C had less injury than allopurinol ($p < 0.029$). These comparisons were analysed using ANOVA and post-hoc Tukey. The single use of Allopurinol, Heparin, Tirofiban or Vitamin C showed a protective effect on venous congestion after global ischemia, and Vitamin C was more effective than Allopurinol when compared both antioxidants. When evaluating the edema, only the antioxidants had statistically lower rates than the CG, whilst all drugs reduced the extravasation of red blood cells compared with the control group ($p < 0.001$).

Introdução

Com o avanço das técnicas cirúrgicas e a difusão da aplicação clínica da microcirurgia nas reconstruções nos últimos 40 anos, os retalhos microcirúrgicos atingiram índices de sucesso superior a 90% nos procedimentos eletivos. Muito se deve a experiência e domínio técnico dos cirurgiões e melhorias dos materiais e controles pós-operatórios aproveitando a maior versatilidade dos retalhos microcirúrgicos nas reconstruções. Entretanto, números mais expressivos de complicações e reintervenções são esperados nos reimplantes e revascularizações de tecidos, pois o tempo de anóxia é variável e ocorre maior exposição celular aos produtos metabólicos da isquemia e reperfusão.^{1, 2, 3, 4, 5, 6}

Estudos experimentais esclarecem a fisiopatologia dos danos gerados as células no período de isquemia e reperfusão dos tecidos. O entendimento das alterações metabólicas ocorridas nesse período permitiu o desenvolvimento de formas de terapias para proteção celular e resgate cujo objetivo é evitar um desfecho negativo.^{7, 8}

Quando se utilizam retalhos microcirúrgicos, as alterações intra e extracelulares e também na microcirculação ocorrem durante o inevitável período de isquemia, é a chamada isquemia primária, que se inicia com a secção do pedículo vascular do retalho e termina após o reestabelecimento do fluxo sanguíneo com as anastomoses microvasculares. Nem sempre tão evidentes neste momento, as alterações fisiológicas durante o tempo de anóxia, que varia em geral de 30 a 120 minutos, é bem tolerado pelos tecidos, mas os produtos do metabolismo gerados durante essa fase podem ter relação direta ao insucesso da cirurgia.⁹

A reperfusão dos tecidos é fundamental para a sobrevivência celular, reestabelece a nutrição e oxigenação vital para o funcionamento metabólico

celular. As alterações metabólicas ocorridas nessa fase de isquemia são transitórias e revertidas com o reestabelecimento do fluxo sanguíneo, com danos mínimos celulares. A reoxigenação tecidual, entretanto quando muito retardada, em contato com os produtos do metabolismo do período de anóxia produz elementos reativos capazes de lesar o próprio tecido.^{2, 10, 11, 12,13,14}

Embora seja um número baixo dentro das complicações, a obstrução do fluxo sanguíneo causando nova exposição dos tecidos à anóxia (isquemia secundária), pode acelerar o acúmulo de metabólitos potencialmente reativos e ter consequências mais devastadoras ao tecido. A isquemia secundária é em geral, menos tolerada, pois encontra um meio previamente sensibilizado e que já acumula substratos reativos potencialmente letais.^{15, 16, 17, 18}

A ampliação das indicações cirurgias com reconstrução tem aumentado as situações clínicas aonde se encontram maiores dificuldades técnicas e consequentemente aumentam o risco de complicações; as tentativas de salvamento de segmentos amputados em que o tempo de isquemia está aumentado, além da atual perspectiva dos transplantes compostos de membros e partes moles, exigem o conhecimento das alterações metabólicas intra e extracelulares ocorridos nos diversos períodos e a introdução de medidas protetoras mais eficientes ou métodos de salvamento com maior eficácia quando do aparecimento das complicações.¹⁵

O desejo de poder transferir ou revascularizar os tecidos faz parte do imaginário do homem há muitos séculos, como retratado no “Milagre da Perna Preta” sobre figura de transplante de perna realizado no século V d.C. por São Cosme e São Damião em Roma¹⁹. A realização de anastomoses vasculares e reimplantes teve destaque científico desde meados de 1900, sendo que muito

deste conhecimento deve ser creditado a Alexis Carrel, laureado em 1912 com o prêmio Nobel de Medicina pelo pioneirismo na cirurgia experimental com técnicas de anastomose vascular e de transplantes.^{19, 20, 21}

A cirurgia plástica reconstrutiva avançou neste período com a introdução dos retalhos tubulares por Filatov(1917)²² na Rússia e Gillies(1920)²³ nos EUA, mostrando a possibilidade de transferência de tecidos compostos `a distância para lesões no membro inferior. Estudos anatômicos e novos conhecimentos da anatomia vascular dos tecidos moles instigam os cirurgiões a transferir imediatamente os retalhos sem ficarem presos a seu pedículo vascular. Eram, entretanto limitados pelo pequeno diâmetro dos vasos e pela pouca eficácia nas técnicas de microanastomoses.^{22,23,24}

Essa barreira foi vencida por Jacobson e Suarez em 1960²⁵ que utilizaram a magnificação do campo visual cirúrgico com auxílio de microscópio permitindo refinamento técnico das anastomoses vasculares de vasos com diâmetro próximo a 2mm.^{26,27,28,29} Esse avanço técnico foi incorporado `a prática clínica, com os primeiros casos de reimplante nos anos 60 utilizando a magnificação ótica no auxílio das anastomoses vasculares;^{30,31,32} relataram melhores índices de sucesso dos procedimentos pouco tempo depois, nos anos 70, o início das transferências de tecidos compostos, os retalhos chamados na literatura inglesa de “free flaps” e traduzidos mais apropriadamente em nossa língua para retalhos microcirúrgicos, descritos por Buncke^{33,34}, Harii e Omori³⁵, Strauch e Murray³⁶, O’Brien³⁷ e outros.

Na América Latina Ferreira, no final do ano de 1972, realiza no Hospital das Clínicas da FMUSP o primeiro reimplante de membro utilizando os princípios técnicos da microcirurgia e pouco tempo depois as primeiras transferências livres

de retalhos, apresentados em 1978 em sua tese de livre docência com a experiência clínica inicial da aplicação da microcirurgia.³⁸

Desde então as aplicações clínicas da microcirurgia se expandiram e ganharam importância única no rol de técnicas de cirurgia reconstrutiva. Uma segunda fase de aprimoramento técnico e conhecimento científico, passou a ter maior relevância no índice de sucesso dos casos tratados. Os aspectos fisiopatológicos da isquemia e da reperfusão, a tempo foco dos estudos nos transplantes de órgão sólidos e outras condições clínicas de isquemia, cardiovascular, cerebral, do trato gastrointestinal e das obstruções arteriais agudas periféricas, motivaram a busca de conhecimento para controle das alterações intra e extracelulares que pudessem comprometer a viabilidade dos tecidos.

- Fisiopatologia da isquemia/reperfusão

A interrupção do fluxo sanguíneo pelas artérias com consequente estabelecimento da anóxia nos tecidos caracteriza o período de isquemia.^{13, 15} A lesão tecidual na isquemia primária ocorre por consumo das fontes de energia celular, pela ativação de vias com acúmulo de metabolitos tóxicos e resultante falência das funções intracelulares que perdem a capacidade de fluxo controlado pelas membranas, com consequente desarranjo intracelular. Pode ser considerada uma morte por desgaste.^{2, 9, 39, 40,41}

O tempo de exposição à anóxia e o nível de atividade metabólica dos tecidos são os fatores diretamente relacionados ao grau de lesão celular; alguns tecidos, com metabolismo celular muito elevado, como por exemplo o cérebro e

intestinos, são especialmente sensíveis a interrupção do fluxo sanguíneo; o tecido muscular esquelético e a pele são relativamente mais resistentes à isquemia. Alguns estudos demonstraram que a diminuição da temperatura (hipotermia), nestas condições, pode atuar de forma protetora, já que há diminuição das atividades metabólicas intracelulares, diminuição do consumo energético e menor acúmulo de metabólitos tóxicos, menor resposta inflamatória e menos edema;⁴² clinicamente observa-se com a hipotermia, um prolongamento do tempo crítico de viabilidade dos tecidos, constatado no aumento das taxas de sucesso dos reimplantes.⁴³

O ambiente anaeróbico intracelular ativa uma via de produção de ATP que gera acúmulo de metabolitos e queda do pH. A integridade estrutural da membrana fosfolipídica fica vulnerável quando os mecanismos de proteção e reparo assim como os de transporte, pela diminuição da disponibilidade energética celular, entram em colapso, resultando em desequilíbrio das trocas iônicas e influxo do íon cálcio.^{9, 10, 40, 44}

O influxo sanguíneo, após a remoção da obstrução arterial, inicia o período de reperfusão dos tecidos. O reestabelecimento da circulação promove a restauração das condições necessárias para a sobrevivência celular, mas paradoxalmente o influxo de oxigênio no tecido pode acelerar o processo de morte da célula. As alterações intracelulares ocorridas no período de isquemia podem desencadear uma reação celular irreversível e apoptose inevitável.^{9, 12, 13,}

14,15, 44

A lesão de reperfusão ocorre por uma exposição dos tecidos fragilizados durante a isquemia aos produtos reativos do metabolismo do oxigênio, que em contato com os substratos acumulados e pela presença de mediadores

inflamatórios, causam desarranjo celular e capilar e consequente extravasamento vascular.¹²

Na reoxigenação dos tecidos, o controle das reações de oxidação é essencial para saúde do tecido e recuperação com sucesso após a isquemia. Em condições normais diversos mecanismos antioxidantes celulares regulam os produtos reativos gerados no início da reperfusão; se a interrupção da oferta de oxigênio ocorrer por período prolongado, pode gerar acúmulo grande destes radicais e desequilibrar essa regulação.^{8, 15, 41, 45}

A fisiopatologia da lesão isquêmica e da lesão pela reperfusão são diferentes e envolvem alterações metabólicas e inflamatórias como componentes da lesão tecidual. A depleção dos ATP e acúmulo de metabólitos que ocorre durante a isquemia inicia um processo de desarranjo intracelular pelo efeito osmótico e por dano as membranas dos sarcolemas; o influxo de oxigênio após a reperfusão embora necessário para o reestabelecimento dos processos intracelulares dependentes de ATP, paradoxalmente reage com os produtos produzidos e acumulados durante a isquemia, gerando metabólitos oxiradicais ativados capazes de lesar as estruturas organizadas das membranas celulares através da peroxidação fosfolipídica. Zweier et al. reportou que o pico de geração de RLO no miocárdio ocorre nos primeiros 10 segundos da reperfusão;⁴⁶ hipótese corroborada por Bertuglia et al. que constataram um aumento de 72% dos RLO em até cinco minutos de reperfusão.⁴⁷ Portanto os efeitos mais deletérios da lesão de isquemia e reperfusão são causados imediatamente após a reperfusão do tecido isquêmico.^{8, 9, 10, 40, 44, 48, 49, 50, 51}

A lesão de isquemia e reperfusão (I/R) é modulada por complexa sinalização intracelular não totalmente conhecida, que dispara uma cascata

inflamatória aguda que resulta em disfunção e necrose celular. Os linfócitos são mediadores da lesão e do “fenômeno de não reperfusão” descrito por Ames et al. em 1968,⁵² caracterizada pelo edema tecidual, formação de trombos na microcirculação, vasoespasmo, aumento da permeabilidade vascular, adesão dos polimorfonucleados (PMN) e acidose celular.^{8, 12, 43, 53, 54, 55, 56}

Demonstrado por Hill e Ward(1971)⁵⁷ na reperfusão do miocárdio isquêmico e em diferentes estudos de isquemia intestinal,⁵⁸ em retalhos cutâneos⁵⁹ e de membros⁶⁰, os primeiros eventos da reperfusão sugerem uma expressão de “antígenos da isquemia” que são reconhecidos por imunoglobulinas IgM formando imunocomplexos que sinalizam para a ativação do complemento e formação de citocinas (interleucina 1 e 8) e C3a e C5a anafilotoxinas, indutoras da degranulação dos mastócitos. A ativação dos linfócitos e formação de complexos de ataque à membrana, mediam a lesão celular pela ativação do metabolismo do ácido aracdônico, propagador da sinalização inflamatória. Este promove uma ativação das plaquetas, induz um estímulo quimiotático e promove a expressão das moléculas de adesão que facilitam o rolamento dos neutrófilos e macrófagos nas vênulas pós capilares, princípio do processo do fenômeno de não reperfusão e ataque da membrana celular.^{8, 14, 40, 48, 54, 61, 62, 63, 64}

A lesão do endotélio vascular deixa o tecido conectivo subendotelial exposto à circulação sanguínea, inicia uma complexa sequência de eventos que resultará na formação do trombo vascular. A adesão plaquetária ao subendotélio é o estímulo para ativação das plaquetas, favorecendo a agregação e liberação de grânulos contendo histamina, serotonina, trombina, fator de ativação plaquetária, entre outros mediadores; a proliferação de receptores de

glicoproteína IIb/IIIa ativados na superfície plaquetária forma pontes de ligação com o fibrinogênio e outras plaquetas, resultando em um bloco plaquetário. Esse acúmulo de plaquetas ativadas, além de favorecer a formação de um trombo libera substâncias vasoativas como o tromboxane A₂, produto da via da ciclooxygenase, que estimula o agrupamento de mais plaquetas e promove diminuição no fluxo sanguíneo.^{1, 55, 61, 65, 66}

Estes mecanismos inflamatórios são mediadores do sistema de coagulação e agem como pró-coagulantes responsáveis pelas trombooses das vênulas pós-capilares e dos espasmos do sistema arterial.^{14, 67}

O óxido nítrico (NO) é um vasodilatador potente produzido pelo endotélio vascular que mantém o tônus basal da microcirculação, na homeostase vascular. Produzido a partir da L-arginina em reação com o NADPH(nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) tem papel importante na regulação da pressão sanguínea modulado pelo influxo celular do Ca²⁺. Na I/R há diminuição significativa da concentração de NO causando grande repercussão na motricidade dos vasos e também, por mecanismo não totalmente compreendido, a adesão e migração dos leucócitos pelo endotélio vascular, influenciando diretamente a permeabilidade dos capilares. Também, o consumo do NO pela reação com os radicais livres de oxigênio resulta na formação do radical peroxinitrito, radical extremamente reativo capaz de causar lesão direta celular, outro mecanismos de agressão do tecido, além de precipitar a vasoconstrição e a formação de trombos na microcirculação.^{8,13,15,44,68,69,70} A endotelina, potente vasoconstritor, também tem sua liberação estimulada pelos níveis reduzidos de NO na isquemia dificultando o reestabelecimento da circulação sanguínea normal.⁷¹

O controle do fluxo de cálcio através da membrana celular é um mecanismo ativo dependente de gasto energético. O período de anóxia e a diminuição das reservas energéticas celular é crítico nesta regulação; o metabolismo anaeróbico por períodos maiores que 2 horas já não supre todas as necessidades de gastos, causando supressão das bombas de cálcio na membrana fosfolipídica e aumento intracelular da concentração deste íon. A manutenção estável da concentração do cálcio intracelular tem importante papel nos processos fisiológicos de regulação enzimática e estabilização da membrana celular, produção de ATP mitocondrial e ainda regulação da endo e exocitose.^{8,9}

-Formação dos radicais livres de oxigênio (RLO)

O corpo humano está exposto a diferentes vias de estresse oxidativo de origem exógena pela alimentação e pelo meio ambiente e suas interações, e de origem endógena através das diversas reações metabólicas intracelulares principalmente nas mitocôndrias, nos processos de fagocitose e defesa celular, tanto nas trocas gasosas pulmonares.⁴⁵

As formas reativas do oxigênio e outros radicais livres tem envolvimento já conhecido na fisiopatologia do envelhecimento, do câncer e outras doenças; estes radicais ativos atacam proteínas, lipídios, carboidratos e o DNA, eventualmente causando lesões.⁷²

Os RLO são as moléculas mais reativas, não são toleradas em grande concentração nos meios celulares e por isso, mecanismos de inativação e remoção destes metabólitos agem conjuntamente para promover o equilíbrio iônico. Através da redução dos peróxidos ou seqüestro dos íons metálicos, ou também pela inativação por ligação molecular, ocorre inativação dos radicais ativados ou parada da cadeia de oxidação. Destacam-se nesse controle as

enzimas superóxido dismutase, catalase e peroxidase, os antioxidantes conhecidos como quelantes vitamina C, vitamina E, ácido úrico, bilirrubinas, carotenóides e flavonóides, e os tampões antioxidantes como a albumina, transferrina e ceratoplasmina.^{7, 8, 45, 73}

Muitas são as células produtoras de radicais livres de oxigênio nos tecidos isquêmicos; neutrófilos, mastócitos, monócitos, linfócitos, plaquetas ativadas entre outras células inflamatórias, além claro das células próprias do tecido, tem papel crucial como fonte deste metabólito ativado nas reações da xantina oxidase, da redução do ferro e do NADPH.^{12, 13, 59, 69}

Durante a isquemia o ATP é catabolizado para hipoxantina em reações em série que sedem energia : ATP- ADP -AMP- adenosina -inosina- hipoxantina-xantina.

Uma protease citoplasmática ativada pelo cálcio intracelular converte a Xantina Desidrogenase em Xantina Oxidase(XO). A XO é uma enzima do endotélio microvascular do músculo esquelético responsável pela produção da maior parte dos RLO; Na reperfusão a XO, por redução monovalente da molécula de oxigênio produz o ânion superóxido (O^{2-}), molécula instável que reage formando peróxido de hidrogênio (H^2O^2) espontaneamente. Metais de transição(ex: ferro, cobre) na presença de H^2O^2 , participam como catalisadores da reação com O^{2-} , formando radical citotóxico mais potente, o hidroxil (OH^-); reação esta conhecida como Haber-Weiss, chamada quando catalisada pelo Ferro de reação de Fenton.^{2, 8, 40}

Por outra via, o oxigênio consumido pelos neutrófilos ativados são convertidos quando associados com a NADPHoxidase da membrana em O^{2-} . A mieloperoxidase abundante nos neutrófilos catalisa a conversão de H^2O^2 para ácido hipocloroso (HOCl), outro oxidante citotóxico potente.

A lesão de I/R é mediada por oxiradicais (O^{2-} , OH^- , H^2O^2) gerados durante a reperfusão, que se originam dos produtos da isquemia em presença de oxigênio, estes RLO em abundância não são inativados completamente devido ao esgotamento dos mecanismos antioxidantes celulares, causando peroxidação lipídica dos ácidos graxos das membranas celulares, resultando em ruptura da integridade destas, além de reagir com proteínas e lipídios intracelulares amplificando a resposta inflamatória e progredindo para lesão celular irreversível.^{2, 7, 8, 40, 51, 61}

Qualquer evento que comprometa a circulação após o período de isquemia primária e reperfusão é chamado de isquemia secundária. Algumas complicações podem ocorrer após a liberação completa do fluxo, destacando-se as obstruções na anastomose vascular arterial ou venosa (falha técnica, hipotensão, hipercoagulabilidade ou desprendimento de placas da parede vascular) ou ação externa na parede dos vasos (compressão, hematoma ou acotovelamento).¹³

A obstrução arterial caracteriza-se pela palidez do tecido e enchimento capilar lento ou ausente, o tecido perde o turgor e fica mais frio quando comparado aos tecidos vizinhos, uma punção apresenta saída lenta de sangue mais escurecido ou apenas secreção serosa.⁷⁴

A obstrução venosa tem aspecto oposto com enchimento capilar rápido e coloração vinhosa escurecida, o tecido fica túrgido mas também pode ficar frio, quando realizada punção no retalho a saída de sangue é rápida e de aspecto escuro. O comprometimento venoso geralmente é mais comum que o arterial devido a fatores, como o sistema de fluxo sanguíneo mais lento favorecendo a estase, o maior risco de compressão extrínseca ou dobramento e torção devido a estruturação mais frágil da parede venosa.^{65, 74,75, 76 ,77 ,78 ,79}

É de fundamental importância o diagnóstico precoce da obstrução vascular arterial, venosa ou de ambos, pois somente a liberação do fluxo sanguíneo mantém a condição *si ne qua non* da viabilidade tecidual.

Diversos métodos de monitorização da perfusão tecidual foram desenvolvidos utilizando-se de aspectos clínicos, de imagem ou laboratorial tais como a temperatura, saturação de oxigênio, fluxometria por Doppler, glicemia tecidual; entretanto alguns sinais de confusão podem retardar o diagnóstico e comprometer o resultado cirúrgico.^{74, 80, 81}

A distinção da origem da obstrução arterial ou venosa, apesar de ocorrer com a mesma cirurgia exploratória, tem importância clínica pelo comprometimento mais intenso e precoce causado pela congestão dos tecidos.

^{6,13, 16, 17, 59, 66, 82, 83, 84, 85, 86,87}

Períodos curtos de oclusão venosa total resultam em lesão muscular precoce; Gabriel et al. realizaram estudo constatando que, após 60 minutos de obstrução venosa com reperfusão de 24 horas ocorre 75% de necrose do tecido muscular.⁶ A sensibilidade do tecido muscular à isquemia arterial ou venosa é reconhecida pela alta atividade metabólica deste tecido. Harashina et al. em estudos com retalhos cutâneos, demonstraram período crítico de oclusão venosa

de 8 horas com necrose de 100%.⁸⁸ Coordenados por Cunha, estudos prévios realizados no laboratório da FMUSP com modelo de amputação subtotal de membros em ratos, apresentaram períodos críticos de viabilidade de 3 a 4 horas quando realizada oclusão venosa, mais curtos quando comparado à resistência de 8 horas dos membros quando realizada a isquemia global.^{89,90} Resultados semelhantes foram obtidos por Nguyen et al. em estudos recentes, que também demonstram pior recuperação dos retalhos com congestão venosa em relação aos isquêmicos arteriais em qualquer tempo.⁹¹

No período inicial da oclusão venosa o fluxo arterial permanece preservado até o momento que a pressão extravascular é alta o suficiente para colapsar os capilares arteriais.⁶ O aumento da pressão vascular causa um extravasamento intenso para o espaço intercelular seguido de hemorragia da microcirculação; o edema resultante além de colapsar todo o sistema microcirculatório é também uma grande barreira para a difusão do oxigênio pelo tecido que justifica o estabelecimento de um ambiente isquêmico mesmo com o fluxo sanguíneo arterial intacto;^{16,17,66,84,91,92,93} Malizos et al. mostraram uma queda no pH tecidual quando realizada a obstrução venosa, que se estabiliza aproximadamente após 1 hora, sugerindo inativação metabólica celular depois desse período.⁸⁶

O pequeno influxo arterial de oxigênio no tecido durante a obstrução venosa até a completa isquemia parece servir de substrato para a produção de RLO. Alguns tratamentos propostos no controle dos RLO apresentaram alguma eficácia^{94,95}, mas sugerem uma etiologia multifatorial dos efeitos deletérios observado na congestão venosa que incluem edema, RLO e trombose. A utilização de aminoesteróides modulando a via inflamatória do ácido aracdônico,

inibindo a adesão leucocitária e migração dos neutrófilos também foi eficaz no controle da peroxidação lipídica e dano celular pós obstrução venosa.^{8, 82}

Alterações da microcirculação podem ser percebidas pelo reestabelecimento do fluxo sanguíneo que é mais lento após a desobstrução venosa, resultado da compressão extrínseca da microvasculatura e aumento da viscosidade intravascular (aumento do hematócrito/plaquetas)^{17, 66}; O edema tecidual ocorre já nos momentos iniciais da obstrução venosa, agindo o fluido intersticial como barreira a difusão do oxigênio dos capilares para a célula.^{84, 91}

-Terapias protetoras

A extensão de lesão de isquemia/reperfusão (I/R) tem relação direta com o tempo de anóxia e com o consumo metabólico do tecido. Uma série de propostas terapêuticas foram testadas como a expansão volêmica, hipotermia, trombólise e anticoagulação. Outras estratégias atacam os múltiplos mecanismos da lesão de I/R baseado na inibição da formação de oxiradicais ou sua neutralização utilizando quelantes dos radicais livres de oxigênio (RLO), controle da ativação do complemento e dos neutrófilos, prevenção da trombose microvascular ou sua trombólise, buscando atenuar a agressão e lesão celular.¹

Algumas intervenções visando contornar os danos causados durante a I/R foram propostos, como a atenuação dos oxiradicais utilizando antioxidantes, prevenção da formação de RLO utilizando inibidor da xantina oxidase, prevenção da adesão e migração dos neutrófilos, pré e pós-condicionamento isquêmico, vasodilatação, anticoagulação, inibição da agregação plaquetária, hipotermia, anticoagulação, entre outros.^{2, 5, 7}

O momento da intervenção terapêutica também foi motivo de inúmeras pesquisas. Os tratamentos pré isquêmicos nem sempre são possíveis pela diversidade de situações clínicas sujeitas a I/R tecidual aguda. O tratamento pós-isquêmico, entretanto, compreende todos os pacientes e podem ser iniciados antes da pré reperfusão, com função protetora ou após a reperfusão com objetivo de resgate.^{41,96,97}

Assim, quando consideradas as complicações que evoluem para isquemia secundária, a terapêutica adotada pode ter caráter protetor ou de resgate. A dificuldade de um diagnóstico precoce de uma obstrução arterial ou venosa, demonstrada pela quantidade de equipamentos e métodos já descritos com esta finalidade⁷⁴, expõe por algum período os tecidos já sensibilizados na isquemia primária a uma nova agressão tecidual até o cirurgião chegar ao diagnóstico, e iniciar reintervenção cirúrgica.

- Agentes antioxidantes e quelantes dos radicais livres de oxigênio (RLO)

Os benefícios de diferentes substâncias e agentes considerados antioxidantes se mostraram efetivos na inativação dos RLO. O sequestro dos radicais livres no espaço intra e também extracelular é um importante mecanismo de defesa contra o estresse oxidativo durante a I/R protegendo dos danos estruturais que a peroxidação lipídica pode causar nas membranas e organelas celulares.^{7,12,13,98}

Entre esses agentes tem destaque:

a- Vitamina C.

O ácido ascórbico chamado popularmente de vitamina C, é um composto endógeno hidrossolúvel conhecido pela grande capacidade de redução dos

radicais livres. A vitamina C e sua forma reduzida glutathione agem como primeira linha de defesa contra o estresse oxidativo pela sua atividade específica redutora de radicais ativados hidrossolúveis (superóxido e hidroxil) e quelante direto, além da ação antioxidante inespecífica em sinergismo com substâncias lipofílicas, por exemplo, na regeneração do tociferóxido em tocoferol, que protegem a membrana celular dos componentes responsáveis pela peroxidação lipídica.^{7, 8, 72, 99,100,101}

Taha et al.¹⁰² demonstraram o consumo da vitamina C na exposição a isquemia e reperfusão, e atenuação da peroxidação lipídica desde o início da reoxigenação; alguns outros estudos demonstraram o mesmo efeito protetor da vitamina C na lesão de reperfusão em diferentes tecidos, nos retalhos cutâneos¹⁰³, pulmonar¹⁰⁴, cerebral¹⁰⁵, renal⁷, cardíaco¹⁰⁶, hepático⁵¹ e intestinal^{107, 108}.

Sakagami e Stoh¹⁰⁹ entretanto, demonstraram um efeito oxidante da vitamina C in vitro, e agressão celular, que pode estar relacionado a concentração plasmática do fármaco. Foram utilizadas doses de 30mg/kg a 1000mg/kg de vitamina C nos estudos experimentais; o efeito protetor antioxidante do fármaco na isquemia/reperfusão dos tecidos tem sido alcançado com doses mais baixas, entre 30-100mg/kg; as altas doses do fármaco, próximas de 1000mg/kg, tem relação com lesão oxidativa por efeito direto e pela interação com íons metálicos.^{7,110,111}

b- Alopurinol

O alopurinol e seu metabólito ativo oxipurinol (aloxantina), atua na proteção celular através da inibição da xantina oxidase, enzima importante na formação dos RLO nas condições de isquemia e reperfusão tecidual. A reação em cadeia, descrita previamente, na qual o ATP fornece energia a célula durante

a isquemia resulta em acúmulo de hipoxantina, que no momento em que ocorre a reperfusão tecidual, a exposição destes produtos do metabolismo anaeróbico ao oxigênio desencadeia reações catabolizadas pela enzima xantina oxidase que resultarão em moléculas de oxigênio hiperreativas O_2^- , a presença do alopurinol é um importante inibidor dessa reação. Além disso, duas outras formas de diminuir a exposição dos tecidos aos radicais ativados do oxigênio, são atribuídos ao alopurinol com mecanismo não bem conhecido; um efeito direto quelante dos radicais livres e a atenuação da ativação e infiltração de neutrófilos, conhecida fonte de radicais ativados.^{98,112,113}

Demonstrado por Manson et al. em 1983¹¹⁴, a relação dos radicais livres com a perda de retalhos foi estudada utilizando um modelo de obstrução venosa induzida em retalhos fásciocutâneos em ratos, que demonstrou a formação dos radicais livres após a reperfusão e que agentes como o alopurinol poderiam evitar a produção destas substâncias tóxicas. Concannon et al.¹¹⁵ observaram em modelo de reimplante de membro de ratos submetidos a isquemia de 6 horas um aumento na taxa de sobrevida de 30% para 60% quando realizada a infusão de alopurinol imediatamente antes da reperfusão. Cunha et al.⁹⁰ dentro desta mesma linha de pesquisa, demonstraram a proteção dos tecidos musculares submetidos à isquemia global quando utilizado o alopurinol, corroborando resultados da literatura.¹¹

- Soluções de preservação

O uso de soluções preservadoras durante a isquemia quente de membros foi testada por diferentes autores e não há um consenso quanto ao benefício. Turk¹¹⁶ e Alper (2002)³, apresentaram resultados opostos desta modalidade de

terapia. A utilização rotineira nos transplantes de órgão de soluções preservadoras como a de Wisconsin, Stanford, Eurocollins entre outras, visa a proteção celular durante o período isquêmico do órgão, prolongando o tempo de preservação deste até sua reperfusão. As características metabólicas de cada órgão e tecido devem ser avaliadas para melhor configuração de uma solução específica para cada tipo celular. A estabilização das membranas celulares do tecido muscular estriado pela solução de Wisconsin, já foi testada neste modelo de amputação de membro de ratos e uma nova solução de preservação foi proposta por Silva¹¹⁷ com benefício, apoiando os resultados de Turk¹¹⁶

- Pré-condicionamento e pós-condicionamento

Murry et al. em 1986, originalmente demonstraram que períodos curtos de isquemia antes de expor o miocárdio a um período longo de anóxia, diminuía a área de infarto e a disfunção do miocárdio;¹¹⁸ Curtos períodos de isquemia antecedendo um período de isquemia com maior duração parece preparar o tecido as alterações que irão ocorrer na ausência de fluxo de oxigênio;¹¹⁹ O pré condicionamento isquêmico ativa um processo de sinalização celular que resulta no aumento da produção de antioxidantes endógenos, como exemplo a superóxido dismutase, aumentando assim os mecanismos de defesa e inativação dos produtos do metabolismo anaeróbio.¹¹⁷ Lee et al.¹²⁰ demonstraram os mesmos fundamentos avaliando a preservação da capacidade funcional do músculo esquelético após pré-condicionamento e isquemia de 60 minutos.^{2, 5, 41}

Estudo de Wang et al. testaram os mesmos princípios no momento da reperfusão, denominado pós-condicionamento, com a hipótese do controle e

oferta intermitente de oxigênio ao tecido ser possível modular a produção de RLO.¹²¹

- Anticoagulação

Diferentes regimes terapêuticos com objetivo de prevenção a trombose vascular foram propostos baseados principalmente na anticoagulação. Nahabedian et al. em 2004 propuseram a utilização da heparina antes da secção do pedículo dos retalhos, seguido de irrigação das anastomoses com heparina e utilização de dextran no pós operatório; Suh et al. (2004) também preconizaram irrigação das anastomoses com solução de heparina e no pós operatório utilização de aspirina(acido acetil salicílico) por 7 dias; Dassonville et al. (2007) utilizaram a heparina de baixo peso molecular; Pohlenz et al. (2007) mantiveram a heparina em bomba de infusão intravascular por 7 dias, enquanto que Nakamizo (2004) e Fukuiwa (2008) utilizaram a prostaglandina E1 por 5 dias no pós operatório, todos com resultados.¹²²

A heparina foi descoberta em 1916 por Mclean, pertencendo a família dos glicosaminoglicanos composta por polissacarídeos com peso molecular variando de 3000 a 40.000 dalton, com produção endógena pelos mastócitos, é o anticoagulante mais importante da prática clínica.¹²³ Utilizada habitualmente na profilaxia da trombose venosa e da tromboembolia, tem sua maior importância na prevenção das trombozes pós angioplastia coronariana do infarto miocárdico, nas hemodiálises, durante a perfusão extracorpórea e com ação protetora pós trombectomias, trombólises e nas revascularizações periféricas.¹²³

O bloqueio da cascata de coagulação pela ação da heparina como cofator da antitrombina III, ocorre através da inativação da trombina(fator II) e fator X, e

também com menor intensidade dos fatores de coagulação IX, X XI e XII; Com o controle da ativação da trombina, não ha estímulo para ativação dos fatores V e XIII e para o recrutamento das plaquetas, impedindo assim a conversão final do fibrinogênio em fibrina.^{65, 123 , 124 ,125, 126}

Nas microcirurgias vasculares a heparina e seus análogos fracionados é utilizada como profilaxia das trombozes das anastomoses arterial e venosa, além da perfusão isolada (wash out) dos retalhos no início do período de isquemia.^{127,128}

A anticoagulação com heparina tem meia vida de 60 minutos quanto injetada intra vascular e protege a microcirculação da trombose, baixa a viscosidade do sangue, diminui a permeabilidade vascular e edema tecidual pela ação anti-inflamatória. A parte do conhecido mecanismo anticoagulante, o bloqueio da resposta inflamatória local além de prevenir a formação dos trombos também melhora o fluxo sanguíneo arterial.¹²⁹ Essa ação anti-inflamatória já foi relatada em diferentes terapêuticas clinicas nos casos de asma¹³⁰ , colite ,obstrução arterial aguda⁵³ e queimaduras.^{131,132}

Estudos em diferentes modelos de isquemia e reperfusão miocárdica demonstraram uma diminuição dos efeitos lesivos ao tecido quando utilizada heparina; um grande numero de proteínas de grupos que incluem a anticoagulação e fibrinólise, metabolismo lipídico, fator de crescimento e apoptose celular, mediadores da resposta imune e de ativação do complemento, além da adesão e migração leucocitária podem interagir por ligações com a molécula da heparina, neutralizando a ativação de citocinas pro inflamatórias e consequentemente diminuindo a sinalização da resposta inflamatória.^{133 ,134}

Como efeito adverso do seu uso clínico, a heparina pode aumentar os índices de hematoma, hipercalcemia e também o risco de trombocitopenia induzido; a descontinuação do tratamento costuma reverter as alterações clínicas, que também podem ser inativada pela ação do sulfato de protamina (1mg/100unidades de heparina). O monitoramento do tempo de tromboplastina parcialmente ativada (TTPA) e do hemograma são necessários para ajuste individualizado da droga sendo uma razão de 1,5-2,5 adotado como “nível terapêutico”.^{123,124,125}

A glicoproteína IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) é um receptor da membrana plaquetária responsável pela ligação com a fibrina e outras plaquetas. A ação dos seus antagonistas são mais potentes na inibição da função plaquetária e risco de eventos trombóticos, que a aspirina e outros antiagregantes.¹³⁵ O tirofiban é um antagonista não peptídico do receptor de glicoproteína IIb/IIIa plaquetário utilizado como bloqueador da interação com o fibrinogênio e da ligação cruzada das plaquetas, portanto uma eficiente ação na prevenção do processo trombótico. Tem sido utilizado clinicamente nas síndromes coronarianas agudas e na rotina do pós cateterismo para desobstrução das coronárias como bloqueador da GPIIb/IIIa de preferência.¹³⁶

O bloqueio da agregação plaquetária e da sua ativação, tem efeito negativo no desencadeamento do metabolismo da ciclooxigenase e síntese das prostaciclina, e suas conseqüências já descritas previamente, portanto considera-se a ação dos inibidores da glicoproteína IIb/IIIa como limitadores também da resposta inflamatória.^{137,138,139,140,141,142}

O tirofiban tem meia vida de 2 a 2,5 horas e uma excreção renal preferencial, devendo ter sua dose ajustada em pacientes com problemas na

função renal. A eficácia comparada dos inibidores da GP IIb/IIIa (tirofiban, abciximab, eptibatide) no bloqueio plaquetário é semelhante, sendo que o abciximab tem risco de trombocitopenia mais elevados e de reações de hipersensibilidade e anafilaxia se administrado novamente.¹⁴³

-Trombólise

A trombólise por definição é um tratamento de resgate. O uso de agentes trombolíticos nas obstruções vasculares tem sua ação pela ativação do plasminogênio, que através da plasmina dissolve os coágulos de fibrina e também as ligações com o fibrinogênio e os fatores de coagulação VIII a XII. Trombólise tem sido utilizada nos casos de obstrução arterial aguda com sucesso, mas aumenta a incidência de sangramentos. Os agentes trombolíticos mais utilizados na prática clínica são a estreptoquinase, a urokinase e o rt-PA, com resultados efetivos no salvamento de retalhos.^{1,96,144,145}

Bui et al. em 2007, propuseram um protocolo de tratamento das trombozes vasculares de origem arterial e venosa consistindo de exploração cirúrgica, trombectomia com passagem de cateter de Fogarty, anticoagulação com heparina e trombólise do retalho em perfusão isolada com estreptoquinase 50.000 a 250.000 (5000U/ml) ou rt-PA 5 a 20mg (1mg/ml), com porcentagem de sucesso de 63%.⁷⁵ Outras causuísticas relatam índices de sucesso pós reexploração e trombólise do retalho entre 34 e 73 por cento.^{146,147} Panchapakesan et al determinaram como indicação de trombólise os retalhos explorados com reestabelecimento de bom fluxo arterial sem um retorno venoso compatível.¹⁴⁸

A estreptoquinase é uma enzima do grupo C estreptococcus beta-hemolítico, que ativa o plasminogênio para produzir a enzima plasmina. Sua

ação tem meia vida de aproximadamente 20 minutos e age pela degradação do fibrinogênio plasmático e dos fatores de coagulação. É conhecida sua antigenicidade podendo produzir reação alérgica como febre, urticária e broncoespasmo, não sendo recomendado sua reutilização dentro do prazo de um ano pelo risco de anafilaxia.¹

O rt-PA (recombinant tissue plasminogen activator) é um trombolítico específico da fibrina com mecanismo de ação envolvendo a conversão do plasminogênio em plasmina, com meia vida plasmática de 5 minutos, tem sido atribuído muitos benefícios ao seu uso nas trombozes venosas. Além de ter menor antigenicidade, tem ação mais rápida e apresenta menores incidências de complicações hemorrágicas quando comparado com outros agentes fibrinolíticos.^{1, 144, 149}

Uma anticoagulação tem se mostrado necessária no seguimento pós trombólises dos infartos agudo do miocárdio; o uso da heparina ou antiagregante plaquetário é recomendado até que o endotélio vascular esteja reparado e o risco de trombose diminua.^{144, 150, 151, 152}

Como podemos ver, diversas propostas terapêuticas protetoras e de resgate tem sido utilizadas com intuito de controlar ou ao menos diminuir os mecanismos de lesão celular entendidos na fisiopatologia da lesão de isquemia/reperfusão. Sabemos que há diferenças nos mecanismos de lesão da isquemia primária e secundária; não há consenso na literatura das terapias profiláticas a serem adotadas, tão pouco as de resgate.

Dando prosseguimento a linha de pesquisa sobre o tema, que estuda a isquemia/reperfusão em modelo experimental de membro posterior de rato, foi realizada uma isquemia secundária conseqüente a obstrução da veia e utilizado

um método de avaliação histológica de fragmentos musculares; pudemos assim estudar a eficácia de algumas terapias protetoras nas complicações relacionadas à insuficiência de drenagem venosa do tecido muscular.

O modelo de amputação subtotal de membro posterior em ratos com um ciclo de isquemia global primária seguido de isquemia secundária, por obstrução venosa isolada, procurou reproduzir condição clínica diária da microcirurgia reconstrutiva e sua complicação mais freqüente, a trombose venosa.

OBJETIVO

Foi formulada a hipótese que as drogas alopurinol, heparina, tirofiban e vitamina C, quando administradas separadamente no momento da reperfusão primária do membro, puderam conferir um efeito protetor celular durante uma congestão venosa no período pós operatório, diminuindo os danos celulares à isquemia secundária.

MÉTODO

A pesquisa experimental foi realizada no Laboratório de Microcirurgia e Cirurgia Plástica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - FMUSP (LIM04), sendo que todos os procedimentos seguiram os protocolos de cuidados submetidos à aprovação pela Comissão de Ética para análise de projetos de pesquisa- CAPPesq sob número 0001/09.

- Animais

Foram utilizados 109 ratos (*Ratus norvergicus*) de linhagem Wistar, com idade de 15 a 20 semanas, machos com peso corporal entre 290 a 380 gramas (media 345g). Todos os animais foram fornecidos pelo biotério central da FMUSP. O procedimento sempre realizado pelo mesmo pesquisador e os animais acondicionados individualmente em gaiolas com alimento e água filtrada (ad libitum) durante o período de análise, com temperatura do ambiente de 23 a 25 grau Celsius.

Foram excluídos e substituídos os animais que durante o procedimento evoluíram para óbito ou tiveram alguma complicação venosa ou arterial. O numero total de óbitos foi de 8 ratos, atribuídos as complicações anestésicas e distribuídos: 2 animais do controle, 2 animais do grupo alopurinol, 1 animal do grupo heparina, 2 animais do grupo tirofiban e 1 animal do grupo vitamina C; Foi verificado trombose venosa no teste de ordenhamento imediatamente antes da colocação do clampe para iniciar a congestão venosa em 1 animal do grupo vitamina C, atribuído a acotovelamento dos vasos femorais.

- Procedimento cirúrgico

Os animais receberam anestesia intraperitoneal com tiopental sódico(50mg/kg) e complementações quando necessário (10mg/kg). O membro

posterior direito e a região inguinal esquerda foram submetido a tricotomia. Posicionados na mesa de procedimentos em decúbito dorsal, os membros foram restritos apos ser realizada a marcação cirúrgica. (foto 1).

Foto 1 – Marcação cirúrgica

Incisados a pele e o tecido celular subcutâneo sobre as marcações prévias na região inguinal do membro posterior direito (foto 2).

Foto 2 – incisão inguinal direta

Os vasos epigástricos superficiais foram identificados à direita e realizada eletrocoagulação com bisturi bipolar (foto 3). Para magnificação do campo cirúrgico foi utilizado o microscópio cirúrgico Karl Kaps com aumento de 16 vezes para dissecação dos vasos femorais (foto 4);

Foto 3 – eletrocoagulação dos vasos epigástricos direito

Foto 4 – dissecção dos vasos femorais direito

Com eletrocautério bipolar os ramos vasculares cutâneos foram eletrocoagulados, e a secção dos músculos da porção proximal da coxa feita

circularmente após eletrocoagulação (foto 5), o nervo ciático foi identificado e seccionado (foto 6).

Foto 5 – secção muscular

Foto 6 – identificação do nervo ciático

O fêmur na sua porção proximal recebeu uma osteotomia com serra manual e uma cola instantânea foi utilizada para evitar o sangramento medular do mesmo; a amputação do membro posterior direito do rato foi completa sendo preservado apenas os vasos femorais, artéria e veia. (foto7a e 7b)

Foto7a – amputação subtotal

Foto 7b – amputação subtotal

Os músculos foram aproximados por pontos em U de nylon 5-0 e a pele suturada com nylon contínuo, mantendo-se via de acesso na parte interna da coxa para manipulação dos vasos femorais (foto 8).

Foto 8 – sutura da musculatura

Na coxa contralateral (esquerda) foi realizada incisão vertical e, sob visão magnificada do microscópio, isolados os vasos femorais e seu ramo inguinal para posterior infusão das drogas (foto 9).

Foto 9 – dissecação dos vasos epigástricos esquerdo

Após a constatação da presença do fluxo sanguíneo pelos vasos femorais pela manobra do ordenhamento (foto 10/11/12).

Fotos 10/11/12 – manobra do ordenhamento

Foi aplicado um clipe microvascular atraumático interrompendo o fluxo da artéria e veia direitos antes da emergência dos vasos epigástricos inferiores (foto 13).

Foto 13 – posicionamento do clampe microvascular (artéria e veia)

Novamente realizado o teste do ordenhamento e confirmada a interrupção do fluxo sanguíneo pelos vasos, iniciando-se assim a isquemia total do membro.

As vias de acesso foram fechadas com pontos simples de nylon 5-0, foi realizada reposição volêmica de 10ml através de infusão subcutânea de solução fisiológica de NaCl a 0,9% ao fim do procedimento. Os animais foram

acondicionados em gaiolas individuais com temperatura ambiente entre 23 e 25 graus Celsius.

Completado o período de isquemia quente de 90 minutos a sutura da coxa esquerda foi reaberta e a veia epigástrica superficial cânulada com agulha 29G. (foto 14)

Foto 14 – infusão da solução na veia epigástrica superficial esquerda

A sutura interna da coxa direita foi reaberta e confirmada a obstrução vascular total pelo clipe microvascular; o mesmo foi então removido e pelo teste de ordenhamento, assim confirmado o reestabelecimento do fluxo pelos vasos femorais. Iniciou-se o primeiro período de reperfusão por 60 minutos. No mesmo momento da reperfusão foram injetado separadamente as soluções na veia epigástrica superficial esquerda cânulada no volume de 1 ml (soro fisiológico, heparina, vitamina C, alopurinol e tirofiban) definindo os grupos de estudo.

Foram divididos 5 grupos com 20 ratos em cada um:

Grupo Controle: injetado 1ml de solução fisiológica de NaCl 0,9% no momento da reperfusão em 20 ratos.

Grupo 1 (alopurinol): injetado 1 ml de solução contendo 45 mg/Kg de alopurinol em bolus no momento da reperfusão em 20 ratos.

O alopurinol (Allopurinol^R - Sigma-Aldrich) foi diluído em hidróxido de sódio 1 N até a solução completa da droga em pó. Nesta solução alcalina foi adicionado ácido clorídrico 1 N até início de precipitação do alopurinol sinalizando máxima solubilidade; foi adicionado uma gota final de hidróxido de sódio 1 N para dissolver o precipitado e acrescentado o volume necessário de água destilada para se obter a concentração final.(90)

Grupo 2 (heparina): injetado 1 ml de solução contendo 200UI/kg de heparina em bolus no momento da reperfusão em 20 ratos.

Grupo 3 (tirofiban): injetado 1ml de solução contendo 50µg/ml de Tirofiban em bolus no momento da reperfusão em 20 ratos.

Grupo 4 (vitamina C): injetado 1 ml de solução contendo 100mg/kg de vitamina C em bolus no momento da reperfusão em 20 ratos.

Após este período de reperfusão de 60 minutos a incisão da face interna da coxa direita foi reaberta e aplicado um clipe microvascular atraumático interrompendo o fluxo da veia femoral direita, próximo à emergência dos vasos epigástricos inferiores mantendo-se o fluxo arterial preservado; (foto 15).

Foto 15 – posicionamento do clampe na veia femoral direita

Realizado o teste do ordenhamento e confirmado a interrupção do fluxo sanguíneo pela veia femoral, iniciou-se o período oclusão venosa (isquemia secundária) do membro por 90 minutos.

Terminado o tempo de congestão, o microclampe vascular foi removido da veia femoral e observada a reperfusão venosa, confirmando a ausência de trombo no seguimento próximo ao ponto de colocação do microclampe vascular pela manobra do ordenhamento na veia femoral; foi estabelecido período de 60 minutos de reperfusão, e após este, a sutura cutânea e muscular do membro posterior direito foi desfeita, os vasos femorais ligados junto a emergência dos vasos epigástricos superficiais e os animais sacrificados através de overdose anestésica por injeção intraperitoneal de tiopental sódico.

O membro posterior foi dissecado imediatamente após a ligadura dos vasos e isolado o músculo gastrocnêmio, que foi armazenado em formol a 10% para realização de análises histológicas

- Análise histológica

O músculo gastrocnêmio foi mantido em formalina a 10% e depois fixado em parafina para realização de cortes de 4 micrometros transversais ao sentido das fibras na porção central do músculo e então corados com hematoxilina-eosina (HE). As laminae foram examinadas sobre um microscópio de luz com magnificação de 20 vezes; O patologista fotografou 10 campos por corte, sendo aleatoriamente escolhidas 05 destas imagens, que foram numeradas randomicamente (www.random.org) para avaliação, devido a natureza não uniforme da lesão de isquemia/reperfusão, que poderia resultar em viés da análise do músculo. Todas as imagens foram examinadas por um mesmo patologista, com o auxílio de um marcador aleatório de 100 pontos equidistantes por campo (“multipurpose test-system”)^{154,155}, classificando 100 fibras musculares por campo sendo totalizado 500 miócitos analisados por lâmina.^{56,}

^{64,96,97}. Foto 16.

Foto 16 – Avaliação Histológica; HE 20X

Seguindo critérios histológicos, as lesões das fibras musculares foram classificadas como sem lesão, lesão moderada e lesão grave (necrose); foram consideradas sem lesão quando as células apresentavam bordas bem definidas e formato poligonal, textura e coloração uniforme, células satélites e núcleo pericelular; consideradas com lesão moderada quando apresentavam bordos definidos, formato redondo, textura e coloração irregular, núcleo pericelular; e lesão grave (necrose) quando apresentava se com perda do contorno de bordos, citoplasma com textura e coloração irregular e núcleo não identificado ou deslocado, aplicando o termo “fibras vermelhas esfarrapadas”, que corresponde a distorção das miofibrilas. ^{56,62, 63, 64,96,97}

As células foram pontuadas pelo grau de alteração histológica recebendo 0 ponto quando a célula foi classificada como íntegra e 1 ponto quando a célula foi considerada com lesão moderada ou apresentava lesão grave, conforme os

critérios descritos anteriormente, totalizando um escore com variação de 0 a 100 pontos por campo; ⁶³ a soma total dos cinco campos avaliados por lâmina foi então dividido por 500 - pontuação total dos campos dividido pelo número de fibras contadas (escore total de dano celular/500), expressando assim uma porcentagem da extensão da lesão muscular.

Foram também analisados a presença de edema e o extravasamento de hemácias para o espaço intercelular, através de escala de pontuação variando de 0 a 4 pontos em cada campo analisado; foi considerado 0 como ausência, 1 ponto - pouco presente ou mínimo, 2 pontos - presença moderada, 3 pontos - presença intensa e 4 pontos - presença muito intensa. O valor absoluto de cada campo foi somado (5 campos por lâmina), variando o resultado absoluto por animal de 0 a 20 pontos. ^{45,156} Foto 17.

Foto 17 – Avaliação histológica; HE 20X

- Análise estatística

Foi realizada a análise estatística com o auxílio do *software* estatístico R 3.0.2 (R Core Team, 2013) para obtenção dos resultados. Os dados como

medidas descritivas de posição (média, mínimo, máximo) e escala (desvio padrão) da porcentagem de extensão da lesão muscular e dos escores de edema e extravasamento de hemácias, foram analisados para cada um dos cinco grupos e então as médias dos grupos foram comparadas através de modelos de comparações múltiplas one way análise de variância – ANOVA e post-hoc Tukey. Foi utilizado um nível de significância de 5% ($p < 0,05$) para considerar as diferenças entre os grupos significativas estatisticamente.

RESULTADOS

O grupo controle apresentou uma taxa de lesão celular de 54,6% ($\pm 10,6$), que quando comparado com os grupos experimentais, que tiveram taxa de lesão celular de, Grupo 1 (alopurinol) 31,5% ($\pm 13,6$), do Grupo 2 (heparina) 24,7% ($\pm 11,7$), do Grupo 3 (tirofiban) 24,6% ($\pm 8,6$) e do Grupo 4 (vitamina C) 21,3% ($\pm 8,6$), que são diferentes estatisticamente do controle com $p < 0,001$ (tabela 1 e 2), representados no gráfico 1 e 2.

Tabela 1: Medidas do percentual de lesão celular

Grupo	n	Mínimo	1º Quartil	Média	Mediana	3º Quartil	Máximo	Desvio Padrão
controle	20	34	49	54.6	56	60	72	10.6
alopurinol	20	10	22	31.5	30	38	60	13.6
heparina	20	8	18	24.7	23	30	54	11.7
tirofiban	20	12	20	24.6	24	30	42	8.6
Vitamina C	20	10	14	21.3	21	26	36	8.6

Tabela 2. Coeficientes da ANOVA para percentual de lesão

Coeficiente	Estimado	Erro padrão	valor t	valor p
Intercepto	54,6	2,413	22,629	<0,001
alopurinol	-23,1	3,412	-6,77	<0,001
heparina	-29,9	3,412	-8,763	<0,001
tirofiban	-30	3,412	-8,792	<0,001
Vitamina C	-33,3	3,412	-9,759	<0,001

Gráfico 1. Boxplot do percentual de lesão por Grupo. g1 – alopurinol / g2 – heparina / g3 – tirofiban / g4 – vitamina C

Gráfico 2. Densidade suavizada do percentual de lesão por Grupo. g1 – alopurinol / g2 –heparina / g3 – tirofiban / g4 – vitamina C

Foi então complementada a comparação entre os grupos para porcentagem de lesão celular pela correção de Tukey; observou-se diferença estatística entre os grupos vitamina C e alopurinol com $p < 0,029$; não houve diferenças estatísticas quando comparados os outros grupos entre si, $p < 0,05$. Tabela 2.1

Tabela 2.1. Comparações múltiplas da regressão linear para percentual de lesão

Contraste	Diferença	IC para diferença (95%)		Valor de p ajustado
		Inf	Sup	
g1-controle	-23,1	-32,6	-13,6	<0,001
g2-controle	-29,9	-39,4	-20,4	<0,001
g3-controle	-30,0	-39,5	-20,5	<0,001
g4-controle	-33,3	-42,8	-23,8	<0,001
g2-g1	-6,8	-16,3	2,7	0,277
g3-g1	-6,9	-16,4	2,6	0,263
g4-g1	-10,2	-19,7	-0,7	0,029
g3-g2	-0,1	-9,6	9,4	1,000
g4-g2	-3,4	-12,9	6,1	0,856
g4-g3	-3,3	-12,8	6,2	0,869

Quando analisado o edema tecidual, o escore do grupo controle tem valor de 10,3($\pm$ 1,9), o G1 (alopurinol) tem 8,7($\pm$ 2,3), o G2 (heparina) 9,8($\pm$ 1,8), o G3 (tirofiban) 9,1($\pm$ 1,6) e o G4 (vitamina C) 8,6($\pm$ 3,6), com uma força estatística baixa, apenas o G1 e o G4 tem media de escore mais baixa estatisticamente comparado ao controle com $p < 0,05$, porém com sobreposição na distribuição dos grupos (tabela 3 e 4) representados no gráfico 3 e 4.

Tabela 3: Medidas resumo do escore de edema

Grupo	n	Mínimo	1º Quartil	Média	Mediana	3º Quartil	Máximo	Desvio Padrão
Controle	20	8	9	10.3	11	12	13	1.9
alopurinol	20	5	7	8.7	8	10	13	2.3
Heparina	20	6	9	9.8	10	11	13	1.8
Tirofiban	20	7	8	9.1	8	10	12	1.6
Vitamina C	20	1	6	8.6	9	12	14	3.6

Tabela 4. Coeficientes da ANOVA para escore de edema

Coeficiente	Estimado	Erro padrão	valor t	valor p
Intercepto	10,35	0,5223	19,815	<0,001
alopurinol	-1,65	0,7387	-2,234	0,028
heparina	-0,6	0,7387	-0,812	0,419
tirofiban	-1,3	0,7387	-1,76	0,082
Vitamina C	-1,8	0,7387	-2,437	0,017

Gráfico 3. Boxplot do escore de edema por Grupo Gráfico. g1 – alopurinol / g2 – heparina /g3 – tirofiban /g4 – vitamina C

Gráfico 4. Densidade suavizada do escore de edema por Grupo. g1 – alopurinol / g2 –heparina /g3 – tirofiban /g4 – vitamina C

Analisado o escore do extravasamento de hemácias, com valor de 9,0($\pm 3,1$) no grupo controle, 3,9 $\pm 3,0$ no G1 (alopurinol), 3,8 $\pm 3,2$ no G2 (heparina), 4,1 $\pm 2,3$ no G3 (tirofiban) e 4,2 $\pm 3,2$ no grupo G4 (vitamina C); todos os grupos experimentais apresentaram-se estatisticamente diferentes do grupo controle, com $p < 0,001$, (tabela 5 e 6) representados no gráfico 5 e 6.

Tabela 5. Medidas resumo o escore de sangue

grupo	n	Mínimo	1º Quartil	Média	Mediana	3º Quartil	Máximo	Desvio Padrão
controle	20	4	7	9.0	10	11	14	3.1
alopurinol	20	1	2	3.9	3	6	11	3.0
heparina	20	1	2	3.8	2	6	10	3.2
tirofiban	20	1	2	4.1	4	6	9	2.3
Vitamina C	20	1	2	4.2	3	7	10	3.2

Tabela 6. Coeficientes da ANOVA para escore de sangue

Coeficiente	Estimado	Erro padrão	valor t	valor p
Intercepto	9	0,6694	13,445	<0,001
alopurinol	-5,1	0,9467	-5,387	<0,001
heparina	-5,2	0,9467	-5,493	<0,001
tirofiban	-4,9	0,9467	-5,176	<0,001
Vitamina C	-4,85	0,9467	-5,123	<0,001

Gráfico 5. Boxplot do escore de sangue por Grupo. g1 – alopurinol / g2 – heparina /g3 – tirofiban /g4 – vitamina C

Gráfico 6. Densidade suavizada do escore de sangue por Grupo. . g1 – alopurinol / g2 –heparina /g3 – tirofiban /g4 – vitamina C

DISCUSSÃO

Com o avanço da cirurgia reconstrutiva e da técnica microcirúrgica, os índices de perda de retalhos microcirúrgicos em centros especializados são inferiores a 5% dos casos, geralmente associados as trombozes vasculares. Apesar da habilidade técnica dos microcirurgiões, a necessidade de reabordagem cirúrgica ocorre em cerca de 15% dos pacientes, já que a intervenção precoce buscando a reversão da interrupção do fluxo arterial ou do venoso constitui a única estratégia baseada em evidência que pode salvar o retalho; o sucesso destas revisões entretanto, ocorre em apenas 50% delas, o que justifica a constante busca de métodos de reconhecimento precoce do comprometimento vascular, e o vasto campo de pesquisa das terapias perioperatorias.^{65, 75, 92, 144, 148, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163}

Desde a descrição por Volkmann em 1881⁵³ das alterações musculares relacionadas à isquemia, como consequência do edema e extravasamento vascular, a tolerância dos tecidos à anoxia temporária tem sido estudada, com propostas de terapias protetoras ou de resgate para aumentar os índices de sucesso dos procedimentos que obrigatoriamente passaram por um período de privação do oxigênio. A compreensão da suscetibilidade dos tecidos, que varia em função da atividade metabólica dos mesmos, é de vital importância no planejamento e tratamento das afecções clínicas e cirúrgicas susceptíveis à fisiopatologia da isquemia e reperfusão tecidual.

O tecido muscular, quando restrito do metabolismo aeróbico, é o mais vulnerável tecido nos membros devido a sua intensa necessidade energética.⁵³ Belkin et al.¹⁶⁴ em 1988 já observaram que membros de rato submetidos à isquemia a partir do uso de um torniquete apresentava lesão muscular significativa após 3 horas. Outros autores destacaram o papel do estresse

oxidativo que é produzido durante o período de reperfusão, sendo a duração da isquemia o fator que mais influencia a severidade deste.⁴⁹ As alterações celulares do endotélio vascular durante a isquemia predispõe a formação dos radicais livres de oxigênio (RLO) e quando acontece a reoxigenação, estes produtos causam danos à integridade do leito microvascular.^{5,165}

Estudos anteriores da lesão celular durante o período de isquemia e reperfusão em diferentes tecidos e a irreversibilidade observada em algumas situações, deu origem ao termo “fenômeno de não reperfusão” descrito por Ames et al. em 1968⁵², que descreveram as causas da obstrução capilar no tecido cerebral como consequência de um período isquêmico, que hoje é utilizado para descrever lesão isquêmica grave de qualquer tecido; há hemoconcentração intravascular, microtrombose, obstrução capilar pelos leucócitos, edema do capilar endotelial, edema tecidual e compressão capilar extravascular, origens da não reperfusão tecidual, embora exista a hipótese que alguma lesão muscular celular irreversível anteceda estes eventos.¹⁶⁶ Pode se afirmar que a reperfusão do tecido isquêmico resulta em lesão celular e microvascular, aparentemente mediados pelos metabólitos reativos do oxigênio RLO e leucócitos PMN ativados;^{14,15, 49,167} agentes pro inflamatórios são produzidos e liberados a partir do estímulo dos oxidantes derivados da xantina oxidase, facilitando o rolamento, aderência e migração dos PMN. Schlag et al. observaram que o aumento da adesão leucocitária ocorre somente após 60 minutos de reperfusão em modelo de isquemia muscular por 2 horas.⁴⁹ Com aumento do tempo de isquemia o grau de envolvimento dos neutrófilos na lesão de reperfusão é maior e mais precoce. O controle dos níveis inflamatórios e dos elementos pro-trombóticos diminuem a lesão da fibra muscular; as cirurgias

eletivas podem ser antecedidas por terapias medicamentosas protetoras visando preservar os níveis de energia muscular celular e minimizando a produção de RLO.^{14,15, 49,55,168,169}

Infelizmente algumas situações clínicas que expõe o tecido a isquemia não podem ser controlados e drogas não podem ser utilizadas de forma protetora. Além disso, algumas drogas também elevam os riscos de sangramento e devem ser utilizadas com cautela nas terapias de resgate, diminuindo o número de pacientes expostos.

O reconhecimento precoce do comprometimento vascular de um retalho e sua reversão é fundamental para a sobrevivência do mesmo, entretanto se houver métodos de prolongamento da tolerância dos tecidos à isquemia e proteção durante a reperfusão pode haver benefício, mesmo nas complicações com reconhecimento mais tardio.

O risco de comprometimento vascular é maior nas primeiras 48 horas pós operatórias e constitui a complicação mais devastadora.^{5,75} Há uma prevalência da obstrução por agregação plaquetária nas trombozes arteriais, enquanto que os coágulos de fibrina são mais comuns na trombose venosa. O fluxo sanguíneo mais baixo e lento no período de reperfusão e também a instabilidade do endotélio vascular nas proximidades da anastomose microcirúrgica, favorecem a adesão das plaquetas e o desencadeamento da cascata de coagulação. O diagnóstico da insuficiência arterial geralmente é mais fácil e precoce que a obstrução venosa, justificando as diferentes características dos trombos arteriais e venosos, sendo o último mais organizado.^{124, 125, 144}

Durante a reperfusão uma hiperemia reativa é observada após a isquemia arterial e não após congestão venosa. As paredes vasculares encontram-se

relaxadas distalmente à oclusão arterial devido a baixa pressão intraluminal e ao acúmulo de metabolitos ácidos; com o fim da obstrução o fluxo vascular encontra os vasos no seu maior relaxamento. Na obstrução venosa, caracterizada pelo edema e aumento da pressão intravascular, há vasoconstrição mediada pelas fibras musculares da parede vascular e também uma compressão externa ao vaso, justificando uma reperfusão mais lenta dos capilares. A lesão do endotélio parece ser importante fator de injúria na reperfusão, já que ele é capaz de modular o tônus vascular e também liberar fatores vasodilatadores ou de ativação inflamatória⁸⁴; o aumento da permeabilidade do leito vascular, pela perda de junção das células endoteliais em sofrimento, permite o escape de proteínas e células e subsequente edema intercelular.¹⁷⁰

A mudança de coloração do retalho para um padrão vinhoso é um dos principais sinais de congestão venosa, já representando um estágio com alterações microvasculares instaladas e com potencial de lesão celular.^{74,144,152}

Mesmo na obstrução venosa há um pequeno influxo arterial, que aumenta a pressão intravascular e resulta em edema tecidual, servindo como barreira na difusão do oxigênio aos tecidos; as alterações metabólicas celulares e a ativação das vias inflamatórias pelo acúmulo de leucócitos ativados na presença de pequena quantidade de oxigênio, eleva as concentrações de RLO; o aumento da viscosidade e estase vascular favorece a formação de trombos na microcirculação.^{17,83,92}

A menor resistência dos retalhos à congestão venosa quando comparada a isquemia global se deve principalmente pelo grande comprometimento que ocorre na reperfusão da microcirculação, muito em função do aumento da pressão hidrostática do extravascular que o edema tecidual causa sobre a

arquitetura dos capilares^{83,92}. Na estase há um aumento da hemoconcentração resultando maior viscosidade, que também é fator da lenta reperfusão microvascular e hipercoagulabilidade. A viscosidade é determinada pelo hematócrito e em menor grau pela concentração de proteínas plasmáticas. A instabilidade do endotélio vascular e o fluxo sanguíneo turbulento através das anastomoses são estímulos potenciais para a adesão e agregação plaquetária, que podem causar uma obstrução física da passagem sanguínea. No endotélio vascular saudável não ocorre adesão de plaquetas e liberação de fatores pro-coagulantes a assim podemos considerar a lesão da parede endotelial como um fator determinante no disparo da via da coagulação e também a responsável pela facilitação do extravasamento dos componentes do sangue ao espaço intersticial.^{17, 66,157}

A agressão ao endotélio na congestão venosa se inicia no período de isquemia, sendo sugerido como causa da lesão uma combinação da isquemia por si e pelo aumento da pressão no sistema vascular causado pela estase. A lesão celular se prorroga com a reperfusão. Hjortdal et al. em 1994, observaram uma dilatação vascular causada pela estagnação do sangue, além de agregação de plaquetas degranuladas aderidas à parede dos vasos.⁶⁶ Tampões de fibrina, lesão celular endotelial, extravasamento de glóbulos vermelhos, plaquetas ativadas e edema são sem dúvidas os componentes precursores da lesão celular originados pela obstrução venosa.¹⁷

Neste estudo utilizamos um modelo experimental que buscava similaridade às situações clínicas comuns nas transferências microcirúrgicas de tecidos compostos (retalhos microcirúrgicos) e nos reimplantes de extremidades, uma vez que a complicação mais freqüente do período pós operatório é a

congestão venosa proveniente de uma trombose da anastomose vascular venosa sem o comprometimento inicial do fluxo arterial.⁹²

O tempo de isquemia primária de 90 minutos é compatível com o tempo médio habitual na prática clínica das transferências de retalhos microcirúrgicos. Estudos prévios demonstram que a isquemia primária de 60 a 120 minutos seguido de reperfusão de 60 minutos não causam comprometimento dos tecidos, notando-se alterações ultraestruturais pequenas mas sem desorganização celular, situação encontrada usualmente no pós operatório das reconstruções utilizando retalhos livres, onde não é comum se observar lesão tecidual após a recuperação apenas de um quadro de edema transitório.^{49, 166,167,170}

As obstruções vasculares, como já descrito, são as principais causas de perda de retalhos e a trombose de origem venosa é mais deletéria que a de origem arterial. O fluxo de baixa pressão e velocidade característico das veias e sua fragilidade estrutural, tornam as anastomoses venosas mais susceptíveis ao risco de compressão extrínseca e dobramento/torção com maior freqüência. A obstrução do fluxo causa uma congestão dos tecidos retrogradamente resultando aumento da pressão hidrostática vascular até que esta atinja a pressão sanguínea arterial e ocorra uma parada do influxo sanguíneo ao retalho, iniciando a isquemia secundária.^{10,83,92,171,172}

A isquemia secundária pela obstrução venosa foi estudada em modelo de retalhos epigástricos em ratos por Knox et al., que utilizaram um modelo de isquemia primária global de 120min e reperfusão, seguida de isquemia secundária pelo clampeamento venoso por 3 e 5 horas testando o efeito protetor da droga L-NAME (inibidor da síntese do óxido nítrico) com melhora da

sobrevida dos retalhos cutâneos.⁶⁹ Diederich et al. realizaram isquemia muscular em ratos e hipotermia durante a reperfusão primária, observando o efeito protetor desta intervenção durante um período de isquemia secundária de 3 horas devido a congestão venosa.⁹² Cunha et al. em 2007, demonstraram em modelo de reimplante de membro de rato um período crítico de viabilidade celular após obstrução venosa isolada entre 3 e 4 horas.⁸⁹ Utilizamos nesta pesquisa o modelo experimental de amputação subtotal de membro de rato descrito em 1991 por Concannon et al. e modificado por Cunha, que permite avaliar o comportamento do tecido muscular dentro de um sistema vascular de grande fluxo como é submetido um membro isolado. Esta linha de pesquisa que se iniciou com avaliações de isquemia primária e efeitos protetores de diversas terapias, também estudou soluções de preservação na isquemia primária e um modelo de congestão venosa isolada.^{89,90,115,173,174}

O modelo proposto agrupa dois momentos distintos de anóxia, estudados anteriormente de forma individual, que como observado possuem fisiopatologia diferentes quando tem origem arterial e origem venosa; além de dois períodos de reperfusão com características próprias, pós isquemia arterial e pós congestão venosa.

O momento de infusão das drogas imediatamente antes da liberação do microclampe dos vasos femorais, encontra um ambiente que foi exposto ao metabolismo anaeróbico com acúmulo de seus produtos, muito susceptíveis à formação de RLO na reexposição ao oxigênio; e também ainda não desencadeou a intensa sinalização inflamatória e ativação plaquetária, observada após o início da reperfusão.⁹⁷

A congestão venosa instituída minutos depois da primeira reperusão, tem ambiente celular em recuperação da agressão tecidual inicial; a entrada de pequeno influxo sanguíneo até sua completa estase, alimenta um tecido sensibilizado previamente com pequena quantidade de oxigênio, além de aumentar de forma progressiva a pressão hidrostática capilar e favorecer o extravasamento do fluido para o interstício celular.^{17,83}

A liberação do fluxo venoso não alivia de imediato a pressão retrograda intravascular; a microcirculação em estase venosa apresenta uma viscosidade sanguínea aumentada (pelo extravasamento) e hemoconcentração, pressão hidrostática extracelular aumentada, causando colapso da microcirculação venosa que dificulta o reestabelecimento do fluxo sanguíneo; além disso, o edema intersticial pode se comportar como uma barreira a difusão dos nutrientes ao tecido.^{16, 92, 93}

Para avaliação mais precisa, escolhemos a análise histológica da musculatura esquelética, que tem particularidades: os grupos musculares são compostos por 2 tipos de fibras que se misturam, fibras vermelhas lentas ou tipo I e fibras brancas rápidas ou tipo II, que diferem pelo seu metabolismo predominante oxidativo com capacidade de contração tônica, típico músculo utilizado nas contrações estáticas e para manutenção da postura, no tipo I; e anaeróbio pelo metabolismo predominante do glicogênio, responsáveis pelas contrações fásicas rápidas, característico dos músculos da locomoção, no tipo II.

⁵³ Essa composição muscular com ambas fibras musculares e seus distintos mecanismos de atividade metabólica, ficam evidentes quando se observa o conjunto muscular e as alterações heterogênicas das fibras ao microscópio. Células com intenso edema, com desarranjo citoplasmático e na membrana

fosfolipídica, podem ser observadas lado a lado de células com pouca alteração nas mesmas condições de fluxo de oxigênio. Diferentes grupos musculares já foram estudados e não se obteve um valor preditivo de sensibilidade quanto ao tipo de fibra muscular nos diferentes cenários de isquemia e reperfusão.

O músculo gastrocnêmio é do tipo misto, composto por fibras do tipo I e tipo II, respectivamente com metabolismos predominantemente oxidativo e glicolítico. O aspecto heterogêneo da sua formação permite uma análise mais ampla das alterações celulares nas fibras com predomínio de metabolismo rápido tanto quanto metabolismo lento, sendo possível avaliar o comportamento de ambas após a ausência de oxigênio e as consequências da sua reintrodução na via metabólica^{62,63,175,176}

Quanto à classificação das células como integras ou lesadas, é de fácil identificação e caracterização as células sem lesão celular, já nas células lesadas como a distinção do grau de lesão (moderado ou grave) nem sempre é tão clara, ocorre uma intersecção natural dos grupos que pode ser observada pelas nuances do grau de agressão à célula, e portanto agrupadas em um único grupo; o curto período de observação dos animais, limita quaisquer intercorrências que poderiam ocorrer no pós-operatório (tromboses e obstruções vasculares, infecção, autofagia) de forma não controlada, mas também não permite obter uma informação precisa das células que evoluiriam para necrose, ou ainda mais específico, qual célula terá déficit funcional completa.⁵⁶

A análise histológica do músculo seguiu os mesmos princípios de estudos que demonstraram que a avaliação histológica é uma mensuração direta da lesão celular que permite a distinção dos miócitos lesados e saudáveis com acurácia e permite uma extrapolação quantitativa da lesão muscular total.^{56,156}

Quanto a análise de parâmetros qualitativos como edema, inflamação, congestão, hemorragia, entre outros, tem sido realizada na literatura através de escalas, de pontuação, de faixa percentual ou cruzes, como forma de quantificar uma alteração não paramétrica. Bozkurt et al. avaliaram inflamação, edema, hemorragia, granulação e congestão de retalhos músculo-adipocutâneos de ratos com taxa de porcentagens de 0, menor que 25%, de 25-50%, de 50-75% ou mais que 75%, pontuando respectivamente de 1 a 5.^{10,156} Princípios de avaliação muito parecidos com os de Coban et al. na análise do edema, congestão e sangramento em retalho fasciais de rato.⁴⁵

Utilizando escala de pontuação de 0 a 4, respectivamente, ausência, mínimo, presença moderada, presença intensa e muito intensa, foi possível uma classificação quantitativa do edema e extravasamento de sangue para o interstício, permitindo inferir as alterações de permeabilidade do endotélio vascular ao fluido sanguíneo (edema) e para os elementos celulares (hemácias e células brancas).

As alterações celulares que poderão resultar em dano celular se iniciam no momento da isquemia primária inevitável na transferência dos retalhos ou em consequência da desvascularização de um segmento pós trauma. O acúmulo de metabólitos neste período de anóxia e a sinalização intracelular como consequência da diminuição da oferta energética, pode causar um colapso dos mecanismos celulares de homeostase e finalmente morte celular. O reestabelecimento do fluxo sanguíneo é a grande esperança de recuperação das funções celulares e essencial para recompor as necessidades energéticas e remoção dos produtos tóxicos, mas também pode ser um agravador das alterações teciduais já instaladas. Com o passar das horas após a reperfusão, os

danos celulares ocorridos no período de isquemia vão sendo sanados e o edema tecidual e a resposta inflamatória começam a diminuir, conseqüentemente as complicações também. A oxigenação do tecido pode promover reações de oxidação dos diversos produtos do metabolismo anaeróbico, produzindo elementos altamente reativos e danosos a microcirculação, excedendo o insulto isquêmico inicial.

A lesão de isquemia/reperfusão portanto envolve um mecanismo complexo de ativação imunológica, bioquímica e inflamatória; uma série de eventos celulares podem resultar na ativação da apoptose celular ou ainda sinalizar o aumento da resposta das imunoglobulinas e complemento, amplificando os danos teciduais.

As terapias de proteção dos tecidos expostos a isquemia e reperfusão são baseadas na diminuição do gasto metabólico celular, inativação dos radicais livres ou controle da resposta inflamatória e coagulação; enquanto as terapias de resgate geralmente visam a lise dos trombos na microcirculação.¹⁶⁶

Uma terapia eficaz no momento da primeira reperfusão poderia antecipar e bloquear a intensa produção e ação lesiva dos RLO, diminuir a sinalização inflamatória e portanto, regular a atração, o rolamento e adesão de leucócitos e polimorfonucleados, além de impedir também a ativação das plaquetas, que por sua vez estimula a cascata de coagulação.⁹²

O bloqueio da formação dos RLO e de seus efeitos deletérios, pode ser atingido por ação direta com redução dos radicais ativados, por ação antioxidante, ou através da inibição de sua síntese.

O alopurinol e seu metabolito ativo oxipurinol, inibidor da xantina oxidase, age bloqueando a gênese dos RLO, mas também há sugestão que ele também é um

quelante direto dos radicais livres.^{98,113} Concannon et al.¹¹⁵ e Cunha et al.⁹⁰, em modelos semelhantes de reimplante de membro em ratos, obtiveram resultados protetores aumentando a viabilidade dos membros quando utilizado o alopurinol após isquemia global; Feller et al. utilizaram a superóxido dismutase, outra enzima que catalisa o oxigênio ativado impedindo a formação de radicais hidroxil, também com sucesso demonstrado na melhora da função muscular pós isquemia quente.¹⁷⁷ Modelo de isquemia e reperfusão muscular em coelhos demonstrou a diminuição dos níveis de xantina oxidase e outros marcadores de radicais livre após o uso do alopurinol;⁷³ em ratos o alopurinol também foi eficaz diminuindo o edema muscular e a permeabilidade vascular pós I/R.^{71, 112, 170}

O alopurinol é o único fármaco antioxidante com ação direta na inibição da xantina oxidase que se utiliza na rotina clínica; o composto aprovado para uso terapêutico porém, só tem disponibilidade na apresentação oral, não sendo possível sua utilização injetável na prática clínica. Alguns estudos que não demonstraram efeito antioxidante efetivo do fármaco, talvez tenham resultados justificados pela disponibilidade plasmática reduzida após ingestão oral.

A vitamina C ou ácido ascórbico, antioxidante com alta dissolubilidade plasmática, é capaz de agir tanto no intracelular como no extracelular compondo a primeira defesa contra os oxidantes do endotélio. Sua efetiva ação como antioxidante inativa diretamente os radicais superóxidos e hidroxil, complementada com potente atuação como quelante no período pós reperfusão; seu forte poder redutor, pela doação de um íon hidrogênio, limita inicialmente a lesão celular marcada principalmente pela peroxidação lipídica que ocorre após a reperfusão, e conseqüentemente bloqueia a “lesão secundária”, caracterizada

pelo gatilho de ativação dos fatores inflamatórios e moléculas de adesão endotelial e todas as suas consequências.^{7, 72, 106, 108, 109,}

Lehr et al. em 1995,¹⁷⁸ apresentaram uma ação pouco discutida da vitamina C, relatando uma prevenção da ativação dos leucócitos, agregação plaquetária e da adesão do endotélio microvascular quando realizado um pré tratamento em ratos submetidos a isquemia e reperfusão, justificando os resultados observados de bloqueio da peroxidação das membranas celulares e não ativação do ciclo da resposta inflamatória.^{7, 12, 106, 111}

Estudos de isquemia/reperfusão do músculo esquelético como nos outros tecidos também apontam os efeitos protetores ácido ascórbico; Erkut et al observaram a diminuição dos níveis de xantina oxidase e da enzima malondialdeído, substratos da síntese dos radicais livres, e o aumento dos níveis de antioxidantes endógenos superóxido dismutase, catalase e glutatona, no período pós reperfusão sugerindo a manutenção das reservas quelantes intrínsecas.⁷³ Foram as mesmas conclusões de van den Heuvel et al. que sugerem também, que a utilização de antioxidantes hidrofílicos como a vitamina C, são capazes de manter a capacidade intrínseca de inativação dos RLO gerados no início da reperfusão e desta forma prevenir o desenvolvimento de lesão tecidual.¹⁷⁹

Porém, foi observado que em altas concentrações plasmática a vitamina C pode apresentar um comportamento pro-oxidante pela sua interação com íons de metais como o ferro e suas formas reativas,^{51, 156} e outros mecanismos pouco conhecidos.^{110, 111} Neste estudo a dose utilizada de vitamina C foi de 100mg/kg, também utilizada com efeito benéfico em outros tecidos.⁷

Os resultados obtidos com o uso dos antioxidantes alopurinol e vitamina C neste estudo estão alinhados com os dados de literatura referente a isquemia/reperfusão de diferentes tecidos e especificamente do músculo esquelético; diferentes modelos de reperfusão de músculo isolado, retalhos cutâneos e fasciocutâneos e de membro, utilizaram diferentes drogas antioxidantes como pré tratamento isquêmico ou com infusão pós isquemia arterial ou venosa no momento da reperfusão.

O uso do alopurinol neste modelo de isquemia/reperfusão e posterior isquemia secundária (congestão venosa) diminuiu significativamente a porcentagem de lesão celular quando comparado o grupo experimental (G1) ao grupo controle ($p < 0,001$). A infusão do alopurinol no momento de maior acúmulo de substratos do metabolismo anaeróbico da isquemia primária, promove uma inibição na síntese dos radicais livres de oxigênio e consequentemente menor agressão celular; no momento seguinte quando se instala a congestão venosa, o ambiente celular com resposta inflamatória mais controlada, apresenta menor edema ($p < 0,028$) e extravasamento celular intersticial ($p < 0,001$), entendendo desta forma que o endotélio vascular consegue manter a regulação da permeabilidade aos elementos celulares do sangue.

O fármaco vitamina C (G4) foi o grupo que mais diminuiu a porcentagem de lesão celular quando comparado ao controle ($p < 0,001$). A potente ação antioxidante, quelante e anti-inflamatória, promove proteção celular eficiente pela atuação ampla da droga na inativação dos RLO, destacando-se como o grupo experimental de menor porcentagem absoluta de lesão celular 21,3%. Embora a dose do fármaco utilizada seja considerada baixa (100mg/kg), o efeito protetor

do tecido durante a congestão venosa foi obtido, minimizando os riscos reversos de oxidação das grandes doses (1000mg/kg).^{7, 12, 73, 100, 103}

O desempenho comparado dos grupos experimentais referente aos dois antioxidantes(G1 e G4) apresenta um melhor resultado protetor celular com relevância estatística do grupo tratado com vitamina C ($p < 0,029$); justifica-se tal eficácia o fato da vitamina C ter ação mais difusa, observado no bloqueio oxidativo das diversas fontes de radicais ativados e ação intra e extracelular, enquanto o alopurinol tem ação primária mais específica intracelular, na inibição de uma das fontes de RLO, a via da xantina.

Diferentes protocolos de anticoagulação tem sido utilizados nos últimos anos sem um consenso, sendo que cerca de 95% dos microcirurgiões indicam alguma forma de profilaxia de trombozes nas reconstruções com retalhos microcirúrgicos e reimplantes. Baseado nas fisiopatologia da trombose pelos princípios de Virchow (estase, hipercoagulabilidade e lesão do endotélio vascular), a terapêutica profilática ideal visa aumentar o fluxo de sangue, diminuindo a viscosidade sanguínea e a agregação plaquetária, e minimizar o risco de formação de coagulo, além de diminuir o edema e regular a resposta inflamatória.^{122, 124, 125, 127, 180}

A heparina é o anticoagulante mais utilizado na prática clínica em diferentes situações¹²³ e além disso podemos destacar as propriedades anti-inflamatórias pela influencia indireta na agregação das plaquetas com a inibição da prostaciclina endotelial, condição que parece ter efeito protetor ao músculo esquelético durante a reperfusão.¹²⁷ O efeito protetor do endotelio da microcirculacao diminui o risco de trombose a permeabilidade vascular e consequentemente o edema.⁵³

A infusão da heparina ao final da isquemia primária no momento imediatamente anterior a reperfusão, promove uma estabilização do tecido com alterações do metabolismo anaeróbico devido sua ação anti-inflamatória, mantendo o leito vascular livre para a “lavagem” dos produtos do metabolismo isquêmico. A obstrução venosa subsequente, promove uma estase sanguínea em um ambiente vascular com baixa capacidade de coagulação, o que diminui o risco de formação de trombos e obstrução microvascular. O grupo experimental G2 que recebeu o fármaco heparina apresentou uma maior viabilidade muscular quando comparado ao grupo controle ($p < 0,001$).

A instabilidade do endotélio vascular também é uma condição que propicia a adesão e aglutinação de plaquetas, como já foi estudado na lesão de não reperfusão do miocárdio e cérebro; a aderência das plaquetas a matrix vascular ocorre pela interação da glicoproteína de superfície Ib com o fator de von Willibrand do subendotélio. 187) Além do efeito físico que o plugue de plaquetas pode causar a microcirculação, vários outros efeitos químicos tem início com a ativação plaquetária: liberação de tromboxane A2 e serotonina causando vasoconstrição; potencialização da cascata inflamatória pela ativação do fator VII e interleucina 1; sinalização e rolamento endotelial dos leucócitos; liberação de radicais livres e trombina. Todos estes efeitos colocam as plaquetas e suas interações como alvo na terapia de prevenção e tratamento das complicações relacionadas as técnicas de microcirurgia vascular e suas aplicações clínicas. ^{181, 182}

A utilização de antiagregantes é bastante difundida entre os microcirurgiões; diferentes drogas que inibem a adesão das plaquetas são utilizadas no período pós operatório visando proteger a microanastomose de

uma obstrução, já que neste ponto o endotélio vascular está lesado e a exposição da matrix subendotelial e o colágeno são fatores de alto risco para a formação de trombo.

A glicoproteína IIb/IIIa é a molécula da membrana celular plaquetária responsável pela ligação com a fibrina, fibrinogênio e com as outras plaquetas. A integridade do leito vascular além de outros fatores locais como a liberação endotelial do óxido nítrico (NO) e das prostaciclina, mantém o fluxo sanguíneo regular impedindo a adesão das plaquetas. A ruptura desta barreira endotelial desencadeia um estímulo de adesão plaquetária que favorece a formação de um tampão local e sinaliza a ativação das outras plaquetas, que irão expressar maior quantidade de glicoproteínas IIb/IIIa em sua superfície. Ligadas a partir da glicoproteína por pontes de fibrinogênio um plugue de plaquetas vai sendo formado, podendo interromper o fluxo sanguíneo por obstrução mecânica. Esse estímulo de ativação se propaga como sinalização inflamatória atraindo outros elementos sanguíneos que podem prorrogar a lesão tecidual.^{141,181}

O bloqueio da glicoproteína IIb/IIIa é utilizado como rotina nos procedimentos de cateterismo e desobstrução coronariana, devido a instabilidade gerada na superfície do endotélio vascular e conseqüente risco de formação de tampão plaquetário. Diferentes drogas foram desenvolvidas com esta propriedade, como o eptibatide, o abciximab e o tirofiban, sendo o último mais utilizado na prática clínica pelo menor risco de sensibilização e anafilaxia.

A utilização do Tirofiban neste estudo, grupo experimental G3, demonstrou uma maior viabilidade do tecido quando comparado ao grupo controle ($p < 0,001$); a ação discutida do efeito anti-inflamatório observado no bloqueio plaquetário e pela não formação de plugues na microcirculação, permite

o reestabelecimento do fluxo sanguíneo após a congestão e recuperação das alterações do metabolismo isquêmico.

Os inibidores da glicoproteína IIb/IIIa foram rapidamente incorporados ao tratamento clínico dos pacientes com risco de obstrução vascular por agregação plaquetária, mas alguns efeitos adversos são relacionados a sua utilização; casos raros mas muito graves de sangramento foram relatados após o uso do abciximab, que não possui um antagonista efetivo; o eptifibatide é um bloqueador mais específico plaquetário, e sua ação pode ser reversível, porém o alto custo e o risco de sensibilização imunológica dos antagonistas peptídeos, limitam sua utilização. O tirofiban por sua vez é um antagonista não peptídico com menor potencial de sensibilização e meia vida mais curta, portanto mais seguro com menores riscos de complicações.^{127, 183}

O edema intersticial que é observado no grupo controle também pode ser notado com menor intensidade, mas com baixa ou sem significância estatística, quando comparado aos grupos. A maior permeabilidade microvascular foi observada por Duarte et al., que relacionaram esta ao tempo de isquemia e consequentemente o aumento progressivo do grau de estresse oxidativo ao endotélio vascular.¹⁶⁵

Durante a isquemia secundária pela obstrução venosa, diferente do observado na isquemia arterial, o aumento da pressão hidrostática capilar ocorre durante a congestão venosa, que é um fator físico não controlado, e de forma passiva há um extravasamento de fluido para o interstício pela barreira endotelial vascular sob estresse anaeróbico.⁸³ Esse acúmulo de fluido intersticial além de dificultar a difusão do oxigênio e nutrientes às células, também pode causar uma compressão extrínseca aos capilares e vênulas, obliterando a luz

destes, que dificulta a passagem do sangue mais viscoso e retarda o reestabelecimento do fluxo venoso e a recuperação celular.^{16,93}

O controle dos diferentes mecanismos do estímulo inflamatório, específicos para cada droga utilizada, resulta menor extravasamento dos elementos celulares do sangue (hemácias e células brancas) em todos os grupos (G1, G2, G3 e G4) quando comparado ao grupo controle ($p < 0,001$); a maior integridade do endotélio vascular e a capacidade de controle da migração celular pela barreira endotelial, pode ser entendido como uma estimativa do dano celular na parede vascular; a funcionalidade da barreira endotelial é um sinal direto de preservação desta. Mesmo as drogas com efeito anticoagulante, como a heparina e o tirofiban, que intuitivamente se espera uma maior difusão das hemácias através da barreira vascular, marcam escore abaixo do controle e semelhantes aos fármacos antioxidante.

O aumento do conhecimento das alterações celulares e teciduais em cada fase da exposição dos tecidos a isquemia e reperfusão, seja de origem arterial ou venosa, possibilita o planejamento de estratégias para profilaxia farmacológica, que antecipa e previne os fatores causadores da lesão tecidual, e desta forma atinge maiores índices de sucesso nas reconstruções que utilizam os retalhos microcirúrgicos.

CONCLUSÃO

Podemos concluir que a hipótese proposta foi verdadeira. O tratamento com os fármacos antioxidantes alopurinol e vitamina C, anticoagulante heparina e o antiagregante plaquetário tirofiban, individualmente no momento da reperfusão primária em modelo de congestão venosa (isquemia secundária), tem efeito protetor da musculatura esquelética, diminuindo a porcentagem de lesão celular quando comparado os grupos experimentais com o grupo controle.

REFERÊNCIAS

1 - Atiyeh BS, Hashim HA, Hamdan AM, Moucharafieh RS. Local recombinant tissue plasminogen activator (rt-PA) thrombolytic therapy in microvascular surgery. *Microsurgery* 1999;19(6):265-71.

2 - Pang CY, Forrest CR, Mounsey R. Pharmacologic intervention in ischemia-induced reperfusion injury in the skeletal muscle. *Microsurgery* 1993;14(3):176-82. Review.

3 - Alper M, Ozek C, Erdem O, Denk M, Colen LB, Prewit R. Effects of University of Wisconsin and lactated Ringer's solutions to ischemia-reperfusion injury in isolated cremaster flap. *Microsurgery* 2002;22(2):69-73.

4 - Chen ZG ,Persons B ,Lin L ,Lineaweaver CW ,Zhang F. Vascular Endothelial Growth Factor Upregulates Inducible Nitric Oxide Synthase Expression in the Muscle Flap Ischemia Model in the Rat. *J reconstr Microsurg* 2009; 25(4): 219-225.

5 - Wang WZ, Baynosa RC, Zamboni WA. Update on ischemia-reperfusion injury for the plastic surgeon: 2011. *Plast Reconstr Surg*. 2011 Dec;128(6):685e-92e.

6 - Gabriel A, Chaney N, Stephenson LL, Zamboni WA. Effect of total venous occlusion on capillary flow and necrosis in skeletal muscle. *Plast Reconstr Surg* 2001 Aug;108(2):430-3.

7 - Korkmaz A, Kolankaya D. The protective effects of ascorbic acid against renal ischemia-reperfusion injury in male rats. *Ren Fail* 2009;31(1):36-43.

8 - Nanobashvili J, Neumayer C, Fuegl A, Sporn E, Prager M, Polterauer P, Malinski T, Huk I. Ischaemia/reperfusion injury of skeletal muscle: Mechanisms, morphology, treatment strategies, and clinical applications. *European Surgery* 2002 ,34 (2) , pp. 83-89.

9 - Brandão ML, Roselino JE, Piccinato CE, Cherri J. Mitochondrial alterations in skeletal muscle submitted to total ischemia. *J Surg Res* 2003 Mar;110(1):235-40.

10 - Nanobashvili J, Neumayer C, Fügl A, Punz A, Blumer R, Prager M, Mittlböck M, Gruber H, Polterauer P, Roth E, Malinski T, Huk I. Ischemia/reperfusion injury of skeletal muscle: plasma taurine as a measure of tissue damage. *Surgery* 2003 Jan;133(1):91-100.

11 - Seyama A. The role of oxygen-derived free radicals and the effect of free radical scavengers on skeletal muscle ischemia/reperfusion injury. *Surg Today* 1993;23(12):1060-7.

12- Ulug BT, Aksungar FB, Mete O, Tekeli F, Mutlu N, Calik B. The effect of vitamin C on ischemia reperfusion injury because of prolonged tourniquet application with reperfusion intervals. *Ann Plast Surg* 2009 Feb;62(2):194-9.

13- van den Heuvel MG, Buurman WA, Bast A, van der Hulst RR. Review: Ischaemia-reperfusion injury in flap surgery. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2009 Jun;62(6):721-6.

14 - Olivas TP, Saylor TF, Wong HP, Stephenson LL, Zamboni WA. Timing of microcirculatory injury from ischemia reperfusion. *Plast Reconstr Surg* 2001 Mar;107(3):785-8.

15 - Siemionowa M, Arslan E. Ischemia/reperfusion injury: a review in relation to free tissue transfers. *Microsurgery*. 2004;24(6):468-75.

16 - Angel MF, Mellow CG, Knight KR, O'Brien BM. Secondary ischemia time in rodents: contrasting complete pedicle interruption with venous obstruction. *Plast Reconstr Surg*. 1990 May;85(5):789-93; discussion 794-5.

17 - Hauge EM, Balling E, Hartmund T, Hjortdal VE. Secondary ischemia caused

by venous or arterial occlusion shows differential effects on myocutaneous island flap survival and muscle ATP levels. *Plast Reconstr Surg* 1997 Mar;99(3):825-33.

18 - Kerrigan CL, Wizman P, Hjortdal VE, Sampalis J. Kerrigan CL, Wizman P, Hjortdal VE, Sampalis J. Global flap ischemia: a comparison of arterial versus venous etiology. *Plast Reconstr Surg*. 1994 Jun;93(7):1485-95.

19 - Daigle JP, Kleinert JM. Major limb replantation in children. *Microsurgery*. 1991;12(3):221-31.

20 - Carrel A, Guthrie CC. Results of a replantation of the thigh. *Science*. 1906 Mar 9;23(584):393-4.

21 -Carrel, A: La technique operateire des anastomoses vasculaires et de La transplantation des visceres. Lyon Medical 1902; 98:850 (APUD Carrel A, Guthrie CC. The Reversal of the Circulation in a Limb. Ann Surg. 1906 Feb;43(2):203-15.

22 - FILATOV VP. Plastic procedure using a round pedicle. Vestn Oftalmol. 1945;24(3):9 ,citado em Mathes Plastic Surgery - second edition pg 22.

23 - Gillies HD. The tubed pedicle in plastic surgery. NY Med J 111:1, 1920, citado em Mathes Plastic Surgery - second edition pg 366 e 481.

24 - Gillies HD. The design of direct pedicle flaps. *Br Med J* 1932 Dec 3;2(3752):1008.

25 - Jacobson JH, Suarez EL. Microsurgery in Anastomosis of small vessels. *Surgical Forum* 1960;11:243-245.

26 - Chase MD, Hase MD, Schwartz SI. Consistent patency of 1.5 millimeter arterial anastomoses. *Surg Forum*. 1962;13:220-2.

27 - Chase MD, Schwartz SI, Rob C. A technique of small artery anastomosis. *Surg Gynecol Obstet*. 1963 Mar;116:381-4.

28 - Urschel HC Jr, Roth EJ. Small arterial anastomoses: II. Suture. *Ann Surg*. 1961 Apr;153:611-6.

29 - Salmon JH. Repair of small arteries. *J Cardiovasc Surg*. 1963 Feb;4:52-4.

30 - Kleinert HE, Kasdan ML, Romero JL. Small blood-vessel anastomosis for salvage of severely injured upper extremity. *J Bone Joint Surg Am*. 1963 Jun;45-A:788-96.

31 - Kleinert HE, Kasdan ML. Restoration of blood flow in upper extremity injuries. *Trauma*. 1963 Sep;3:461-76.

32 - Malt RA, Mckhann C. Replantation of several arms. *JAMA* 1964 Sep 7;189:716-22.

33 - Buncke HJ Jr, Schulz WP. Experimental digital amputation and reimplantation. *Plast Reconstr Surg*. 1965 Jul;36:62-70

34 - Buncke HJ Jr. Important advances in microsurgery. *Calif Med*. 1972 Jan;116(1):54.

35 - Harii K, Omori K, Omori S. Successful clinical transfer of ten free flaps by microvascular anastomoses. *Plast Reconstr Surg*. 1974 Mar;53(3):259-70.

36 - Strauch B, Murray DE. Transfer of composite graft with immediate suture anastomosis of its vascular pedicle measuring less than 1 mm. in external diameter using microsurgical techniques. *Plast Reconstr Surg.* 1967 Oct;40(4):325-9.

37 - O'Brien BM. *Plast Reconstr Surg.* 1973 Sep 52(3):271-8

38 - Ferreira, M.C. Transferência de retalhos cutâneos livres com microcirurgia vascular (tese livre docência) Faculdade de Medicina da USP 1978.

39 - Kerrigan CL, Stotland MA. Ischemia reperfusion injury: a review. *Microsurgery.* 1993;14(3):165-75. Review.

40 - Francischetti I, Moreno JB, Scholz M, Yoshida WB. Leukocytes and the inflammatory response in ischemia-reperfusion injury. *Rev Bras Cir Cardiovasc* 2010 Oct-Dec;25(4):575-84

41 - Pang CY, Forrest CR. Acute pharmacologic preconditioning as a new concept and alternative approach for prevention of skeletal muscle ischemic necrosis. *Biochem Pharmacol.* 1995 Apr 18;49(8):1023-34.

43 - Stefanutti G, Pierro A, Vinardi S, Spitz L, Eaton S. Moderate hypothermia protects against systemic oxidative stress in a rat model of intestinal ischemia and reperfusion injury. *Shock* 2005 Aug;24(2):159-64.

44 - Monassier JP. Reperfusion injury in acute myocardial infarction. From bench to cath lab. Part I: Basic considerations. *Arch. Cardiovasc Dis* 2008 Jul-Aug;101(7-8):491-500.

45 - Coban YK, Kurutas EB, Ciralik H. Ischemia-reperfusion injury of adipofascial tissue: an experimental study evaluating early histologic and biochemical alterations in rats. *Mediators Inflamm.* 2005 Oct; 24(5):304-8.

46 - Zweier JL, Flaherty JT, Weisfeldt ML. Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischemic myocardium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 Mar;84(5):1404-7.

47 – Bertuglia S, Giusti A. Microvascular oxygenation, oxidative stress, NO suppression and superoxide dismutase during postischemic reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003 Sep;285(3):H1064-71.

48 - Wang WZ, Baynosa RC, Zamboni WA. Therapeutic interventions against reperfusion injury in skeletal muscle. *J Surg Res* 2011 Nov;171(1):175-82.

49 - Schlag MG, Harris KA, Potter RF. Role of leukocyte accumulation and oxygen radicals in ischemia-reperfusion-induced injury in skeletal muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001 Apr;280(4):H1716-21.

50 - Zweier JL, Talukder MA. The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. *Cardiovasc Res*. 2006 May 1;70(2):181-90.

51 - Park SW, Lee SM. Antioxidant and prooxidant properties of ascorbic acid on hepatic dysfunction induced by cold ischemia/reperfusion. *Eur J Pharmacol*. 2008 Feb 12;580(3):401-6.

52 - Ames A 3rd, Wright RL, Kowada M, Thurston JM, Majno G. Cerebral ischemia. II. The no-reflow phenomenon. *Am J Pathol*. 1968 Feb;52(2):437-53.

53 - Blaisdell FW. The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: a review. *Cardiovasc Surg* 2002 Dec;10(6):620-30.

54 - Huang L. The impact of lidocaine on secondary ischemia injury of skin flaps. *Transplant Proc.* 2011 Sep;43(7):2550-3.

55 - Korompilias AV, Chen LE, Seaber AV, Urbaniak JR., Actions of glucocorticosteroids on ischemic-reperfused muscle and cutaneous tissue. *Microsurgery* 1996;17(9):495-502.

56 - McCormack MC, Kwon E, Eberlin KR, Randolph M, Friend DS, Thomas AC, Watkins MT, Austen WG Jr., Development of reproducible histologic injury severity scores: skeletal muscle reperfusion injury. *Surgery* 2008 Jan;143(1):126-33

57 - Hill JH, Ward PA. The phlogistic role of C3 leukotactic fragments in myocardial infarcts of rats. *J Exp Med.* 1971 Apr 1;133(4):885-900.

58 - Guzmán-de la Garza FJ, Cámara-Lemarroy CR, Alarcón-Galván G, Cordero-Pérez P, Muñoz-Espinosa LE, Fernández-Garza NE. Different patterns of intestinal response to injury after arterial, venous or arteriovenous occlusion in rats. *World J Gastroenterol.* 2009 Aug 21;15(31):3901-7.

59 - Zhang F, Hu EC, Topp S, Lei M, Chen W, Lineaweaver WC. Proinflammatory cytokines gene expression in skin flaps with arterial and venous ischemia in rats. *J Reconstr Microsurg* 2006 Nov;22(8):641-7.

60 - Harkin DW, D'Sa AA, Yassin MM, Young IS, McEneny J, McMaster D, McCaigue MD, Halliday MI, Parks TG. Reperfusion injury is greater with delayed restoration of venous outflow in concurrent arterial and venous limb injury. *Br J Surg* 2000 Jun;87(6):734-41.

61 - Gillani S, Cao J, Suzuki T, Hak DJ. The effect of ischemia reperfusion injury on skeletal muscle. *J. Care Injured* 2012;43:670–675.

62 - Chan RK, Austen WG Jr, Ibrahim S, Ding GY, Verna N, Hechtman HB, Moore FD Jr. Reperfusion injury to skeletal muscle affects primarily type II muscle fibers. *J Surg Res*. 2004 Nov;122(1):54-60.

63 - Chan RK, Verna N, Afnan J, Zhang M, Ibrahim S, Carroll MC, Moore FD Jr. Attenuation of skeletal muscle reperfusion injury with intravenous 12 amino acid peptides that bind to pathogenic IgM. *Surgery* 2006 Feb;139(2):236-43.

64 - Murphy AD, McCormack MC, Bichara DA, Nguyen JT, Randolph MA, Watkins MT, Lee RC, Austen WG. Poloxamer 188 protects against ischemia-reperfusion injury in a murine hind-limb model. *Plast Reconstr Surg* 2010 Jun;125(6):1651-60.

65 - Hanasono MM, Butler CE. Prevention and treatment of thrombosis in microvascular surgery. *J Reconstr Microsurg*. 2008 Jul;24(5):305-14.

66 - Hjortdal VE, Sinclair T, Kerrigan CL, Solymoss S. Venous ischemia in skin flaps: microcirculatory intravascular thrombosis. *Plast Reconstr Surg*. 1994 Feb;93(2):366-74.

67 - Khouri RK, Cooley BC, Kenna DM, Edstrom LE. Thrombosis of microvascular anastomoses in traumatized vessels: fibrin versus platelets. *Plast Reconstr Surg*. 1990 Jul;86(1):110-7.

68 - Chen ZG, Persons B, Lin L, Lineaweaver WC, Zhang F. Vascular endothelial growth factor upregulates inducible nitric oxide synthase expression in the muscle flap ischemia model in the rat. *J Reconstr Microsurg* 2009 May;25(4):219-25.

69 - Knox LK, Angel MF, Gamper T, Amiss LR, Morgan RF. Secondary ischemic tolerance improved by administration of L-NAME in rat flaps. *Microsurgery*. 1996;17(8):425-7.

70 - Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1991 Jun;43(2):109-42.

71 - Moreno JB, Francischetti I, Hafner L. Ischemia-reperfusion injuries in skeletal muscles: pathophysiology and new therapeutic trends focused on controlled reperfusion. *J Vasc Br* 2002;1(2):113-20.

72 . Niki E. Action of ascorbic acid as a scavenger of active and stable oxygen radicals. *Am J Clin Nutr* 1991 Dec;54(6 Suppl):1119S-1124S.

73 - Erkut B, Özyazıcıoğlu A, Karapolat BS, Koçoğulları CU, Keles S, Ateş A, Gundogdu C, Kocak H. Effects of ascorbic Acid, alpha-tocopherol and allopurinol on ischemia-reperfusion injury in rabbit skeletal muscle: an experimental study. *Drug Target Insights* 2007;2:249-58.

74 - van Adrichem LN, Gultuna I, Mulder HD, Hovius SE, van Strik R, van der Meulen JC. Differences between arterial and venous occlusion in microvascular surgery. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 1993;27(1):23-7.

75 - Bui DT, Cordeiro PG, Hu QY, Disa JJ, Pusic A, Mehrara BJ., Free flap reexploration: indications, treatment, and outcomes in 1193 free flaps. *Plast Reconstr Surg* 2007 Jun;119(7):2092-100.

76 - Brown JS, Devine JC, Magennis P, Sillifant P, Rogers SN, Vaughan ED. Factors that influence the outcome of salvage in free tissue transfer. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2003 Feb;41(1):16-20.

77 - Hoffmann J, Ehrenfeld M, Hwang S, Schwenzer N. Complications after microsurgical tissue transfer in the head and neck region. *J Craniomaxillofac Surg.* 1998 Aug;26(4):255-9.

78 - Talbot SG, Pribaz JJ., First aid for failing flaps. *J Reconstr Microsurg* 2010 Oct;26(8):513-5.

79 - Fukuiwa T, Nishimoto K, Hayashi T, Kurono Y. Venous thrombosis after microvascular free-tissue transfer in head and neck cancer reconstruction. *Auris Nasus Larynx* 2008 Sep;35(3):390-6.

80 - Disa JJ, Cordeiro PG, Hidalgo DA. Efficacy of conventional monitoring techniques in free tissue transfer: an 11-year experience in 750 consecutive cases. *Plast Reconstr Surg*. 1999 Jul;104(1):97-101.

81 - Jones NF. Intraoperative and postoperative monitoring of microsurgical free tissue transfers. *Clin Plast Surg*. 1992 Oct;19(4):783-97.

82 - Shin MS, Angel MF, Im MJ, Manson PN. Effects of 21-aminosteroid U74389F on skin-flap survival after secondary ischemia. *Plast Reconstr Surg* 1994 Oct;94(5):661-6

83 - Hjortdal VE, Hauge E, Hansen ES. Differential effects of venous stasis and arterial insufficiency on tissue oxygenation in myocutaneous island flaps: an experimental study in pigs. *Plast Reconstr Surg*. 1992 Mar;89(3):521-9.

84 - Chen KT, Mardini S, Chuang DC, Lin CH, Cheng MH, Lin YT, Huang WC, Tsao CK, Wei FC. Timing of presentation of the first signs of vascular compromise dictates the salvage outcome of free flap transfers. *Plast Reconstr Surg*. 2007 Jul;120(1):187-95.

85 - Chen KT, Mardini S, Chuang DC, Lin CH, Cheng MH, Lin YT, Huang WC, Tsao CK, Wei FC. Timing of presentation of the first signs of vascular compromise dictates the salvage outcome of free flap transfers. *Plast Reconstr Surg*. 2007 Jul;120(1):187-95.

86 - Malizos KN, Seaber AV, Urbaniak JR. A comparative study of the effect of arterial *and venous occlusion after various periods of ischemia*. *J Reconstr Microsurg*. 1990 Jul;6(3):271-7.

87 - Lozano DD, Stephenson LL, Zamboni WA. Effect of hyperbaric oxygen and medicinal leeching on survival of axial skin flaps subjected to total venous occlusion. *Plast Reconstr Surg*. 1999;104:1029-32.

88 - Harashima T, Sawada Y, Watanebe S. The relationship between venous occlusion time in island skin flaps and flap survivals. *Plast Reconstr Surg*. 1977;60:92-5.

89 - Cunha MS, Silva JCF da, Nakamoto HA, Fels KW, Ferreira MC. Estreptoquinase e oxigênio hiperbárico em congestão após reimplante de membro. *Rev Assoc Med Bras* 2007; 53(1): 29-33.

90 - Cunha MS, Silva JCF da, Nakamoto HA, Ferreira MC. Study of warm ischemia followed by reperfusion on a lower limb model in rats: effect of allopurinol and streptokinase. *Clinics*. 2005;60(3):213-20.

91 - Nguyen GK, Hwang BH, Zhang Y, Monahan JF, Davis GB, Lee YS, Ragina NP, Wang C, Zhou ZY, Hong YK, Spivak RM, Wong AK. Novel biomarkers of arterial and venous ischemia in microvascular flaps. *PLoS One* 2013 Aug 14;8(8):e71628.

92 - Diederich RS, Mowlavi A, Meldrum G, Medling B, Bueno RA, Neumeister MW. Local cooling provides muscle flaps protection from ischemia-reperfusion injury in the event of venous occlusion during the early reperfusion period. *Hand (N Y)*. 2009 Mar;4(1):19-23.

93 - Meldon JH, Garby L. The blood oxygen transport system. A numerical simulation of capillary-tissue respiratory gas exchange. *Acta Med Scand Suppl* 1975;578:19–29.

94 - Angel MF, Mellow CG, Knight KR, O'Brien BM. The effect of deferoxamine on tolerance to secondary ischaemia caused by venous obstruction. *Br J Plast Surg*. 1989 Jul;42(4):422-4.

95 - Knight KR, Angel MF, Lepore DA, Abbey PA, Arnold LI, Gray KA, Mellow CG, O'Brien BM. Secondary ischaemia in rabbit skin flaps: the roles played by thromboxane and free radicals. *Clin Sci (Lond)*. 1991 Mar;80(3):235-40.

96 - Crawford RS, Albadawi H, Atkins MD, Jones JE, Yoo HJ, Conrad MF, Austen WG Jr, Watkins MT. Postischemic poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibition reduces ischemia reperfusion injury in a hind-limb ischemia model. *Surgery* 2010 Jul;148(1):110-8.

97 - Crawford RS, Albadawi H, Atkins MD, Jones JJ, Conrad MF, Austen WG Jr, Fink MP, Watkins MT. Postischemic treatment with ethyl pyruvate prevents adenosine triphosphate depletion, ameliorates inflammation, and decreases thrombosis in a murine model of hind-limb ischemia and reperfusion. *J Trauma* 2011 Jan;70(1):103-10

98 - Sapalidis K, Papavramidis TS, Gialamas E, Deligiannidis N, Tzioufa V, Papavramidis S. The role of allopurinol's timing in the ischemia reperfusion injury of small intestine. *J Emerg Trauma Shock*. 2013 Jul;6(3):203-8.

99 - Yoshida WB, Campos EB. Ischemia and reperfusion in skin flaps: effects of mannitol and vitamin C in reducing necrosis area in a rat experimental model. *Acta Cir Bras*. 2005 Sep-Oct;20(5):358-63. Epub 2005 Sep 5.

100 - Sağsöz N, Kisa U, Apan A. Ischaemia-reperfusion injury of rat ovary and the effects of vitamin C, mannitol and verapamil. *Hum Reprod.* 2002 Nov;17(11):2972-6.

101 - Arslan E, Basterzi Y, Aksoy A, Majka C, Unal S, Sari A, Demirkan F. The additive effects of carnitine and ascorbic acid on distally burned dorsal skin flap in rats. *Med Sci Monit* 2005 Jun;11(6):176-180.

102 - Taha MO, Souza HS, Carvalho CA, Fagundes DJ, Simões MJ, Novo NF, Caricati-Neto A. Cytoprotective effects of ascorbic acid on the ischemia-reperfusion injury of rat liver. *Transplant Proc.* 2004 Mar;36(2):296-300.

103 - Zaccaria A, Weinzwieg N, Yoshitake M, Matsuda T, Cohen M. Vitamin C reduces ischemia-reperfusion injury in a rat epigastric island skin flap model. *Ann Plast Surg* 1994 Dec;33(6):620-3.

104 - Demertzis S, Scherer M, Langer F, Dwenger A, Hausen B, Schäfers HJ. Ascorbic acid for amelioration of reperfusion injury in a lung autotransplantation model in sheep. *Ann Thorac Surg.* 2000 Nov;70(5):1684-9.

105 - Henry PT, Chandy MJ. Effect of ascorbic acid on infarct size in experimental focal cerebral ischaemia and reperfusion in a primate model. *Acta Neurochir (Wien).* 1998;140(9):977-80.

106 - Dingchao H, Zhiduan Q, Liye H, Xiaodong F. The protective effects of high-dose ascorbic acid on myocardium against reperfusion injury during and after cardiopulmonary bypass. *Thorac Cardiovasc Surg.* 1994 Oct;42(5):276-8.

107 - Nakamura M, Ozaki M, Fuchinoue S, Teraoka S, Ota K. Ascorbic acid prevents ischemia-reperfusion injury in the rat small intestine. *Transpl Int* 1997;10(2):89-95.

108 - Higa OH, Parra ER, Ab'Saber AM, Farhat C, Higa R, Capelozzi VL., Protective effects of ascorbic acid pretreatment in a rat model of intestinal ischemia-reperfusion injury: a histomorphometric study. *Clinics* 2007 Jun;62(3):315-20.

109 - Sakagami H, Satoh K. Modulating factors of radical intensity and cytotoxic activity of ascorbate (review). *Anticancer Res.* 1997 Sep-Oct;17(5A):3513-20.

110 - Wayner DD, Burton GW, Ingold KU. The antioxidant efficiency of vitamin C is concentration-dependent. *Biochim Biophys Acta.* 1986 Oct 29;884(1):119-23.

111 - Kearns SR, Daly AF, Sheehan K, Murray P, Kelly C, Bouchier-Hayes D. Oral vitamin C reduces the injury to skeletal muscle caused by compartment syndrome. *J Bone Joint Surg Br.* 2004 Aug;86(6):906-11.

112 - Im MJ, Hoopes JE, Yoshimura Y, Manson PN, Bulkley GB. Xanthine:acceptor oxidoreductase activities in ischemic rat skin flaps. *J Surg Res.* 1989 Mar;46(3):230-4.

113 - Ciz M, Cizova H, Lojek A, Kubala L, Papezikova I., Ischemia/reperfusion injury of rat small intestine: the effect of allopurinol dosage. *Transplant Proc* 2001 Aug;33(5):2871-3.

114 - Manson PN, Anthenelli RM, Im MJ, Bulkley GB, Hoopes JE. The role of oxygen-free radicals in ischemic tissue injury in island skin flaps. *Ann Surg.* 1983 Jul;198(1):87-90.

115 - Concannon MJ, Dooley TW, Puckett CL. Improved survival in a replantation model containing ischemic muscle. *Microsurgery.* 1991;12(1):18-22.

116 - Turk JB, Zhang WX, Babajianian M, Urken ML, Biller HF, Weinberg H. The use of a new perfusate in experimental microvascular flaps: a threefold increase in ischemic tolerance. *J Reconstr Microsurg.* 1991 Oct;7(4):305-9;

117 - Silva RH. Avaliação de proteção celular a isquemia de retalhos musculares com soluções preservadoras de tecidos em modelo de ratos. (tese doutorado) Faculdade de Medicina da USP, 2009.

118 - Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986 Nov;74(5):1124-36.

119 - Rüdiger HA, Kang KJ, Sindram D, Riehle HM, Clavien PA. Comparison of ischemic preconditioning and intermittent and continuous inflow occlusion in the murine liver. *Ann Surg*. 2002 Mar;235(3):400-7.

120 - Lee HT, Schroedes CA, Shah PM, Babu SC, Thompson CI, Beloni FL. Preconditioning with Ischemia or Adenosine Protects Skeletal Muscle from Ischemic Tissue Reperfusion Injury. *Journal of surgical research* 1996; 63, 29–34.

121 - Wang WZ, Anderson G, Firrell JC, Tsai TM. Ischemic preconditioning versus intermittent reperfusion to improve blood flow to a vascular isolated skeletal muscle flap of rats. *J Trauma*. 1998 Nov;45(5):953-9.

122 - Brands MT, van den Bosch SC, Dieleman FJ, Bergé SJ, Merkx MA. Prevention of thrombosis after microvascular tissue transfer in the head and neck. A review of the literature and the state of affairs in Dutch Head and Neck Cancer Centers. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2010 Feb;39(2):101-6.

123 - Batty P, Smith G. Anticoagulation. *Surgery* 31:5 2013

124 - Askari M, Fisher C, Weniger FG, Bidic S, Lee WP. Anticoagulation therapy in microsurgery: a review. *J Hand Surg Am* 2006 May-Jun;31(5):836-46.

125 - Levin LS, Cooper EO. Clinical use of anticoagulants following replantation surgery. *J Hand Surg Am*. 2008 Oct;33(8):1437-9

126 - Freitas FA, Piccinato CE, Cherri J, Marchesan WG. Effects of pentoxifylline and heparin on reperfusion injury island skin flaps in rats exposed to tobacco. *J Surg Res* 2010 Nov;164(1):139-45.

127 - Jokuszies A, Herold C, Niederbichler AD, Vogt PM. Anticoagulative strategies in reconstructive surgery--clinical significance and applicability. *Ger Med Sci*. 2012;10:Doc01

128 - Cox GW, Runnels S, Hsu HS, Das SK. A comparison of heparinised saline irrigation solutions in a model of microvascular thrombosis. *Br J Plast Surg*. 1992 Jul;45(5):345-8.

129 – Hirsh J. Heparin. *N Engl J Med* 1991;324:1565-74

130 - Ahmed T, Smith G, Vlahov I, Abraham WM. Inhibition of allergic airway responses by heparin derived oligosaccharides: identification of a tetrasaccharide sequence. *Respir Res* 2012 Jan 23;13:6.

131 - Lakshmi RT, Priyanka T, Meenakshi J, Mathangi KR, Jeyaraman V, Babu M. Low molecular weight heparin mediated regulation of nitric oxide synthase during burn wound healing. *Ann Burns Fire Disasters* 2011 Mar 31;24(1):24-9.

132 - Troshev K, Dimitrov R. Application of heparin in the local treatment of burns. *Acta Chir Plast*. 2001;43(4):143-4.

133 - Young E. The anti-inflammatory effects of heparin and related compounds. *Thromb Res* 2008;122(6):743-52.

134 – Hua HT, Albadawi H, Entabi F, Conrad MF, Stoner MC, Houser S, Watkins MT. Effects of acute global venous obstruction and unfractionated heparin on muscle cytokine synthesis. *Ann Vasc Surg*. 2009 Jan-Feb;23(1):108-15.

135 - Topol EJ. Toward a new frontier in myocardial reperfusion therapy: emerging platelet preeminence. *Circulation*. 1998 Jan 20;97(2):211-8.

136 - Bledzka K, Smyth SS, Plow EF. Integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$: from discovery to efficacious therapeutic target. *Circ Res*. 2013 Apr 12;112(8):1189-200

137 - Chung TL, Pumplun DW, Holton LH 3rd, Taylor JA, Rodriguez ED, Silverman RP. Prevention of microsurgical anastomotic thrombosis using aspirin, heparin, and the glycoprotein IIb/IIIa inhibitor tirofiban. *Plast Reconstr Surg* 2007 Oct;120(5):1281-8.

138 - Yates YJ, Farias CL, Kazmier FR, Puckett CL, Concannon MJ. The effect of tirofiban on microvascular thrombosis: crush model. *Plast Reconstr Surg* 2005 Jul;116(1):205-8

139 - Ferguson JJ, Waly HM, Wilson JM. Fundamentals of coagulation and glycoprotein IIb/IIIa receptor inhibition. *Eur Heart J* 1998 Apr;19 Suppl D:D3-9.

140 - Cannon CP, Weintraub WS, Demopoulos LA, Vicari R, Frey MJ, Lakkis N, Neumann FJ, Robertson DH, DeLucca PT, DiBattiste PM, Gibson CM, Braunwald E. Comparison of early invasive and conservative strategies in patients with unstable coronary syndromes treated with the glycoprotein IIb/IIIa inhibitor tirofiban. *N Engl J Med*. 2001 Jun 21;344(25):1879-87

141 - Kuo YR, Jeng SF, Wang FS, Huang HC, Wei FC, Yang KD. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonist (abciximab) inhibited platelet activation and promoted skin flap survival after ischemia/reperfusion injury. *J Surg Res*. 2002 Sep;107(1):50-5.

142 - Molero L, Farré J, García-Mendez A, Jiménez Mateos-Caceres P, Carrasco Martín C, Millás I, Navarro F, Córdoba M, Casado S, López-Farré A. Endothelin-1

induced proinflammatory markers in the myocardium and leukocytes of guinea-pigs: role of glycoprotein IIb/IIIa receptors. *Cardiovasc Res.* 2003 Jan;57(1):109-18.

143 - Tcheng JE. Clinical challenges of platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor inhibitor therapy: bleeding, reversal, thrombocytopenia, and retreatment. *Am Heart J* 2000 Feb;139(2 Pt 2):S38-45.

144 - Casey WJ 3rd, Craft RO, Rebecca AM, Smith AA, Yoon S. Intra-arterial tissue plasminogen activator: an effective adjunct following microsurgical venous thrombosis. *Ann Plast Surg* 2007 Nov;59(5):520-5.

145 - Tran NV, Bishop AT, Convery PA, Yu AY. Venous congestive flap salvage with subcutaneous rt-PA. *Microsurgery* 2006;26(5):370-2.

146 - Yii NW, Evans GR, Miller MJ, Reece GP, Langstein H, Chang D, Kroll SS, Wang B, Robb GL. Thrombolytic therapy: what is its role in free flap salvage? *Ann Plast Surg.* 2001 Jun;46(6):601-4.

147 - Nakatsuka T, Harii K, Asato H, Takushima A, Ebihara S, Kimata Y, Yamada A, Ueda K, Ichioka S. Analytic review of 2372 free flap transfers for head and neck reconstruction following cancer resection. *J Reconstr Microsurg.* 2003 Aug;19(6):363-8.

148 - Panchapakesan V, Addison P, Beausang E, Lipa JE, Gilbert RW, Neligan PC. Role of thrombolysis in free-flap salvage. *J Reconstr Microsurg.* 2003 Nov;19(8):523-30.

149 – Ganz W. The Thrombolysis in Myocardial Infarction (TIMI) trial. Phase I findings. TIMI Study Group. *N Engl J Med.* 1985 Apr 4;312(14):932-6.

150 - Rinker BD, Stewart DH, Pu LL, Vasconez HC. Role of recombinant tissue plasminogen activator in free flap salvage. *J Reconstr Microsurg*. 2007 Feb;23(2):69-73.

151 - Stein B, Foster V. Antithrombotic therapy in cardiac disease. *Circulation* 1989; 80: 1501-1513.

152 – Pederson WC. Clinical Use of Anticoagulants Following Free Tissue Transfer Surgery. *J Hand Surg Am*. 2008 Oct;33(8):1435-6.

153 - Indications for fibrinolytic therapy in suspected acute myocardial infarction: collaborative overview of early mortality and major morbidity results from all randomised trials of more than 1000 patients. Fibrinolytic Therapy Trialists' (FTT) Collaborative Group. *Lancet*. 1994 Feb 5;343(8893):311-22.

154 - Weibel ER, Kistler GS, Scherle WF. Practical stereological methods for morphometric cytology. *J Cell Biol* 1966 Jul;30(1):23-38.

155 - Mandarim-de-Lacerda CA. Stereological tools in biomedical research. *An Acad Bras Cienc*. 2003 Dec;75(4):469-86. Epub 2003 Nov 4. Review. Erratum in: *An Acad Bras Cienc*. 2007 Mar;79(1):51.

156 - Bozkurt M, Kapi E, Kulahci Y, Gedik E, Ozekinci S, Isik FB, Celik Y, Selcuk CT, Kuvat SV. Antioxidant support in composite musculo-adipose-fasciocutaneous flap applications: An experimental study. *J Plast Surg Hand Surg* 2013 Jun 4.

157 - Mirzabeigi MN, Wang T, Kovach SJ, Taylor JA, Serletti JM, Wu LC. Free flap take-back following postoperative microvascular compromise: predicting salvage versus failure. *Plast Reconstr Surg* 2012 Sep;130(3):579-89.

158 - Kubo T, Yano K, Hosokawa K. Management of flaps with compromised venous outflow in head and neck microsurgical reconstruction. *Microsurgery*. 2002;22(8):391-5.

159 - Gill PS, Hunt JP, Guerra AB, Dellacroce FJ, Sullivan SK, Boraski J, Metzinger SE, Dupin CL, Allen RJ. A 10-year retrospective review of 758 DIEP flaps for breast reconstruction. *Plast Reconstr Surg*. 2004 Apr 1;113(4):1153-60.

160 - Blondeel PN, Arnstein M, Verstraete K, Depuydt K, Van Landuyt KH, Monstrey SJ, Kroll SS. Venous congestion and blood flow in free transverse rectus abdominis myocutaneous and deep inferior epigastric perforator flaps. *Plast Reconstr Surg*. 2000 Nov;106(6):1295-9.

161 - Vega S, Smartt JM Jr, Jiang S, Selber JC, Brooks CJ, Herrera HR, Serletti JM. 500 Consecutive patients with free TRAM flap breast reconstruction: a single surgeon's experience. *Plast Reconstr Surg*. 2008 Aug;122(2):329-39

162 - Smit JM, Werker PM, Liss AG, Enajat M, de Bock GH, Audolfsson T, Acosta R. Introduction of the implantable Doppler system did not lead to an increased salvage rate of compromised flaps: a multivariate analysis. *Plast Reconstr Surg*. 2010 Jun;125(6):1710-7.

163 - Khouri RK, Cooley BC, Kunselman AR, Landis JR, Yeramian P, Ingram D, Natarajan N, Benes CO, Wallemark C. A prospective study of microvascular free-flap surgery and outcome. *Plast Reconstr Surg*. 1998 Sep;102(3):711-21.

164 - Belkin M, Brown RD, Wright JG, LaMorte WW, Hobson RW 2nd. A new quantitative spectrophotometric assay of ischemia-reperfusion injury in skeletal muscle. *Am J Surg*. 1988 Aug;156(2):83-6.

165 - Duarte JA, Glöser S, Remião F, Carvalho F, Bastos ML, Soares JM, Appell

HJ. Administration of tourniquet. I. Are edema and oxidative stress related to each other and to the duration of ischemia in reperfused skeletal muscle? *Arch Orthop Trauma Surg* 1997;116(1-2):97-100.

166 - Urbaniak JR, Seaber AV, Chen LE. Assessment of ischemia and reperfusion injury. *Clin Orthop Relat Res*. 1997 Jan;(334):30-6.

167 - Suematsu M, DeLano FA, Poole D, Engler RL, Miyasaka M, Zweifach BW, Schmid-Schönbein GW. Spatial and temporal correlation between leukocyte behavior and cell injury in postischemic rat skeletal muscle microcirculation. *Lab Invest*. 1994 May;70(5):684-95.

168 - Forbes TL, Harris KA, Jamieson WG, DeRose G, Carson M, Potter RF. Leukocyte activity and tissue injury following ischemia-reperfusion in skeletal muscle. *Microvasc Res*. 1996 May;51(3):275-87.

169 - Carden DL, Smith JK, Korthuis RJ. Neutrophil-mediated microvascular dysfunction in postischemic canine skeletal muscle. Role of granulocyte adherence. *Circ Res*. 1990 May;66(5):1436-44.

170 - Appell HJ, Duarte JA, Glöser S, Remião F, Carvalho F, Bastos ML, Soares JM. Administration of tourniquet. II. Prevention of postischemic oxidative stress can reduce muscle edema. *Arch Orthop Trauma Surg*. 1997;116(1-2):101-5.

171 - Lozano DD, Stephenson LL, Zamboni WA. Effect of hyperbaric oxygen and medicinal leeching on survival of axial skin flaps subjected to total venous occlusion. *Plast Reconstr Surg*. 1999 Sep;104(4):1029-32.

172 - Sternbergh WC 3rd, Adelman B. The temporal relationship between endothelial cell dysfunction and skeletal muscle damage after ischemia and reperfusion. *J Vasc Surg*. 1992 Jul;16(1):30-9.

173 – Cunha MS, Silva JCF, Nakamoto H, Simão DT, Ferreira MC. Effect of allopurinol and hyperbaric oxygen therapy in a replantation model after warm ischemia in rats. *Rev. Col. Bras. Cir.* 2005; 32(2): 64-68.

174 - Cunha MS, da Silva JC, Nakamoto HA, Machado FA, Ferreira MC. Effect of IIb-IIIa glycoprotein inhibitors in a partial limb amputation model submitted to warm ischemia in rats. *J Reconstr Microsurg.* 2009 Jun;25(5):283-8.

175 - Carmo-Araújo EM, Dal-Pai-Silva M, Dal-Pai V, Cecchini R, Anjos Ferreira AL. Ischaemia and reperfusion effects on skeletal muscle tissue: morphological and histochemical studies. *Int J Exp Pathol.* 2007 Jun;88(3):147-54.

176 - Sternbergh WC 3rd, Adelman B. Skeletal muscle fiber type does not predict sensitivity to postischemic damage. *J Surg Res.*1992 Nov;53(5):535-41.

177 - Feller AM, Roth AC, Russell RC, Eagleton B, Suchy H, Debs N. Experimental evaluation of oxygen free radical scavengers in the prevention of reperfusion injury to skeletal muscle. *Ann Plast Surg.* 1989 Apr;22(4):321-31.

178 - Lehr HA, Frei B, Olofsson AM, Carew TE, Arfors KE. Protection from oxidized LDL-induced leukocyte adhesion to microvascular and macrovascular endothelium in vivo by vitamin C but not by vitamin E. *Circulation.* 1995 Mar 1;91(5):1525-32.

179 - van den Heuvel MG, Bast A, Haenen GR, Ambergen AW, Mermans JF, van der Hulst RR. The role of antioxidants in ischaemia-reperfusion in a human DIEP flap model. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2012 Dec;65(12):1706-11

180 - Xipoleas G, Levine E, Silver L, Koch RM, Taub PJ. A survey of microvascular protocols for lower-extremity free tissue transfer I: perioperative anticoagulation. *Ann Plast Surg.* 2007 Sep;59(3):311-5.

181 - Thiagarajan P., New targets for antithrombotic drugs. *Am J Cardiovasc Drugs* 2002;2(4):227-35.

182 - Barrabés JA, Inserte J, Agulló L, Alonso A, Mirabet M, Garcia-Dorado D. Microvascular thrombosis: an exciting but elusive therapeutic target in reperfused acute myocardial infarction. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*. 2010 Dec 1;10(4):273-83.

183 - Sternbergh WC 3rd, Makhoul RG, Adelman B. Heparin prevents postischemic endothelial cell dysfunction by a mechanism independent of its anticoagulant activity. *J Vasc Surg*. 1993 Feb;17(2):318-27.