RAMIRO HESQUIO SILVA

“Avaliação de proteção celular a isquemia de retalhos musculares
com soluções preservadoras de tecidos em modelo de ratos”

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

Área de concentração: Cirurgia Plástica

Orientador: Prof. Dr. Marcus Castro Ferreira

São Paulo

2009

Prefacio

A inteligência suprema é a que coordena este sistema, e que o mundo dos conceitos a chama de “Cosmos”; existimos graças a esta perfeita sincronia de todos os elementos, ao fenômeno de não reperfusão que não ocorre somente no corpo humano. O planeta Terra já passou por um lapso de Extinção Permeana massiva há 250 milhões de anos, quando o transportador oceânico do Planeta (assim como as veias e artérias) parou, e as águas estancou, o que acidificou e extinguiu mais de 90% das formas de vida existentes no Planeta. O planeta Terra também tem suas proteases ácidas, assim como as caspases celulares, bem como o Fitoplancton que produz 50% de todo o O₂, vivendo nos oceanos a mercê da acidificação; e sabe-se que o pH oceânico está baixando. O segredo do código cósmico que organiza o átomo está confinado a essa inteligência suprema que coordena nossas células, as interações com as outras, próximas e longes da nossa galáxia. O humano mora no citoplasma planetário, que está formado pelos oceanos, influenciando diretamente a troposfera, primeira capa sobre o nível do mar, que é o espaço preciso da morada do homem (10 km), a 2ª capa é estratosfera (13 km), a 3ª a mesosfera (30 km), a 4ª a termosfera (80 km), e finalmente o espaço extracelular localizado a mais de 100-150 km sobre o nível do mar. Visto desde esta perspectiva um ser humano não é nada mais que um microrganismo que foi desenhado para viver na troposfera, composta de ar e água, e que guarda o inconsciente evolutivo da espécie que ele representa e que se manifesta aqui e agora como uma energia que questiona seu microcosmo.

A célula tem uma interdependência entre o mundo intracelular e o extracelular; interdependência entre a vida e a atmosfera, toda célula é um mundo constante de enumeráveis câmbios, isto para perpetuar a vida; o citosol é altamente poderoso e altamente sensível, sendo essencial para a vida; o citosol planetário é a atmosfera que protege o núcleo das condições externas, o controle das condições deste citosol nos leva a um entendimento maior da dinâmica celular que ocorre desde uma célula corporal até uma célula cósmica (o planeta)

Todo movimento atmosférico é devido ao calor em movimento que conjugado com a água produz câmbios complexos e imprescindíveis. A nível capilar, a isquemia exemplifica um campo aberto ao entendimento de milhões de fatores, que somadas tomam a decisão irrefutável de um desfecho (apoptose) o sucesso (vida); o presente estudo é um intento por compreender a nível microcirculatorio o efeito protetor das soluções aqui apresentadas.

Os processos fisiológicos se repetem em espelho; à medida que nosso entendimento se acerca as condições que favorecem e protegem a microcirculação corporal, podemos tomar com maior consciência nossa missão neste momento evolutivo da célula cósmica “o Planeta”, nos integrando ao seu processo, sem que nosso passo afete negativamente outros sistemas de vida, por que no entendimento da unidade está o segredo da eternidade.

A apoptose planetária está a vir no tempo programado, assim como a apoptose celular.

Agradecimentos

Agradeço a bondade dos doadores dos processos meioticos que decidiram se unir um dia e conformar este microrganismo; impulsionado, e apoiado em seu crescimento cotidiano... Obrigado a meus pais.

Assim mesmo um agradecimento sem tempo a quem confiou e respaldou o projeto que aqui se apresenta o Professor Marcus Castro Ferreira, e a seu sistema solar: Norinha, que com a sabedoria de um Júpiter protege as órbitas do sistema interno, a quem agradeço seu abrigo e amor durante esta visita ao lado sul do planeta.

Como não agradecer aos Professores natos que se encontram no caminho e na hora certa e que enriqueceram estes anos com seus ensinios e confidencias para chegar ao entendimento das galáxias internas, de onde mesmo o elétron tem um universo em expansão.

A meus irmãos, energias paralelas desde outros tempos, meus sobrinhos, lembranças que temos que doar uma melhor célula cósmica do que aquela que recebemos.

Agradeço a todos os meus irmãos de alma, círculo energético primário do aqui e agora, que se somam a este tubo de energia, chamado vida. Em especial, agradeço ao Dr. Amado Saul Cano, exemplo intocável de perseverança e entrega.

Meus agradecimentos especiais também a Dra. Mariana Matera Veras, quem realinhou seu cosmos ao processo que aqui se apresenta, realizando uma parte fundamental da análise estereológica, sua impressão desde as ciências básicas, minha admiração e agradecimento.

Agradeço também ao Instituto Politécnico Nacional (IPN), Universidade Nacional Autónoma do México (UNAM) e a Universidade de São Paulo (USP); assim também a todos os colegas The American British Cowdray, Medical Center, I.A.P.(ABC), do Hospital Geral do México (HGM), e do Hospital das Clínicas (HC).

Agradeço aos professores de microcirurgia, em especial o professor e amigo Dr. Jose Luis Haddad Tame. Obrigado a todos, por seus ensinamentos os quais com seus caminhos percorridos contribuíram para a ampliação e entendimento do meu caminho. Obrigado por compartilhar seus sucessos e erros do ser humano que levam dentro de cada um de vocês, e que ficarão em meu coração e terão meu respeito eterno.

Meu agradecimento aos meus colegas, em especial ao Dr. Jose Carlos Faes; assim como também os que ainda não nasceram, por que a missão é de todos... uma só consciência evolutiva.

Agradecimento ao Laboratório de Biologia Celular da FMUSP e a Dra. Elia Caldini que acreditou e aceitou este projeto em colaboração, ampliando e enriquecendo as ciências básicas do presente estudo.

Agradecimento ao pessoal do Laboratório de Microcirurgia da FMUSP, que sempre encontrou uma solução para cada experiência. E em especial a Edna Maria Rodrigues dos Santos e Maria Aparecida Moreira que com sua alegria de viver incita a superação cotidiana.

Agradecimento também a Geração Cósmica, Fundação de Consciência Planetária, nascida como fruto desta busca. Obrigado Julie, Norman e Carlos, membros ativos desta integração e a todos os membros por vir.

SUMARIO	Pag.
Lista de Abreviaturas.....	I
Lista de Figuras.. ..	II
Lista de Tabelas.....	III
Lista de Graficos.....	IV
Resumo.	V
Summary.	VI
1.Introdução	1
2. Revisão da Literatura	5
2.1 Isquemia primária e reperfusão	5
2.2 Dano do tipo isquemia e reperfusão	7
2.3 Dano a células endotelial.....	13
2.4 Isquemia secundaria.....	15
2.5 Fenômeno de não reperfusão.....	17
2.6 Apoptose celular	19
2.7 Técnica de transplante Microcirurgico	22
2.8 Solução de perfusão.....	23
3. Objetivos.....	32

4. Material e Métodos	33
4.1 Animais Experimentais	34
4.2 Grupos experimentais.....	34
4.3 Procedimento cirúrgico	36
4.4 Estudo imunoistoquímico e ultra-estrutural.....	40
4.4.1 Estudo estereológico do volume total de células apoptóticas.....	40
4.4.2 Avaliação quantitativa e qualitativa de mitocôndrias na fibra muscular	46
4.5 Análise estatística.....	48
 5. Resultados	 49
 6. Discussão	 56
 7. Conclusões	 66
 8. Referências	 68

I. Lista de abreviaturas

I/R	Isquemia/Reperusão
UW	Solução da Universidade de Wisconsin
CP-USP	Solução cirurgia plástica da Universidade de São Paulo
FMUSP	Faculdade de medicina da universidade de São Paulo
LIM	Laboratório de investigação medica
DNA	Acido desoxirribonucléico
ATP	Adenosina trifosfato
AMP	Adenosina monofosfato
cGMP	Guanosina monofosfato cíclico
pH	Potencial hidrogeniônico
PAF	Fator de ativação plaquetario
TNF	Fator de necrose tumoral
TNFα	Fator de necrose tumoral alfa
TF	Fator tecidual
NFKB	Fator nuclear kB
ROS	Espécies reativas de oxigênio
O₂⁻	Anion superoxido
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
OH⁻	Radical hidroxila
SOD	Superoxido dismutase
NO	Oxido nítrico
NOS	Oxido nítrico sintetase
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotideo-P

fMLP	N-formylmethionyl phenylalanine
PAPS	Poly-ADP ribose polymerase
CAM-1	Molécula de adesão celular 1
MAPK	Ativação de proteínas miogénicas
HC	Hidrocortisona
DMX	Dexametasona
No.	Numero
Hr	Horas
Min.	Minuto
SD	Desvios padrões
GI	Grupo 1
GII	Grupo 2
GIII	Grupo 3
GV	Grupo 4
Pag.	Pagina
nmol	Nanomol
kg	Quilograma
g	Grama
ml	mililitro
Mg	Miligramas
n	Numero de animais
°C	Graus Celsius

Lista de Figuras	Pag.
Figura 1: Separação do membro pélvico direito.....	37
Figura 2: Pinçamento dos vasos femorais profundos (<i>isquemia</i>).....	37
Figura 3: Irrigação com solução preservadoras de tecidos	39
Figura 4: Liberação dos <i>clamp</i> (reperfusão).....	39
Figura 5 Inclusão esterologica.....	42
Figura 6 Análise de imagens IMAGE-J das células apoptóticas.....	45
Figura 7 Posicionamento do músculo para obtenção das biopsias	47
Figura 8 Blocos de resina spurr “ Microscopia eletrônica”.....	47
Figura 9 Micrografias imunoistoquímica para a caspase 3	54
Figura 10 Eletromicrografias do tecido muscular.....	55

II. Lista de Tabelas

Pag.

Tabla 1	Média e desvio padrão dos parâmetros referentes ao volume de células apoptóticas e numero de mitocôndrias normais e danificadas no tecido muscular.....	50
----------------	---	----

III. Lista de gráficos	Pag.
Gráfico 1 Volume total médio de células apoptóticas no músculo gastrocnêmico.....	51
Gráfico 2 Porcentagem do volume total do músculo gastrocnêmico ocupado por células marcadas positivamente por Caspase 3.	52
Gráfico 3 Porcentagem de mitocôndrias danificadas nos miócitos do músculo vasto lateral	53

IV. Resumo

A transferência de retalhos livres e o reimplante de tecidos têm em comum a exposição dos tecidos à isquemia e tempos de reperfusão variáveis, que são importantes na determinação dos danos celulares estruturais e ultra-estruturais, às vezes irreversíveis. O tempo de isquemia dificilmente pode ser controlado no período pré ou transoperatório, mas pode-se tentar prevenir ou diminuir as alterações celulares com soluções preservadoras, como, por exemplo, a da Universidade de Wisconsin, amplamente utilizada na prática clínica dos transplantes de tecidos. Porém a disponibilidade e o custo alto destas soluções dificultam seu uso rotineiro nos centros cirúrgicos. O presente trabalho propõe a utilização de solução de preservação (Solução Plástica-USP) que pode ser facilmente preparada com medicamentos acessíveis e baixo custo; a eficiência desta solução foi comparada com a da solução de Wisconsin.

Os resultados demonstraram que não existe diferença significativa entre a solução Plástica-USP, comparável à solução de Wisconsin; conferindo, ambas, um maior nível de proteção celular sobre os controles; beneficiando significativamente os resultados, e diminuindo assim os riscos de perdas do transplante a baixo custo.

Descritores

Isquemia-reperfusão, apoptose, músculo esquelético, retalho livre, microcirurgia vascular.

V. Summary

The free flaps transfer and reimplantation of tissue has in common the exposure of the tissue to ischemia and different time of reperfusion which are important for the determination of the extent of the cellular injury, being sometimes irreversible. In the pre and trans-surgical procedure the control of the ischemic period is difficult. Although efforts are made to prevent and decrease cellular changes using preservative solution, such as University of Wisconsin (UW) used in routine transplant of organs. The availability and high cost of this solution some time is one problem.

The present study was made in a rat model that we have been reported in others works, we proposed the utilization of a preservation solution that we called Plastic Surgery-USP solution (PS-USP); witch can be easily prepared with accessible and low cost drugs.

The efficiency of this PS-USP solution was compared to UW; our result showed that there is not significative difference in the protective effects of the PS-USP and UW solutions; both solutions were efficient considering cellular protection to ischemia/reperfusion injury, decreasing the risks of flap lost, with low cost and easy disposition.

Descriptors

Ischemia-reperfusion, apoptosis, skeletal muscle, free flap, microsurgery

1. Introdução

As transferências de tecidos utilizando técnica microcirúrgica representam uma realidade atual com demanda crescente, acompanhando o desenvolvimento das técnicas reconstrutivas; na medida em que entendemos os processos intracelulares envolvidos em sua sobrevivência, poderemos controlar as variáveis independentes que acompanham o sucesso destes procedimentos. A taxa de sucesso esperada atualmente é maior que 90% quando utilizado retalhos microcirúrgicos, mas os cirurgiões continuam se frustrando pela perda ocasional e inesperada de alguns desses retalhos. Dados experimentais indicam que a fisiopatologia das perdas origina-se nos danos provocados pelo processo de isquemia/reperfusão (I/R) e recomendam diversas terapias a fim de evitar esse desfecho; os dados experimentais, muitas vezes, são confusos e desorganizados dificultando a utilização na prática clínica.

A isquemia primária se inicia logo após a conclusão da dissecação do retalho na área doadora e com a oclusão e a secção do pedículo vascular pelo cirurgião; inicia-se fase crítica que dura até que circulação seja restabelecida (reperfusão). Na maioria das vezes, a causa da perda dos retalhos não é evidente durante a fase de isquemia primária, entretanto fatores técnicos e fisiológicos ocorrem nesta fase e podem ser determinantes no insucesso ulterior dos retalhos.

Ao completar-se a anastomose vascular e liberarem-se os *clamps*, o período de reperfusão se inicia; se os eventos ocorridos durante a fase de coleta do retalho forem favoráveis, o restabelecimento da circulação

sanguínea é nutritivo e reverte o desarranjo fisiológico transitório provocado durante o período de isquemia primária; o retalho se recupera durante as fases iniciais de reperfusão com injúrias mínimas e o metabolismo celular normal é restabelecido, porém se eventos desfavoráveis ocorrerem durante a fase de restabelecimento do fluxo sanguíneo, a reperfusão pode induzir dano letal ao retalho.

Devemos separar aqui outra causa de insucesso de transplante que ocorre quando um novo período de isquemia se instala em conseqüência de problemas técnicos com outra interrupção do fluxo sanguíneo, que é sempre mais grave que a conseqüente reperfusão primária; fase esta chamada de isquemia secundária, que precisa de uma pronta revisão cirúrgica é mandatória para salvar o retalho. O restabelecimento do novo fluxo sanguíneo promove a infusão de substratos envolvidos no processo de injúria do tecido dependentes do tempo de isquemia, havendo risco de perda do retalho; as taxas de insucesso aumentam de acordo com a duração da isquemia causada e com o número de episódios isquêmicos não desejados.

Kerrigan e Stotland¹ caracterizaram o dano tecidual provocado por injúria isquêmica primária que leva a morte celular causada por desgaste, lesão isquêmica é anóxica, e quando prolongada pode induzir a necrose celular; o esgotamento das reservas da adenosina trifosfato (ATP) causa falência das bombas de membrana, toxinas se acumulam e ocorre a destruição de estruturas intracelulares vitais; já o dano irreversível após a reperfusão é caracterizado como morte celular por bombardeamento; os neutrófilos ativados, mediadores de inflamação se acumulam e radicais

livres de oxigênio e enzimas proteolíticas são liberadas concomitante ao aumento do fluxo sanguíneo.

Os períodos da I/R são fases inevitáveis nos transplantes microcirúrgicos, o índice de re-exploração após o transplante é de cerca de 10% nos retalhos cutâneos e miocutâneos, com recuperação de 69%; as causas preponderantes que levam a re-exploração são a trombose da anastomose e o fenômeno de não reperfusão. A lavagem mecânica com soluções irrigadoras e preservadoras, procedimento praticado nestes casos, pode guiar maior proteção celular; as soluções preservadoras de tecidos têm ação comprovada na manutenção e no prolongamento da viabilidade de diversos órgãos usados como transplantes, coração, fígado, pâncreas, rins. Uma das soluções mais estudadas é a solução da Universidade de Wisconsin (UW), cujo efeito protetor já foi demonstrado em transplantes de órgãos, entretanto na maior parte dos casos estas soluções não estão disponíveis nos centros cirúrgicos que atendem as emergências microcirúrgicas.

Na cirurgia reconstrutiva, a transferência microcirúrgica de retalhos musculares e tecidos compostos promoveram avanço importante na reabilitação e reconstituição de ferimentos complexos além de impulsionar a cirurgia oncológica ablativa uma vez que se ampliaram as possibilidades e os índices de segurança dos retalhos. Na experiência dos grandes centros mundiais de microcirurgia reconstrutiva, incluindo-se o ligado a disciplina de cirurgia plástica da FMUSP, nenhuma solução preservadora tem sido utilizada na rotina clínica.

No presente estudo foi avaliado em um modelo I/R em ratos, já previamente descrito e utilizado no laboratório de investigação medica 04 (LIM04) da FMUSP² um estudo prospectivo, aleatório, duplo-cego, e experimental; que estudo a solução preservadora da UW e uma nova solução preservadora denominada “Solução Cirurgia Plástica-USP”, pratica e de disponibilidade de preparo em centro cirúrgico não especializado; a avaliação do grau de proteção celular foi realizada determinando os níveis de apoptose e alteração ultra-estrutural das mitocôndrias dos miócitos.

2. Revisão da Literatura

2.1 Isquemia Primária

A isquemia primária se inicia com a interrupção do fluxo sanguíneo quando o tecido entra em um período de anóxia. Os níveis teciduais de oxigênio decrescem e o metabolismo intracelular muda de aeróbico para anaeróbico; Na presença do metabolismo anaeróbico, ocorre acúmulo de lactato e conseqüentemente ha queda do potencial Hidrogeniônico (pH) celular e da disponibilidade de ATP para o suprimento das bombas de íon. Estas alterações comprometem a função de transporte da membrana celular gerando maior concentração de metabólitos no interior da célula. Os níveis de cálcio também aumentam e mediadores pró-inflamatórios se acumulam^{1,3-4}. A severidade do dano produzido pela isquemia primaria é diretamente proporcional a duração do período de isquemia⁵.

Tecidos com metabolismo como os músculos são mais susceptíveis a danos no período de isquemia. Estudos experimentais demonstram também que o pré-condicionamento de retalhos musculares através de curtos ciclos de I/R antes de um insulto isquêmico demorado tem ação protetora para o tecido⁶.

Ao término do período de isquemia primária podem-se observar algumas alterações estruturais e metabólicas nos tecidos:

- 1) Diminuição do diâmetro capilar decorrentes do intumescimento endotelial, vaso constrição e edema intersticial

- 2) Acúmulo de leucócitos prontos para liberar enzimas proteolíticas e espécies reativas intermediárias de oxigênio
- 3) Disfunções metabólicas das células endoteliais causando a diminuição da habilidade para sintetizar e liberar vasodilatadores e degradar substâncias vaso constritoras
- 4) Disfunção das membranas celulares e acúmulo de toxinas intra e extracelulares
- 5) Estímulo do sistema de enzimas relacionadas à síntese de mediadores

Com a liberação dos clampes vasculares, em pesquisas experimentais ou clinicamente após a revascularização microcirurgia, inicia-se o período de reperfusão que pode resultar duas respostas teciduais distintas: a restauração e recuperação do metabolismo celular normal ou a morte celular determinada pela intensidade das alterações ocorridas durante o período de isquemia primária e principalmente na injúria causada pelos metabólitos formados na reperfusão.

O grau de lesão e eventual evolução são determinados por vários fatores tais como o tipo de tecido reperfundido, a temperatura mantida no período isquêmico, o tempo decorrido de anóxia, a pressão na reperfusão, os tratamentos farmacológicos adotados na proteção do tecido e pelo pré-condicionamento fisiológico realizados

Sob condições favoráveis a reperfusão restabelece o fluxo sanguíneo normal e a função metabólica dos tecidos. Primeiramente ocorre o restabelecimento do fluxo no local da anastomose vascular; Falhas devido a

problemas técnicos ou trombose da anastomose podem ocorrer em geral previamente após a liberação dos clampes. Embora a atenção do cirurgião seja direcionada ao local de sutura, uma perfeita microanastomose não garante o sucesso da revascularização do retalho se o tempo decorrido nesta segunda isquemia for muito longo. A reperfusão deve ocorrer também na microcirculação, e falhas no restabelecimento do fluxo neste nível tem causa principalmente inflamatória e devido à micro tromboses, resultando no fenômeno de não reperfusão (“no reflow”).

2.2 Dano por isquemia e reperfusão

A reperfusão é essencial para a sobrevivência do retalho, a injúria por reperfusão é um processo inflamatório modulado por mecanismo complexo de sinalização do sistema imune.

Quando o fluxo sanguíneo é restabelecido e permite o influxo de substratos inflamatórios nocivos, estes podem afetar a membrana celular e em último caso destruir o retalho. O ponto de transição entre a reperfusão normal e a que provoca dano é pouco conhecido e difere muito entre os vários tecido e diferentes condições experimentais. Alguns tecidos são mais resistentes a isquemia; a pele e os ossos podem tolerar períodos de isquemia de até 3 horas sem nenhuma dificuldade, já outros tecidos como o músculo esquelético e a mucosa intestinal são pouco tolerantes mesmo a períodos mais curtos de anóxia; É certo que para a maioria de tecidos, longos períodos de isquemia resultam em danos irreparáveis na microcirculação⁵.

Quando o clampe é liberado duas zonas de injúria devem ser recuperadas para permitir uma reperfusão com sucesso⁷. A primeira é a anastomose vascular onde a trombose é o maior risco, a segunda corresponde à microvascularização distal e ao parênquima do retalho e é nesta zona que o dano da isquemia e reperfusão ocorrem.

No momento da reperfusão, neutrófilos adicionais, plaquetas e outras células inflamatórias da circulação periférica rapidamente se acumulam no retalho em resposta aos sinais de agentes quimiotáticos; ocorre também inchaço das células endoteliais e edema intersticial, resultando em aumento da pressão hidrostática na microcirculação e diminuição do diâmetro do lúmen capilar; há perda do controle adrenérgico no tônus vascular e também da produção de agentes vasodilatadores como o óxido nítrico produzido pelas células endoteliais; leucócitos e plaquetas se ligam as vênulas pós-capilares, dificultando o fluxo sanguíneo capilar. Os *shunts* arterio-venosos começam a se abrir, congestionando e diminuindo o fluxo da microcirculação capilar que nega nutrientes aos tecidos distais; uma vez atingida esta situação o processo de reversão e recuperação do retalho tecidual é muito difícil.

A importância dos neutrófilos no processo de dano tecidual decorrente de injúria de isquemia e reperfusão é reconhecida há muitos anos. Já foram considerados iniciadores do processo lesional, mas estudos recentes demonstram que sua participação é mais importante nas fases finais quando ocorre a maior parte da destruição tecidual.

Os neutrófilos são atraídos ao local inflamado por sinais quimiotáticos produzidos pelas plaquetas, células endoteliais e outros leucócitos durante a fase de isquemia primária. Uma vez ativados, os neutrófilos se aderem ao endotélio vascular no local da injúria e migram para o espaço intersticial adjacente por mecanismo de diapedese.

Há cada vez mais evidências da importância dos neutrófilos ativados, que produzem grandes quantidades de radicais reativos de oxigênio. Fisiologicamente, os neutrófilos utilizam lisossomos com cargas de espécies reativas de oxigênio para destruir patógenos localizados pelo sistema imune, em alguns estados inflamatórios, incluindo o dano do I/R, estes agentes são direcionados contra o hospedeiro ao invés do patógeno; produzem proteinases e fosfolipases que lesam as células endoteliais e as membranas vasculares, levando a perda da integridade dos vasos e provocando subsequente edema, trombose e necrose tecidual³.

Um estudo experimental conduzido com retalhos de músculo esquelético (*Latissimus dorsi*) mostrou o acúmulo destas células por meio de injeção de neutrófilos marcados radioativamente antes da reperfusão. Este estudo também confirmou a presença de uma produção aumentada de radicais superóxido e quantidades aumentadas de neutrófilos marcados foram detectadas tanto na porção cutânea quanto no tecido muscular do retalho miocutâneo⁸.

A maior parte das pesquisas sobre o dano tecidual decorrente de injúria por isquemia e reperfusão centra-se no processo de sinalização feito pelo sistema imune, que ativa os neutrófilos e os direciona ao local da lesão.

Os mediadores inflamatórios enviam sinais de ativação aos neutrófilos, sinais quimiotáticos que os recrutam da periferia, sinais para adesão ao endotélio ou para a liberação inesperada de conteúdos intracelulares destruidores.

Durante a isquemia primária, o comprometimento do transporte através da membrana celular leva ao acúmulo de cálcio no interior da célula, que age como um segundo mensageiro e ajuda a aumentar a produção de mediadores inflamatórios; estes são de fato os iniciadores da injúria tecidual decorrente da isquemia e reperfusão. Os mediadores inflamatórios iniciais são lipídeos que não requerem a transcrição e síntese assim como os mediadores peptídicos, os mais importantes incluem o fator de ativação plaquetário (PAF), leucotrieno B₄ e o tromboxano A₂ ¹.

O PAF é produzido por células endoteliais e células inflamatórias e além de provocar a ativação e acúmulo plaquetário, age como um potente vasoconstritor e sinal quimiotático para os neutrófilos; o PAF também regula a produção de citocinas, tais como o TNF e interleucinas, que amplificam o processo inflamatório ¹. Mesmo quando as plaquetas não se aderem ao local de anastomose vascular, a exposição de elementos do tecido conjuntivo no local de anastomose pode estimular a liberação de PAF, que resultará na vasoconstrição e no recrutamento de neutrófilos para microcirculação e para o parênquima do retalho.

As enzimas necessárias para gerar estas substâncias (lipoxigenases, e ciclooxigenases) estão presentes no neutrófilos e o bloqueio químico destas reduz a injúria tecidual decorrente da isquemia e reperfusão ^{3,9}. Estas

enzimas são quimiotaxicas, vasoconstritoras, ativadoras de plaquetas e regulam a adesão de moléculas na superfície do neutrófilos

A diminuição do trombohexane A2 em animais durante procedimentos experimentais, melhora as taxas de permeabilidade na microcirculação após injúria isquêmica, especificamente os bloqueadores do trombohexane A2 apresentam um efeito protetor na microcirculação em modelos de retalho muscular em ratos ¹⁰.

Moléculas como as selectinas, integrinas e imunoglobulinas facilitam à adesão do neutrófilos a circulação injuriada, e quando bloqueadas a adesão de leucócitos na microcirculação do retalho fica diminuída, causando menor vasoconstrição e necrose tecidual ^{11,12}. O bloqueio experimental das enzimas responsáveis pela produção de leucotrieno B4 resultou em uma menor expressão de receptores na superfície celular do neutrófilos e conseqüentemente diminuição do dano tecidual ⁹.

Radicais livres (espécies reativas de oxigênio) são moléculas que apresentam elétrons não pareados na última camada e por isso são altamente reativos. Estas moléculas reagem violentamente com outras moléculas estáveis, geralmente resultando na formação de radicais livres adicionais. Os radicais livres são tóxicos para todas as substâncias biológicas inclusive proteínas, polissacarídeos, ácidos nucleicos, colágeno, fosfolípidios e ácidos graxos, a exposição das membranas celulares a espécies reativas de oxigênio pode resultar em lesão desta barreira permitindo um aumento da permeabilidade e conseqüentemente morte celular.

Entre os componentes da microcirculação o dano das células endoteliais resulta em exposição do colágeno e membrana basal, promovendo a adesão de plaquetas e granulócitos e início da cascata de trombose microvascular ⁴.

As principais espécies reativas de oxigênio são o anion superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^-) ^{1,4}; os sistemas xantina oxidase e Nicotinamida adenina dinucleotídeo-P oxidase (NADPH) produzem o ânion superóxido que é funcional nos neutrófilos ativados; o peróxido de hidrogênio é produzido pela enzima superóxido dismutase, e o radical hidroxila surge de reações catalisadas por moléculas de ferro.¹

A importância e participação da enzima xantina oxidase na reperfusão do retalho tem sido objeto de interesse em diversos estudos; há concentrações limitadas desse sistema xantina-oxidase na pele humana¹³, mas no músculo esquelético mesmo quando se bloqueia a ação da xantina oxidase quimicamente com agentes químicos (allopurinol) não houve uma redução da lesão do tecido muscular ¹⁴.

2.3 Dano a células endoteliais

A integridade das células endoteliais é crucial para a manutenção da homeostase da microcirculação; as células endoteliais perdem sua funcionalidade em casos de isquemia prolongada ou dano do tipo isquemia e reperfusão, primeiramente a morfologia da célula endotelial é alterada e se tornam mais arredondadas e inchadas, o lúmen capilar diminui e ocorre a perda da integridade capilar e as paredes dos vasos se tornam mais permeáveis.

Além das alterações morfológicas, o dano nestas células provoca disfunções fisiológicas; As células endoteliais normais são capazes de produzir substâncias vasodilatadoras e degradar substâncias vasoconstritoras ¹⁵. O óxido nítrico é um dos vasodilatadores normalmente produzidos nestas células, no estado anóxico, as células endoteliais perdem a habilidade de sintetizar óxido nítrico e degradar substâncias vasoconstritoras ¹⁶. Para testar esta hipótese em modelo de retalho microcirurgico, um grupo de Louisville perfundiu retalhos com várias soluções, incluindo nitroprusside (que é um doador de elétrons) após um período de isquemia. O restabelecimento do fluxo sanguíneo demonstrado em arteríola do retalho foi significativamente maior nos grupos perfundidos previamente com nitroprusside quando comparado ao grupo controle ou ainda com o grupo tratado com acetilcolina.

A depleção do adenosina monofosfato cíclico (AMPc) dentro das células endoteliais é um importante fator regulador da adesão neutrofílica e perda da capacidade de vasodilatação; quando se aumenta experimentalmente a concentração de AMPc dentro das células endoteliais há uma maior proteção contra o dano decorrente da isquemia e reperfusão¹⁷.

O dano as células endoteliais pode resultar em diminuição do calibre vascular, aumento da pressão de perfusão, diminuição na produção de substâncias vasodilatadora, perfuração dos capilares e exposição dos elementos do tecido conjuntivo que constituem a parede vascular.

Um dos principais estímulos trombogênicos é o fator tecidual (TF), que é uma proteína específica encontrada primariamente na adventícia e em outros tecidos perivasculares. Quando os vasos do retalho são transeccionados, a conseqüente exposição dos componentes da parede vascular serve como estímulo trombogênico.

Diversos estudos investigaram qual seria o papel da inibição do fator tecidual na melhora da permeabilidade microvascular; foi avaliada a distribuição do fator tecidual em artérias da placenta humana e concluiu se que o fator tecidual está mais concentrado na adventícia que no endotélio vascular; quando a via inibidora do fator tecidual é aplicada nos vasos, a atividade da trombina na parede dos vasos é reduzida, demonstrando que a inibição da via do fator tecidual é efetiva na prevenção da trombogenia¹⁸.

Em outro estudo que utilizou modelo de orelha de coelho, a inibição da via do fator tecidual foi avaliada quanto à eficácia na prevenção de

trombose no local da anastomose, altas concentrações de inibidores do fator tecidual garantiram a permeabilidade neste modelo, mesmo quando comparado ao modelo que utiliza heparina e ou hirundina. Nenhuma alteração sistêmica dos fatores de coagulação foi observada, sugerindo que a inibição da via do fator tecidual seria um agente tópico efetivo no sítio da anastomose ¹⁹.

2.4 Isquemia Secundária

A isquemia secundária pode ocorrer após a reperfusão primária e tem diferentes razões: trombose arterial ou venosa, vasoespasmo ou dano pós I/R. A reperfusão do retalho pode ser interrompida logo após o término da anastomose, os estudos têm observado que um segundo período de isquemia é muito mais prejudicial ao retalho que o evento isquêmico inicial ²⁰

Em estudos experimentais utilizando retalhos miocutâneos, o período de isquemia secundária produziu significativas alterações não observadas em retalhos que somente sofreram o mesmo período de isquemia primária, no primeiro caso, ocorreu trombose massiva dos retalhos que sofreram isquemia secundária, o peso do retalho (que serve como indicador de edema), estava aumentado no grupo com um segundo período de isquemia e a concentração de fibrinogênio e plaquetas estavam elevada no efluente venoso ²¹. Outro estudo evidenciou a sobrevida dos retalhos quando comparado a isquemia secundária provocada por oclusão arterial ou venosa; a oclusão venosa secundária resultou em sobrevida pouco menor comparado a oclusão arterial; foi observado que um aumento do tempo de

reperfusão entre os dois episódios isquêmicos, pode aumentar a sobrevivência do retalho no caso de uma isquemia secundária arterial, provavelmente devido ao grau do dano isquêmico produzido no retalho ²².

Em estudo com retalhos cutâneos em animais experimentais no intervalo entre a isquemia primária e a secundária de 24 horas ou menos, a isquemia secundária produziu mais necrose do retalho que a isquemia primária isolada e quando esse intervalo era aumentado para 72 horas, a sobrevivência do retalho foi similar para a isquemia secundária e primária ²³. As alterações bioquímicas durante a isquemia secundária têm sido objeto de diversos estudos, há um acúmulo da enzima xantina oxidase e do malondialdeído, ambos capazes de gerar radicais livres e um decréscimo da concentração de ATP e da superóxido dismutase, um seqüestrador de radicais livres ²⁴.

2.5 Fenômeno de não reperfusão

O fenômeno de não reperfusão (*no reflow phenomenon*) foi descrito em 1967 como a falta de reperfusão nos capilares nutritivos após o restabelecimento da perfusão no tecido isquêmico, o fenômeno de “não reperfusão” é resultado da injúria ocorrida durante os períodos I/R.²⁵⁻²⁷.

Ha diversas teorias para explicar o mecanismo da “não reperfusão”, entre estas está a teoria da hemoconcentração intravascular, onde a permeabilidade aumentada dos capilares provoca perda de fluido no espaço intervascular e aumenta o hematócrito capilar, implicando na perda das propriedades reostáticas do sangue. A participação deste mecanismo no fenômeno do “não reperfusão” é suportada por achados de que a redução do hematócrito no período pré-operatório reduz os danos causados pela injúria por isquemia e reperfusão.

Outra teoria sobre os mecanismos deste fenômeno de “não reperfusão” é a do intumescimento das células endoteliais, ao tornarem hipóxicas as células edemaciam e o funcionamento das bombas iônicas fica comprometido, este intumescimento celular também leva a diminuição do lúmen dos vasos e aumento na resistência hidrostática ao fluxo sanguíneo.

Uma terceira teoria está fundamentada na ligação de leucócitos aos capilares, claramente a ligação destes é observada em vênulas pós-capilares, mas o comprometimento do fluxo nos capilares é incerta.

Uma outra ainda baseia-se no edema intersticial, como resultado de mecanismos apresentados anteriormente, que ocorre devido ao aumento na pressão de fluido no espaço intervascular e o aumento da pressão intersticial

provoca a compressão extravascular da microcirculação impedindo o fluxo, quando eliminado experimentalmente a adesão de células sanguíneas da série branca o edema diminui e as evidências do fenômeno diminuem ²⁷.

A formação de trombos pode ocorrer rapidamente no local da anastomose vascular ou pode ser retardada e ocorrer no pedículo arterial como resultado de eventos originados na microcirculação distal. Barker et al do grupo de Louisville estudaram o processo da formação de trombos de maneira sistemática; as pesquisas mostraram inicialmente que alterações transitórias e abruptas na perfusão regional dos retalhos microcirurgicos ocorrem após a anastomose; assim postularam que a microembolia originária no local da anastomose vascular era responsável pelas alterações detectadas na microcirculação periférica ²⁸.

Um estudo experimental em ratos com retalhos de tecido muscular, definiu duas zonas nas quais as alterações poderiam levar a trombose. A primeira zona foi definida como sendo o local da anastomose e a segunda zona da microcirculação periférica; a primeira zona (local de anastomose), o sangue que volta a circular é exposto a células endoteliais cujas funções estão alteradas, ao componente de tecido conjuntivo da parede dos vasos e os biomateriais exógenos (fio de sutura); estes fatores favorecem a trombogenicidade no local da sutura vascular sendo máxima nos 30 minutos após a reperfusão.

O endotélio lesionado e o tecido conjuntivo exposto iniciam a via extrínseca da trombose, levando a formação de trombos, acúmulo de plaquetas e trombose no local de anastomose; as plaquetas se acumulam e

a microcirculação é “chuviscada” por pequenos êmbolos; entretanto os êmbolos por si só não são a principal causa dos danos na microcirculação distal ²⁹; mas sim a ativação da trombina, que inicia a cascata de efeitos sobre a microcirculação que levam a vasoconstrição, quimiotaxia dos leucócitos, edema intersticial, edema celular, extravasamento de fluido e produção de espécies reativas de oxigênio.

Os eventos na segunda região resultam no fechamento da microcirculação e início do fenômeno de “não reperfusão”, que se manifesta como isquemia do retalho e eventualmente formação retrograda de trombo no pedículo arterial.

2.6 Apoptose celular

Apoptose o morte celular programada esta envolvida na fisiopatologia do dano decorrente de isquemia, além de desempenhar um papel importante na homeostase e como mecanismo de defesa ³⁰⁻³¹.

Embora inúmeros estímulos possam disparar a apoptose, este processo é mediado através de três vias principais de regulação que são

- 1- via dos receptores de morte
- 2- via do retículo endoplasmático
- 3- via mitocôndria

Em certas condições estas vias podem trocar informações para aumentar os estímulos apoptóticos, confirmando que estas vias mitocôndria e do retículo endoplasmático desempenham um papel importante na

apoptose mediada por receptores de morte; a desregulação destas três vias podem contribuir para a resistência as drogas.

As mitocôndrias são reguladoras intrínsecas críticas da via apoptótica em resposta a lesão do DNA, remoção de fatores de crescimento ou I/R. A ativação da via mitocôndria resulta na quebra da homeostase mitocôndria e liberação de proteínas mitocôndria, que são fatores apoptogênicos. A ativação da via dos receptores de morte também liga a via celular intrínseca através de Bid. A permeabilização da membrana mitocôndria induz a liberação de proteínas mitocôndria (Citocromo C, Smac/DIABLO, AIF, Omi/HtrA2, e endonucleases G), as quais são reguladas por fatores pró e anti-apoptóticos (família das Bcl-2) e na via das caspase dependente e independente. Os fatores anti-apoptóticos (Bcl-2 ou Bcl-X L) inibem a liberação de fatores mitocôndria apoptogênicos enquanto que os fatores pró-apoptóticos (Bax e Bak) ativam a liberação ³¹.

Estudos recentes sugerem que além da via mitocôndria e dos receptores de morte, outras organelas incluindo o reticulo endoplasmático, complexo de Golgi e lisossomos são pontos importantes na integração da sinalização pró-apoptótica e na percepção de dano.

Cada organela possui um sensor que detecta alterações específicas, vias de transdução de sinais ativada localmente que emitem sinais e garantem a comunicação entre as organelas. A resposta genômica nas organelas intercelulares, após o dano ao DNA, são controladas e amplificadas pela via de sinalização mitocôndria, induzindo a apoptose, autofagia e outras vias de morte celular.

Todo retalho livre tem potencial para desenvolver danos teciduais em decorrência de injúria por I/R; na re-exploração o retalho é reperfundido rapidamente, porém quando problemas inesperados ocorrem a corrida contra o tempo continua, mesmo os tecidos mais resistentes podem ser comprometidos sem chance de salvação devido a um período aumentado de isquemia.

O desfecho ou perda dos retalhos causados pelo dano I/R podem ser diminuídos pela utilização de medicamentos protetores celulares, durante períodos prolongados de isquemia do tecido, aumentando as chances de recuperação do retalho.

2.7 Técnica de transplante microcirurgico

O transplante de retalhos microcirúrgicos e tecidos compostos, tornou-se um método muito utilizado com resultados satisfatórios em procedimentos rotineiros para correção de complexas perdas teciduais decorrente de trauma, ausências congênitas ou cirurgias oncológicas ablativas. De todas as cirurgias realizadas cerca de 14 % têm complicações pós operatórias que podem levar a perda do retalho, nas últimas três décadas os índices de sucesso aumentaram chegando a cerca de 95%³²⁻³⁴.

A trombose dos vasos anastomosados, distúrbios da microcirculação no tecido transplantado e injúria do tipo isquemia e reperfusão levam a perda parcial ou total do retalho e geralmente ocorrem logo no início do período pós-operatório³⁵⁻³⁷.

Complicações tardias que levam a diminuição da sobrevivência do retalho estão relacionadas a infecções e insuficiência vascular. Diversos autores enfatizam que os fatores técnicos e fisiológicos ocorridos durante o procedimento cirúrgico são na maioria das vezes responsáveis pela perda do retalho; relatam que um tempo longo de isquemia estaria diretamente associado com a severidade do dano tecidual e índices aumentados de perda do retalho^{5,38},

Os mecanismos fisiopatológicos envolvidos podem ocorrer durante os diferentes estágios do procedimento cirúrgicos, sendo os danos decorrentes da injúria por isquemia e reperfusão após o restabelecimento da circulação sanguínea bastante documentados na literatura³⁷⁻³⁹.

2.8 Soluções de Perfusão

A utilização de soluções preservadoras em transplantes de tecidos de diversos órgãos tem demonstrado grande utilidade na proteção contra danos celulares. A imersão e irrigação de órgãos transplantados com soluções preservadoras de tecidos como a solução de Wisconsin, Eurocolins, Stanford, Beyersdorf e Custodio aumenta a prevenção do dano celular e a sobrevida. O efeito destas soluções sobre o endotélio vascular já foi estudado por vários pesquisadores como Cartier, Hollmann, Pelleerin etc⁴⁰.

O efeito da utilização de solução preservadora na prevenção do dano por isquemia prolongada sobre o músculo estriado foi estudado pela primeira vez no modelo de perfusão de retalhos microcirurgicos com solução de UW. Esta solução previne o dano celular, pois diminui as alterações de membrana celular e estabiliza as células do tecido musculares, também foi demonstrado que sua utilização diminui o dano por reperfusão em células endoteliais de sinusóides hepáticos⁴¹

A solução UW é considerada um das mais efetivas soluções para a conservação, e foi desenvolvida experimentalmente para o transplante de pâncreas⁴²⁻⁴³, e somente depois aplicada na preservação do fígado⁴¹⁻⁴⁵, coração^{44,46}, e pulmão⁴⁷. Enxertos de fígado preservados por mais de 24 hs nesta solução mantém sua capacidade de transplante e produção satisfatória de bile⁴⁸. Quando comparada a outras soluções previamente utilizadas para a preservação fria de órgãos para transplante, a solução de UW mostra-se mais efetiva e o tempo de preservação é maior^{49,50}. Embora ainda seja sugerido que a isquemia fria por mais de 12 hs seja um grande

risco para o receptor^{51,52}. O desenvolvimento de soluções preservadoras deve considerar os requerimentos específicos para cada órgão, a avaliação dos benefícios e efeitos da utilização de soluções preservadoras no transplante de tecidos tem sido feita utilizando-se modelos animais com base na sobrevivência após o transplante^{44,46,53-55}, estudos morfológicos de tecidos armazenados^{56,57}, estudos bioquímicos sobre a liberação de lactato desidrogenase⁵⁸, medições do potencial de membrana⁵⁹ e análise da bile^{60,61}. além destes estudos *in vivo*, modelos *in vitro* de cultura de células tem sido muito utilizados⁵⁸.

Na cirurgia plástica as emergências microcirúrgicas como de amputação de membros e trombose de retalhos microcirurgicamente transplantados não possuem um protocolo padrão de preservação de tecidos, mesmo assim o transplante microcirurgico de retalhos apresenta somente 10% de trombose que irão requerer uma re-exploração que se realizada a tempo resultará em uma taxa de 69% de recuperação⁶². O transplante de diversos órgãos tem sido possível graças a uma boa conservação tecidual.

Sem duvida na maioria das vezes não se conta com a disponibilidade de soluções preservadoras de tecido nos centros cirúrgicos, onde são atendidas as emergências cirúrgicas, como por exemplo, de amputação, de re-exploração de um retalho trombosado.

Dadas as necessidades e com base na literatura, decidimos neste estudo propor e testar *in vivo* uma solução de emergência, possível de ser preparada com os recursos disponíveis em qualquer centro cirúrgico na

preservação de retalhos de tecido muscular; a avaliação da solução proposta foi realizada comparando-se os resultados e efeitos sobre os níveis de apoptose e morfologia mitocôndrial dos miócitos do retalho.

Solução Cirurgia Plástica - USP

Ringer lactato + Heparina + Dexametasona + Insulina + Vitamina C

a). Heparina

Os anticoagulantes são administrados sistematicamente em soluções tópicas no sítio de anastomose durante o período da isquemia primária, com o objetivo de prevenção da trombose do retalho transplantado, o tecido muscular é mais suscetível a injúrias isquêmicas irreversíveis e por isso está sujeito a perdas no reimplante^{63,64}. A heparina é um anticoagulante efetivo na prevenção da trombose em vasos de pequeno e grande calibre e sua utilização reduz a injúria em modelos de isquemia no coração,⁶⁵ cérebro,⁶⁶ rim⁶⁷ e retalhos de pele⁶⁸; a heparina também mostra um efeito protetor dos efeitos de I/R em músculos⁶⁹. Em condições experimentais a heparina foi aplicada antes da isquemia, este procedimento não é análogo aos cenários clínicos de heparinização de tecidos isquêmicos, como no caso de reimplante de extremidades.

Xialolu et al.⁷⁰ avaliaram a utilização de heparina como solução de lavagem de retalhos musculares, neste estudo os retalhos foram perfundidos em diferentes momentos durante intervalos isquêmicos e comparado a retalhos de animais heparinizados antes da remoção do retalho ou imediatamente após a recirculação do transplante; a avaliação histológica

mostrou uma menor infiltração celular (redução do influxo de macrófagos e leucócitos no espaço intersticial) e o menor edema aparente, evidenciado pela separação das fibras musculares. A atividade da desidrogenase foi significativamente maior em todos os retalhos reperfundidos e nos retalhos heparinizados previamente a isquemia, quando comparado aos retalhos que não foram submetidos a heparinização e naqueles heparinizados após isquemia, foi concluído que a heparinização oferece proteção contra a I/R tanto nos retalhos transplantados quanto em extremidades amputadas.

b). Dexametasona

Corticosteróides tem seu uso bem estabelecido para uso clínico como anti-inflamatório e sabidamente são supressores da função imunológica e da resposta inflamatória e alérgica agudas ^{71,72}. Umeki e Soejima ⁷³demonstraram que os corticosteróides tem um efeito inibitório na geração de radicais superóxido pelos neutrófilos e em sistemas livres de células.

Roilides et al ⁷⁴ mostraram que hidrocortisona (HC) na dose de 30 mmol/L ou dexametasona (DMX) a 1 mmol/L inibem significativamente a liberação de radicais superóxido por leucócitos polimorfonucleares em resposta a N-formylmethionyl leucyl phenylalanine (fMLP). É possível que os corticosteróides auxiliem na supressão da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) em processos inflamatórios *in vivo*, os ROS mediam a atividade bactericida de células fagocitárias que também resultam em dano tecidual, como no caso da injúria por isquemia e reperfusão.

Estes dados mostram que os corticosteróides têm um importante papel inibitório da produção de radicais superóxido pelos leucócitos *in vitro*, porem não há dados quantitativos sobre seus efeitos *in vivo* nem sobre os aspectos farmacodinâmicos deste efeito.

Sabe-se que os corticosteróides inibem a enzima fosfolipase A2, que facilita a geração de ROS ⁷⁵. Um estudo recente demonstra que em certas linhagens celulares, os glicocorticóides exercem seus efeitos pela indução da expressão da proteína IκB que acelera as endotoxinas que induzem o fator de necrose tumoral alfa (TNFα) e incrementam a formação de ROS. Dandona et al ⁷⁶ fez observações consistentes que demonstram que o uso do glicocorticoides induzem a inibição de ROS, também mostrou evidencias sobre a duração e intensidade deste efeitos inibitórios após a administração de HC; estes efeitos provavelmente explicam o efeito antiinflamatório dos corticosteróides *in vivo* e os efeitos colaterais da terapia com corticosteróides em termos de imunossupressão.

Long et al ⁷⁷mostraram que o edema, inflamação e a necrose de fibras musculares é menos severa em grupos tratados com DMX que em grupos tratados com solução salina. Estes resultados indicam que o pré tratamento com DMX atenua, mas não reverte completamente, o déficit da função contrátil de músculos esqueléticos submetidos a isquemia durante as primeiras 24 h da após reperfusão.

c). Insulina

Na década passada, foi mostrado que a insulina também apresenta uma série de efeitos biológicos quando é administrada em doses fisiologicamente relevantes em relação às células endoteliais, plaquetas e função leucocitária, que pode ser cardioprotetora ou potencialmente anti aterosclerótica⁷⁸.

A insulina suprime a transcrição de endotoxinas que induzem fatores pró-inflamatórios em ratos e suínos^{79,80}; o efeito supressor da insulina também foi demonstrado em ratos expostos a injúria termal⁸¹; o uso da insulina em modelos de endotoxemia *in vivo* e *in vitro* indicam uma diminuição da atividade da poly-ADP ribose polymerase (PAPS), e diminuição nos índices de apoptose e na secreção de TNF- α e IL-1 β . Com base nestes estudos, nota-se que a insulina tem um efeito inibidor direto da inflamação induzida por endotoxinas⁸².

Em preparados isolados de coração, foi mostrado que a adição de insulina, no momento da reperfusão, após ligadura das artérias coronária descendentes anterior, reduz a área de infarto em 45%^{83,84}, sugerindo que há uma ação anti-apoptótica da insulina⁸⁵. Em um modelo de cão de isquemia por baixo fluxo, a insulina também melhorou a função contrátil e a eficiência metabólica do miocárdio sem alterar os níveis de ATP, de fosfocreatina e de fosfato^{86,87}.

A insulina também parece agir como um vasodilatador^{88,89}, esta ação está relacionada a rápida liberação de óxido nítrico (NO) e expressão de NO síntese (e-NOS) pelo endotélio⁸⁹⁻⁹¹; ocorre também como um inibidor da

agregação plaquetária pela ativação da NOS plaquetária e geração de NO seguidas por um aumento no guanidina monofosfato cíclico (cGMP) ^{92,93}. A insulina suprime a expressão de molécula 1 de adesão celular (CAM-1), MCP-1 e a ligação de fator nuclear kB (NFkB) em células endoteliais de aorta humana in vitro (97), o NFkB é um fator de transcrição importante que induz a transcrição de mais de 200 genes pró-inflamatórios, assim revela um potente efeito antiinflamatório, comparável aos glicocorticóides ⁹⁴⁻⁹⁵

A insulina também protege a função e estrutura mitocondrial conferindo uma proteção as alterações da membrana interna e cristas mitocondrial em decorrência de estresse oxidativo ⁹⁶

d). Vitamina C

Os antioxidantes reduzem o dano oxidativo decorrente da injúria por isquemia e reperfusão. A vitamina C por si só não reduz o tamanho do infarto, mas protege o tecido contra a lesão oxidativa. Considerando-se os modelos experimentais existentes, os resultados indicam que os seqüestradores de radicais livres intracelulares contribuem significativamente para a proteção subsequente ⁹⁷⁻⁹⁹; assim o efeito de seqüestradores naturais de radicais livres, como a vitamina C, são significativos no mecanismo de proteção do pré condicionamento inibindo a peroxidação lipídica, seqüestrando as espécies reativas de oxigênio ¹⁰⁰.

A vitamina C é um co-oxidante na regeneração do radical tocoferoxil em tocoferol que afeta a peroxidação lipídica na reperfusão, prevenindo o dano induzido por I/R¹⁰¹.

Entretanto sabe-se que o ascorbato reage com hidroxiperóxidos endógenos produzindo o radical alkoxyl que é um iniciador da lipoperoxidação¹⁰², o estresse oxidativo pode ativar múltiplas vias de sinalização celular, induzindo a ativação de proteínas miogênicas (MAPK)¹⁰³; a P38 MAPK é um elemento chave na transdução de sinal de isquemia em modelos de I/R do miocárdio; e a combinação de vitaminas antioxidante reduz a atividade das MAPKs¹⁰⁴. O mecanismo pelo qual o efeito da vitamina C demonstra o efeito protetor do pré condicionamento da isquêmica pode estar relacionado à inibição do estresse oxidativo induzido pela ativação das MAPKs¹⁰¹.

O pré-condicionamento isquêmico induz alterações características nos antioxidante endógenos, como a superóxido dismutase (SOD), o que pode ter um papel muito importante na proteção contra injurias do tipo I/R¹⁰⁵. Demonstrou-se que a atividade da SOD no sangue aumenta nos grupos pré-condicionados com vitamina C durante a fase tardia de reperfusão, ao contrario, a atividade da SOD diminui constantemente no grupo controle sem proteção com vitamina C¹⁰⁶. O pré tratamento com vitamina C restabelece a atividade da SOD durante a reperfusão indicando uma melhora da depleção do sistema de defesa anti-oxidante durante o a isquemia e reperfusão.

Preservação fria

A hipotermia é uma técnica habitual utilizada na preservação de órgãos; o resfriamento dos tecidos em temperaturas abaixo de 4°C, faz com cristais intercelulares se formem, baixando os requerimentos do metabolismo celular. A hipotermia resulta na falta de mecanismos homeostáticos responsáveis pela manutenção do volume celular em normotermia, em especial a bomba Na/K ATPase, que é fundamental para a manutenção dos níveis intra e extracelulares deste íons. Quando atividade da Na/K ATPase é reduzida durante a hipotermia, o sódio entra na célula seguindo moléculas de cloro e a água, o que resultará em edema celular e conseqüentemente dano a estrutura e funcionamento da célula. Em particular, quando este dano acomete as células endoteliais, acaba provocando a obstrução da luz, fenômeno este conhecido como de não refluxo, podendo portanto provocar danos irreversíveis⁴⁰. Estudos recentes mostram que a preservação fria prolongada promove a adesão leucocitária, que resulta em um incremento no dano microvascular¹⁰⁷. Outro estudo que avaliou os efeitos da preservação fria mostra que há um incremento na concentração de cálcio intracelular, logo nos sessenta minutos seguintes após o resfriamento; este aumento na concentração de cálcio, esta associado a desorganização das moléculas de actina o que promove a deformação celular¹⁰⁸.

3. Objetivos

- a) Avaliar si soluções irrigadoras conferem um grão de proteção no modelo de I/R
- b) Avaliar se a solução de Wisconsin diminui os danos celulares devidos a I/R no tecido muscular esquelético
- c) Avaliar o efeito de uma solução desenvolvida na FMUSP “solução Cirurgia Plástica-USP” (CP-USP) na proteção celular em modelo de I/R no tecido muscular esquelético.

4. Material e Métodos

O presente estudo foi desenvolvido no Laboratório de Microcirurgia e cirurgia plástica (LIM 04), em conjunto com o Laboratório de Biologia Celular (LIM 59) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), no período de fevereiro de 2005 a janeiro de 2008 com a aprovação da Comissão de Ética para análise de Projetos de pesquisa- CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital da Clínicas da FMUSP.

Foram utilizados modelo de isquemia reperfusão do membro posterior de rato com amputação subtotal preservando somente os vasos femorais^{2,109-111}. A dissecação dos vasos foi realizada com auxílio de um microscópio (karl Kaps model D-35614 ASSLAR – 16 X), deixando intactos os vasos femorais para a aplicação do clampe microvascular de pressão standarizada e os vasos epigasticos superficiais para a aplicação da solução preservadora, dissecando cefalicamente o ramo por onde foi canulada a arteria epigastrica superficial com um cateter e conduzida a irrigação do membro com as soluções preservadoras testadas; a saída do excesso da solução de lavagem da extremidade foi feita pela veia epigástrica superficial.

4.1 Animais Experimentais

Foram utilizados 20 ratos machos da linhagem Wistar com 3 meses de idade e peso médio de 333 ± 48 ($p > 0,005$) gramas, obtidos do Biotério Central da FMUSP. Os animais foram divididos randomicamente em quatro grupos experimentais de acordo com o protocolo de perfusão.

Para a perfusão dos membros foi utilizada uma bomba de perfusão contínua de maneira que para todos os procedimentos a velocidade e pressão de perfusão (150 mmHg) fosse padronizada

4.2 Grupos experimentais

Os grupos experimentais foram formados de acordo com o tipo de solução de reperfusão utilizada:

Grupo 1 (Controle)- clampeamento sem perfusão nenhum

Grupo 2- clampeamento com perfusão de Solução da Universidade de Wisconsin previamente a reperfusão sanguínea

Hidroxyethyl-starch	50 g/L
Raffinose	17,83 g/L
Lactobionate	35,83 g/L
Adenosina	1,34 g/L
Sulfato de magnésio	1,23 g/L
Glutathione	0.922 g/L
Allopurinol	0,136 g/L
Insulina	40 U
Dexametazona	16 mg
Osmolaridade	320
Ph	7.4

Grupo 3- clampeamento com perfusão de Solução de Ringer Lactato

+ heparina previamente a reperusão sanguínea

Princípios ativos Por 100 ml

Cloruro sódico	600 mg
Cloruro potássio	40 mg
Cloroso cálcico dihidratado	27 mg
Lactato sódico	312 mg
Osmolaridad teórica:	277 mOsm/l
Valor de acidez:	< 1 mmol/l
pH:	5,0 - 7,0
Heparina	10000 UI

Grupo 4- clampeamento com perfusão: Solução Cirurgia Plástica-USP:

Princípios ativos Por 100 ml

Cloroso sódico	600 mg
Cloroso potássio	40 mg
Cloroso cálcico dihidratado	27 mg
Lactato sódico	312 mg
Heparina	10000 UI
Vitamina C	100 mg
Dexametazona	16 mg
Insulina	40 UI
Osmolaridade teórica:	277 mOsm/l
Valor de acidez:	< 1 mmol/l
pH:	5,0 - 7,0

4.3 Procedimento Cirúrgico

A anestesia geral dos animais foi realizada por injeção intraperitoneal de Rompum e Ketamina (2mg/100mg) e Xilazina (20 mg/ 100mg). Todo o procedimento cirúrgico de amputação do membro pélvico direito foi conduzido sob microscópio. A separação de todos os elementos de sustentação do membro ao nível inguinal, sendo meticulosa e completa com exceção dos vasos femorais, ainda com a finalidade de evitar danos diretos a artéria femoral durante a perfusão das soluções preservadoras, dissecou-se os vasos epigástricos superficiais, com secção cefálica, inserimos um cateter na artéria epigástrica superficial por onde foi realizada a irrigação do sistema da coxa, prévio clampeamento dos vasos femorais a fim de isolar completamente a coxa. A veia epigástrica superficial serviu para saída do excesso das soluções preservadoras e após o termino da perfusão, ambos vasos epigástricos superficiais foram ligados (Fig.1)

Uma vez dissecado o membro posterior e os vasos mencionados, provocou-se a isquemia por 120 min. mediante o pinçamento da artéria e veia femoral, isolando-se assim o membro pélvico (Fig.2).

Figura 1: Separação completa do membro pélvico direito. Foram conservadas apenas os vasos femorais (seta preta). A seta amarela indica a dissecação e secção cefálica dos vasos epigástricos superficial a fim de fazer a irrigação da coxa com as soluções preservadoras, sem lesar o pedículo principal.

Figura 2: Pinçamento dos vasos femorais.

O grupo I não foi irrigado previamente ao restabelecimento da circulação sanguínea.

Nos grupos II, III e IV, logo após o pinçamento dos vasos, procedeu-se a lavagem da coxa com as soluções preservadoras, através da artéria epigástrica superficial, seccionada cefalicamente; com auxílio de uma máquina de infusão contínua padronizada a 1 mL/minuto a uma pressão de 150mmHg se irrigou-se a coxa com a solução correspondente a cada grupo, a via de saída do excesso foi eliminado através da veia epigástrica superficial, exemplificando um modelo fechado de I/R; descartando deste modo as variáveis de agressão endotelial nos vasos femorais e obtendo um endotélio íntegro, com a única agressão do *clamp*; desta forma avaliamos somente as alterações celulares distais relacionadas bem como o índice de proteção das soluções empregadas num modelo muscular íntegro. (Fig. 3)

Ao término da irrigação, isolou-se completamente o membro por um período de 120 minutos (isquemia primária). Uma vez cumprido o período de isquemia, o *clamp* foi removido da veia femoral e logo em seguida da artéria femoral para permitir a reperfusão sanguínea da extremidade por um período de 90 minutos (Fig.4). Ao completarmos o ciclo isquemia-reperfusão conforme o protocolo descrito anteriormente, procedeu-se então a dissecação dos músculos para o estudo morfológico. O músculo vasto lateral foi isolado e amostrado para estudo ultra-estrutural e o músculo gastrocnêmico para avaliação dos níveis de apoptose pela imunomarcagem da caspase 3 ativada.

Os animais foram sacrificados mediante uma overdose de anestésicos.

Figura 3: Irrigação do membro com 10 ml de solução protetora correspondente a cada grupo, utilizando via de acesso a artéria epigástrica superficial e como via de saída do excesso a veia epigástrica superficial.

Figura 4: Liberação dos clamp dos vasos femorais, permitindo a reperfusão sanguínea *in vivo* por 90 minutos.

4.4 Estudo imunoistoquímico e ultra-estrutural

Para verificar e comparar a eficiências das soluções testadas no sentido de proteger o tecido muscular de dano do tipo isquêmico foi realizado um estudo morfométrico do tecido muscular reperfundido, enfatizando os níveis de apoptose por meio de imunomarcação pela caspase 3 ativada e pela quantificação e avaliação qualitativa das mitocôndrias na fibra muscular.

A avaliação dos índices de apoptose foi conduzida no músculo gastrocnêmico com auxílio de métodos estereológicos. Já no estudo ultra-estrutural (avaliação das mitocôndrias) utilizamos o músculo vasto lateral.

4.4.1 Estudo estereológico do volume total de células apoptóticas

Amostragem do tecido

Neste estudo utilizamos o método FRACIONATOR¹¹² para estimar o volume total de células apoptóticas presentes no músculo gastrocnêmico. O FRACIONATOR é um método não tendencioso utilizado para se estimar quantidades tais como, volume, área de superfície, comprimento e número de estruturas. Este método envolve uma série de procedimentos sistemáticos de amostragem em vários níveis, conhecendo-se em cada etapa a fração amostrada.

Após a dissecação, o músculo gastrocnêmico foi pesado e depois fixado por imersão em paraformaldeído tamponado (pH 7,4) por 24 hs, sendo então, transferido para álcool 70%, onde foi mantido até a etapa de amostragem.

Na primeira etapa da amostragem, o músculo fixado foi cortado em fatias de 4 mm perpendiculares ao seu maior eixo (Fig.5a, b), produzindo cerca de 6-7 fatias por músculo. Para evitar “bias” o primeiro corte foi feito randomicamente em uma posição entre 4 mm da inserção do músculo. Estas fatias foram sistematicamente e uniformemente amostradas de maneira que toda segunda fatia foi selecionada, o que nos garante uma fração de amostragem de (f1) de $\frac{1}{2}$. Na segunda etapa (Fig.5c, d), estas fatias selecionadas foram mais uma vez seccionadas em fatias de 2 mm, perpendiculares ao primeiro plano de corte, gerando cerca de 9-12 fragmentos (Fig.5 e, f). Novamente as fatias foram sistematicamente e uniformemente amostradas, de modo que toda segunda fatia fosse selecionada; também neste caso a fração de amostragem (f2) foi de $\frac{1}{2}$, cerca de 5-6 fragmentos foram selecionados por músculo. Esta última amostragem compõe o conjunto de fragmentos representativos do músculo a ser avaliado.

Estes fragmentos foram rotineiramente emblocados em parafina, todos juntos em um só bloco (Fig.5 g), de maneira que cortes transversais ao maior eixo da fibra muscular fossem obtidos com auxílio de um micrótomo. Dois cortes de 4 μ m de espessura, do início e meio de cada bloco, contendo amostras de 5-6 fragmentos foram colhidos em laminas silanizadas, outros dois cortes foram coletados em laminas normais, corados com hematoxilina eosina para estudo histopatológico.

Figura 5a e 5b- Após ser pesado o músculo foi colocado com seu eixo maior paralelo à superfície sobre uma guia de corte de linhas para que fatias de 4mm fossem obtidas com auxílio de uma navalha

Figura 5c e 5d- Após a obtenção das fatias, elas foram sistematicamente e uniformemente selecionadas (1ª fração de amostragem = $\frac{1}{2}$) para que novamente fossem seccionadas em fatias de 2mm, sendo os cortes desta vez perpendiculares ao primeiro corte.

Figura 5e e 5f- As fatias obtidas na etapa anterior foram novamente sistematicamente e uniformemente selecionadas (2ª fração de amostragem = $\frac{1}{2}$)

Figura 5g - As fatias selecionadas na segunda etapa foram emblocadas todas juntas em parafina (5g) de maneira que cortes transversais ao maior eixo da fibra muscular fossem obtidos.

Marcação imunoistoquímica de células apoptóticas

A apoptose é o processo de morte celular programada que ocorre em tecidos normais, fazendo parte de seu desenvolvimento e manutenção. Entretanto em certas patologias ou danos teciduais mostra níveis elevados, como no caso dos danos isquêmicos. A apoptose, dependendo do estímulo, pode ser ativada por duas vias: uma mediada por receptores e outra por via mitocôndrial mas que em ambos os casos, a enzima caspase 3 é uma caspase efetora.

Para o estudo imunoistoquímico, os cortes recolhidos em laminas silanizadas foram desparafinados e hidratados. A hidratação foi realizada em banhos de álcoois em concentração decrescente e finalizada em banho de água deionizada. A peroxidase endógena foi bloqueada com banhos em água oxigenada 10 volumes por 15 minutos (5 vezes) e depois lavados em água corrente e PBS. A recuperação antigênica foi realizada aquecendo-se os cortes em panela de pressão, imersos em tampão citrato de sódio. As reações inespecíficas foram bloqueadas com banho de leite desnatado 6% por 30 minutos. As laminas foram incubadas em câmara úmida por 18 hs com o anticorpo primário anti Caspase 3. Após a lavagem em PBS, os cortes foram incubados com anticorpo secundário biotinilado (Vetor- IgG goat) durante 1 hora à 37°C. Após lavagem em PBS, procedeu-se a incubação como complexo conjugado a peroxidase (Dako L120SAB+) e, finalmente a reação foi revelada com diaminobenzidina (DAB) por 5 minutos. Os núcleos foram evidenciados por contra-coloração com hematoxilina. Os controles

negativos foram preparados omitindo-se o anticorpo primário, e em seu lugar foi utilizado albumina fetal bovina.

Determinação do volume total de células apoptóticas

Para se estimar a fração de volume de células apoptóticas, foram utilizados 10-15 campos microscópicos por bloco. As laminae foram fotografadas utilizando-se uma objetiva de 40X, e a fração de volume (Vv) de células positivas para caspase 3 foi estimada pelo método de contagem de pontos ¹¹⁴.

Para isto um sistema teste com espaçamento entre pontos de = 34,64 μm e área de 1200 μm^2 associada a cada ponto foi sobrepostos aleatoriamente nos cortes. O programa Imagem J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) ¹¹⁵, foi utilizado para a realização das contagens e geração dos sistemas teste (Fig. 6). Os pontos incidentes sobre as células marcadas positivamente para caspase 3 (P_{apop}) e sobre o tecido muscular total (P_{musc}) foram contados e a fração de volume (VV) das células apoptóticas estimada usando-se a seguinte equação (1):

(1)

$$\text{Est VV} = \Sigma P_{\text{apop}} / \Sigma P_{\text{musc}}$$

onde ΣP_{apop} e ΣP_{musc} são a soma de todos pontos em todos os campos e cortes de cada músculo avaliado.

Subseqüentemente, o volume total de células apoptóticas (V_{apop}) foi estimado multiplicando-se a fração de volume (V_V) pelo volume do músculo correspondente (V_{musc}) segundo a fórmula (2):

(2)

$$\text{Est } V_{\text{apop}} = V_V \times V_{\text{musc}}$$

O volume (V_{musc} , cm^3) do músculo gastrocnêmico foi determinado dividindo-se o peso fresco do músculo pela do tecido, considerada $1,06 \text{ g.cm}^{-3}$ ^{112,113}.

Fig. 6 – Exemplo da aplicação do sistema teste de pontos utilizando o programa de Análise de imagens IMAGE J para avaliação dos volume ocupado por células apoptóticas.

4.4.2 Avaliação quantitativa e qualitativa de mitocôndrias na fibra muscular

Amostragem do tecido

Para a avaliação qualitativa e quantitativa das mitocôndrias da fibra muscular foi realizada no músculo vasto lateral; assim após a dissecação, o músculo foi rapidamente amostrado. Para tanto, o músculo foi apoiado sobre uma superfície plana e sobre ele foi colocada de maneira aleatória uma folha transparente com furos dispostos quadraticamente servindo de guia para a obtenção das biópsias (Fig. 7). As biópsias foram obtidas daqueles furos incidentes sobre o músculo; cerca de 9-12 biópsias foram obtidas para cada músculo, estas após fixação por imersão em glutaraldeído 2% em tampão fosfato de sódio e potássio (0,15M, pH 7,2) foram processadas segundo a rotina do Centro de Multiusuário de Microscopia Eletrônica do Laboratório de Biologia Celular da FMUSP. Dos blocos preparados, apenas da metade selecionada randomicamente, foram feitos cortes (70 nm) para o estudo ultra-estrutural (Fig. 8); de cada bloco, obteve-se um corte e neste, cinco campos foram selecionados e fotografados para contagem e avaliação qualitativa das mitocôndrias; totalizando aproximadamente 25 campos por músculo.

Figura 7: Posicionamento do músculo para obtenção das biopsias para o estudo ultra-estrutural.

Fig. 8- Blocos de resina spurr para obtenção de cortes para Microscopia eletrônica.

Quantificação morfométrica do número de mitocôndrias normais e alteradas no tecido muscular

Os cortes foram observados em microscópio eletrônico, e o número de mitocôndrias normais ou danificadas foram contados em cada campo. Mitocôndrias que apresentaram alterações ou ruptura da membrana, mudanças na organização e aspecto normal do conteúdo interior foram classificadas como danificadas.

4.5 Análise estatística

Toda a análise estatística foi realizada utilizando-se o software - estatístico SPSS 13. Os dados foram checados quanto a normalidade e as médias e desvios padrões (SD) foram calculados para cada grupo. Comparações múltiplas One-way ANOVA seguidas pelo teste de Tukey ou Kuskal-Wallis, seguidas pelo pós-teste de Bonferroni foram aplicadas para comparação entre os quatro grupos estudados. A diferença foi considerada estatisticamente significativa ao nível de $p < 0,05$.

5. Resultados

Os valores dos parâmetros relacionados ao volume de células apoptóticas no tecido muscular bem como os dados sobre a avaliação das mitocôndrias normais e danificadas avaliados nos quatro grupos estudados estão apresentados na Tabela 1 e no Gráfico 1, 2 e 3.

Os resultados mostram com relação ao efeito protetor, avaliado pelos níveis de células apoptóticas no tecido muscular, que a utilização de qualquer uma das soluções provê uma melhora, ou seja, a perfusão da solução previamente a I/R diminui a ocorrência de apoptose das células musculares. Quando comparadas entre si, a solução II e a IV foram as que apresentaram melhores resultados, não sendo significativamente diferentes entre si. Já quando comparadas as soluções II e IV com a III, os efeitos de redução do volume de células apoptóticas no tecido muscular é maior para a solução II ($p < 0,001$) bem como para a solução IV ($p < 0,002$).

Com relação a proteção ao dano mitocôndrial, os resultados são semelhantes. As soluções II, III e IV quando comparadas ao tecido não tratado pela perfusão de solução protetora apresentam resultados significativamente positivos com relação a diminuição nos danos as mitocôndrias dos miócitos. As soluções II e IV apresentam resultados superiores quando comparadas a solução III ($p < 0,001$ e $p < 0,0001$ respectivamente).

Quando comparadas entre si, as soluções II e IV não apresentam diferenças significativas.

Tabela 1. Média e desvio padrão dos parâmetros referentes ao peso, volume de células apoptóticas e numero de mitocôndrias normais e danificadas no tecido muscular.

	Grupos								p
	I		II		III		IV		
PESO	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	
Peso corpóreo (g)	309	0,44	344,4	21,4	313,6	12,9	377,2	27,7	ns
Peso m. gastrocnêmico(g)	0,58	0,02	0,592	0,03	0,564	0,03	0,713	0,05	ns
Peso m. vasto lateral (g)	2,31	0,39	2,24	0,67	1,85	0,52	2,41	0,17	ns
APOPTOSE									
Volume de células apoptóticas (cm³)	0,118	0,026	0,025	0,013	0,033	0,020	0,053	0,024	<0,001
Porcentagem do volume muscular ocupada por células apoptóticas	30%	0,065	7%	0,036	9%	0,046	12%	0,039	<0,001
DANO MITOCONDRIAL									
Mitocôndrias danificadas (%)	70%	0,123	34%	0,108	68%	0,071	42%	0,054	<0,001
Número de mitocôndrias normais por área (µm²)	0,106	0,051	0,279	0,163	0,122	0,045	0,171	0,038	<0,03
Número de mitocôndrias danificadas por área (µm²)	0,243	0,047	0,126	0,039	0,257	0,047	0,122	0,024	<0,001

Gráfico 1- Volume total médio de células apoptóticas no músculo gastrocnêmico.

Gráfico 2- Porcentagem do volume total do músculo gastrocnêmico ocupado por células marcadas positivamente por Caspase 3.

Gráfico 3- Porcentagem de mitocôndrias danificadas nos miócitos do músculo vasto lateral.

Fig.9- Micrografias do tecido muscular marcado imunoistoquimicamente para a caspase 3 e contracorado pela Hematoxilina nos diferentes grupos experimentais. a, grupo I; b, grupo II, c, grupo III e d, grupo IV.

Fig. 10- Eletromicrografias do tecido muscular avaliado nos 4 grupos experimentais. a, grupo I; b, grupo II, c, grupo III e d, grupo IV.

6. Discussão

A importância de se manter uma microcirculação estável durante o transplante de retalhos de tecidos para se alcançar índices elevados de sucesso e sobrevivência já foi amplamente reportado¹¹⁶. Entretanto, pouco se sabe sobre as alterações na microcirculação tecidual durante o processo, e como elas podem influenciar a qualidade do implante assim como seus efeitos para a sobrevivência e desfechos após a transferência.

Siemionow e Arslan³⁸ realizaram uma revisão sobre o impacto da injúria por isquemia e reperfusão na transferência livre de tecidos e destacaram que a isquemia primária se inicia quando o cirurgião secciona o pedículo vascular. A dissecação do pedículo vascular do retalho durante o implante também contribui para a isquemia primária do respectivo tecido. A isquemia crítica ocorre antes do cirurgião clampar as estruturas vasculares do pedículo para a subsequente transferência do retalho, que resulta em um aumento crítico da duração da isquemia; acredita-se que um vasoespasma direto e induzido mecanicamente na microcirculação durante a dissecação do pedículo representa um dos mecanismos patogênicos envolvidos no comprometimento da microcirculação durante a fase inicial de isquemia.

Kroll et al³⁵ observaram que a maioria (80%) das trombozes ocorrem nos dois primeiros dias após o transplante, a trombose venosa é mais comum (>60%) do que a arterial, e ocorre nas primeiras 24 hs após o procedimento cirúrgico; trombozes tardias estão associadas com altos índices de perda do retalho. Chen et al¹¹⁷ reportaram uma taxa de 10% de re-exploração devido ao comprometimento do retalho, uma taxa de 85% de

recuperação, e ainda que 95% das re-explorações ocorrem nas primeiras 72 hs do período pós operatório. Dos retalhos comprometidos, 57% apresentavam problemas relacionados ao componente venoso e 42 % relacionado ao componente arterial. Quando avaliada a taxa de recuperação do retalho com relação ao tipo de complicação vascular, notaram que nos casos em que o comprometimento era venoso, a taxa de recuperação foi de 91%, enquanto que para problemas relacionados ao componente arterial a taxa é de 75% ($p<0,024$).

Quando um retalho apresenta trombose o período de isquemia global, é inevitável até que o fluxo sanguíneo seja restabelecido; complicações durante o procedimento cirúrgico podem resultar em um aumento ou repetição do período de isquemia tecidual, e como resultado destes períodos de isquemia e posterior reperfusão pode-se observar a perda parcial ou completa necrose do retalho.

Devido as baixas taxas de perda (em torno de 5%), diferenças significativas na sobrevivência do retalho não são observadas com relação a utilização de agentes profiláticos, até que estudos controlados sejam conduzidos. Entre os experientes cirurgiões microvasculares não há um consenso sobre qual o agente ou combinação de agentes farmacológicos e suas respectivas dosagens devem ser utilizadas para prevenir a trombose. Uma pesquisa com 106 cirurgiões microvasculares, mostra que 96% deles utilizam o mesmo tratamento profilático anti-trombose, que inclui heparina, dextran ou aspirina em diferentes combinações¹¹⁸.

Evidências clínicas indicam o procedimento de re-exploração nos casos de suspeita de comprometimento do retalho transplantado e a exploração tardia aumenta os riscos de perda irreversível e a ocorrência do fenômeno de não reperfusão no retalho. A detecção precoce e a rápida re-exploração do retalho com sinais de comprometimento vascular estão associadas a melhores desfechos. Por exemplo, Bui et al ¹¹⁹ encontram em uma série de 83 pacientes que retalhos livre com recuperação foram re-explorados significativamente mais rápido (média 4 horas) que retalhos que não sobreviveram (média 9 horas) em após a detecção do comprometimento. A trombose no pedículo pode ser de fato aparente somente durante os estágios tardios de comprometimento do retalho. Hidalgo e Jones ¹²⁰ não encontraram trombose em paciente que retornaram ao centro cirúrgico 1,5 horas após o diagnóstico do comprometimento do retalho em comparação a 64% de trombose encontrada em pacientes que foram submetidos a re-exploração somente 3 ou mais horas depois do diagnóstico.

O tratamento de trombose no local de anastomose inclui a correção de todos os fatores mecânicos e técnicos que a causaram. Isto inclui rever as anastomoses, aliviar a compressão ou tensão no pedículo e irrigar ou evacuar hematomas compressivos. Quando uma anastomose é revisada o vaso deve ser perfundido com uma solução de irrigação para prover uma proteção local do retalho ¹¹⁹.

A formação de coágulos após uma injúria vascular com dano do revestimento endotelial e exposição do tecido conjuntivo subendotelial ao

sangue circulante envolve uma seqüência complexa de eventos. A hemóstase primária é um processo mediado por plaquetas que ocorre segundos após a injúria e é de importância fundamental para interromper a perda de sangue nos capilares, pequenas vênula e arteríolas. Durante a hemóstase primária, as plaquetas aderem ao sub-endotélio, agregando-se e liberando grânulos que contêm inúmeros mediadores formando um tampão hemostático. Durante a isquemia a trifosfato de adenosina (ATP) e os níveis de glicogênio diminuem e grandes doses de lactato se acumulam; Durante a reperfusão a restauração do fluxo sanguíneo tem o efeito benéfico de remover os radicais livres e prover nutrientes. Chavarría e Sastré¹²¹ demonstraram que a isquemia prolongada (maior de 120 min.) favorece o dano intracelular com alterações bioquímicas e histológicas características que se manifestam com edema, cariopícnose y rhabdomiólise.

Em nosso estudo foi utilizado um modelo puro de I/R em músculo esquelético, para avaliar o dano na microcirculação (zona secundária), já que a variável do dano endotelial causado no sítio de uma anastomose (zona primária) foi descartado ao se dissecar os vasos epigástricos superficiais; em nosso modelo utilizamos estes mesmos vasos como via de lavagem com as soluções preservadoras, deste modo não foi produzido nenhuma lesão nos vasos femorais. As soluções utilizadas foram aquecidas e administradas de modo a ter a mesma temperatura que a corpórea. Este modelo foi pensado com a finalidade de ter uma avaliação mais precisa do que acontece com o dano na microcirculação e o efeito protetor da lavagem do retalho muscular durante a isquemia de 120 minutos. Conduzimos uma

avaliação esterológica dos níveis de apoptose e ultraestrutural das mitocôndrias dos miócitos.

A hemóstase primária e secundária não são eventos separados, mas sim eventos intimamente ligados; as plaquetas ativadas aceleram a coagulação do plasma e da mesma forma os produtos da cascata de coagulação tais como a trombina, que induz a ativação plaquetária. Khouri et al ⁶² inibiram seletivamente a agregação primária das plaquetas e depois a deposição de fibrina em um modelo de “crush-avulsion” arterial em ratos para determinar suas contribuições relativas para a ocorrência de trombose. A inibição da agregação plaquetária teve efeitos mínimos na melhora das taxas de patência vascular e a inibição da produção de fibrina melhorou as taxas de patência, o que levou os autores a concluir que a fibrina desempenha um papel mais decisivo na formação do trombo em cirurgias microvasculares.

A habilidade da solução salina heparinizada ou Solução Ringer-lactato na redução da trombose quando aplicada topicamente no local de anastomose tem sido avaliada clínica e experimentalmente. Wieslander e Dougan¹²² examinaram a patência de vasos após a utilização de diferentes soluções de irrigação contendo solução salina normal e solução de Ringer lactato contendo ou não heparina. Eles encontraram que a agregação plaquetária é diminuída pelas soluções que contêm heparina.

Cox et al ¹²³ utilizaram um modelo em rato para demonstrar que a irrigação com solução salina heparinizada na concentração de 100 U/ml inibe significativamente a formação de trombo sem alterar os perfis de

coagulação. Andresen et al ¹²⁴ também mostrou que a irrigação com heparina a 100 U/mL é mais eficiente que doses sistêmicas de 50 e 100 U/kg na prevenção da formação de trombos uma hora depois da anastomose em modelo trombogênico utilizando a artéria femoral de rato.

A irrigação com solução heparinizada é uma prática comum durante as anastomoses, sem dúvida não se tem demonstrado uma superioridade quando comparada com grupos controles sem irrigação com heparina. Em nosso estudo podemos observar que a solução do grupo III (Ringer lactato com heparina a 100u/ml) mostrou leve proteção considerando a porcentagem de mitocôndrias danificadas nos miócitos do músculo vasto lateral quando comparado com o grupo que não foi irrigado.

Os transplantes de tecido já estão padronizados para diversos órgãos e nos permitem aprender com base neles e aplicá-los na prática microcirúrgica, como por exemplo, o uso de soluções preservadoras de tecidos; dentro das quais esta a solução da Universidade de Wisconsin. Esta solução apresenta um efeito protetor contra os danos decorrentes da isquemia e reperfusão, prevenindo o dano celular irreversível por isquemia prolongada em retalhos microcirúrgicos. Seus efeitos protetores devem-se a agentes impermeabilizadores como o ácido lactobiônico e a rafinosa pentaidratada; amido hidroxietílico para suprimir o edema celular secundário à hipotermia, adenosina para estimular a regeneração do ATP, glutatona para suprimir o dano por radicais livres, alupurinol para a supressão de xantinoxidase; potássio, sódio e magnésio, para manter um ambiente fisiologicamente equilibrado e fosfatos como um tampão de pH. A solução de

Wisconsin, está padronizada para diversos órgãos como coração, pâncreas, e fígado. Neste estudo utilizamos a solução de Wisconsin como padrão de efeito protetor, por ser largamente utilizado e comparamos os efeitos com outras duas soluções: solução heparinizada e uma proposta por nosso grupo, solução Cirurgia Plástica-USP; Os músculos para este estudo foram removidos intactos para que se pudesse conduzir um análise de base estereológica para a avaliação dos níveis de apoptose e do dano mitocôndrial.

A emergência microcirúrgica não pode esperar, e os centros cirúrgicos não especializados, não contam com soluções preservadoras como a da universidade de Wisconsin. Apenas dispõe de medicamentos (Ringer lactato, Heparina, Dexametazona, Insulina e Vitamina C) que permitem a rápida preparação da solução proposta, e assim no presente estudo, juntamos em uma solução a tradicional heparina, a dexametazona, e a recentemente reconhecida, insulina, que já tem demonstrado seu efeito anti-apoptótico assim como o efeito anti-inflamatório e pro-fibrinolítico; além destes agregamos também um antioxidante capaz de diminuir os níveis sanguíneos de produtos da peroxidação de lipídios, estabilizador da atividade da superóxido dismutase, tudo com a finalidade de formar uma solução de fácil acesso e baixo custo, mas não menos efetiva que uma solução preservadoras de tecidos como a já conhecida solução de Wisconsin.

A dexametazona tem um efeito anti-inflamatório potente, contribuindo para uma menor adesão e ativação de neutrófilos. A DXM inibe a adesão de moléculas no endotélio, prevenindo o recrutamento e leucócitos nas áreas

inflamadas, Este efeito parece ocorrer pela via do receptor de glucocorticóides ao nível transcripcional. A DMX também atua no nível de receptores citoplasmáticos iniciando a biosíntese de proteínas inibidoras de fosfolipase A2. Ela também tem efeito inibitório na peroxidação dos lipídios e estudos recentes a indicam como uma inibidora da óxido nítrico sintase (NOS). Um estudo *in vitro* demonstrou que a DXM protege o músculo esquelético da fadiga em I/R. Chen et al. determinaram a influência da DXM na função contrátil do músculo esquelético reperfundido, demonstrando que depois de um período de 3 horas de isquemia no músculo esquelético a DXM protege o tecido e atenua sua função no período inicial de reperfusão

77

Em estudos recentes, mostra-se que a insulina tem um forte efeito anti-inflamatório, que até pode ser comparado com dos glicocorticóides, Além disso a insulina também apresenta um efeito antiapoptótico somado ao seu poder anti-inflamatório e antifibrinolítico, conferindo-lhe um lugar na solução proposta. A combinação de insulina e glicocorticóides parece ser hoje em dia a opção terapêutica mais viável e substitui o uso de corticóides sozinhos ⁹⁵.

Finalmente, agregou-se a vitamina C, um antioxidante capaz de diminuir os níveis sanguíneos de produtos da peroxidação de lipídios, estabilizando a atividade da superóxido dismutase.

A preparação da solução Plástica-USP foi pensada de maneira a se ter uma solução de fácil preparação e baixo custo, mas com uma efetividade similar as soluções preservadoras já conhecidas, como a solução da Universidade de Wisconsin.

No presente estudo a amostra foi homogênea já que não houve diferenças significativa entre os grupos, tanto em peso corpóreo quanto em o peso de ambos os músculos avaliados.

Com base nos resultados, observamos claramente que a solução de Wisconsin oferece proteção irrefutável contra o dano de I/R, apreciamos fidedignamente que não há diferenças significativas entre as soluções de Wisconsin e a Solução Plástica-USP quando avaliada quanto aos níveis de apoptose no tecido muscular. Ambas as soluções demonstram ser significativamente superiores ao grupo controle e ao grupo somente irrigado com heparina.

A solução Cirurgia Plástica - USP demonstrou também claramente sua superioridade quando comparada com uma solução de irrigação complementada apenas com heparina, ao observar o volume de células apoptóticas (cm^3), a porcentagem do volume muscular ocupada por células apoptóticas e mitocôndrias danificadas; Ao avaliar a porcentagem de mitocôndrias danificadas nos miócitos do músculo vasto lateral, a solução proposta mostrou pelo número de mitocôndrias danificadas por área (μm^2), uma proteção levemente maior que a solução de Wisconsin; mas a diferenças não foi significativa, e a solução de Wisconsin foi levemente superior que a proposta e analisar o número de mitocôndrias normais por área (μm^2), mas também a diferença não foi significativa.

Permanece ainda nenhum consenso sobre o regime profilático ideal para a prevenção de trombose na cirurgia microvascular; o procedimento cirúrgico cuidadoso e refinado, juntamente com o diagnóstico precoce de

comprometimento do retalho são os aspectos mais significativos na determinação do sucesso do implante do retalho. O uso rotineiro de soluções de irrigação parece ter beneficiado significativamente os desfechos e diminuído assim os riscos de perdas.

A solução Cirurgia Plástica - USP demonstrou sua utilidade e representa uma ferramenta a mais na prática clínica dos transplantes microcirurgicos; assim, também cabe enfatizar que representa uma opção nos casos de re-exploração de retalhos e para a conservação dos membros amputados onde geralmente não existe um local especializado em microcirurgia por perto e trasladados entre cidades ou até entre estados devem ser realizados.

7. Conclusão

A irrigação do tecido muscular diminui o dano celular causado pela isquemia e reperfusão com relação aos níveis de apoptose

A composição da solução protetora é determinante para este efeito

A solução Cirurgia Plástica - USP demonstrou uma eficácia semelhante a solução da universidade de Wisconsin, representando um alternativa na proteção contra os danos causados por isquemia e reperfusão em retalhos musculares submetidos a um período de 120 minutos, com baixo custo e fácil preparação.

8. Referências

- 1** Kerrigan CL, Stotland MA. Ischemia reperfusion injury: A review. *Microsurgery* 1993;14(13):165–175
- 2** Cunha, M.S., Nakamoto, H., Ferreira, M.C. Study of warm ischemia followed by reperfusion on a lower limb model in rats effect of Allopurinol and Streptokinase. *Clinics*. 2005;60:3:213-220.
- 3** Kirschner RE, Fyfe BS, Hoffman LA, Chiao JJC, Davis JM, Fantini GA Ischemia-reperfusion injury in myocutaneous flaps: Role of leukocytes and leukotrienes. *Plast Reconstr Surg* 1997;99:1485–1493.
- 4** Russell RC, Roth AC, Kucan JO, Zook EG. Reperfusion injury and oxygen free radicals: A review. *J Reconstr Microsurg* 1989;5:79–84.
- 5** Morris SF, Pang CY, Zhong A, Boyd B, Forrest CR. Assessment of ischemia-induced reperfusion injury in the pig latissimus dorsi myocutaneous flap model. *Plast Reconstr Surg* 1993;92:1162–1172
- 6** Pang CY, Yang RZ, Zhong A, Xu N, Boyd B, Forrest CR. Acute ischaemic reconditioning protects against skeletal muscle infarction in the pig. *Cardiovasc Res* 1995;29:782–788.

-
- 7** Johnson PC, Heil BV, Parva B, et al. Thrombin activity on dissected and anastomosed human arteries. *J Surg Res* 1996;60:193–198
- 8** Lee C, Kerrigan CL. Neutrophil localization following reperfusion of ischemic skin flaps. *Plast Reconstr Surg* 1992;89(5):910–915.
- 9** Dolan R, Hartshorn K, Andry C, et al. In-vivo correlation of neutrophil receptor expression, ischemia- reperfusion injury, and selective 5-lipoxygenase inhibition in guinea pigs. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1998;124: 1377–1380.
- 10** O'Shaughnessy M, Anderson GL, Acland RD, Barker JH. Platelet-derived thromboxane A2 decreases microvascular perfusion after arterial repair. *Plast Reconstr Surg* 1997;99:834–841.
- 11** Stotland MA, Kerrigan CL. The role of platelet activating factors in musculocutaneous flap perfusion injury. *Plast Reconstr Surg* 1997;99:1989–1999.
- 12** Zamboni WA, Stephenson LL, Roth AC, et al. Ischemiareperfusion injury in skeletal muscle: CD18 dependent neutrophil adhesion. *Plast Reconstr Surg* 1997;99:2002–2007.

-
- 13** Picard-Ami LA Jr., MacKay A, Kerrigan CL. Effect of allopurinol on the survival of experimental pig flaps. *Plast Reconstr Surg* 1992;89(6):1098–1103.
- 14** Dorion D, Zhong A, Chiu C, Forrest CR, Boyd B, Pang CY. Role of xanthine oxidase in reperfusion injury of ischemic skeletal muscles in the pig and human. *J Appl Physiol* 1993;75:246–255.
- 15** Wang WZ, Anderson G, Fleming JT, et al. Lack of nitric oxide contributes to vasospasm during ischemia reperfusion injury. *Plast Reconstr Surg* 1997;99:1099–1108.
- 16** Rubanyi GM. Endothelium derived relaxing and contracting factors. *J Cell Biochem* 1991;46:27.
- 17** Roth A, Russell R. The role of cAMP in mediating protective effects from ischemia reperfusion injury. Abstracts from American Society for Reconstructive Microsurgery, 13th Annual Meeting, Scottsdale Arizona, January 1998
- 18** Dumanian GA, Heil BV, Khouri RK, et al. Tissue factor and its inhibition at the human microvascular anastomosis. *Plast Reconstr Surg* 1996;60:263–269.

19 Lantieri LA, Ozbek MR, Deune EG, et al. Plast Reconstr Surg 1996;97:587–594.

20 Angel MF, Knight KR, Amiss LR, Morgan RF. Further investigation of secondary venous obstruction. Microsurgery 1992;13(5):255–257.

21 Hjortdal VE, Sinclair T, Kerrigan CL, Solymoss S. Venous ischemia in skin flaps: Microcirculatory intravascular thrombosis. Plast Reconstr Surg 1994;93:366–374

22 Hauge EM, Balling E, Hartmund T, Hjortdal VE. Secondary ischemia caused by venous or arteriole occlusion shows differential effects on myocutaneous island flap survival and muscle ATP levels. Plast Reconstr Surg 1997;99:825–833.

23 Angel MF, Knight KR, Mellow CG, Wanebo J, Amiss LR, Morgan RM. Timing relationships for secondary ischemia in rodents: The effect of venous obstruction. J Reconstr Microsurgery 1992;8:107–109

24 Mellow CG, Knight KR, Angel MF, Coe SA, O'Brian BM. Biochemical basis of secondary ischemia. J Surg Res 1992;52:226–232.

25 Majno G, Ammes A, Chiang J, Wright RL. No re-flow after cerebral ischemia. Lancet 1996;2:569–570.

-
- 26** Ammes A, Wright RL, Kowada M, Thirsten JM, Majno G. Cerebral ischemia II: The no re-flow phenomenon. *Am J Pathol* 1968;52:437–453.
- 27** Menger MD, Rucker M, Vollmar B. Capillary dysfunction in striated muscle: Ischemia reperfusion on the mechanisms of “no re-flow.” *Shock* 1997;8:2–7.
- 28** Barker JH, Acland RD, Anderson GL, Patel J. Microcirculatory disturbances following the passage of emboli in an experimental free flap model. *Plast Reconstr Surg* 1992;90:95–102.
- 29** Barker JH, Gu JM, Anderson GL, et al. The effects of heparin and dietary fish oil on embolic events and the microcirculation downstream from a small artery repair. *Plast Reconstr Surg* 1993;91:335–343.
- 30** Michael Bezuhly, M.D., Robert Liwski, M.D., PhD, Kenneth A. West, M.D. and Steven F. Morris, M.D., M.Sc, Activated protein C: An Emerging therapeutic agent in the prevention os ischemia-reperfusion injury. *J Reconstr microsurg* 2008;24:361-367
- 31** Srivastava R. Apoptosis, Cell Signaling and Human Diseases, Molecular Mechanisms. Vol 1. *University of Texas Health Center, r. Tyler* , 2007.

-
- 32.** Kroll SS, Schusterman MA, Reece GP, et al. Choice of flap and incidence of free flap success. *Plast Reconstr Surg* 1996;98:459–463
- 33** Hidalgo DA, Disa JJ, Cordeiro PG, et al. A review of 716 consecutive free flaps for oncologic surgical defects: refinement in donor-site selection and technique. *Plast Reconstr Surg* 1998;102:722–732; discussion 733–724
- 34** Gusenoff JA, Vega SJ, Jiang S, et al. Free tissue transfer: comparison of outcomes between university hospitals and community hospitals. *Plast Reconstr Surg* 2006;118:671–675
- 35** Kroll SS, Schusterman MA, Reece GP, et al. Timing of pedicle thrombosis and flap loss after free-tissue transfer *Plast Reconstr Surg* 1996;98:1230–1233
- 36.** Hirigoyen MB, Urken ML, Weinberg H. Free flap monitoring: a review of current practice. *Microsurgery* 1995;16:723–726; discussion 727
- 37** Khalil AA, Aziz FA, Hall JC. Reperfusion injury. *Plast Reconstr Surg* 2006;117:1024–1033
- 38** Siemionow M, Arslan E. Ischemia/reperfusion injury: a review in relation to free tissue transfers. *Microsurgery* 2004;24:468–475

39 Jokuszies A, Niederbichler A, Meyer-Marcotty M, et al. Influence of transendothelial mechanisms on microcirculation: consequences for reperfusion injury after free flap transfer. Previous, current, and future aspects. *J Reconstr Microsurg* 2006;22:513–518

40 Libro: U.J.Hesse, B. de hemptinne (eds) organ preservation solution with HTK and UW solution. Update on the clinical use and experimental studies. lengerich; Berlin;düsseldorf; Leipzig; riga; Scottsdale (USA); Wien; Zagreb:Pabst,1999

41 Fratte´ S, Gendrault JL, Steffan AM, Kirn A. Comparative ultrastructural study of rat livers preserved in Euro-Collins or University of Wisconsin solution. *Hepatology* 1991;13:1173-1180

42 Wahlberg JA, Southard JH, Belzer FO. Development of a cold storage solution for pancreas preservation. *Cryobiology* 1986;23:477-482.

43 Wahlberg JA, Love R, Landegaard L, Southard JH, Belzer FO. 72-hour preservation of the canine pancreas. *Transplantation* 1987;43:5-8.

44. Wicomb WN, Collins AB, Tokunaga Y, Esquivel C. Choice of cation in solutions for hypothermic storage of liver and heart. High-sodium versus high-potassium. *Transplantation* 1991;51:281-282.

- 45** Wieland E, Schu"tz E, Armstrong VW, Ku"the F, Heller C, Oellerich M. Idebenone protects hepatic microsomes against oxygen radical-mediated damage in organ preservation solutions. *Transplantation* 1995;60:444-45
- 46** Sumimoto R, Dohi K, Urushihara T, Jamieson NV, Ito H, Sumimoto K, et al. An examination of the effects of solutions containing histidine and lactobionate for heart, pancreas and liver preservation in the rat. *Transplantation* 1992;53:1206-1210.
- 47** Bresticker MA, LoCicero J III, Oba J, Greene R. Successful extended lung preservation with UW solution. *Transplantation* 1992;54:780-784.
- 48** Jamieson NV, Sundberg R, Lindell S, Southard JH, Belzer FO. A comparison of cold storage solutions for hepatic preservation using the isolated perfused rabbit liver. *Cryobiology* 1988;25:300-310.
- 49** Howden BO, Jablonski P, Thomas AC, Walls K, Biguzas M, Scott DF, et al. Liver preservation with UW solution. I. Evidence that hydroxyethyl starch is not essential. *Transplantation* 1990;49:869-872
- 50** Olthoff KM, Millis JM, Imagawa DK, Nuesse BJ, Derus LJ, Rosenthal JT, et al. Comparison of UW solution and Euro-Collins solutions for cold preservation of human liver grafts. *Transplantation* 1990;49:284-290.

- 51** Adam R, Bismuth H, Diamond T, Ducot B, Morino M, Asarcioglul, et al. Effect of extended cold ischemia with UW solution on graft function after liver transplantation. *Lancet* 1992;340:1373-1376.
- 52** Takada Y, Boudjema K, Jaeck D, Bel-Haouari M, Doghmi M, Chenard M-P, et al. Effects of platelet-activating factor antagonist on preservation/reperfusion injury on the graft in porcine orthotopic liver transplantation. *Transplantation* 1995;59:10-16.
- 53** Sumimoto R, Jamieson NV, Wake K, Kamada N. 24-hour rat liver preservation using UW solution and some simplified variants. *Transplantation* 1989;48:1-5.
- 54** Sumimoto R, Kamada N, Jamieson NV, Fukuda Y, Dohi K. A comparison of a new solution combining histidine and lactobionate with UW solution and Euro-Collins for rat liver preservation. *Transplantation* 1991;51:589-593.
- 55** Matsumoto K, Honda K, Kobayashi N. Protective effect of heat preconditioning of rat liver graft resulting in improved transplant survival. *Transplantation* 2001;71:862-868.
- 56** Astarcioglu I, Delautier D, Adam R, Gigou M, Bismuth H, Feldmann G. The influence of the temperature of storage on survival and ultrastructure of transplanted UW-preserved rat liver grafts. *Transplantation* 1993;55:230-234.

57 Gao W, Bentley RC, Madden JF, Clavien PA. Apoptosis of sinusoidal endothelial cells is a critical mechanism of preservation injury in rat liver transplantation. *Hepatology* 1998;27:1652-1660.

58 Southard JH, van Gulik TM, Ametani MS, Vreugdenhil PK, Lindell SL, Pienaar BL, et al. Important components of the UW solution. *Transplantation* 1990;49:251-257.

59 Cohen AJ, Burczynski FJ, Rosser BG, Lipschitz J, Minuk GY. The effects of various organ preservation solutions on hepatocyte membrane potentials, intracellular calcium concentrations, and outcome following liver transplantation. *Am J Surg* 2000;179:154-60.

60 Vajdova K, Smrekova R, Kukan M, Lutterova M, Wsolova L. Bile analysis as a tool for assessing integrity of biliary epithelial cells after cold ischemia/reperfusion of rat livers. *Cryobiology* 2000;41:145-152.

61 Tian Y, Fukuda C, Schilling MK. Interstitial accumulation of Na⁺ and K⁺ during flush-out and cold storage of rat livers: Implications for graft survival. *Hepatology* 1998;28:1327-1331.

-
- 62** Khouri RK, Cooley BC, Kunselman AR, et al. A prospective study of microvascular free-flap surgery and outcome. *Plast Reconstr Surg* 1998;102:711–721
- 63** Harris K, Walker PM, Mickle DAG, Harding R, Gatley R, Wilson GJ, Kuson B, McKee N, Romashin AD: Metabolic response of skeletal muscle to ischemia. *Am J Physiol* 1986.250:213-220
- 64** Presta M, Ragnotti G: Quantification of damage to striated muscle after normothermic or hypothermic ischemia. *J Surg Res* 1989.47:389-396
- 65** Saliba MJ, Covell JW, Bloor CM: Effects of heparin in large doses on the extent of myocardial ischemia after acute coronary occlusion in the dog. *Am J Cardiol* 37:595-604, 1976.
- 66** Smith DR, Ducker TB, Kempe LG: Temporary experimental intra cranial vascular occlusion: Effect of massive doses of heparin on brain survival. *J Neurosurg* 30:537-554, 1969.
- 67** Fegen JP, Albert DJ, Persky L: The role of heparin in prolonging acute renal ischemia time. *Invest Urol* 9:16-20, 1979
- 68** Wong L, Im MJ, Hoopes JE: Increased survival of island skin flaps by systemic heparin in rats. *Ann Plasr Surg* 26:221-226, 1991

69 Wright JG, Kerr JC, Valeri R, Hobson RW: Heparin decreases ischemia-reperfusion injury in isolated canine gracilis model. Arch Surg 123:470-472, 1988

70 Xiaolu Li, M.D., Brian C. Cooley, J. David Fowler, D.V.M., And John S. Gould, M.D. Intravascular Heparin Protects Muscle Flaps From Ischemia/reperfusion injury. Microsurgery 16:90-93 1995

71 Cato AC, Wade E: Molecular mechanisms of anti-inflammatory action of glucocorticoids. Bioessays 18:371-378, 1996 152, 1996

72 Schwiebert LA, Beck LA, Stellato C, et al: Glucocorticosteroid inhibition of cytokine production: Relevance to antiallergic actions. J Allergy Clin Immunol 97:143-152, 1996

73 Umeki S, Soejima R: Hydrocortisone inhibits the respiratory burst oxidase from human neutrophils in whole cell and cell free systems. Biochim Biophys Acta 1052:211-215, 1990

74 Roilides E, Uhlig K, Venzon D, et al: Prevention of corticosteroid induced suppression of human polymorphonuclear leukocyte induced damage of aspergillus fumigatus hyphae by granulocyte colony stimulating factor and gamma interferon. Infect Immun 61:4870-4877, 1993

-
- 75** Masferrer JL, Seibert K: Regulation of prostaglandin synthesis by glucocorticoids. *Receptor* 4:25-30, 1994
- 76** Paresh Dandona, Kuldip Thusu, Raheela Hafeez, Ehad Abdel-Rahman, and Ajay Chaudhuri Effect of Hydrocortisone on Oxygen Free Radical Generation by Mononuclear Cells *Metabolism*, Vol 47, No 7 (July), 1998: pp 788-791
- 77** Long-En Chen, M.D. Ph.D.,* William P. Silver, M.D.,Anthony V. Seaber, Anastasios V. Korompilias, M.D.,And James R. Urbaniak, M Effects Of Dexamethasone On The Contractile Function Of Reperfused Skeletal Muscle *Microsurgery* 17:313–320 1996
- 78** Dandona P, Mohanty P, Chaudhuri A, Garg R, Aljada A. Insulin infusion in acute illness. *J Clin Invest* 2005.115:2069–2072
- 79** Brix-Christensen V, Andersen SK, Andersen R, et al. Acute hyperinsulinemia restrains endotoxin-induced systemic inflammatory response: an experimental study in a porcine model. *Anesthesiology* 2004100:861–870

80 Jeschke MG, Klein D, Bolder U, Einspanier R. Insulin attenuates the systemic inflammatory response in endotoxemic rats. *Endocrinology* 2004. 145:4084–4093

81 Jeschke MG, Einspanier R, Klein D, Jauch KW.. Insulin attenuates the systemic inflammatory response to thermal trauma. *Mol Med* 2002 8:443–450.

82 Horvath EM, Benko R, Gero D, Kiss L, Szabo C.. Treatment with insulin inhibits poly(ADP-ribose)polymerase activation in a rat model of endotoxemia. *Life Sci* 2008. 82:205–209

83 Jonassen AK, Brar BK, Mjos OD, Sack MN, Latchman DS, Yellon DM. Insulin administered at reoxygenation exerts a cardioprotective effect in myocytes by a possible anti-apoptotic mechanism. *J Mol Cell Cardiol* 2000. 32:757–764.

84 Jonassen AK, Sack MN, Mjos OD, Yellon DM. Myocardial protection by insulin at reperfusion requires early administration and is mediated via Akt and p70s6 kinase cell-survival signaling. *Circ Res* 2001. 89:1191–1198

85 Gao F, Gao E, Yue TL, Ohlstein EH, Lopez BL, Christopher TA, Ma XL.. Nitric oxide mediates the antiapoptotic effect of insulin in myocardial

ischemia-reperfusion: the roles of PI3- kinase, Akt, and endothelial nitric oxide synthase phosphorylation. *Circulation* 2002. 105:1497–1502

86 Tune JD, Mallet RT, Downey HF. Insulin improves contractile function during moderate ischemia in canine left ventricle. *Am J Physiol* 1998;274:H1574–H1581

87 Tune JD, Mallet RT, Downey HF. Insulin improves cardiac contractile function and oxygen utilization efficiency during moderate ischemia without compromising myocardial energetics. *J Mol Cell Cardiol* 1998. 30:2025–2035.

88 Grover A, Padginton C, Wilson MF, Sung BH, Izzo Jr JL, Dandona P. 1995. Insulin attenuates norepinephrine-induced vasoconstriction. An ultrasonographic study. *Hypertension* 2008; 25:779–784

89 Steinberg HO, Brechtel G, Johnson A, Fineberg N, Baron AD. 1994. Insulin-mediated skeletal muscle vasodilation is nitric oxide dependent. A novel action of insulin to increase nitric oxide release. *J Clin Invest* 94:1172–1179

90 Aljada A, Dandona P. Effect of insulin on human aortic endothelial nitric oxide synthase. *Metabolism* 2000;49:147–150.

- 91** Zeng G, Quon MJ. Insulin-stimulated production of nitric oxide is inhibited by wortmannin. Direct measurement in vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 1996. 98:894–898.
- 92** Trovati M, Anfossi G, Massucco P, Mattiello L, Costamagna C, Piretto V, Mularoni E, Cavalot F, Bosia A, Ghigo D. Insulin stimulates nitric oxide synthesis in human platelets and, through nitric oxide, increases platelet concentrations of both guanosine-3',5'-cyclic monophosphate and adenosine-3',5'-cyclic monophosphate. *Diabetes* 1997. 46:742–749.
- 93** Trovati M, Massucco P, Mattiello L, Mularoni E, Cavalot F, Anfossi G.. Insulin increases guanosine-3',5'-cyclic monophosphate in human platelets. A mechanism involved in the insulin antiaggregating effect. *Diabetes* 1994, 43:1015–1019.
- 94** Aljada A, Ghanim H, Saadeh R, Dandona P. Insulin inhibits NFkappaB and MCP-1 expression in human aortic endothelial cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2001. 86:450–453.
- 95** Paresh Dandona, Ajay Chaudhuri, Husam Ghanim, And Priya Mohanty Potential Use Of Insulin As An Anti-Inflammatory Drug Drug Development Research (2008)69:101–110

- 96** Vanhorebeek I, De Vos R, Mesotten D, Wouters PJ, De Wolf-Peeters C, Van den Berghe G. Protection of hepatocyte mitochondrial ultrastructure and function by strict blood glucose control with insulin in critically ill patients. *Lancet* 2005. 365:53–59
- 97** Murphy E, Glaskow W, Fralix T, Steenbergen C. Role of lipoxygenase metabolites in ischemic preconditioning. *Circ Res* 1995;76:457–67.
- 98** Goto M, Liu Y, Yang XM, Ardell JL, Cohen MV, Downey JM. Role of bradykinin in protection of ischemic preconditioning in rabbit hearts. *Circ Res* 1995;77:611–21.
- 99** Bolli R, Zughaib M, Li XY, Tang XL, Sun JZ, Triana JF, et al. Recurrent ischemia in the canine heart causes recurrent bursts of free radical production that have a cumulative effect on contractile function. A pathophysiological basis for chronic myocardial stunning. *J Clin Invest* 1995;96:1066–84.
- 100** Guaiquil VH, Golde DW, Beckles DL, Mascareno EJ, Siddiqui MAQ. Vitamin C inhibits hypoxia-induced damage and apoptotic signalling pathways in cardiomyocytes and ischemic hearts. *Free Radic Biol Med* 2004;37:1419–29.

101 K. Tsovolas A, Efstathios K. Iliodromitis A, Ioanna Andreadou A,B, Anastasia Zogaa,Maritina Demopouloub, Konstantinos E. Iliodromitis A, Theodora Manolaki A, Sophia L. Markantonis C, Dimitrios Th. Kremastinosacute Administration Of Vitamin C Abrogates Protection From Ischemic Preconditioning In Rabbits Pharmacological Research 57 (2008) 283–289

102 Casalino E, Sblanco C, Landriscina C. A possible mechanism for initiation of lipid peroxidation by ascorbate in rat liver microsomes. Int J Biochem Cell Biol 1996;28:137–49.

103 Feuerstein GZ, Young PR. Apoptosis in cardiac diseases: stress- and mitogen-activated signalling pathways. Cardiovasc Res 2000;45:560–9.

104 Qin F, Shite J, Liang C. Antioxidants attenuate myocyte apoptosis and improve cardiac function in CHF: association with changes in MAPK pathways. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2003;285:H822–32.

105 Steeves G, Singh N, Singal PK. Preconditioning and antioxidant defense against reperfusion injury. Ann NY Acad Sci 1994;723:116–27

106 Andreadou I, Iliodromitis EK, Mikros E, Bofilis E, Zoga A, Constantinou

M, et al. Melatonin does not prevent the protection of ischemic preconditioning in vivo despite its antioxidant effect against oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2004;37:500–10.

107 Aki Enomoto, M.D. Takeshi Kikuchi, B.S., Norimasa Seo, M.D,PhD, Kenjiro Matsuno, M.D., Ph.D. and Eiji Kobayashi, M.D., Ph.D, impec of cold preservation on leukocyte adhesion to the transplanted rat lung. *Microsurgery* 2007,27:228-233

108 G. Aravinda Upadhya, Stefan A. Topp, Richard S Hotchkiss, John Anagli and Steven M. Strasberg. Effect of cold preservation on intracellular calcium concentration and calpain activity in rat sinusoidal endothelial cells. *Hepatology*, 2003;37:313-323

109 Matthew J. Concannon, M.D., Thomas W. Dooley, M.D. and Charles L. Puckett, M.D. Improved survival in a replantation model containing ischemic muscle. *Microsurgery* 1991; 12:18-22

110 Michael E. McCarty, M.D., Eugene A. Grossi, M.D., Court Cutting, M.D., Christopher D. Prevel, M.D., Raguram Elluru, M.D., and Barry L. Eppley, M.D., D.M.D. Sympathetic blockade of isolated rat hindlimbs by intra-arterial guanethidine: the effect on blood flow and arterial-venous *shunting*. *Microsurgery* 1995; 16:476-481

111 Robert H, Ablove, M.D., Owen J. Moy, M.D., Clayton A. Peimer, Charles M. Severin, Ph.D., and Frances M. Sherwin. Effect on high-energy phosphates and free radical scavengers on replant survival in a ischemic extremity model. *Microsurgery*. 1996;17:481-486.

112 Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Møller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B, Sørensen FB, Vesterby A, et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS*. 1988; 96(5):379-94.

113 Wulfsohn D, Nyengaard JR, Tang Y. Postnatal growth of cardiomyocytes in the left ventricle of the rat. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*. 2004; 277(1):236-47.

114 Howard CV, Reed MG. Unbiased stereology. Three-dimensional measurement in microscopy. 2nd ed. Abingdon, Oxon: Garland Science/Bios Scientific. 2005:103-117.

115 O programa Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>)

116 de Weerd L, Mercer JB, Setsa LB. Intraoperative dynamic infrared thermography and free-flap surgery. *Ann Plast Surg* 2006;57:279–284

- 117** Chen KT, Mardini S, Chuang DCC, et al. Timing of presentation of the first signs of vascular compromise dictates the salvage outcome of free flap transfers. *Plast Reconstr Surg* 2007;120:187–195
- 118** Glicksman A, Ferder M, Casale P, et al. 1457 years of microsurgical experience. *Plast Reconstr Surg* 1997;100:355–363
- 119** 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;119:2092–2100
- 120** Hidalgo DA, Jones CS. The role of emergent exploration in free tissue transfer: a review of 150 consecutive cases. *Plast Reconstr Surg* 1990;86:492–498
- 121** Chavarría G, Sastré N. Daño muscular por isquemia y reperfusion repeddas. Problemática del análisis histopatológico. *Cirugía Plástica*. 1995 5:3:92-95.
- 122** Wieslander JB, Dougan P. Washout of vessels with heparin does not improve patency following severe microarterial trauma: an experimental study. *Ann Plast Surg* 1990;24:216–222

123 Cox GW, Runnels S, Hsu HSH, Das SK. A comparison of heparinized saline irrigation solutions in a model of microvascular thrombosis. *Br J Plast Surg* 1992;45:345–347

124 Andresen DM, Barker JH, Hjortdal VE. Local heparin is superior to systemic heparin in preventing arterial thrombosis. *Microsurgery* 2002;22:265–272