

Tatiana de Moura

**Estudo da ação da estreptoquinase e do allopurinol em
retalhos cutâneos em ilha submetidos à isquemia
prolongada : estudo experimental em ratos**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Área de concentração : Cirurgia Plástica
Orientador: Prof. Dr. Rolf Gemperli

São Paulo

2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Moura, Tatiana de

Estudo da ação da estreptoquinase e do alopurinol em retalhos cutâneos em ilha submetidos à isquemia prolongada : estudo experimental em ratos / Tatiana de Moura. -- São Paulo, 2009.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Cirurgia.

Área de concentração: Cirurgia Plástica.

Orientador: Rolf Gemperli.

Descritores: 1.Estreptoquinase 2.Alopurinol 3.Traumatismo por reperfusão
4.Retalhos cirúrgicos 5.Radicaais livres

USP/FM/SBD-135/09

Aos meus pais, Archimedes e Vera, pelo amor incondicional

Aos meus irmãos, Lisandra e Junior, pela amizade eterna

Ao meu marido, Marcos, minha fonte de luz e paz

AGRADECIMENTOS:

Agradeço ao Professor Doutor Marcus Castro Ferreira, a quem admiro e respeito profundamente, por sempre ter me incentivado a seguir no caminho da pesquisa científica e vida acadêmica e por ter me apresentado à cirurgia plástica infantil quando ainda era acadêmica.

Ao Professor Doutor Rolf Gemperli pela sua orientação dedicada e cuidadosa.

À Disciplina de Cirurgia Plástica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, todos os assistentes, médicos colaboradores, estagiários, residentes e funcionários que de alguma forma contribuíram para minha formação.

Aos Doutores: Diógenes Laércio Rocha, Dov Charles Goldenberg, Fábio Ezo Aki, Fábio Busnardo, Henri Friedhofer, José Carlos Marques Faria, Júlio Moraes Besteiro, Miguel Modolin, Nivaldo Alonso, Paulo Tuma Jr., Wilson Cintra Jr; pelos ensinamentos preciosos.

Aos amigos Ary de Azevedo Marques e Eduardo Kawata Sakae pela ajuda incansável para a realização deste trabalho e pela amizade sincera.

Aos colegas: Natanael Ahn, Rogério Barbosa, Cássio Trevisan, Sabrina Bernal e Gustavo Damásio Magliocca, pela ajuda ao longo destes anos.

A Sra. Marinalva de Souza Aragão que não mediu esforços para me auxiliar no levantamento bibliográfico.

Ao Laboratório de Microcirurgia da Disciplina de Cirurgia Plástica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (LIM 04), principalmente as queridas Sra. Maria Aparecida Moreira de Oliveira, Sra. Silvana Biagioni, Sra Edna Rodrigues dos Santos e Sra. Roqueline Lago que sempre me acolheram com muito carinho.

Á Deus, por me dar força e direção.

Sumário:

1. Lista de Abreviaturas	06
2. Resumo	09
3. Summary	12
4. Introdução	15
5. Métodos	25
6. Resultados	37
7. Discussão	47
8. Conclusões	73
9. Anexos	75
10. Referências	82

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

I.V.	intra venoso
mg/kg	miligrama por quilograma
cm	centímetro
p	nível descritivo (estatística)
U.I./kg	unidades internacionais por quilograma de peso
%	porcentagem
NaCl	cloreto de sódio
ml	mililitro
N	normal
°C	graus Celsius
ATP	adenosina tri-fosfato
ADP	adenosina di-fosfato
AMP	adenosina mono-fosfato
XD	xantina desidrogenase
XO	xantina oxidase
NO	neutrófilo
OH ⁻	radical hidroxila
O ₂ ⁻	radical superóxido
O ₂	oxigênio molecular
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
RL	radical livre
PG	prostaglandina
TX	tromboxane
LTB	leucotrieno

PAF	fator agregador de plaquetas
NADPH	dinucleotídeo nicotinamida adenina
e ⁻	elétron
SOD	super óxido dismutase

RESUMO

Moura T. “Estudo da ação da estreptoquinase e do alopurinol em retalhos cutâneos em ilha submetidos à isquemia prolongada- estudo experimental em ratos” [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina. Universidade de São Paulo; 2009.

Objetivo: Estabelecer relação entre a sobrevivência de retalhos cutâneos em ilha submetidos à isquemia prolongada e o uso da estreptoquinase e do alopurinol administrados após o período de isquemia prolongado. **Método:** Foram utilizados 48 ratos machos da raça Wistar, com pesos entre 300 e 350g, divididos em quatro grupos com 12 cada um, sendo; grupo controle, alopurinol, estreptoquinase e associação de alopurinol com estreptoquinase, submetidos à dissecação de retalho epigástrico em ilha, seguido de clameamento do feixe vascular, por 8 horas em isquemia mista normotérmica. Após este período, as pinças foram retiradas e cada animal recebeu o esquema terapêutico proposto através de injeção intravenosa. A análise da sobrevivência dos retalhos foi realizada no sétimo dia de pós-operatório. Foram realizadas análises descritivas (% de área necrótica) e de variâncias, bem como, comparações múltiplas de Dunnett T3 entre os quatro grupos e o teste da mediana. **Resultados:** O grupo controle apresentou em média 79,88% de necrose da área total, aqueles que receberam alopurinol apresentaram em média 64,05% de necrose e o grupo que recebeu estreptoquinase apresentou em média 55,52% de necrose. Com a associação das duas drogas os ratos apresentaram em média 54,30% de área necrótica. Aplicando o teste Dunnett e o teste da mediana verificou-se de que o grupo estreptoquinase é o que possui o menor percentual de necrose neste estudo, e o que apresentou diferença estatística significativa em relação ao grupo controle. **Conclusão:** A administração sistêmica da estreptoquinase após 8 horas de isquemia mista normotérmica resultou em aumento da sobrevivência de

retalhos epigástricos em ilha em ratos, quando comparado à administração de alopurinol, associação do alopurinol e estreptoquinase e do grupo controle.

Descritores: Estreptoquinase, Alopurinol, Traumatismo por reperfusão, Retalhos cirúrgicos, Radicais livres.

SUMMARY

Moura T. "Study of the effect of streptokinase and alopurinol in island skin flaps submitted to prolonged ischemia - experimental study in rats." [Dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina. Universidade de São Paulo; 2009.

Summary:

Background: To establish a relation between the survival rate of island skin flaps submitted to a prolonged ischemia and the effect of streptokinase and allopurinol administered after the ischemic period. **Methods:** A total of 48 male Wistar rats, each weighing between 300 and 350 grams, separated in four groups of twelve each, as follows: control, allopurinol, streptokinase and association of allopurinol and streptokinase, were submitted to an epigastric island flap dissection followed by the epigastric vessel bundle clamping. Flaps remained this way for 8 hours in normothermic mixed ischemia. After the ischemic period, the clamps were removed and each rat received the therapeutic scheme proposed for the group through intravenous injections. Flap survival analysis was performed on the seventh post operative day. Variance and descriptive analyses (as a percentage of the necrotic area) as well as Dunnett-T3 multiple comparisons among the 4 groups and median tests were carried out. **Results:** Rats in the control group presented an average of 79.88% of necrosis in the flap total area; those which received allopurinol presented an average of 64.05% of necrosis whereas the group which received streptokinase showed an average of 55.52% of necrosis. With the association of both drugs, rats presented an average of 54.30% of necrosis in the flap total area. . By applying Dunnet test and the median test, we could verify that the streptokinase group had the lowest necrosis rate in this study. **Conclusion:** The systemic administration of streptokinase after 8 hours of normothermic global ischemia resulted in an increase

in survival rate of epigastric island skin flaps in rats, when compared to the administration of alopurinol, association of the two drugs and the control group

Key words: Streptokinase, Alopurinol, Reperfusion injury, Surgical flaps, Free radicals.

INTRODUÇÃO

O entendimento dos mecanismos da lesão por isquemia e reperfusão tecidual tornou-se um grande desafio na medicina nas últimas décadas. Isto se deve ao fato de ser um mecanismo de lesão presente em todos os tecidos, com conseqüências graves como a necrose tecidual, as seqüelas funcionais, podendo ocasionar até a morte do indivíduo. Lesões traumáticas, como amputações e esmagamentos; acidentes cardiovasculares; transplantes de órgãos e tecidos e reconstruções microcirúrgicas são exemplos onde o período de isquemia imposto ao tecido, seguido ou não da reperfusão, é fator determinante para a sobrevivência do tecido envolvido.

O tempo de isquemia crítico ² foi definido como o período máximo de isquemia que um tecido pode tolerar e ainda sobreviver sem que ocorram perdas teciduais. O tempo de isquemia médio se refere ao período em que ocorre necrose de 50% do retalho. Esses períodos variam de tecido para tecido, e baseados nestes valores que se infere a chance de determinados tecidos sobreviverem após a interrupção do fluxo sanguíneo.

Ames e cols.¹⁹, em 1968, submeteram coelhos a diferentes períodos de isquemia cerebral, observando que quanto mais longo este período, maior a lesão cerebral decorrente das obstruções vasculares. Foi, pela primeira vez, referido o fenômeno da não reperfusão tecidual. Este conceito consiste na não perfusão tecidual, a despeito da permeabilidade do pedículo, ou seja, não existe perfusão do leito capilar, mesmo com o pedículo principal livre, isto é sem trombose dos vasos.

A partir deste estudo ¹⁹, outros autores desenvolveram pesquisas deste fenômeno em outros tipos de tecido. Strock e cols. , em 1969, avaliaram a resposta vascular e alterações microvasculares do músculo esquelético submetido à isquemia. Gardner e cols., em 1983, estudaram a resposta miocárdica a diferentes períodos de isquemia, e verificaram a redução da extensão da necrose miocárdica com uso de quelantes de radicais livres. E finalmente May e cols.¹⁸, em 1978, descreveram o fenômeno da não reperfusão em retalhos cutâneos em coelhos, que foram submetidos a vários períodos de isquemia, e evidenciando que, quanto maior o tempo ao qual o tecido permanecia isquêmico, maior seria o retardo do enchimento venoso após a reperfusão.

Retalhos cutâneos são o principal alvo de estudos na área da cirurgia plástica, e de outras especialidades que praticam a cirurgia reconstrutiva.

Morujo ⁶², em 1961, descreveu a circulação sanguínea da pele, referindo-se a dois tipos de artérias, quais sejam, as musculocutâneas e as cutâneas diretas. Este conhecimento detalhado foi extremamente importante para a execução de retalhos cutâneos e musculocutâneos, permitindo enorme avanço da cirurgia reconstrutiva.

Outras características foram descritas para classificação dos retalhos, que podem ser divididos segundo o sentido da rotação, sua composição, localização da área doadora e seu pedículo.

Mc Gregor e Morgan ⁶², em 1963, classificaram os retalhos em axiais e ao acaso. Os axiais são retalhos com sistema arteriovenoso predominante,

anatomicamente reconhecido, ao longo do seu maior eixo, enquanto que os retalhos ao acaso não possuem padrão vascular definido.

Seguindo essa linha de classificação baseada no tipo de vascularização, em especial no pedículo, descreveram-se os retalhos em ilhas que são retalhos ligados a tecidos vizinhos apenas pelo seu pedículo vascular. Os retalhos livres, por sua vez, são retalhos transferidos para áreas receptoras distantes da sua origem, conectados através de anastomose vasculares a pedículos vasculares da área receptora; como retalhos em ilhas que tiveram seu pedículo vascular seccionado.

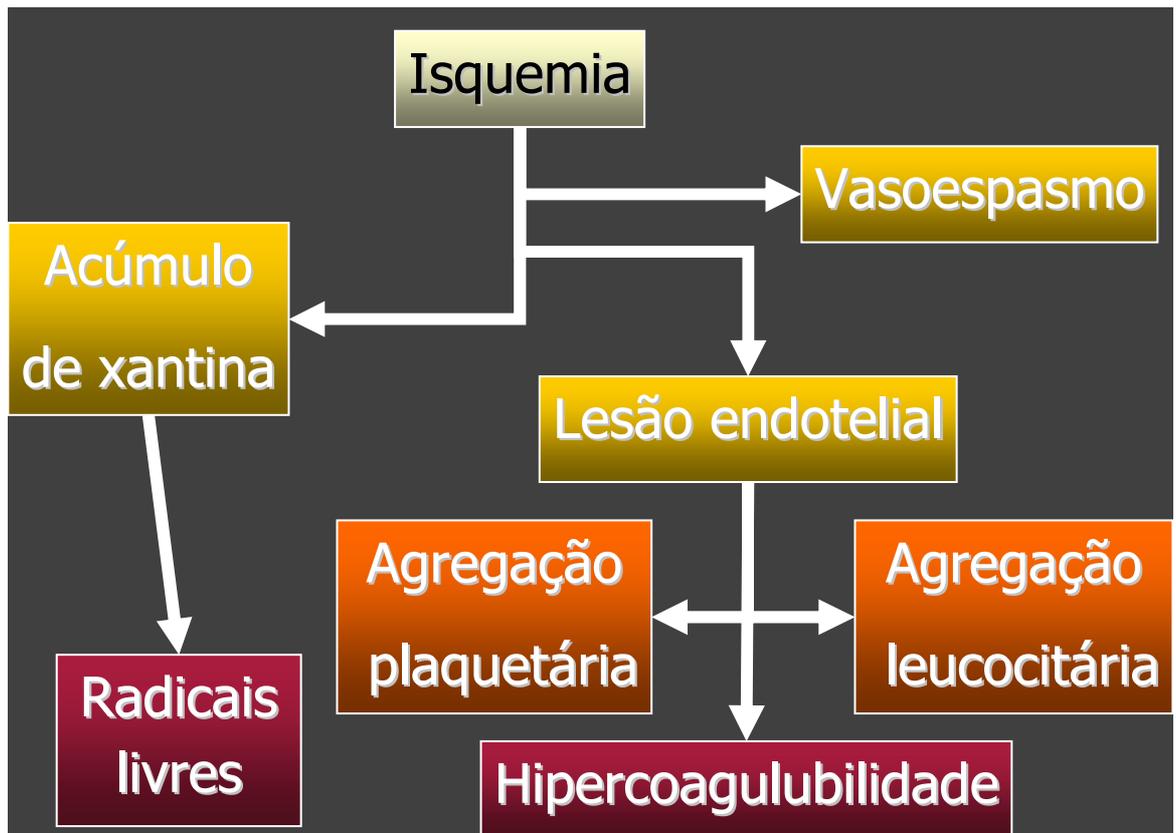
Os retalhos cutâneos ou musculocutâneos livres tem sido o método de eleição para reconstruções de grandes defeitos secundários à ressecção de tumores ou traumas extensos ³⁴. Durante o procedimento, o fluxo sanguíneo é desconectado por tempo variável, o que leva a uma condição isquêmica, chamada de isquemia primária, seguida da reperfusão ao término da anastomose nos vasos receptores. Após a realização das anastomoses o retalho ainda pode sofrer isquemia secundária por trombose do pedículo, o que significa o reinício de um novo ciclo isquêmico e maior dano tecidual.

Isquemia é a condição de aporte sanguíneo inadequado a uma porção de tecido caracterizada por oferta insuficiente de oxigênio. Nestas condições, as células iniciam o metabolismo anaeróbico. ⁵³

Quando ocorre trombose do pedículo (traumas, embolias ou pós-reconstrução microcirúrgicas) há um rápido aumento da pressão intraluminal, principalmente devido à trombose venosa, com edema

intersticial, que age como barreira para a difusão do oxigênio, levando à lesão das células endoteliais e exposição da matriz celular.¹ Plaquetas aderem à matriz subendotelial mediadas por colágeno, fibronectina e fator de Von Willebrand³⁶. Uma vez ativadas, as plaquetas degranulam, liberando ADP e serotonina, que induzem a agregação de outras plaquetas. Há também a liberação de trombina levando a conversão de fibrinogênio em trombo.³⁷

Além disso, células endoteliais lesadas perdem suas propriedades antitrombóticas e fibrinolíticas deixando de secretar prostaciclina, que é um antiagregante plaquetário e potente vasodilatador, ocasionando uma vasoconstrição.³⁷ Aliados a este estado de hipercoagulabilidade, PMN⁷ são recrutados ao local e toda a cascata inflamatória é ativada. Os leucócitos iniciam um processo em três fases, onde há um rolamento destas células pela parede do vaso, a adesão às células endoteliais e posterior migração para o interstício, onde causam inúmeros efeitos deletérios através da liberação de enzimas proteolíticas, produção de radicais livres e obstrução física da microcirculação a nível capilar^{29, 58}. A consequência clínica da perda funcional dos capilares (vasos de 7 a 100 μm) é a trombose da microcirculação resultando em ausência de reperfusão do tecido a despeito da permeabilidade dos vasos nutridores do tecido.^{18, 36, 56}



Reperusão é a restauração do fluxo sanguíneo, com oferta de oxigênio a tecidos isquêmicos.

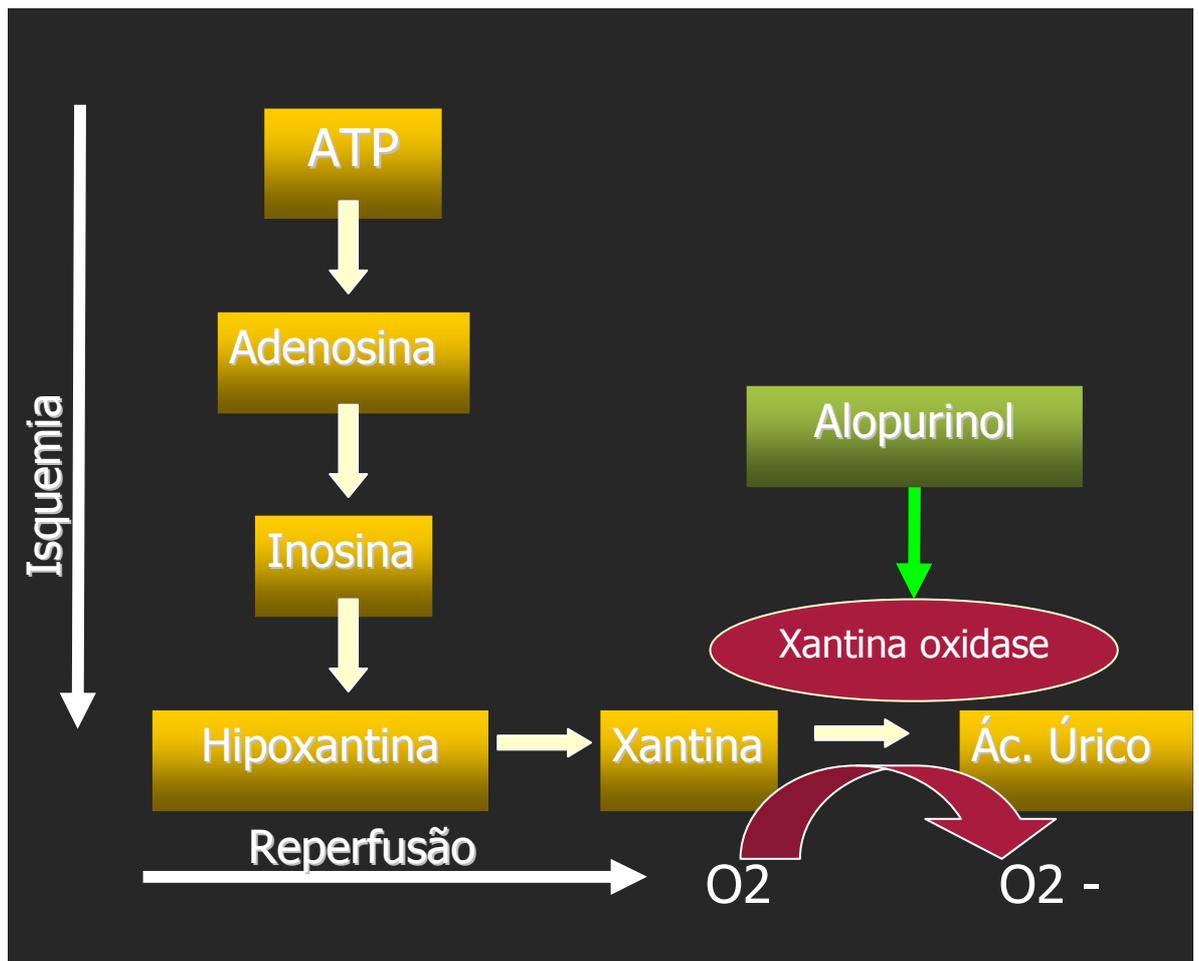
Sabe-se que a lesão tecidual não se deve apenas à privação do oxigênio durante a isquemia, mas principalmente pela formação de radicais livres durante a reperusão.^{2,18} Durante o período de isquemia o ATP é consumido e degradado em ADP, este em hipoxantina e por fim em xantina, que vai se acumulando no tecido isquêmico.^{9, 14, 15, 20, 21, 39}

Com a reperusão o oxigênio reage como um acceptor de elétrons da xantina oxidase que metaboliza xantina em ácido úrico.^{16, 17, 54} Nesta reação há produção de radicais livres derivados do oxigênio (superóxido, hidroxila e

peróxido), que são moléculas com um elétron não pareado em seu orbital mais externo, o que lhes conferem alto poder reativo, levando à peroxidação das membranas plasmáticas ²⁰ (celulares e das organelas), causando a desintegração celular. A subsequente reação destes compostos na presença de íons metais, principalmente o ferro, resulta na geração de radicais secundários ainda mais tóxicos.

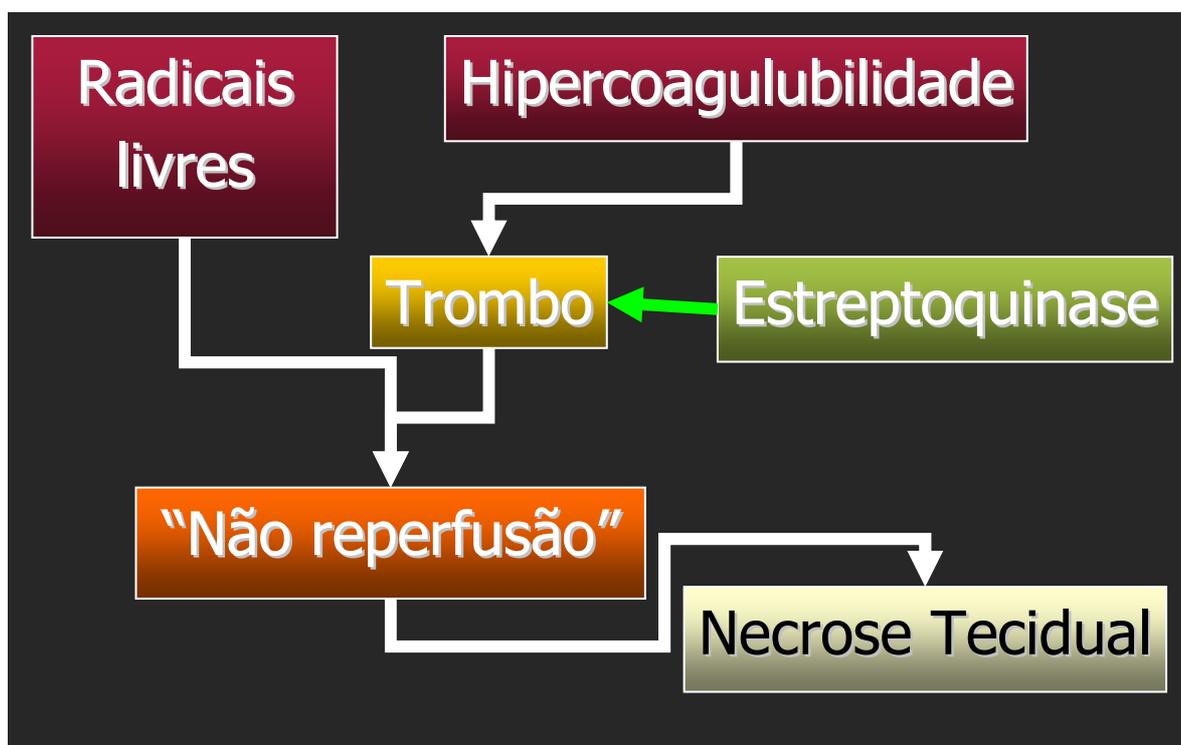
Baseados nos supostos mecanismos envolvidos nessa cadeia de reações que se inicia no levantamento de retalho, seguido pelo período isquêmico variável e de reperfusão tecidual, foram utilizados experimentalmente antiinflamatórios, antineoplásicos, trombolíticos, vasodilatadores e quelantes de radicais livres entre outros ^{3, 4, 12, 14,21, 31, 33, 35, 40, 54, 61}.

O Alopurinol, que é substância amplamente utilizada na prática clínica para o tratamento da hiperuricemia, é um inibidor da xantina oxidase, e já foi utilizado em estudos pregressos ^{22, 23, 28, 38, 41, 45, 57}. Nestes existem divergências quanto às doses e período de administração, bem como se utilizados no período antes ou depois da isquemia e em diferentes tecidos submetidos a diferentes tempos de isquemia. Os resultados são controversos, alguns estudos relatam vantagens e outros relatam ineficácia deste fármaco.



A Estreptoquinase, por sua vez, é uma droga de ação trombolítica derivada do grupo C do streptococo β hemolítico, descoberta em 1933 e amplamente utilizada na prática clínica no tratamento de infarto do miocárdio, tromboembolismo pulmonar, outras síndromes trombóticas e no tratamento de transplantes de tecidos após trombose da anastomose vascular.^{30, 32, 35, 36, 37, 56, 57, 58}

Os processos bioquímicos envolvidos na lesão de isquemia e reperfusão já foram parcialmente desvendados. A formação de trombos na microcirculação e a liberação de radicais livres são eventos que levam a lesão celular, muitas vezes irreversível.⁵¹



Na prática clínica, 7 a 11% dos retalhos livres executados sofrem processo de necrose tecidual³⁴, devido à lesão de isquemia e reperfusão, pois os avanços das técnicas e instrumentais microcirúrgicos diminuíram consideravelmente a incidência de problemas com a permeabilidade das anastomoses dos vasos do pedículo do retalho nos vasos receptores.

O mecanismo fisiopatológico responsável pela necrose tecidual é ainda desconhecido, e o estudo das drogas que possivelmente minimizem os efeitos da lesão por isquemia e reperfusão podem representar a elucidação desta complexa cadeia de reações.

O objetivo deste estudo é estabelecer uma relação entre a sobrevivência de retalhos cutâneos em ilha em ratos, submetidos à isquemia prolongada e o uso dos fármacos: Estreptoquinase e Alopurinol; administrados após o período específico de isquemia, comparando as áreas de sobrevivência dos retalhos.

MÉTODOS

Foram utilizados 48 ratos adultos machos da raça Wistar (*Ratus norvegicus*), com peso entre 300 e 350 g, divididos em quatro grupos, com 12 ratos cada, quais sejam:

GRUPO 1: oclusão dos vasos epigástricos inferiores a direita durante oito horas com posterior injeção de 1 ml de cloreto de sódio a 0.9%.

GRUPO 2: oclusão dos vasos epigástricos inferiores a direita durante oito horas com posterior injeção de 1 ml de solução de Alopurinol* 100mg/kg, diluído em 1N de NaOH e titulado com 2 N de HCl até o ponto de cristalização.

GRUPO 3: oclusão dos vasos epigástricos inferiores a direita durante 8 horas com posterior injeção de 1 ml de solução contendo 10.000 unidades internacionais de Estreptoquinase† diluída em solução salina a 0,9%.

GRUPO 4: oclusão dos vasos epigástricos inferiores a direita durante oito horas com posterior injeção de 1 ml de solução da associação das duas drogas nas doses já estabelecidas.

* Alopurinol (Sigma-Aldrich A8003 – Alemanha)

† Estreptoquinase (Streptase 1500000 IU-Hoeschst Marion Roussel-USA)

Os procedimentos experimentais foram iniciados com a anestesia dos animais com pentobarbital (uso veterinário) na dose de 35mg/kg por via intraperitoneal, aplicado no quadrante inferior esquerdo do abdome. Os animais eram mantidos em respiração espontânea e utilizadas doses suplementares de anestésico inalatório (éter etílico) quando necessárias.

A seguir os ratos eram posicionados em decúbito dorsal horizontal fixados sobre uma prancha rígida através de amarras removíveis nos membros superiores e inferiores, submetidos à tricotomia das regiões abdominal e inguinal bilateral, e antissepsia com álcool iodado, isolando-se as áreas restantes com campos estéreis.

Posteriormente os limites do retalho foram demarcados sobre a pele do animal, com dimensões de 3,0 X 6,0 cm, a partir da linha média (limite medial) e região inguinal direita (limite inferior) (Figura 1).

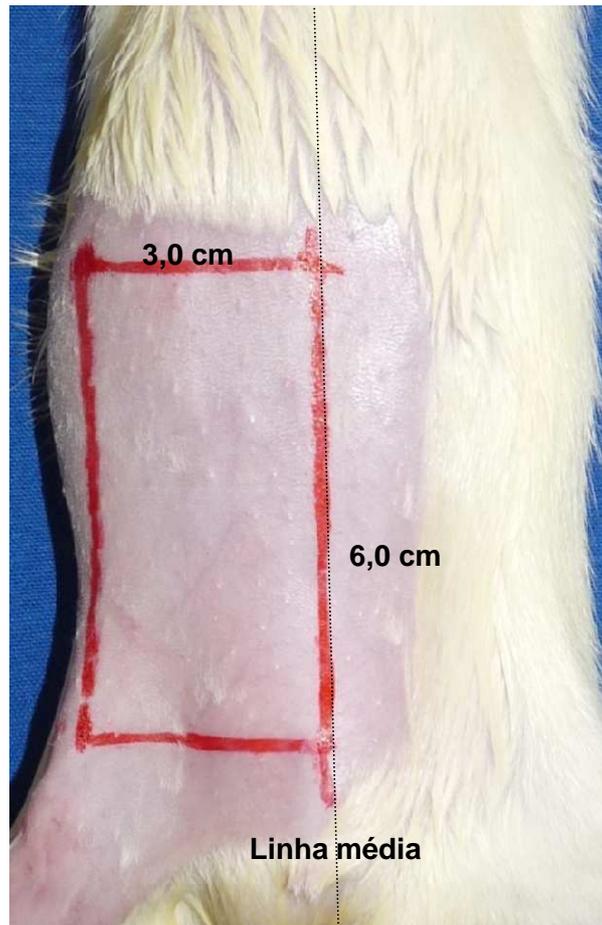


FIGURA 1: Demarcação dos limites do retalho no abdome do rato, com dimensões de 3 X 6 cm.

Este retalho possui irrigação sanguínea axial através dos vasos epigástricos superficiais inferiores, ramos diretos dos vasos femorais, e se dividem em ramo medial e lateral. (Figura 2)

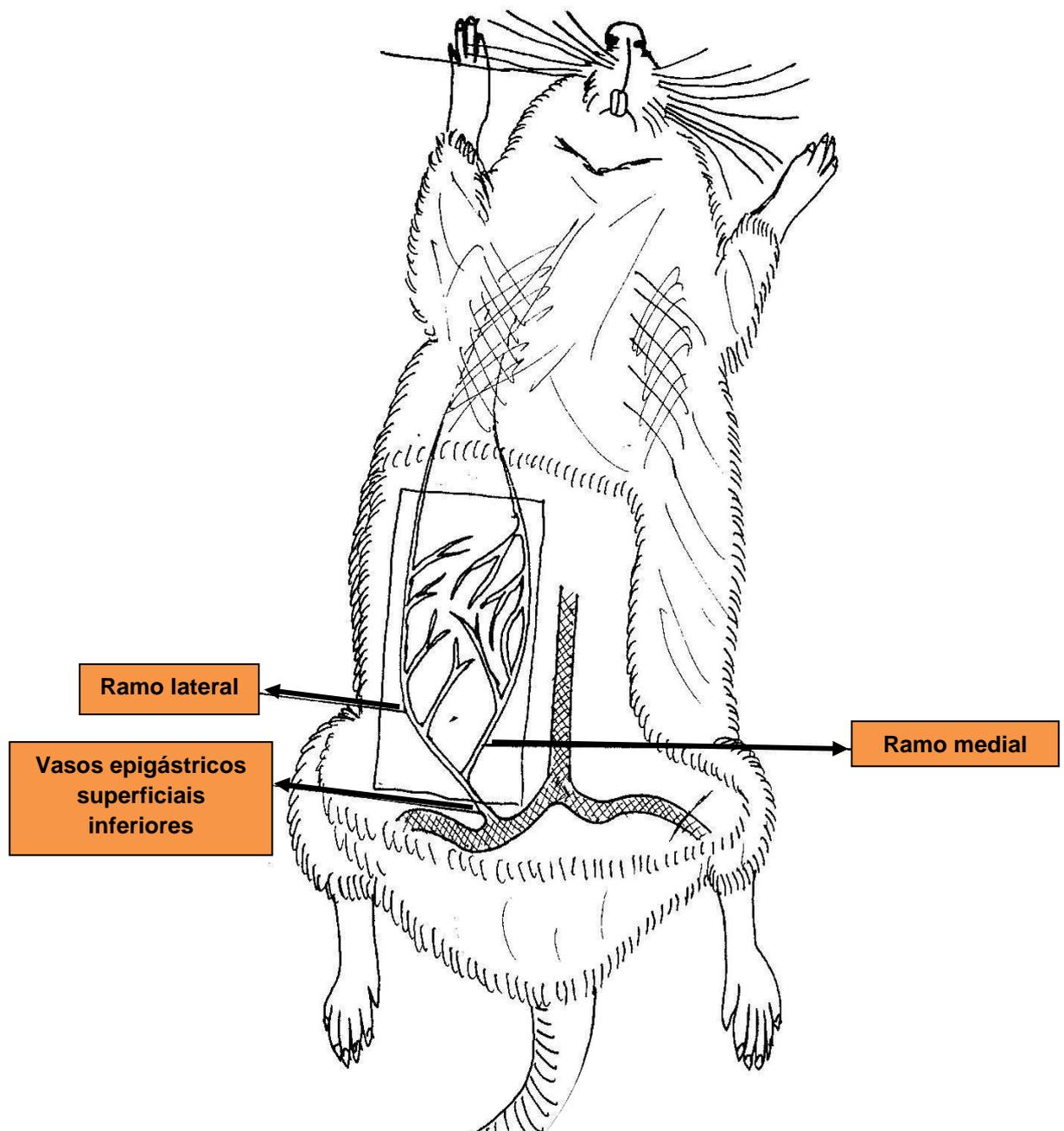


FIGURA 2: Vasos epigástricos superficiais inferiores e seus ramos medial e lateral.

Em seguida realizou-se a dissecção do retalho, através de incisão da pele até o plano aponeurótico, com exceção da região inguinal direita, onde somente a pele foi incisada. A direção da dissecção ocorreu do sentido

crânio-caudal (Figura 3 e 4) e médio-lateral, até a esqueletização do pedículo na emergência dos vasos epigástricos (Figura 5).

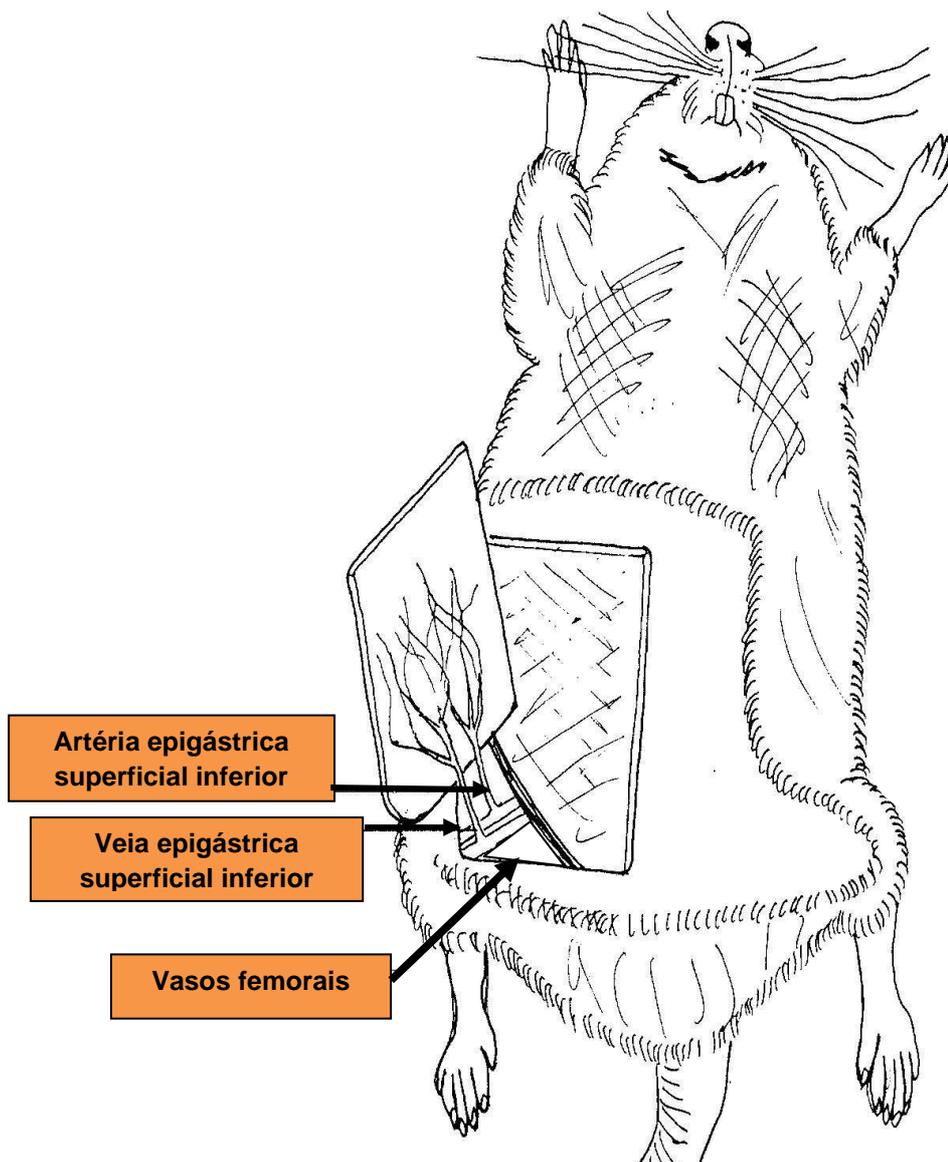


FIGURA 3: Vasos femorais e vasos epigástricos superficiais

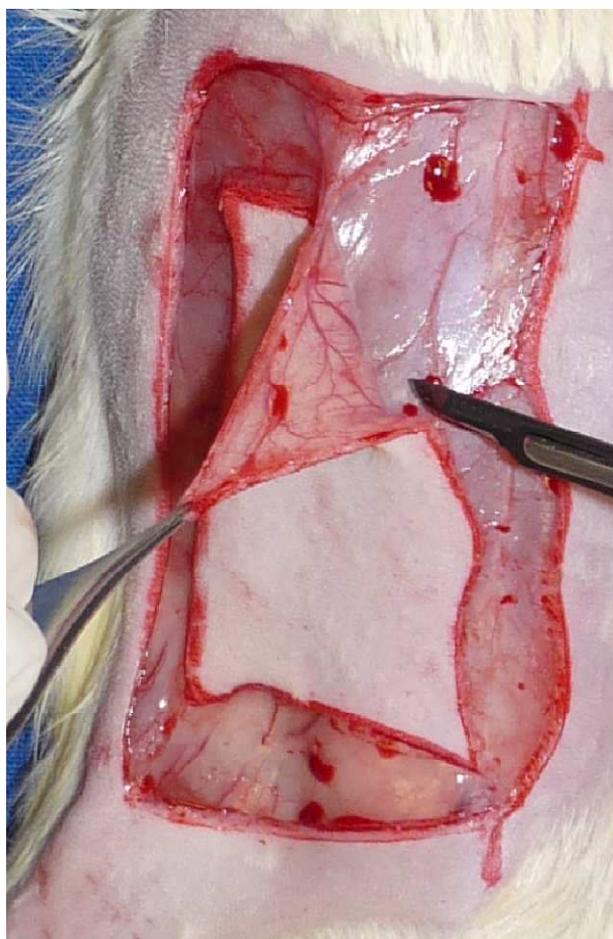


FIGURA 4: Dissecção Crânio – Caudal do retalho epigástrico inferior.

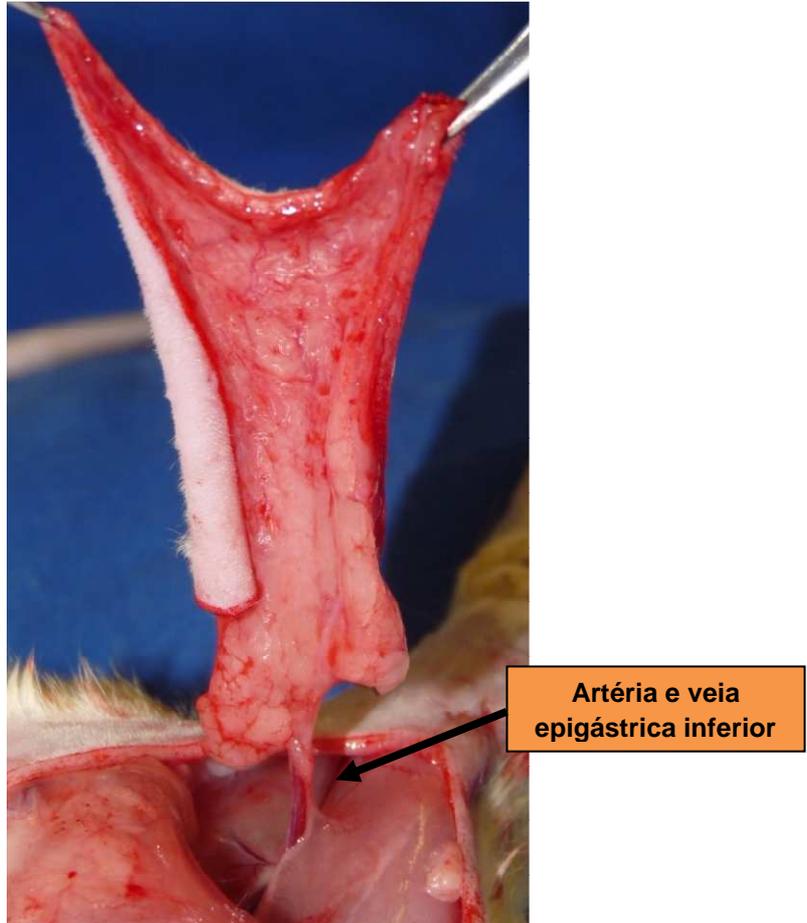


FIGURA 5 : Retalho epigástrico inferior em ilha e seu pedículo.

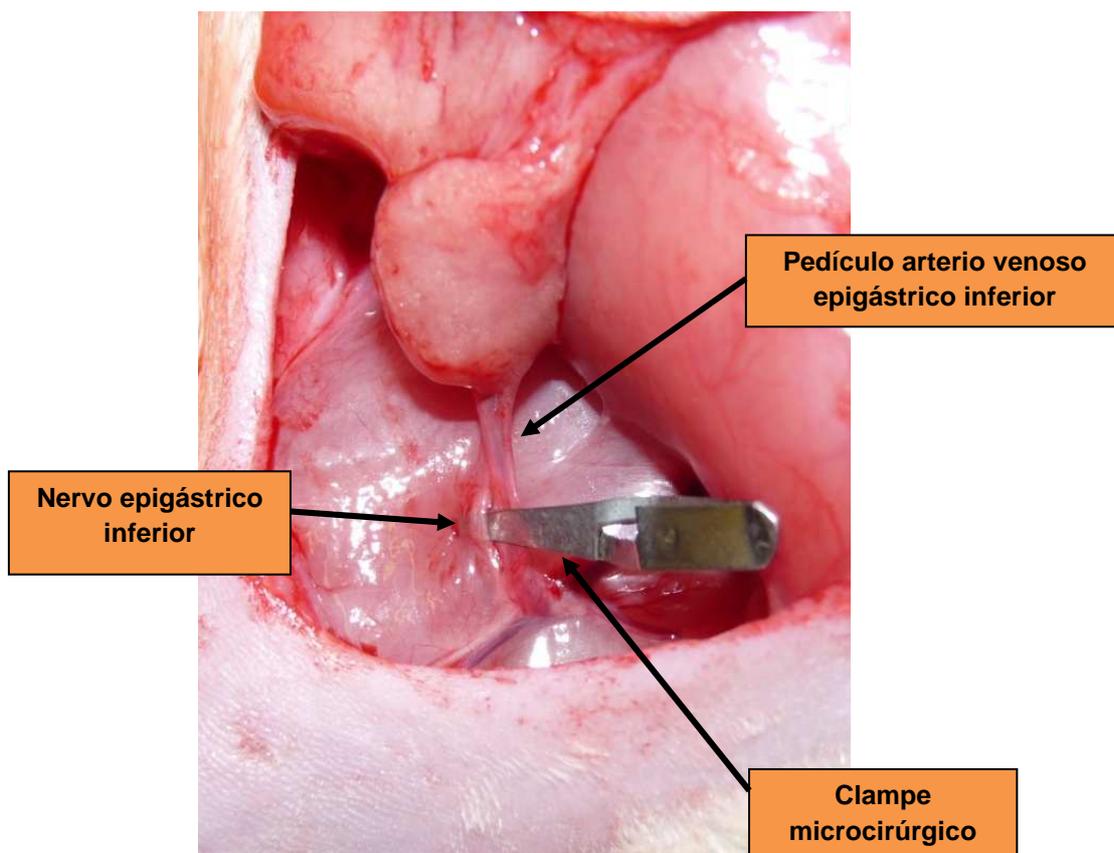


FIGURA 6: Clampeamento do pedículo arteriovenoso do retalho epigástrico inferior para realização da isquemia mista normotérmica, com exclusão do nervo epigástrico inferior no clampeamento.

A disseção do pedículo com isolamento do nervo epigástrico foi realizada com o objetivo de diminuir o risco de autofagia. Em toda a disseção do pedículo utilizou-se microscópio microcirúrgico[‡]. A seguir, os animais foram submetidos a oito horas de isquemia mista normotérmica, com clampeamento conjunto da artéria e veia epigástricas inferiores direitas com clampe micro cirúrgico do tipo Acland 2V na emergência dos vasos femorais (Figura 6).

[‡] Zeiss modelo OPMI-6 - US

A isquemia completa foi certificada pelo teste de ordenhamento, onde com o auxílio de duas pinças microcirúrgicas, ordenhava-se os vasos do sentido proximal para o distal, testando-se seu enchimento. Se não houvesse enchimento sanguíneo a isquemia era considerada efetiva. O retalho, a seguir, era reposicionado à sua origem, procedendo-se a seguir a sutura às bordas da incisão utilizando fios de náilon monofilamentar 5.0; sendo realizada sutura contínua em todas as bordas do retalho com exceção da borda inferior direita na qual foi realizada sutura através de pontos separados com o mesmo tipo de fio de sutura, a fim de facilitar a retirada do clampe após o período de isquemia. (Figura 7).



FIGURA 7: Retalho em isquemia suturado à sua posição original, após clampeamento.

Quinze minutos antes do término do período de isquemia, os animais eram novamente anestesiados com anestésico inalatório (éter etílico) e fixados na prancha rígida para a dissecação dos vasos femorais esquerdos. Com auxílio do microscópio microcirúrgico realizou-se a cateterização da veia femoral, utilizando cateter de silicone de 0.7 mm. Após o período de oito horas de isquemia, iniciou-se o processo de aplicação dos fármacos correspondentes a cada grupo, depois da retirada do clampe microcirúrgico dos vasos epigástricos direitos.

Para o procedimento de dissecação dos vasos femorais esquerdos os ratos foram submetidos à anestesia local com xylocaína 2% nos locais de manipulação. Durante o período de isquemia do retalho, a analgesia utilizada foi dose única de dipirona por via intramuscular na região dorsal esquerda do rato, na dose de 30mg/kg.

Nos 15 minutos subsequentes, os vasos epigástricos foram observados e o teste de ordenhamento foi realizado para a avaliação do restabelecimento do fluxo sanguíneo para o retalho. Os animais que não apresentaram fluxo sanguíneo adequado para o retalho foram excluídos do estudo e considerados como erro técnico.

A incisão inguinal esquerda e a borda inferior do retalho foram suturadas com pontos separados de fio de náilon monofilamentar 5 .0.

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais com água e ração “ad libitum”, em temperatura ambiente constante de 25^o Celsius, sob observação diária até o sétimo dia, quando eram novamente anestesiados

por via inalatória com éter etílico, fixados na prancha com intuito de transpor graficamente as áreas viáveis e necróticas do retalho para uma folha de acetato transparente, sobreposta à região abdominal do rato. (ANEXO A)

Estas imagens foram escaneadas e analisadas através de um programa intitulado Auto Cad (ANEXO B). Assim as porcentagens entre a área necrótica e a área total dos retalhos foram comparadas com a finalidade de normatizar os dados.

Aqueles que apresentavam sinais de autofagia do retalho foram excluídos do estudo. Os animais foram então sacrificados, através de anestésicos inaláveis (éter etílico), conforme orientação da Associação Americana de Medicina Veterinária e Conselho Federal de Medicina Veterinária (ANEXOS C e D).

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados pelo mesmo pesquisador.

Os dados computados foram submetidos à análise estatística utilizando análises descritivas e comparações múltiplas de Dunnett T3 entre os quatro grupos, com nível de significância de 5%.

Este projeto de pesquisa foi desenvolvido no Laboratório de Microcirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - CAPPesq-HCFMUSP, sob o número 0498/07. (ANEXO E).

RESULTADOS

Foram utilizados no estudo 63 animais. Foram excluídos do estudo quinze ratos, sete animais apresentaram complicações anestésicas evoluindo para o óbito no período peri operatório. Oito animais apresentaram autofagia do retalho até o sétimo dia pós-operatório, não possibilitando análise da área de necrose. A mortalidade peri-operatória foi de 11%.

Tempo médio do procedimento foi de 18 minutos e todos os animais foram operados pelo mesmo pesquisador.

Analisados os retalhos após sete dias, os animais do grupo controle apresentaram em média 79,88% da área total do retalho epigástrico necrosado, os que receberam alopurinol apresentaram em média 64,05% e os animais do grupo que receberam estreptoquinase apresentaram em média 55,52%. Com a associação das duas drogas os ratos apresentaram em média 54,30% de necrose da área total retalho (Gráfico 1).

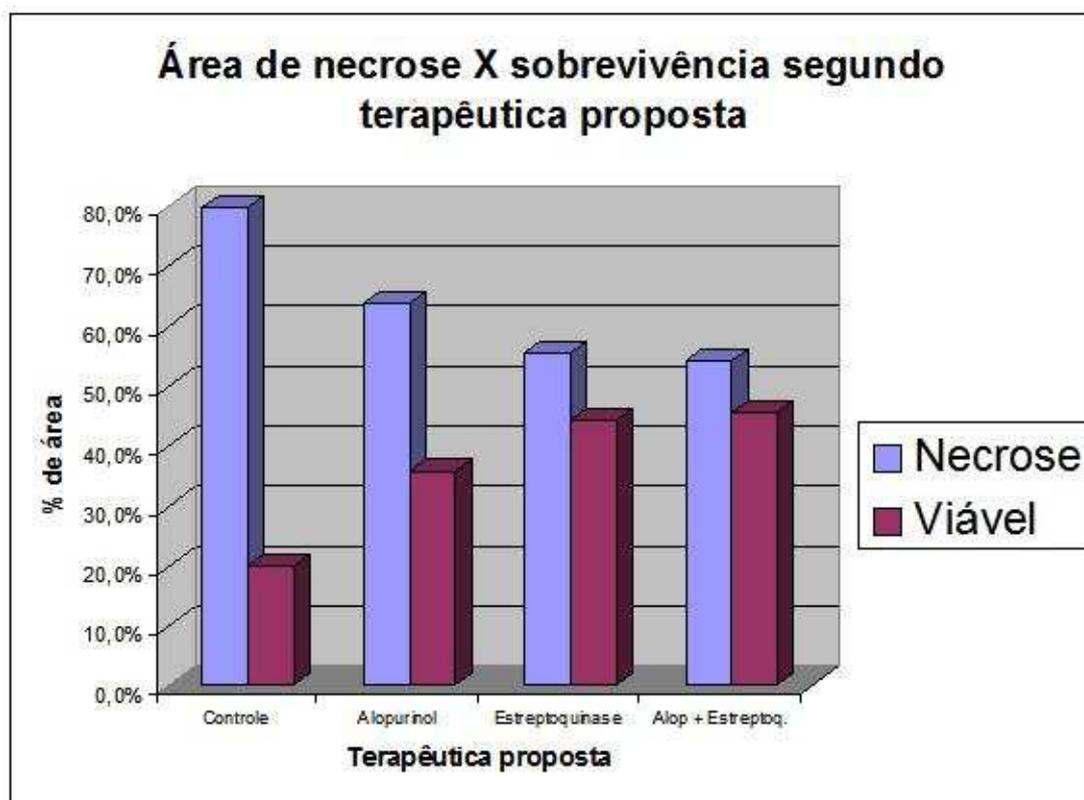


Gráfico 1: Área de necrose e área viável nos grupos estudados.

Grupo controle

O grupo controle, composto de 12 ratos apresentou as seguintes porcentagens de necrose em relação a área total do retalho:

Grupo controle	Área de Necrose (%)
Rato 1	91,41
Rato 2	84,67
Rato 3	45,46
Rato 4	88,00
Rato 5	100,00
Rato 6	100,00
Rato 7	100,00
Rato 8	42,00
Rato 9	78,12
Rato 10	84,17
Rato 11	80,72
Rato 12	63,97

O grupo controle apresentou média de 79,88% de área necrótica com desvio padrão de 19,84.

Grupo Estreptoquinase

O grupo de 12 animais que recebeu Estreptoquinase apresentou as seguintes porcentagens de necrose em relação a área total do retalho :

Grupo Estreptoquinase	Área de Necrose (%)
Rato 13	48,18
Rato 14	64,08
Rato 15	52,67
Rato 16	69,04
Rato 17	52,09
Rato 18	63,13
Rato 19	53,19
Rato 20	52,74
Rato 21	46,90
Rato 22	45,40
Rato 23	58,07
Rato 24	60,75

O grupo apresentou média de 55,52% de área necrótica com desvio padrão de 7,46.

Grupo Alopurinol

O grupo que recebeu Alopurinol é composto por 12 animais e apresentou as seguintes porcentagens de necrose em relação a área total do retalho:

Grupo Alopurinol	Área de Necrose (%)
Rato 25	73,83
Rato 26	68,94
Rato 27	43,21
Rato 28	79,00
Rato 29	87,49
Rato 30	48,46
Rato 31	88,51
Rato 32	73,73
Rato 33	49,49
Rato 34	50,72
Rato 35	33,09
Rato 36	72,18

O grupo apresentou uma média de 64,05% de área necrótica, com desvio padrão de 18,28.

Grupo Alopurinol + Estreptoquinase

O grupo que recebeu a combinação das duas drogas apresentou as seguintes porcentagens de necrose em relação a área total do retalho:

Grupo Alopurinol +Estreptoquinase	Área de Necrose (%)
Rato 37	23,75
Rato 38	67,87
Rato 39	50,58
Rato 40	12,00
Rato 41	18,44
Rato 42	76,71
Rato 43	53,47
Rato 44	52,78
Rato 45	64,28
Rato 46	83,85
Rato 47	76,15
Rato 48	71,70

Esse grupo apresentou média de 54,30% de necrose, com desvio padrão de 24,24.

Gráfico das médias

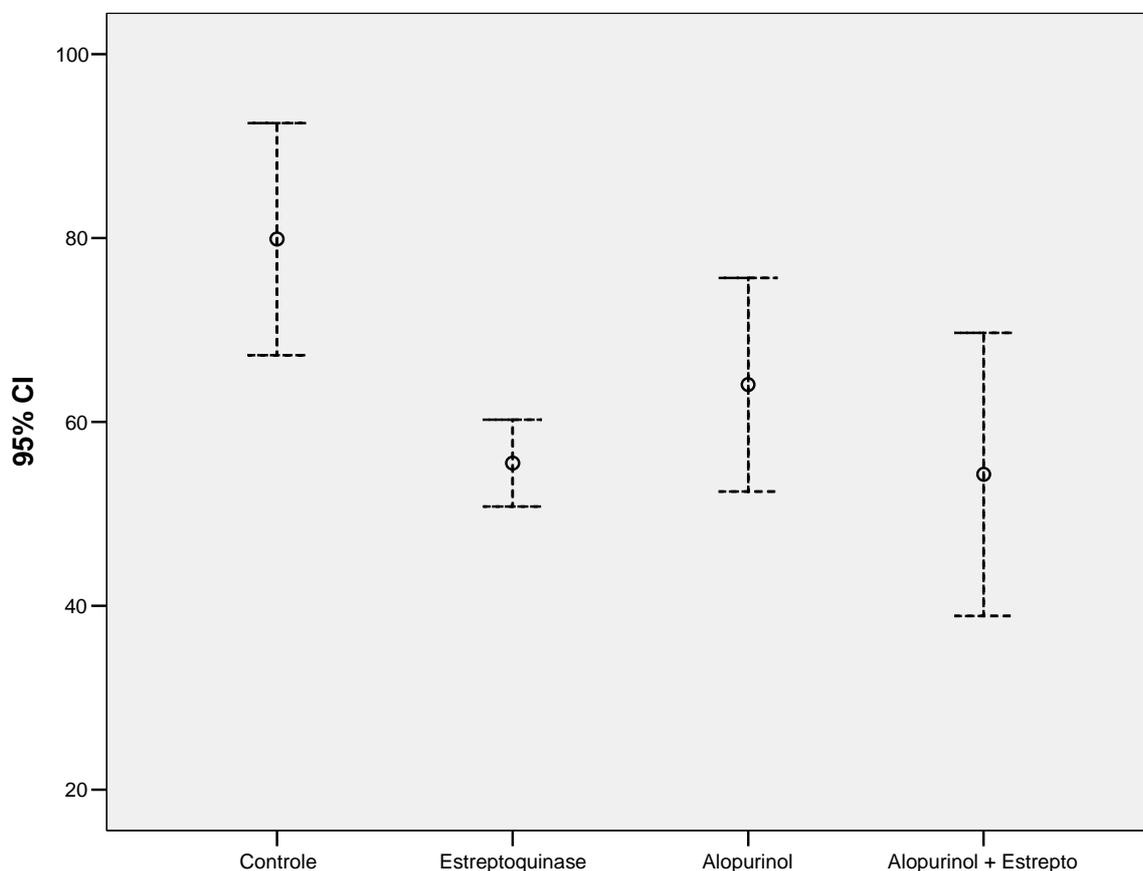


Gráfico 2: Gráfico das médias dos grupos estudados com seus intervalos de confiança de 95%.

O gráfico das médias representa as médias de cada grupo e o seu intervalo de confiança de 95 %, isto significa que 95% das medidas de cada grupo estão neste intervalo, desta forma, quanto menor o intervalo, mais homogêneo é o grupo. No gráfico fica mais fácil a visualização que o grupo da Estreptoquinase apresenta o menor intervalo de confiança; com limite

superior de 60,26% e limite inferior de 50,68%. O menor intervalo entre as amostras. O Grupo que recebeu Estreptoquinase é estatisticamente diferente dos outros grupos apresentando $p=0,005$. (Gráfico 2).

Teste Dunnett T3

O teste Dunnett T3 foi aplicado para as comparações múltiplas entre os grupos onde apenas um tratamento serviu de referência, ou seja, comparou-se todos com apenas um. O nível de significância adotado foi de 5% ($p \leq 0,05$).

➤ Comparação com o grupo controle

A diferença entre a média do Grupo Estreptoquinase e a média do Grupo Controle foi de 24,35 com intervalo de confiança de 36,97. Sendo essa a maior diferença entre as médias com o menor intervalo de confiança.

A diferença entre a média do Grupo do Alopurinol e a média do Grupo Controle foi de apresentou uma diferença entre as médias de 15,82 com intervalo de confiança de 44,75. Sendo essa a menor diferença entre as médias com intervalo de confiança intermediário.

A diferença entre a média do Grupo do Alopurinol mais Estreptoquinase e a média do Grupo Controle foi de 25,57 com intervalo de confiança de 52,12. Sendo essa a maior diferença, porém com maior intervalo de confiança.

Verificamos que o grupo Estreptoquinase é o único grupo estatisticamente diferente do grupo controle ($p=0,008$), ou seja, o grupo Estreptoquinase está apresentando uma maior concentração das medidas em torno da média e essas são as menores encontradas no estudo. (Gráfico 3)

Gráfico 3 : Aplicação do Teste Dunnett T3

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Medidas
Dunnett T3

(I) Grupos	(J) Grupos	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Controle	Estreptoquinase	24,35667*	6,11921	,008	5,8713	42,8420
	Alopurinol	15,82250	7,78858	,270	-6,5581	38,2031
	Alopurinol+Estrepto	25,57833	9,04364	,056	-,4835	51,6402
Estreptoquinase	Controle	-24,35667*	6,11921	,008	-42,8420	-5,8713
	Alopurinol	-8,53417	5,69929	,596	-25,6654	8,5971
	Alopurinol+Estrepto	1,22167	7,32171	1,000	-21,1323	23,5756
Alopurinol	Controle	-15,82250	7,78858	,270	-38,2031	6,5581
	Estreptoquinase	8,53417	5,69929	,596	-8,5971	25,6654
	Alopurinol+Estrepto	9,75583	8,76497	,837	-15,5851	35,0968
Alopurinol+Estrepto	Controle	-25,57833	9,04364	,056	-51,6402	,4835
	Estreptoquinase	-1,22167	7,32171	1,000	-23,5756	21,1323
	Alopurinol	-9,75583	8,76497	,837	-35,0968	15,5851

*. The mean difference is significant at the .05 level.

DISCUSSÃO

A lesão de isquemia e reperfusão tem sido ao longo das últimas décadas, alvo de pesquisas em diversas especialidades médicas. Isto se deve a grande importância do entendimento destes fenômenos e para com isso propor tratamento deste tipo de lesão celular em doenças isquêmicas e reconstruções microcirúrgicas.

O animal escolhido para realização deste estudo foi o rato da linhagem Wistar, por ser um animal de pequeno porte, de fácil aquisição e padronização no que diz respeito à idade, peso, sexo, alojamento, alimentação, cuidados de limpeza e manipulação experimental. Além disso, estes animais apresentam índice reduzido de mortalidade, são resistentes a infecções, podendo ser utilizados em grande número. Além de possibilitar a anestesia por via inalatória, intraperitoneal ou intravenosa, conforme a necessidade³⁷.

Foram incluídos 48 animais, divididos em quatro grupos. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias de peso corpóreo entre os quatro grupos de animais. A predeterminação do peso dos animais teve o objetivo de tornar a amostra mais homogênea possível.

Os retalhos em ilha se mostram como modelo experimental adequado em estudos de isquemia e reperfusão por facilitar a manipulação do pedículo sejam somente da artéria, apenas da veia ou de ambos os vasos. Dessa forma podem-se mimetizar várias situações da prática clínica como trombozes arteriais ou venosas, de órgãos ou tecidos transplantados, bem como amputações ou avulsões, onde existe lesão completa do pedículo. A

partir desse modelo experimental, vários estudos^{21, 25, 26, 27, 37, 41, 43, 47, 50, 51, 59, 62,63} foram realizados em retalhos cutâneos, sendo o mais consagrado o retalho epigástrico inferior descrito por Sasaki e Pang em 1980⁵⁰.

Petry e Wortham⁵¹ em 1984 estudaram a anatomia do retalho epigástrico no rato, concluindo que o padrão vascular dos vasos epigástricos superficiais se mantinha constante, com o tronco principal dos vasos epigástricos superficiais se dividindo em um ramo medial de pequeno calibre que se anastomosa com um ramo dos vasos mamários internos e um ramo lateral de localização não constante que se anastomosa com os vasos torácicos laterais. Por essa característica da anatomia não constante do ramo lateral os autores recomendaram que a dissecação fosse realizada no sentido medial para lateral e de crânio para caudal. A incisão lateral deveria ser realizada lateralmente ao pedículo, a fim de incluir o ramo lateral, evitando a isquemia distal do retalho por déficit de fluxo sanguíneo.

No presente estudo o ramo lateral do pedículo epigástrico inferior foi incluído em todos os retalhos dissecados.

Prada e cols.⁴⁷ em 2002 executaram um estudo preliminar onde realizaram a elevação do retalho epigástrico inferior em ilha em ratos, com dimensões de 3 cm de largura por 6 cm de comprimento, e o suturaram em seu leito receptor. Analisaram os retalhos no sétimo dia pós operatório, evidenciando que a totalidade dos retalhos sobreviveu sem nenhuma perda parcial. Desta forma ficou provado que este retalho, nestas dimensões, não apresentava isquemia em sua porção distal, e servia como modelo adequado para o estudo de eventos isquêmicos.

O tempo de isquemia crítico foi definido como o período máximo de isquemia que um tecido pode tolerar e ainda sobreviver sem perdas ². O tempo de isquemia médio se refere ao período em que há necrose de 50% do retalho². Esses períodos variam de tecido para tecido e baseados nestes valores é que se inferiu a chance de determinados tecidos sobreviverem após a interrupção do fluxo sanguíneo⁵³. Em retalhos cutâneos, o tempo de isquemia crítico é em torno de 13 horas para a isquemia arterial ²⁸, enquanto que o tempo de isquemia médio é em torno de sete horas. Já o tempo de isquemia crítico para isquemia secundária de retalhos cutâneos é de apenas 4 horas e 42 minutos. ⁵³

Retalhos podem ser submetidos a diferentes lesões isquêmicas, quais seja isquemia da porção distal, quando o retalho é realizado maior do que a capacidade do aporte sanguíneo do pedículo, é denominada de isquemia distal, ³⁴ ou quando ocorre isquemia de todo o retalho, por obstrução extraluminal ou intraluminal da artéria e/ou da veia do pedículo, temos a isquemia global que podendo ser arterial, venosa, ou mista.

Existem dois tipos de complicações nas cirurgias de reconstrução com retalhos: necrose parcial de retalhos pediculados devido a fluxo sanguíneo inadequado, e lesão por isquemia e reperfusão causando perda parcial ou completa de um retalho livre. Necrose parcial acontece em 25% dos retalhos miocutâneos pediculados ⁴⁸ na cirurgia reconstrutiva da cabeça e pescoço e reconstrução de mama. O verdadeiro significado destas pequenas complicações só pode ser mensurado quando levam ao aumento da morbidade para o paciente, seja aumentando o período de internação

hospitalar, o número de cirurgias ou até mesmo retardando o tratamento adjuvante nos casos oncológicos.

Na tentativa de minimizar estas perdas parciais vários métodos foram utilizados ao longo dos anos. Uma alternativa muito utilizada inicialmente era a autonomização, que consistia na transferência de retalhos em dois tempos cirúrgicos. Primeiramente, procedia-se a dissecação do retalho até a base do seu pedículo principal, mantendo-o em seu leito ou realizando a transferência parcial do mesmo. Desta forma, o fluxo sanguíneo pelo plexo subdérmico ou por pedículos secundários era interrompido, já submetendo o retalho a um grau considerável de isquemia. Após os dias necessários para que houvesse neovascularização dependente do leito receptor o retalho era finalmente transferido. O desafio era saber quantos dias eram necessários para a realização do segundo estágio cirúrgico.

Em 1980, Besteiro e cols.⁵⁹ realizaram um estudo sobre a circulação de retalhos cutâneos em ilha em ratos, utilizando o retalho epigástrico. O retalho era dissecado e suturado novamente ao seu leito. Em períodos que variaram de dois a oito dias pós dissecação dos retalhos, a artéria do pedículo era ligada e a área de necrose era avaliada após sete dias da ligadura das artérias. Concluíram que a partir do quinto dia já existia sobrevivência do retalho em grau considerável, e que esta sobrevivência passa a ser consistente a partir do sétimo dia.

Gemperli e cols., em 1985⁶² estudaram a sobrevivência de retalhos em ilha em ratos após ligadura seriada dos diferentes elementos do pedículo

vascular. Neste estudo houve a interposição de lâmina de silicone entre o retalho e o leito para evitar a neovascularização a partir do leito. Observaram que o aporte sanguíneo arterial e venoso era indispensável até o quinto dia e que mesmo que o leito receptor fosse mal vascularizado, a secção dos elementos do pedículo neste modelo experimental, poderia ser feita após o quinto dia, uma vez que haveria neovascularização à custa das bordas.

A necessidade de se minimizar a morbidade do procedimento e, sobretudo de diminuir os tempos cirúrgicos fez com que a transferência de retalhos em dois tempos fosse sendo abandonada e retalhos à distância passaram a ser transferidos em tempo único.

Geralmente é aceitável uma taxa de 90 a 95% de sucesso nas transferências de retalhos livres ³⁴, verificando-se em outros estudos que podem ocorrer perdas totais de retalhos livres em 16% dos casos. ⁴⁸ As taxas de reexploração destes retalhos variam de 4 a 26 % para poder se alcançar tal taxa de sucesso ³⁴. Nestes casos, o tecido é submetido a um segundo período de isquemia e se este período exceder a tolerância normal do tecido à isquemia ocorrerá necrose do retalho.

Estas complicações podem ser devastadoras, resultando em novas cirurgias, exposição de estruturas nobres, infecções, dentre outras. As perdas de retalhos são mais freqüentemente atribuídas à trombose microvascular. Este problema tem sido bastante estudado, diminuindo sobremaneira a incidência de trombose vascular perianastomótica com a melhora importante das técnicas e materiais microcirúrgicos.

Existe um estímulo à pesquisa novos fármacos, que usados pré ou pós isquemia, seriam capazes de aumentar a sobrevivência dos retalhos, como bloqueadores de canais de Ca^{+2} (cálcio), vasodilatadores, agentes que diminuem a viscosidade sangüínea, antiinflamatórios, quelantes de radicais livres, trombolíticos, oxigênio hiperbárico, entre outros tratamentos tópicos ou sistêmicos. ^{3, 4, 12, 14, 21, 31, 33, 35, 40, 54, 61}

Durante a transferência do retalho, existe um período obrigatório de isquemia global de algumas horas, mas no período intra operatório ou após a cirurgia as complicações podem prolongar ou levar a repetição do período isquêmico, denominado de isquemia secundária ⁷. Certo período de isquemia é tolerado pelo tecido, porém a fase de hipoxia e subsequente reperfusão ocasionam lesão de isquemia e reperfusão que podem resultar em necrose parcial ou total do tecido. O fenômeno de não reperfusão resulta na necrose parcial ou total do retalho apesar de não haver trombose no pedículo, ou mesmo após a resolução de trombozes perianastomóticas ^{6, 8, 18, 19, 33, 55}. As dimensões e forma do retalho são importantes para a diminuição do risco de nele ocorrer necrose parcial. A inclusão de um componente anatômico seja a fáscia ou músculo, ou ainda a inclusão de um pedículo axial específico aumenta vigorosamente as chances de sobrevivência de um retalho cutâneo.

A transição entre a lesão celular reversível e a irreversível é pouco compreendida e isso estimula a investigação dos complexos eventos metabólicos intracelulares e intravasculares relacionados com a morte celular.

Harashina e cols.⁴³, em 1977, realizaram um estudo de oclusão venosa em retalhos epigástricos em ilha em ratos onde os retalhos foram submetidos a diferentes períodos de isquemia venosa (de 2 a 24 horas) verificando que o grupo com 6 horas de isquemia venosa apresentava boa restauração do fluxo com necrose distal mínima em seis dos oito retalhos deste grupo. Já o grupo submetido a 8 horas de oclusão venosa apresentava necrose total de todos os retalhos.

Prada e cols.⁴⁷, em 2002, realizaram um estudo piloto para determinar o período de isquemia global e mista, normotérmica a que retalhos epigástricos em ilha em ratos poderiam ser submetidos produzindo a maior taxa de necrose parcial nestes retalhos, sem um padrão tudo-ou-nada de necrose. Submeteram os retalhos a isquemia em intervalos de 2 horas até o máximo de 8 horas. O período encontrado foi o de 8 horas, onde houve uma média de 50% de necrose dos retalhos.

Dessa forma, o período de 8 horas de isquemia global, mista e normotérmica foi escolhido para a realização deste estudo. Acredita-se que este período, quando se chega a uma situação de estresse metabólico extremo neste modelo, porém com sobrevivência parcial do retalho, pode facilitar a comparação dos dados. Além disso, a isquemia mista mimetiza situações como a transferência de retalhos livres e amputações.

Vários estudos utilizaram a análise de área necrótica ou área de tecido viável do retalho versus a área total do retalho para a realização da

análise dos resultados.^{2, 3, 7, 12, 23, 26, 27, 38, 47,49, 52, 54, 59, 61, 62, 63} Este é um método objetivo, matemático e de fácil execução.

Como todos os retalhos apresentaram retrações e distorções nas bordas, alterando o formato retangular original de três cm por seis cm, optou-se por usar as porcentagens de áreas necróticas, ao invés de usar os valores absolutos das áreas necróticas⁴⁷.

As mudanças estruturais e metabólicas que ocorrem durante a isquemia incluem: diminuição de calibre capilar, seqüestro de leucócitos, disfunção metabólica em células endoteliais, ativação de sistemas enzimáticos mediados por substâncias pró inflamatórias. A queda do pO₂ leva ao aumento de lactato e, portanto à queda do ph. A estabilidade da membrana plasmática fica comprometida bem como os transportes iônicos; com isso há influxo de Ca⁺² para dentro da célula levando a ativação de várias enzimas, além disso, o Ca⁺² age como co-fator de diversos processos pró inflamatórios (FIGURA 8). O aumento da osmolaridade causada pelo acúmulo destes metabólitos causa edema e aumento da permeabilidade.^{33,}

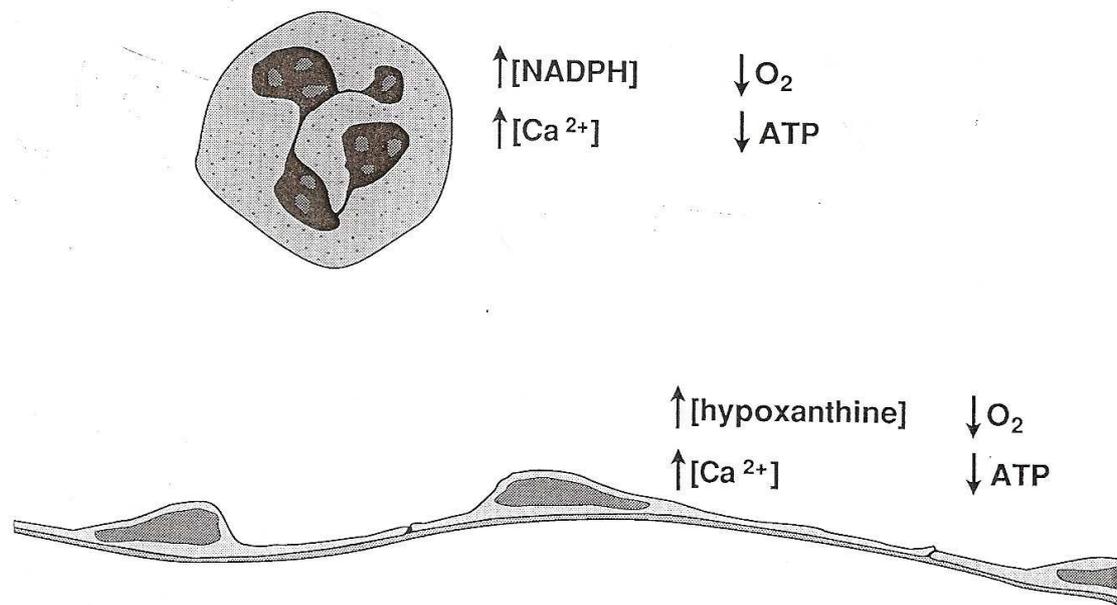


FIGURA 8: Isquemia: déficit de O_2 e consumo de ATP, acúmulo de NADPH e hipoxantina e influxo de Cálcio.

Com a exposição da matriz subendotelial, plaquetas aderem ao endotélio mediadas por colágeno, fibronectina e fator de Von Willebrand. Plaquetas ativadas liberam grânulos contendo ADP e serotonina que induzem agregação de outras plaquetas. Trombina é também liberada, que ativa outras plaquetas e converte fibrinogênio em fibrina.

Além disso, células endoteliais lesadas perdem suas propriedades antitrombóticas e fibrinolíticas como a diminuição da liberação de prostaciclina, que é um potente vasodilatador e antiagregante plaquetário ⁴⁶. Havendo desta forma, um estado de hipercoagulabilidade o que leva a trombose microvascular, que têm um papel crucial na não reperusão de um tecido isquêmico.

O valor da terapia anticoagulante para transferência de retalhos livres já está bem estabelecido na literatura.²⁵ Algum tipo de profilaxia de trombos é feito de rotina em 91% dos centros especializados em reconstrução microcirúrgica, com uma incidência de trombose de 7,1% contra 15,2% quando não é realizada nenhuma terapia anticoagulante.

A Estreptoquinase foi o primeiro agente trombolítico utilizado clinicamente, sendo um polipeptídeo de cadeia única, que é produzido pelo estreptococoB-hemolítico do grupo C. A primeira aplicação clínica da estreptoquinase, no ser humano, foi realizada em 1949, por Tillett, para tratar um derrame pleural organizado. No entanto, a dificuldade de se obter um preparado altamente purificado e não pirogênico impediu a sua utilização pela via intravascular, até 1950, quando Fletcher pôde utilizá-la em um paciente com infarto agudo do miocárdio.⁵⁶

O mecanismo de ação da estreptoquinase induz a ativação indireta do plasminogênio, formando um "complexo ativador" estreptoquinase-plasminogênio, que transforma o plasminogênio circulante em plasmina e, conseqüentemente, leva à desintegração da fibrina ligada ao coágulo, bem como um consumo do fibrinogênio circulante.

Morfologicamente, a composição do trombo difere entre arteríolas e vênulas. Nas arteríolas, a formação dos trombos começa com agregação plaquetária. Os leucócitos não são observados nas arteríolas antes ou depois da formação dos trombos. Nas vênulas, a formação do trombo se deve ao agrupamento de eritrócitos, plaquetas e leucócitos aderidos às

paredes dos vasos.⁵⁸ Acredita-se que a diferença se deve à velocidade de fluxo e às características das células endoteliais das arteríolas e das vênulas; por exemplo, prostaciclina e fator ativador de plasminogênio são sintetizados em larga escala pelo endotélio venular comparado ao endotélio arteriolar. Essa diferença é muito importante no mecanismo de ação do trombolítico.

Jacobs e cols. em 1981³⁶ realizaram um estudo da atividade fibrinolítica e de patência dos vasos e anastomoses em ratos e evidenciaram que a atividade fibrinolítica está presente na superfície da íntima das pequenas artérias e que esta atividade tem uma relação inversa ao período de isquemia, ou seja, quanto maior o período de isquemia, menor a atividade fibrinolítica. Após seis horas de isquemia, a atividade fibrinolítica da superfície das arteríolas só retorna ao normal com 96 horas de fluxo restabelecido. Além disso, este estudo evidenciou o efeito benéfico do uso da estreptoquinase na patência dos vasos e das anastomoses.

Puckett e cols. em 1983²⁷ realizaram um estudo sobre os efeitos da estreptoquinase em retalhos isquêmicos. Submeteram retalhos epigástricos em ilha a isquemia arterial de 7 horas e infundiu via intra arterial estreptoquinase no pedículo do retalho. Evidenciaram uma diminuição de 35% de necrose nos retalhos que receberam o trombolítico.

Lipton em 1986³⁰ relatou um caso clínico onde a trombose do pedículo de um retalho de fíbula para o antebraço foi resolvida com o uso da

estreptoquinase, infundida por uma hora através da artéria do pedículo, sem infusão sistêmica.

Schubert em 1987 ³² relatou o uso clínico da estreptoquinase em um retalho microcirúrgico do músculo grande dorsal para cobertura de defeito no couro cabeludo pós queimadura química de terceiro grau. Após 15 minutos do término da realização da anastomose, o retalho mostrou-se frio e sem sangramento nas bordas, não havia mais pulsação na artéria do pedículo e a reexploração foi indicada. O cirurgião realizou a trombectomia e reanastomose por quatro vezes e então indicou o uso do trombolítico, realizando a lavagem do retalho através da infusão da solução de estreptoquinase via arterial por 10 minutos. Nova anastomose foi realizada e o retalho ficou bem perfundido.

Weinzweig e Gonzalez em 1994 ⁸ publicaram dez casos onde houve perda parcial de retalhos microcirúrgicos, demonstrando que o padrão de perda de retalhos microcirúrgicos não era um padrão tudo-ou-nada. Em um destes casos os autores utilizaram a estreptoquinase para tratar a trombose arterial de um retalho antebraquial para cobertura de defeito em face após ressecção de dermatofibrosarcoma da parótida esquerda. A via de administração também foi intra-arterial através da artéria do pedículo do retalho, sem infusão sistêmica.

Hirigoyen e cols. em 1995 ⁴⁶ realizaram um estudo em retalho epigástrico em ilha em ratos submetidos à isquemia prolongada para avaliar o benefício de heparina na sobrevivência dos retalhos. Análise da

microscopia eletrônica evidenciou, nos retalhos submetidos a seis horas de isquemia com quatro horas de revascularização, áreas de endotélio lesado com muitas plaquetas agregadas e aderidas, principalmente na microcirculação venosa. Um número significativo de vênulas aparece totalmente trombosadas, com inúmeros eritrócitos e leucócitos extravasados. Nos animais que receberam o trombolítico, a maioria dos vasos estava patente, sem dilatação vascular ou extravasamento dos eritrócitos, com poucos focos de lesão endotelial também no território venoso. As plaquetas mantiveram seus grânulos e a configuração discóide normal.

Hashimoto e cols. em 2003⁵⁸ avaliaram os efeitos trombolíticos de uroquinase, heparina e prostaglandina E1 (PGE1) em um modelo de isquemia em orelhas de coelhos. Sugeriram que a heparina tem seu efeito anticoagulante principalmente na arteríola e que sua influência nas plaquetas poderia não ser importante nos trombos venulares. A plasmina, que é convertida em plasminogênio pela uroquinase, degrada fibrina; então, a uroquinase age reduzindo os trombos venulares, com pouco efeito nos trombos arteriolares. Já a PGE1, que tem uma ação antiagregante plaquetária, vasodilatadora e de aumentar as propriedades reológicas das hemácias, apresentou efeitos antitrombóticos nas arteríolas, atuando nas vênulas apenas sob altas doses da medicação.

Cunha e cols. em 2005⁵⁷ realizaram um estudo em um modelo de isquemia de membros em ratos e evidenciou que a taxa de viabilidade dos membros dos ratos que receberam a estreptoquinase foi significativamente superior ao grupo controle.

No processo inflamatório a primeira célula a ser ativada é o neutrófilo (NO), que são células chave na lesão de isquemia e reperfusão.^{6, 29, 33, 44, 48, 49, 52, 53} Uma vez ativados, principalmente pelo fator agregador de plaquetas (PAF), os neutrófilos aderem ao endotélio lesado e migram para o interstício (FIGURA 11). Este tipo de migração se dá por um processo em três fases: primeiro os NO rolam sobre o endotélio, depois aderem à parede vascular através de moléculas de adesão^{33, 48, 53} como CD11 e CD18 na parede dos NO e às moléculas ICAM-1 no endotélio; e, por fim, migram por entre as células endoteliais para o interstício onde causam inúmeros efeitos deletérios.

A consequência clínica da perda funcional dos capilares, vasos com diâmetro de 7 a 100 µm, é a não perfusão tecidual e necrose do tecido.

Korthuis e cols.⁶ em 1988 realizaram um estudo com retalhos musculares em cachorros submetidos a 4 horas de isquemia e reperfundidos com sangue depletado de NO. A perfusão com sangue sem NO preveniu o aumento da permeabilidade vascular e da resistência periférica. Os resultados indicaram que NOs ativados lesão a célula endotelial pela produção de radicais livres através do sistema da dinucleotídeo nicotinamida adenina oxidase (NADPH oxidase). Outro mecanismo de lesão demonstrado foi a obstrução de capilares pela adesão de NO à parede do endotélio edemaciado. O diâmetro luminal reduzido pelo edema poder ser completamente obstruído e não permitir a perfusão mesmo com a restauração de pressão de perfusão normal.

Outro experimento realizado por Cordeiro e cols.⁵² em 1999 utilizou anti-histamínicos para bloquear mastócitos em retalhos epigástricos em ilha em ratos evidenciando melhora da sobrevida dos mesmos.

Askar e cols.⁴⁹ em 2005 realizaram estudo do efeito de agentes antineoplásicos na sobrevivência do retalho epigástrico em ilha em ratos e evidenciaram que a neutropenia causou efeito benéfico.

Outro componente da matriz subendotelial envolvido neste processo é o ácido aracdônico, que é substrato de duas enzimas: a ciclooxigenase, que produz intermediários vasoativos chamados prostanóides (prostraglandinas - PG e tromboxane - TX) e a lipooxigenase, que produz peróxidos lipídicos e leucotrienos (importante substância pró inflamatória).

Prostraglandinas são sintetizadas pela maioria das células, mais notadamente pela célula endotelial, enquanto que o tromboxane é sintetizado predominantemente pelas plaquetas e NO⁴⁸. PG é um potente vasodilatador e antiagregante plaquetário e, TX é importante vasoconstrictor e agregante plaquetário. Isto posto, acredita-se que estas substâncias são responsáveis pela regulação do fluxo sanguíneo e da ação trombolítica na microvasculatura.

O uso de PGI₂ elevou de 39% para 68% a taxa de sobrevivência de retalhos epigástricos isquêmicos em coelhos.³³ Outros medicamentos que já foram estudados são os antiinflamatórios como aspirina, ibuprofeno e indometacina; estes fármacos levam a inibição da ciclooxigenase e da síntese do TX, apresentando melhora na sobrevida de retalhos cutâneos.³³

Uma vez estabelecida a reperfusão, da mesma forma que o prejuízo da isquemia cessa, com o oferecimento do oxigênio molecular ao tecido isquêmico, inicia-se uma fase ainda mais deletéria a célula.

A maioria dos esforços dos pesquisadores é focada nesta fase e no tratamento dos radicais livres derivados do oxigênio, produzidos com a oferta de oxigênio molecular (O_2)^{9, 11, 16, 15, 17, 20, 21, 38, 39, 40, 41}.

Em situação de estresse metabólico, onde há menor oferta de O_2 com depleção das reservas energéticas; a célula perde a capacidade de manter o gradiente iônico da membrana e o grande influxo de cálcio para o citoplasma leva a ativação de uma protease que converte, irreversivelmente, a xantina desidrogenase (XD) em enzima xantina oxidase (XO) (FIGURA 9).

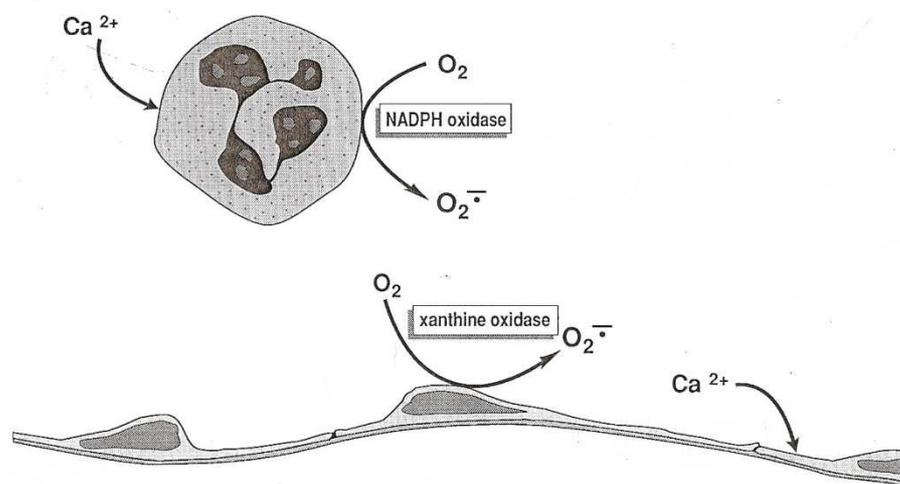


FIGURA 9: Início da reperfusão, produção de radicais livres, maior influxo de cálcio.

Radicais livres (RL) são moléculas com alto poder reativo pela presença de um elétron (e^-) não pareado em seu orbital mais externo,

podem servir como oxidantes ou redutores.⁹ Suas ações incluem: aumento da permeabilidade capilar, aumento da agregação plaquetária, aumento da adesão de neutrófilo, lipoperoxidação das membranas e estímulo ao metabolismo de eicosanóides (leucotrienos e tromboxane).²⁰ (FIGURA 10)

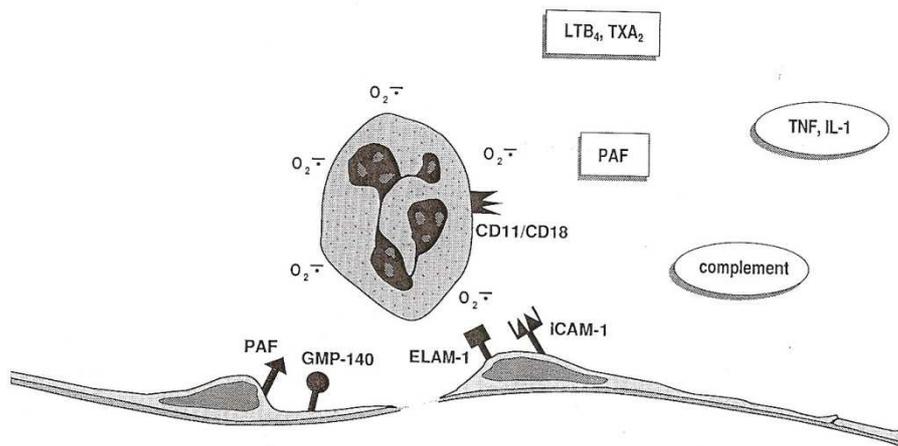


FIGURA 10: Evolução da reperfusão: lesão da membrana endotelial, ativação enzimática de proteases e lípases, geração de mediadores inflamatórios, expressão das moléculas de adesão.

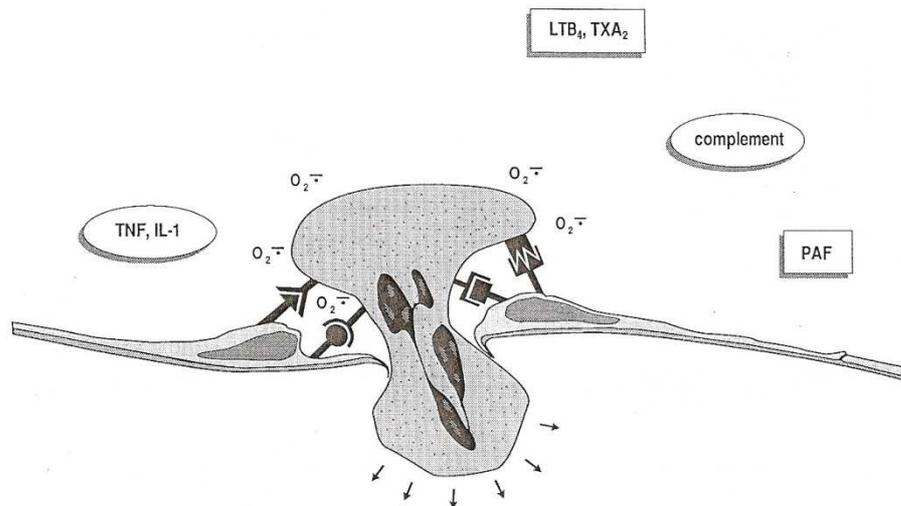
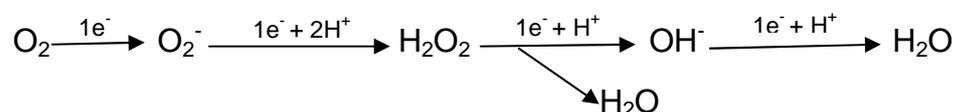


FIGURA 11: Adesão, emigração neutrófilica, com degranulação das enzimas proteolíticas no espaço perivascular.

São fontes de radicais livres ¹⁶:

1. XO endotelial
2. NADP/NADPH oxidase dos NO
3. Transporte iônico da membrana mitocondrial
4. Ácido aracdônico
5. Oxidação de catecolaminas.

O radical superóxido (O_2^-) é produzido pela redução de um elétron da molécula de O_2 , se outro elétron é adicionado com mais dois hidrogênios iônicos (H^+), teremos a produção do radical peróxido (H_2O_2). A adição de outro elétron produz o radical hidroxila (OH^-), o mais deletério dos RL.²⁰



A XD, que corresponde a 90% do total de atividade desta enzima no tecido saudável não pode transferir elétrons do O₂ molecular para formar RL, mas atua no sistema NADPH oxidase como se segue:



A maior fonte de radicais O₂⁻ no tecido isquêmico é a XO, esta enzima usa o O₂ molecular ao invés do NAD⁺ como acceptor de elétrons, produzindo RL superóxido e peróxido de hidrogênio como se segue:



A subsequente reação destes compostos na presença de íons metais, como ferro, resultam na geração de radicais secundários ainda mais tóxicos.

16

A xantina, que é substrato destas enzimas, é acumulada no tecido isquêmico a partir da metabolização para consumo energético de adenina trifosfato (ATP) em adenina difosfato (ADP), este em adenina monofosfato (AMP). A catabolização destes compostos energéticos culmina com o acúmulo de adenosina, inosina e por fim hipoxantina, que é convertida em xantina. A conversão de xantina em ácido úrico é irreversível, depletando dessa forma as reservas de purinas da célula.

Os mecanismos de defesa enzimáticos endógenos para clareamento dos RL são:

1. Sistema de transporte de elétrons da citocromo oxidase
2. Superóxido dismutase (SOD)

3. Catalase e glutaciona peroxidase

E os quelantes de RL não enzimáticos endógenos são:

1. Transferrina, ácido ascórbico, cisteína e ceruplasmina.
2. Vitamina E.
3. Ácidos graxos.

Os quelantes de RL podem agir em reações que removem os RL, bem como inibindo reações que liberem RL.

Durante a isquemia duas mudanças importantes ocorrem no tecido: uma nova enzima entra em atividade (XO) e há acúmulo de seus substratos (hipoxantina e xantina).

Vários estudos evidenciaram o aumento da concentração de XO com o tempo de isquemia.^{11, 17, 22} Quando a ação da XO é inibida as oxipurinas são protegidas e um grau considerável delas pode ser reutilizado para produção de adenina (substrato do ATP) e guanina.⁴²

Alopurinol é um quelante de RL enzimático²⁰ inibidor seletivo das etapas terminais da biossíntese de ácido úrico, sendo eficaz no tratamento da hiperuricemia primária da gota e secundária aos distúrbios hematológicos ou na terapia antineoplásica. O alopurinol e seu metabólito principal, a aloxantina (oxipurinol), são inibidores da xantina oxidase. Juntamente com a SOD, é uma droga amplamente pesquisada no tratamento e prevenção dos efeitos dos RL.

Manson e cols.²² em 1983, avaliaram o efeito do alopurinol administrado antes da elevação de retalhos epigástricos em ilha em ratos submetidos a 8 horas de isquemia venosa. Evidenciaram que os retalhos tratados com alopurinol apresentavam níveis normais de XO, enquanto que os retalhos não tratados apresentavam o dobro da atividade da XO. Os retalhos tratados com alopurinol apresentaram taxas inferiores de necrose.

Os autores supracitados, utilizando o mesmo modelo experimental, demonstraram que a administração de SOD, antes e imediatamente após a reperfusão, apresentou melhora na sobrevida dos retalhos. Os autores concluíram que a administração de quelantes de RL só teria efeito no período logo após a reperfusão.²¹

Im e cols.⁴¹ em 1984, realizaram um estudo com retalhos epigástricos em ilha em ratos submetidos a 8 horas de isquemia venosa; os quais receberam alopurinol e SOD 30 minutos antes e 60 minutos após a reperfusão. Neste estudo houve diminuição significativa da área de necrose dos retalhos dos ratos que receberam SOD e também naqueles que receberam alopurinol, tanto na administração pré como pós reperfusão. Porém a administração do alopurinol após a reperfusão evidenciou uma melhora expressiva, isto pode ser explicado pelo fato de apesar dos RL serem formados imediatamente após a reperfusão, a reperfusão de todo o tecidos pode não ser efetiva no primeiro momento.

Ambrósio e cols.⁴⁰ em 1985, realizaram um estudo com SOD para redução da área de infarto em cachorros demonstrando grande melhora,

desta forma evidenciou-se a importância dos RL na lesão isquêmica miocárdica.

Pokorny e cols.³⁸ em 1989, avaliaram o efeito do alopurinol combinado a SOD em diversas doses em retalhos cutâneos em ratos. A administração foi intraperitoneal e a análise foi tanto de área de sobrevivência do retalho como de fluxo sanguíneo no terceiro dia pós operatório. Tanto a dose mais baixa (35 mg/kg de alopurinol) quanto à dose máxima administrada (100 mg/kg) apresentaram melhores resultados que os retalhos controle, porém altas doses de alopurinol tiveram efeitos tóxicos de litíase urinária.

Picard-Ami e cols.¹⁶ em 1989 realizaram um importante estudo que avaliou os níveis de XO na pele de ratos, porcos e humanos. Evidenciaram que o nível de XO na pele dos ratos foi quarenta vezes maior que na pele de humanos e porcos.

Senel e cols.³⁹ em 1997 realizaram um estudo de cicatrização cutânea em modelo de isquemia evidenciando que RLs eram uma das maiores causas de lesão tecidual em uma ferida em cicatrização e que o uso de SOD e alopurinol melhora a cicatrização cutânea em ratos sob condições isquêmicas.

O aumento da atividade da XO pode ser significativamente bloqueado com a administração do alopurinol antes da elevação do retalho, e isto resulta no aumento da sobrevivência do retalho.^{17, 22, 23, 38,41}

Outros estudos, porém, não evidenciaram melhora da sobrevivência de retalhos cutâneos com o uso do alopurinol.^{13, 26, 45, 57}

O maior problema da maioria dos experimentos é encontrar relevância nos resultados obtidos em animais experimentais para os humanos. O modelo que mais se aproxima da pele humana é o porco³³, porém existe dificuldade de manipulação, acondicionamento do animal e custos que interferem em seu uso em grande escala. Talvez alguma forma de teste *in vitro* com pele humana possa ser usada no futuro.

Outra grande dificuldade é encontrar uma via de administração ideal para o tratamento, já que a administração diretamente no pedículo em casos de trombozes tardias necessita de nova intervenção cirúrgica e a administração sistêmica pode trazer efeitos colaterais indesejados ou não atingir, no tecido isquêmico, a dose desejada do medicamento.

Além disso, os resultados encontrados na literatura são de difícil interpretação e comparação, já que difere amplamente em doses terapêuticas, composição dos retalhos, espécies usadas, períodos de isquemia, tipo de isquemia, associação de fármacos, momento e via de administração, como também nos métodos de análise.

Em nosso estudo a administração da estreptoquinase, infundida sistemicamente após 8 horas de isquemia no momento da reperfusão, apresentou melhora significativa em relação ao controle. Foi o grupo que apresentou o maior número de dados próximo da média caracterizando também o grupo mais homogêneo. Por outro lado, o uso do alopurinol e a

associação de ambas as drogas não demonstraram diferença estatística em relação ao grupo controle.

Diversos estudos evidenciaram os efeitos benéficos do alopurinol utilizado como pré tratamento, ou seja, momentos antes da elevação do retalho, ou antes, do período isquêmico ^{17, 22, 23, 38, 41}, sendo que um estudo realizado em porcos não demonstrou benefício no uso do alopurinol antes da isquemia ⁴⁵. Outros experimentos avaliaram a administração do alopurinol no período pós isquêmico apresentando resultados controversos. ^{13, 26, 28, 38, 39, 42,47}

Provavelmente, administrando o alopurinol como pré tratamento, o benefício deve ser maior, prevenindo a formação de radicais livres, uma vez que sua ação é a de inibir a xantina oxidase, não agindo diretamente nos radicais livres.

Já a estreptoquinase, consagrada na prática clínica como terapia em infartos do miocárdio, entre outras doenças trombóticas, parece exercer melhor efeito quando utilizada, como veículo de desobstrução dos vasos do retalho, com a solução trombolítica infundida sob pressão maior que a do animal na tentativa de reverter os processos que levam a não reperfusão ⁸.
^{27, 31, 32}

Uma nova diretriz de estudo da sobrevivência dos retalhos cutâneos é o pré condicionamento isquêmico, onde períodos curtos de isquemia controlada seguido de reperfusão aumentariam a tolerância do tecido a um período isquêmico posterior mais prolongado. ⁴⁸

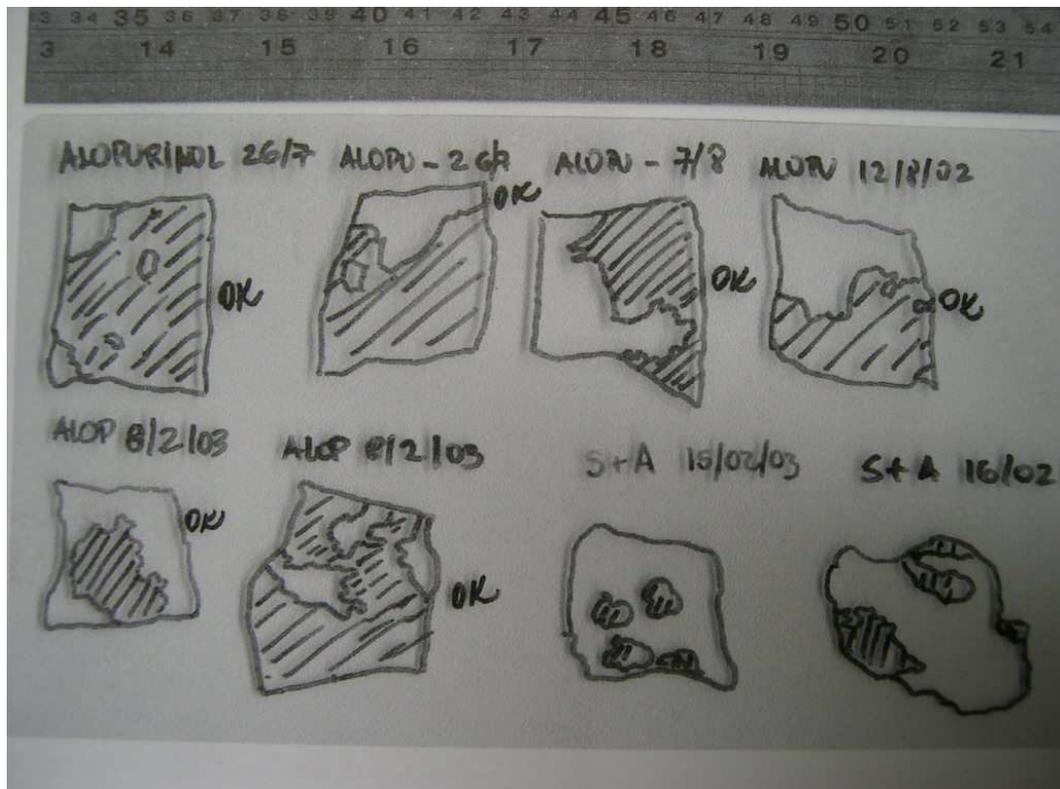
Mais esforços devem ser destinados para o completo entendimento destes mecanismos de lesão celular, para que o resultado possa chegar à prática clínica e assim alcançarmos nosso objetivo maior que é o benefício dos pacientes.

CONCLUSÕES

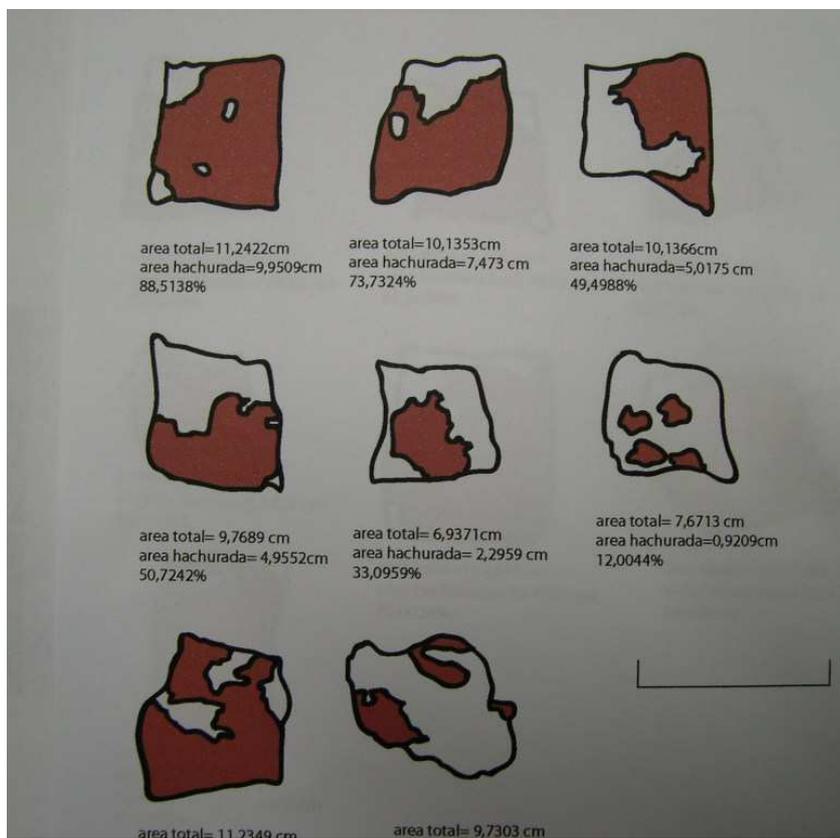
Conclui-se que a administração sistêmica da Estreptoquinase, após oito horas de isquemia global mista normotérmica seguido de reperfusão, apresentou melhora na taxa de sobrevivência de retalhos epigástricos em ilha em ratos, quando comparado aos retalhos de animais que receberam alopurinol, associação das duas drogas ou solução de cloreto de sódio.

ANEXOS

ANEXO A: Folha de acetato com a transposição gráfica dos retalhos (área hachurada=área necrótica)



ANEXO B: Imagens escaneadas, área em vermelho = área necrótica



ANEXO C:

Agentes de eutanásia

Método	Níveis recomendados	Comentários
CO ₂	Concentração acima de 70%	Alta concentração pode ser estressante para certas espécies
Nitrogênio e Argônio	Altas concentrações	Podem ser estressantes para algumas espécies, outros métodos são preferíveis
CO	Concentrações de 4% a 6%	Efeitos tóxicos cumulativos para pessoal exposto, explosivo em concentrações acima de 10%
MS 222, TMS	≥ 250 mg/L	Eutanásia de anfíbios e peixes; animais mergulhados na solução; método não apropriado se os animais forem usados como alimento
Cloreto de potássio	1 a 2 mmol/kg	Animal deve, necessariamente, estar previamente anestesiado

Tabela 2. Métodos de eutanásia para animais ectotérmicos (peixes, anfíbios e répteis)

Método	Níveis recomendados	Comentários
Pentobarbital de sódio	60 a 100 mg/kg	Outros barbitúricos podem causar dor quando injetados
MS 222, TMS	Ver tabela 1	
Hidrocloreto de benzocaína	≥ 250 mg/L	Eutanásia de anfíbios e peixes, animais mergulhados na solução
2-fenoxietanol	0,5 a 0,6 mL/L ou 0,3 a 0,4 mg/L	Eutanásia de peixes

Fonte: Report of the AVMA Panel on Euthanasia, JAVMA, vol 218 nº 05, 2001

ANEXO D:

Eutanásia

Métodos Inaceitáveis:

- I - Embolia Gasosa;
- II - Traumatismo Craniano;
- III - Incineração in vivo;
- IV - Hidrato de Cloral (para pequenos animais);
- V - Clorofórmio;
- VI - Gás Cianídrico e Cianuretos;
- VII - Descompressão;
- VIII - Afogamento;
- IX - Exsanguinação (sem sedação prévia);
- X - Imersão em Formol;
- XI - Bloqueadores Neuromusculares (uso isolado de nicotina, sulfato de magnésio, cloreto de potássio e todos os curarizantes);

Métodos Aceitáveis:

Espécie	Recomendados	Aceitos sob Restrição
Anfíbios	Barbitúricos, anestésicos inaláveis (em algumas espécies), Dióxido de Carbono (CO ²), Monóxido de Carbono (CO), metano sulfonato de triclaína (TMS, MS222), hidrocloreto de benzocaína, dupla secção da medula espinhal	Pistola de ar comprimido, pistola, atordoamento e decapitação, decapitação e secção da medula espinhal
Animais selvagens de vida livre	Barbitúricos intra-venosos (IV) ou intra-peritonais (IP), anestésicos inaláveis, cloreto de potássio com anestesia geral prévia.	CO ² , CO, Nitrogênio (N ²), argônio, pistola de ar comprimido, pistola, armadilhas (testadas cientificamente)
Animais zoológicos	Barbitúricos, anestésicos inaláveis, CO ² , CO, cloreto de potássio com anestesia geral prévia	N ² , argônio, pistola de ar comprimido, pistola
Aves	Barbitúricos, anestésicos inaláveis, CO ² , CO, pistola	N ² , argônio, deslocamento cervical, decapitação
Cães	Barbitúricos, anestésicos inaláveis, CO ² , CO, cloreto de potássio com anestesia geral prévia	N ² , argônio, pistola de ar comprimido, eletrocussão com sedação prévia
Cavalos	Barbitúricos, cloreto de potássio com anestesia geral prévia, pistola de ar comprimido	Hidrato cloral, (IV, após sedação), pistola, eletrocussão com sedação prévia

Coelhos	Barbitúricos, anestésicos inaláveis, CO ² , CO, cloreto de potássio com anestesia geral prévia	N ² , argônio, deslocamento cervical (<1kg), decapitação, pistola de ar comprimido
Gatos	Barbitúricos, anestésicos inaláveis, CO ² , CO, cloreto de potássio com anestesia geral prévia	N ² , argônio
Mamíferos marinhos	Barbitúricos, hidroclorato de etorfina	Pistola (cetáceos <4m de comprimento)
Peixes	Barbitúricos, anestésicos inaláveis, CO ² , triclaína metano sulfonato (TMS, MS222), hidroclorato de benzocaína, 2-fenoxietanol	Decapitação e secção da medula espinhal, atordoamento e decapitação ou secção da medula espinhal
Primatas não-humanos	Barbitúricos	Anestésicos inaláveis, CO ² , CO, N ² , argônio
Répteis	Barbitúricos, anestésicos inaláveis (em algumas espécies), CO ² (em algumas espécies)	Pistola de ar comprimido, pistola, decapitação e secção da medula espinhal, atordoamento e decapitação
Roedores e outros pequenos mamíferos	Barbitúricos, anestésicos inaláveis, CO ² , CO, cloreto de potássio com anestesia geral prévia	Metoxiflurano, N ² , argônio, deslocamento cervical (ratos <200g), decapitação
Ruminantes	Barbitúricos, cloreto de potássio com anestesia geral prévia, pistola de ar comprimido	Hidrato cloral (IV, após sedação), pistola, eletrocussão, com sedação prévia
Suínos	Barbitúricos, CO ² , cloreto de potássio com anestesia geral prévia, pistola de ar comprimido	Anestésicos inaláveis, CO, hidrato cloral, (IV após sedação), pistola, eletrocussão com sedação prévia, pancada na cabeça (< 3 semanas de idade)
Visões, raposas, e outros mamíferos criados para extração do pêlo	Barbitúricos, anestésicos inaláveis, CO ² (visões requerem altas concentrações para eutanásia sem agentes suplementares), CO, cloreto de potássio, com anestesia geral prévia	N ² , argônio, eletrocussão, com sedação prévia seguida de deslocamento cervical.

Fonte: Resolução N° 714 de junho de 2002 do Conselho Federal de Medicina Veterinária

ANEXO E:



APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 03/10/2007, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0498/07**, intitulado: **"ESTUDO DA AÇÃO DA STREPTOQUINASE E DO ALLOPURINOL EM RETALHOS CUTÂNEOS EM ILHA SUBMETIDOS À ISQUEMIA PROLONGADA- ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS"** apresentado pelo Departamento de **CIRURGIA**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **PROF. DR. MARCUS CASTRO FERREIRA**

Pesquisador (a) Executante: **TATIANA DE MOURA**

CAPPesq, 05 de Outubro de 2007

assinatura
Massad

Prof. Dr. Eduardo Massad
**Presidente da Comissão
de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa**

PROF. DR. MARCUS CASTRO FERREIRA
Coordenador da Pós-Graduação
Área de Cirurgia Plástica
FMUSP

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovidio Pires de Campos, 255, 5º andar - CEP 05403-010 - São Paulo - SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br -sol

Massad
16/10/07

REFERÊNCIAS

Referências:

1. Fantone JC. Pathogenesis of ischemia-reperfusion injury: an overview. In: Zelenock GB, ed. *Clinical ischemic syndromes*. St Louis: CV Mosby, 1990: 137-145
2. Kerrigan C., Rollin D. Critical Ischemia Time and the failing skin flap. *Plast Reconstr Surg* 1982;69:986-989.
3. Zarem HA, Hayden B, Soderberg R, et al. Effect of corticosteroid administration in ischemia-ischemic injury. *Plast Reconstr Surg* 1988;82:865-871
4. Breitbart GB, Dillon PK, Suval WD, et al. Dexamethasone attenuates microvascular ischemia-reperfusion injury in the rat cremaster muscle. *Microvas Res* 1989;38:115-163
5. Nischter LS, Sobieski MW, Edgerton MT. Augmentation of critical skin flap survival following ibuprofen therapy. *Ann Plast Surg* 1986;16:305-312
6. Korthuis RJ, Goisham MB, Granger DN. Leukocyte depletion attenuates vascular injury in postischemic skeletal muscle. *Am J Physiol* 1988; 254:H823
7. Till GO, Friedl HP, Ward PA. Phagocytic cell-mediated injury: relationship to ischemic injury. In: Zelenock GB, ed. *Clinical ischemic syndromes*. St Louis: CV Mosby, 1990: 337-345
8. Weinzwieg N, Gonzalez M. Free tissue Failure is not an all-or-none phenomenon. *Plast Reconstr Surg* 1995; 96:648-660.

9. McCord JM. Oxygen derived free radicals in post ischemic tissue injury. *N Engl J Med* 1985; 312:152-163
10. Angel MF, Ramasastry SS, Swartz WM, et al. Augmentation of skin flap survival with allopurinol. *Ann Plast Surg* 1987; 18:494-497
11. Angel MF, Ramasastry SS, Swartz WM, et al. The critical relationship between free radicals and degrees of ischemia. Evidence for tissue intolerance of marginal perfusion. *Plast Reconstr Surg* 1988; 81: 233-239
12. Suarez Nieto C, Suarez Garcia MJ, Barthe Garcia P.A Comparative study on the effect of various pharmacological agents on the survival of skin flaps in the rat. *Br J Plast Surg* 1992;45:113-116
13. Stewart RJ, Moore T, Bennett B, et al. Effect of free radical scavengers and hyperbaric oxygen on random-pattern skin flaps. *Arch Surg* 1994;129:982-987
14. Suzuki S, Miyachi Y, Niwa Y, Isshiki N. Significance of reactive oxygen species in distal flap necrosis and its salvage with liposomal SOD. *Br J Plast Surg* 1989;42:559-564
15. Parks DA, Bulkey GB, Granger DN. Role of oxygen free radicals in shock, ischemia and organ preservation. *Surgery* 1983;94:428-432
16. Picard-Ami LA, Mackay A, Kerrigan CL. Pathophysiology of ischemic skin flaps: differences in xanthine oxidase levels among rats, pigs and humans. *Plast Reconstr Surg* 1991;87:750-755
17. Rees R, Smith D, Li TD, et al. The role of xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase in skin ischemia. *J Surg Res* 1994;56:162-167

18. May JW, Chait LA, O'Brien BM, Hurley JV. The no reflow phenomenon in experimental free flaps. *Plast Reconstr Surg* 1978;61:256-267
19. Ames A III, Wright R, Kowoda M, Thurston JM, Majno G. Cerebral ischemia II. The no reflow phenomenon. *Am J Pathol* 1968;52:437-453
20. Angel MF, Ramasastry SS, Swartz WM, et al. Free radicals: basic concepts concerning their chemistry, pathophysiology, and relevance to plastic surgery. *Plast Reconstr Surg* 1987;79:990-997
21. 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;198:87-90
22. Im MJ, Pak WH, Shen CJ, Manson PN, Bulkley GB, Hoopes JE. Effect of allopurinol on the survival of hyperemic island skin flaps. *Plast Reconstr Surg* 1984;73:276-278
23. Im MJ, Manson PN, Bulkley GB, Hoopes JE. Effect of superoxide dismutase and allopurinol on the survival of acute island skin flaps. *Ann Surg* 1985; 201:357-359
24. Maeda M, Fukui A, Tamai S. Combined therapy with antithrombotic agents and radical scavengers for reperfusion injury of flaps. *J Reconstr. Microsurg* 1988; 5 344-348
25. Murthy P, Riesberg M, Hart S, Bustillo A, Duque C, Said S, Civantos F. Efficacy of perioperative thromboprophylactic agents in the maintenance of anastomotic patency and survival of rat microvascular free groin flaps. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2003; 129:176-182.

26. Im MJ, Beil RJ, Wong L, Angel MF, Manson PN. Effects of sympathetic denervation and oxygen free radicals on neovascularization in skin flaps. *Plast reconstr Surg* 1993; 92:736-741.
27. Puckett C, Misholy H, Reinisch J. The effects of streptokinase on ischemic flaps. *Hand Surg* 1983;8: 101-104.
28. Tamir G, Yafee B, Pri-Chen S, Hauben DJ, Tsur H. The effect of Allopurinol on experimental island skin flap survival under prolonged periods of arterial ischemia. *Br J Plast Surg* 1994;47:155-157
29. Marzella L, Jesudass RR, Manson PN, Myers RAM, Bulkey GB. Functional and structural evaluation of vasculature of skin flaps after ischemia and reperfusion. *Plast Reconstr Surg* 1988; 82:742-750.
30. Lipton H, Jupiter J. Streptokinase salvage of a free tissue transfer case report and a review of the literature
31. Dolan RW, Kerr D, Schneiderman T, Arena S .Reducing Ischemia-reperfusion injury in rat island groin flaps using dexamethasone. *Annals of Plast Surg* 1995; 35:1098-1103.
32. Schubert W, Hunter D, Guzman-Stein G, et al. Use of streptokinase for the salvage of a free flap case report and review of use of thrombolytic therapy. *Microsurgery* 1987;8:117-121
33. Knight K. Review of postoperative pharmacological infusions in ischemia flaps. *Microsurgery*. 1994; 15:675-684.
34. Kerrigan CI, Stoland MA. Ischemia reperfusion injury: a review .*Microsurgery* 1993;14:165-175

35. Maeda M, Fukui A, Tamai S, et al. Continuous local intra-arterial infusion of antithrombotic agents for replantation (comparison with intravenous infusion). *Br J Plas Surg* 1991;44:520-525
36. Jacobs GR, Reinish JF, Puckett CL. Microvascular fibrinolysis after ischemia: its relation to vascular patency and tissue survival. *Plast Reconstr Surg* 1981; 68:737-741.
37. Cooley BC, Gould JS. Experimental models for evaluating antithrombotic therapies in replantation microsurgery. *Microsurgery* 1987;8:230-233
38. Pokorny 'A, Bright D, Cummings W. The effects of allopurinol and superoxido dismutase in a rat model of skin flap necrosis. *Otolaryngol Hesd Neck Surg.* 1989; 115:207-212.
39. Senel O, Centikale O, Ozbay G, Ahçioğlu F, Bulan R .Oxygen free radicals impair wound healing in ischemic rat skin. *Ann Plast Surg* 1997; 39:516-523.
40. Ambrosio G, Lewis BC, Hutchins GM, et al. Reduction in experimental infarct size by recombinant human superoxide dismutase. Insights into pathophysiology of reperfusion injury. *Circulation* 1986;7:1424-1433
41. Im MJ, Manson, Bulkey GB, et al. Effects of superoxide dismutase and allopurinol on the survival of acute island skin flaps. *Ann Surg* 1985;201:357-359
42. De Wall RA, Vasko KA, Stanley EL, et al. Responses of ischemic myocardium to allopurinol. *Am Heart J.* 1971;82:362.

43. Harashina T, Shawada Y, Watanabe S. *The relationship between venous occlusion time in island skin flaps and survival. Plast Reconstr. Surg* 1977;60:P92-95
44. Lepore D, Knight K, Bhattacharya S, Ritz M, Robbins S, Sieg P, Morrison W, O'Brien B. *Drug mixture which improves survival of ischemic rabbit epigastric skin flaps. Microsurgery.* 1994; 15:685-692.
45. Picard-Ami LA, Mackaay A, Kerrigan CL. *Effects of Allopurinol on the survival of experimental pig flaps. Plast Reconstr Surg* 1992; 89:1098-1103.
46. Hirigoyen MB, Zhang W, Gordon RE, Prabhat A, Urken ML, Weinberg H. *Additional benefit of heparin in the thrombolytic salvage of ischemic skin flaps. Ann Plast Surg.* 1995;35(6);612-619
47. Prada FS, Arrunategui G, Alves MC, Ferreira MC, Zumiotti AV. *Effect of Allopurinol, superoxide dismutase and hyperbaric oxygen on flap survival. .Microsurgery* 2002; 22:352-360.
48. Zahir K, Syed S, Zink J, Restifo R, Thomson J. *Ischemic preconditioning improves the survival of skin and myocutaneous flaps in rat model. Plast Reconstr Surg;* 1998 102(1): 140-150.
49. Ibrahim Askar, M. Faruk Oktay, Ali Gurlek, Bilsel Bac. *Protective effects of some antineoplastic agents on ischemia-reperfusion injury in Epigastric Island skin flaps. Microsurgery* 2006 3 march DOI 10.1002/micro.20193 193-198.

50. Sasaki GH, Pang CY. Hemodynamics and viability of acute neurovascular island skin flaps in rats. *Plast Reconstr Surg* 1980; 65: 152-159.
51. Petry JJ, Wortham KA. The anatomy of epigastric flap in the experimental rat. *Plast Reconstr Surg* 1984; 74:410-415.
52. Cordeiro PG, Lee JJ, Mastorakos D, Hu QY, Pinto JT, Santamaria E. Prevention of ischemia-reperfusion injury in a rat skin flap model: the role of mast cells, cromolyn sodium and histamine receptor blockade. *Plast Reconstr Surg* 2000; 105: 654-659.
53. Siemionow M, Arslan E. Ischemia/Reperfusion injury: a review in relation to free transfers. *Wiley InterScience DOI*;10.1002/micr.20060.
54. Klein, Matthew B; Chan, Pak H.; Chang, James. Protective effects of superdismutase against Ischemia-Reperfusion injury: Development and application of a transgenic animal model. *Plast Reconstr Surg* 111 jan 2003 251-255.
55. Mellow, C.; Knight, K.; Angel, M.; Coe, S.; O'Brien Bernard. The Biochemical Basis of Secondary Ischemia. *Journal of Surgical Research* 52,226-232 (1992).
56. Fletcher AP, Aljaersig N, Sherry S: The maintenance of a sustained thrombolytic state in man: I. Induction and effects. *J Clin Invest* 38: 1.096, 1959.
57. Cunha M.; Silva J.; Nakamoto H.; Ferreira, M. 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.

58. Hashimoto, I.; Nakanishi, H.; Shono, Y.; Masharino, Y.; Maki T. *The Features of thrombus in a microvessel injury model and the antithrombotic efficacy of heparin, urokinase and prostaglandin E1. Plast Reconstr Surg* 2003 111 (7) June 2003 pp 2307-2314.
59. Besteiro J, Ferreira M, Tariki J. *Circulação de retalhos em ilha: estudo experimental em ratos. Rev. Paul. Med., 1980; 96: 56-60.*
60. Chem R, Perin E, Maracaja P. *Estudo de revascularização de retalhos em ratos. R. Amrigs, 1982; 26(1): 22-26.*
61. Inci G, Kara C, Özden A, Öçsel H. *The effect of trimetazidine on the survival of rat island skin flaps subjected to ischemia-reperfusion injury. Ann Plast Surg. 2001; 47(2): 168-171.*
62. Gemperli R. *Estudo da sobrevivência de retalhos em ilha após ligadura seriada dos diferentes elementos do pedículo vascular – Estudo experimental. São Paulo, 1985. 74p. Tese (Doutorado) Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.*
63. Fontana C. *Efeito da N2 – Mercaptopropioniglicina na sobrevivência de retalhos cutâneos submetidos à oclusão temporária do pedículo vascular – Estudo experimental em ratos. São Paulo, 1992. Tese (Doutorado) Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.*