

# Modelo experimental de reimplante de membro após isquemia quente em ratos e efeito da estreptoquinase, alopurinol e terapia com oxigênio hiperbárico\*

## Replantation model after warm ischemia in rats and the effectiveness of allopurinol, streptoquinase and hyperbaric oxygen therapy\*

José Carlos Faes da Silva\*\* Danielle Tiemi Simão\*\* Leandro Gregorut Lima\*\*  
Marcelo Sacramento Cunha\*\*\* Alexandre Wada\*\*\*  
e Hugo Nakamoto\*\*\* Marcus Castro Ferreira\*\*\*\*

Silva JCF, Simão DT, Lima LG, Cunha MS, Wada A, Nakamoto H, Ferreira MC. Modelo experimental de reimplante de membro após isquemia quente em ratos e efeito da estreptoquinase, alopurinol e terapia com oxigênio hiperbárico. Rev Med (São Paulo) abr.-dez. 2001;80(2/4):78-88.

**RESUMO:** A isquemia prolongada leva a alterações na microcirculação tecidual e liberação de radicais livres do oxigênio conhecidos como fenômeno de não reperfusão. Foi realizado amputação com preservação dos vasos e nervos do membro posterior direito em 110 ratos. Os grupos GM1, GM2, GM3, GM4 e GM5 foram submetidos a isquemia quente de 0, 2, 4, 6, 8 horas. As taxas de sobrevida dos membros isquêmicos após 7 dias de avaliação foram 100%, 80%, 63,6%, 50%, 20%. Os grupos GE1, GE2 e GE3 foram tratados com estreptoquinase, alopurinol e terapia com oxigênio hiperbárico após isquemia de 6 horas. As taxas de sobrevida foram 66,7%, 70% e 30%. Os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste do Qui-quadrado e considerados significantes quando  $p < 0,05$ . Os resultados sugerem um aumento significativo da sobrevida de membros isquêmicos após utilização do alopurinol e estreptoquinase. A terapia com oxigênio hiperbárico diminuiu significativamente a sobrevida dos membros isquêmicos.

**DESCRITORES:** Ratos Wistar; Reimplante/métodos; Extremidade/cirurgia; Perna/transplante; Isquemia/cirurgia; Alupurinol/uso terapêutico; Oxigenação hiperbárica/métodos; Estreptoquinase/uso terapêutico.

## INTRODUÇÃO

### Histórico

A história do reimplante de membros é fascinante. A tradição da religião cristã atribui aos irmãos gêmeos Cosmos e Damião o primeiro

reimplante de membro realizado com sucesso. Cosmos era um médico clínico e Damião, um cirurgião no século III na Sicília. Eles realizaram muitos feitos médicos não usuais e o imperador romano Diocleciano, não aprovando estas atitudes,

\* Prêmio Oswaldo Cruz (Área Cirúrgica) - XX COMU Congresso Médico Universitário da FMUSP.

\*\* Acadêmicos da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

\*\*\* Residentes do Depto. de Cirurgia Plástica da Faculdade de Medicina da USP (orientadores).

\*\*\*\* Professor Titular da Disciplina de Cirurgia Plástica e Queimaduras da FMUSP (orientador).

sentenciou-os à morte e foram decapitados em 287 d. C. Cerca de três séculos após (século V d. C.) Cosmos e Damião reapareceram na basílica de São Cosmos e Damião em Roma e realizaram o milagre da perna preta: excisaram a perna de um guardião fiel da igreja que apresentava um tumor e transferiram a perna de um negro que havia falecido no mesmo dia<sup>19</sup>.

Durante muito tempo o reimplante e transplante de membros fizeram parte de lendas e eram atribuídos a milagres<sup>15</sup>. O primeiro reimplante de membros foi realizado com sucesso em cães em 1903 por Hopfner. Em 1906, Carrel e Guthrie publicaram um trabalho que se tornou clássico relatando reimplantes de membros em cães. O estudo do reimplante e transplante de membros em cães continuou e estes procedimentos cirúrgicos começaram a fazer parte da realidade médica<sup>34</sup>.

Em 1960, Jacobson e Swarez introduziram a utilização do microscópio para realização de anastomoses vasculares e mostraram a superioridade de anastomoses microcirúrgicas em relação às anastomoses sem o auxílio do microscópio. Surgiu assim a microcirurgia e um novo campo a ser explorado na cirurgia de reimplante de membros<sup>34,48</sup>. Dois anos depois, Ronald Malt realizou o primeiro reimplante de membro em humanos em Boston. Um garoto de 12 anos de idade teve seu braço reimplantado após amputação traumática abaixo do ombro. Desde então, o reimplante e transplante de membros têm sido exaustivamente estudados em modelos experimentais de ratos, cães e primatas e aplicados clinicamente em diversos centros médicos<sup>48</sup>.

### Estado atual

A sobrevivência e resultado funcional final do segmento reimplantado dependem da prevenção de efeitos deletérios da anóxia. Os tecidos do membro a ser reimplantado têm diferentes resistências diante da anóxia. O músculo esquelético, em particular, é menos tolerante a isquemia e suas consequências anatômicas, metabólicas e fisiopatológicas foram bem estudadas<sup>20,51</sup>. O tempo de isquemia se torna essencial para o microcirurgião diante de um membro amputado. A manutenção da viabilidade muscular é crítica para o sucesso do reimplante<sup>42</sup>.

A hipotermia tem sido considerada fator fundamental na manutenção da viabilidade muscular<sup>42</sup>.

A viabilidade do membro amputado e possibilidade de sucesso do reimplante pode ser determinado por critérios clínicos. O grau de lesão no segmento amputado e coto é um bom fator prognóstico. O melhor indicador de sucesso do reimplante é o nível de concentração de K no membro

amputado após a reperfusão. Uma concentração maior que 6,5 mmol/L indica um mau prognóstico e se correlaciona com a presença da síndrome de reperfusão<sup>54</sup>.

A busca da melhor viabilidade dos membros levou diversos autores a tentarem vários modelos de perfusão do membro amputado, hipotermia e infusão de drogas anticoagulantes<sup>20</sup>. Surgiram, desta forma, vários relatos de sucesso de reimplantes com períodos cada vez maiores de isquemia<sup>33</sup>.

### Isquemia e reperfusão

O membro isquêmico continua sendo um problema para o microcirurgião, além da patência das anastomoses microcirúrgicas, a circulação distal e periférica é igualmente importante para a sobrevivência dos retalhos e membros amputados. A isquemia leva à obstrução do fluxo sanguíneo para tecidos periféricos, o que é conhecido como fenômeno de não reperfusão. Esta obstrução tem caráter progressivo com formação de trombos na microcirculação, agregação plaquetária, edema celular e edema tecidual. A progressão deste fenômeno leva à irreversibilidade das lesões e morte do membro ou retalho<sup>32</sup>.

Recentemente, o interesse científico tem sido voltado para o possível papel dos radicais livres do oxigênio na patogênese da morte tecidual após reperfusão e a prevenção desta lesão por agentes farmacológicos. Resultados promissores foram obtidos com o uso de agentes antioxidantes e similares em diferentes tecidos. Estes resultados sugerem possível benefício na prevenção dos efeitos da isquemia tecidual. A hipótese de que os radicais livres estão envolvidos na necrose de retalhos foi primeiramente demonstrado por Manson em 1983<sup>30</sup> e Im em 1984<sup>24</sup>. Utilizando um modelo de obstrução venosa induzida em retalhos fásiocutâneos em ratos, os autores demonstraram que os radicais livres eram formados após reperfusão e que agentes como o alopurinol poderiam evitar a produção destas substâncias tóxicas. Angel et al. em 1985 estudaram o papel etiológico dos radicais livres na necrose de retalho induzida por hematoma. Observaram que a utilização de antioxidantes como a deferoxamina e quelantes do ferro poderiam minimizar a necrose induzida pelo hematoma<sup>5</sup>.

A trombose vascular continua sendo uma importante complicação na microcirurgia do reimplante de membros amputados ou transferência de tecidos compostos. Vários fatores causam trombose e levam a falência da anastomose microvascular<sup>10,26,36,53</sup>. Alguns fatores são inerentes aos tecidos a ser reimplantados, outros são dependentes de boa técnica cirúrgica. O trauma tecidual tem sido

reconhecido como o principal fator de perda do membro<sup>25</sup>. Vários agentes antiagregantes plaquetários e trombolíticos têm sido estudados em retalhos experimentais para prevenir a trombose vascular<sup>8,27</sup>.

A terapia com oxigênio hiperbárico tem sido aplicada em uma série de situações clínicas. Existem evidências em estudos experimentais de que a sua utilização pode ser benéfica para reduzir a lesão por isquemia tecidual. A utilização da terapia com oxigênio hiperbárico em retalhos isquêmicos, enxertos compostos e na preservação de membros antes do reimplante tem sido estudado. Os resultados para retalhos isquêmicos são conflitantes e muito animadores para enxertos compostos e preservação de membros isquêmicos<sup>12,31,37,38,59,61</sup>.

## OBJETIVO

O tempo de isquemia, lesão de reperfusão e o fenômeno de não reperfusão permanecem bastante estudados pois se constituem nos principais fatores de insucessos na microcirurgia e reimplantes de membros. Existem várias evidências que apontam efeito benéfico de drogas antioxidantes, trombolíticas e terapia com oxigênio hiperbárico em situações de isquemia, porém faltam trabalhos conclusivos para que estas drogas e a terapia com oxigênio hiperbárico sejam utilizados na prática clínica dos reimplantes.

O presente trabalho pretende testar um novo modelo de reimplante de membro após isquemia quente em ratos e testar o efeito da droga antioxidante alopurinol, da droga trombolítica estreptoquinase e da terapia com oxigênio hiperbárico neste novo modelo.

## MATERIAL E MÉTODO

### Animais

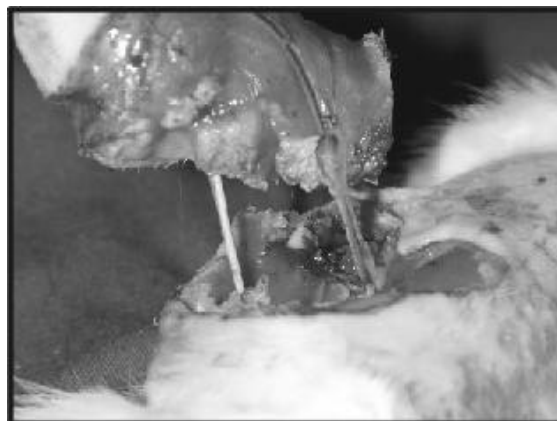
Foram utilizados 110 ratos (*Ratus norvegicus*) machos, de linhagem wistar, adultos e com massa corporal variando entre 290 e 400 gramas. Os animais foram acondicionados em gaiolas individuais, alimento e água ad libitum, período claro/escuro de 12/12 horas e temperatura ambiente de 23°C.

### Procedimento cirúrgico

Os animais foram anestesiados com tiopental sódico (50 mg/Kg) intraperitoneal. Tricotomias foram realizadas nas regiões inguinais direita e esquerda e femoral direita. O procedimento de amputação unilateral do membro posterior direito foi realizado sempre pelo mesmo cirurgião mantendo intactos os

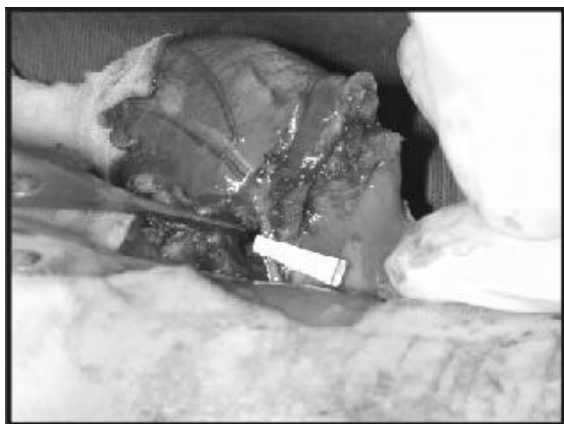
vasos e nervos femurais e nervo ciático conforme descrição a seguir.

Os animais foram posicionados em decúbito dorsal horizontal com imobilização dos quatro membros. Procedeu-se a marcação das incisões com canetas de marcação permanente em membro posterior direito. Incisão vertical em região inguinal direita com dissecação sob microscópio cirúrgico *Karl Kaps* (modelo D- 35614 ASSLAR) e aumento de 16 vezes dos vasos femurais comuns com seus ramos e nervo femural. Eletrocauterização dos vasos epigástricos superficiais inferiores e outros ramos pélvicos. Incisão circular na porção média da coxa em toda a circunferência abrangendo pele e tecido celular subcutâneo, hemostasia com eletrocautério bipolar<sup>28,29</sup>. Secção com prévia eletrocoagulação da musculatura do terço médio da coxa mantendo o nervo ciático identificado e intacto. Osteotomia do fêmur em terço médio com serra simples e manual, mantendo-se o feixe protegido por pequeno segmento de luva cirúrgica. Obteve-se assim uma amputação do membro com manutenção dos vasos femurais e nervos do membro posterior (Figura 1).

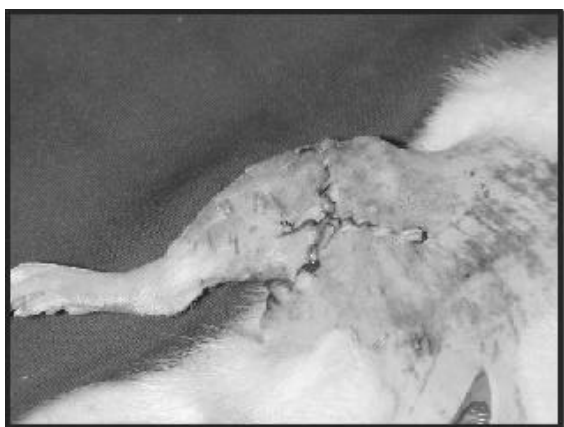


**Figura 1 - Amputação com preservação do feixe vâsculo nervoso.**

Síntese com fixação intramedular do fêmur com agulha 30 X 7 e cola instantânea para evitar sangramento excessivo. Síntese da musculatura com pontos em U horizontal de *nylon* 5-0. Aplicou-se o clipe microvascular atraumático nos vasos femurais antes da emergência dos vasos epigástricos inferiores evitando-se incluir o nervo femural (Figura 2). Observou-se a interrupção dos fluxos arterial e venoso dos vasos femurais através do teste de enchimento. Fechamento da pele com sutura contínua em chuleio simples de *nylon* 5-0 (Figura 3). A reposição volêmica foi realizada através da injeção subcutânea de 50 ml/Kg de solução fisiológica de NaCl a 0,9% após o procedimento cirúrgico.



**Figura 2 - Posicionamento do clipe vascular microcirúrgico.**



**Figura 3 - Síntese da pele e clipe vascular posicionado**

Os ratos foram submetidos a tempos de isquemia quente a partir do pinçamento dos vasos. Durante este período os animais foram mantidos em gaiolas individuais a uma temperatura ambiente de 25°C obtida através de lâmpada halogênica de 45 W e 127 V, mantida a 30 cm da gaiola.

Após o período de isquemia, os ratos foram novamente anestesiados com tiopental sódico (doses de 10 mg/Kg) para que se obtivesse a menor dose necessária para uma anestesia adequada. Incisão vertical em região inguinal esquerda com dissecação dos vasos femurais e seus ramos. Canulação da veia epigástrica superficial inferior com agulha 29 G. A sutura vertical da pele à direita é aberta e retirado o clipe vascular. Foi observado a patência dos vasos femurais através do teste de ordenhamento arterial e venoso e ausência de trombos (a presença de trombos ou ausência de fluxo nos vasos femurais exclui o rato do experimento). No momento da reperfusão é

injetado soluções (soro fisiológico, estreptoquinase, alopurinol) de 1 ml através do cateter na veia epigástrica superficial esquerda nos grupos modelos e experimentais. Procedeu-se então o fechamento da pele com sutura contínua citada acima.

Os ratos foram divididos em grupos modelos e experimentais. Os grupos modelos, com 10 a 11 ratos cada, foram submetidos a tempos de isquemia de 0, 2, 4, 6 e 8 horas (GM1, GM2, GM3, GM4, GM5 respectivamente).

1. Grupo modelo 1 (GM1): 10 ratos foram submetidos ao procedimento cirúrgico com 0 hora de isquemia.

2. Grupo modelo 2 (GM2): 10 ratos foram submetidos a isquemia de 2 horas.

3. Grupo modelo 3 (GM3): 11 ratos foram submetidos a isquemia de 4 horas.

4. Grupo modelo 4 (GM4): 10 ratos foram submetidos a isquemia de 6 horas.

5. Grupo modelo 5 (GM5): 10 ratos foram submetidos a isquemia de 8 horas.

O grupo modelo 4 foi utilizado como controle dos grupos experimentais.

Os grupos experimentais receberam estreptoquinase, alopurinol e foram submetidos a terapia com oxigênio hiperbárico (GE1, GE2 e GE3 respectivamente).

1. Grupo experimental 1 (GE1): foi injetado 1ml de solução contendo 20000 UL/Kg de estreptoquinase em bolus após reperfusão em 12 ratos<sup>11</sup>.

2. Grupo experimental 2 (GE2): foi injetado 1 ml de solução contendo 45 mg/Kg de alopurinol em bolus após reperfusão em 10 ratos<sup>14</sup>.

3. Grupo experimental 3 (GE3): 10 ratos foram levados à câmara hiperbárica modelo Seecrhist até 1 hora após reperfusão. Foram realizadas 6 sessões de 30 minutos com oxigênio a 100% a 2,5 ATM, períodos de compressão e descompressão de 5 minutos e intervalos de 12 horas entre as sessões.

### **Drogas utilizadas**

O tiopental (frasco-ampolas de 1g) foi diluído em 20 ml de soro fisiológico a 0,9%. A estreptoquinase (Streptase<sup>®</sup> 1500000 UI – Hoechst Marion Roussel) foi diluída em soro fisiológico a 0,9%. O alopurinol (Allopurinol<sup>®</sup> - Sigma-Aldrich) foi diluído em hidróxido de sódio 1 N até a solução total. A esta solução alcalina foi adicionado ácido clorídrico 1 N até início de precipitação do alopurinol sinalizando máxima solubilidade. Uma gota final de hidróxido de sódio 1 N foi adicionado para dissolver o precipitado e acrescentado água destilada para se obter o volume final necessário<sup>14</sup>.



## Exclusão de animais

Os animais foram excluídos dos grupos quando evoluíram a óbito durante o procedimento experimental ou antes de 7 dias de pós-operatório (20 ratos), trombose arterial após retirada do clipe vascular (3 ratos), trombose venosa após retirada do clipe vascular (2 ratos), clipe vascular não funcionando (1 rato) e extravasamento na injeção de drogas (1 rato).

## Pós operatório e avaliação da viabilidade do membro

Os animais foram observados por um período de 7 dias. A viabilidade dos membros foi determinada através de exame clínico e observou-se resposta do tipo tudo ou nada. O membro não viável foi definido pela necrose total do membro e o membro viável foi definido por sobrevivência total do membro ou sobrevivência total com presença de necrose parcial apenas de pele próximo à sutura (definida como secundária à lesão tecidual cirúrgica e por desenlramento). Os ratos foram sacrificados após 7 dias através de "overdose" de éter inalatório.

## Avaliação dos resultados

Os resultados foram transformados em porcentagem de viabilidade do membro por grupo e foram chamados de taxa de sobrevivência dos membros. Os grupos foram comparados entre si e analisados estatisticamente pelo teste do Qui-quadrado. O nível de significância adotado foi de 5% ( $p < 0,05$ ).

## RESULTADOS

### Grupos modelos

O grupo modelo 1 foi submetido a 0 hora de isquemia e foi observado 100% de viabilidade dos membros. O grupo modelo 2 (isquemia de 2 horas) evoluiu com uma taxa de viabilidade dos membros de 80%, o grupo modelo 3 (isquemia de 4 horas) evoluiu com 63,6% de viabilidade dos membros, o grupo modelo 4 (isquemia de 6 horas) evoluiu com 50% de viabilidade dos membros e o grupo modelo 5 (isquemia de 8 horas) evoluiu com 20% de viabilidade dos membros. Os grupos GM1 e GM2, GM2 e GM3, GM3 e GM5, GM4 e GM5 são diferentes estatisticamente com  $p < 0,05$ . Os grupos GM3 e GM4 não são diferentes estatisticamente (Tabela 1 e Gráfico 1).

Tabela 1 - Grupos modelos.

	1ºPO	3ºPO	5ºPO	7ºPO	9ºPO	11ºPO
Glicemia	70	51	50	77	70	73
Amilase	216	547	336	194	172	90
Lipase	1915	3019	1430	620	321	190
Uréia	69	71	73	75	69	52
Creatinina	6.1	6.6	3.8	2.5	1.8	1.3
Amilase urinária Unid/h	251	504	601	1326	1449	1900

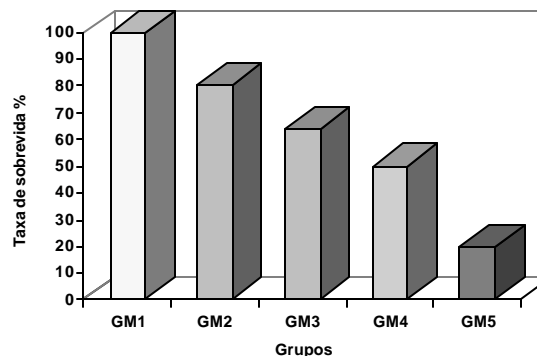


Gráfico 1 - Grupos modelos.

### Grupos experimentais

O grupo experimental 1 (estreptoquinase) evoluiu com taxa de viabilidade dos membros de 66,67% e é diferente estatisticamente dos grupos GM1, GM2, GM4, GM5 ( $p < 0,05$ ). Não se observou diferença estatística entre os grupos GE1 e GM3 (Tabela 2 e Gráfico 2).

Tabela 2 - Grupos experimentais e grupo modelo 4.

Grupos	n	Nº membros viáveis	Taxa de sobrevivência %
GM4	10	5	50
GE1	12	8	66,7
GE2	10	7	70
GE3	10	3	30

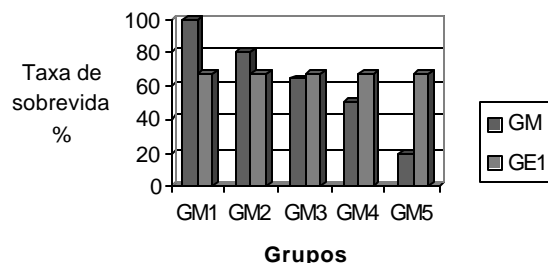
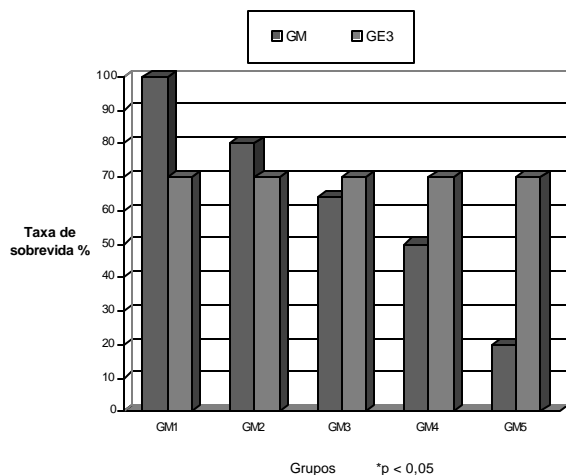


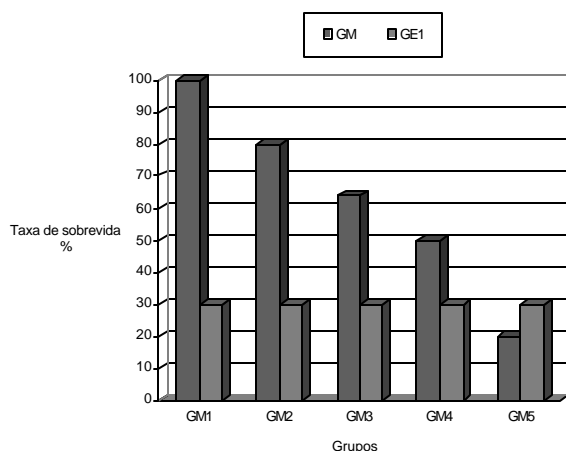
Gráfico 2 - Grupo experimental 1 x grupos modelos.

O grupo experimental 2 (alopurinol) evoluiu com taxa de viabilidade dos membros de 70% e é diferente estatisticamente dos grupos GM1, GM4, GM5 ( $p < 0,05$ ). Não se observou diferença estatística entre os grupos GE2 e GM2, GE2 e GM3 (Tabela 2 e Gráfico 3).



**Gráfico 3 - Grupo experimental 2 x grupos modelos.**

O grupo experimental 3 (câmara hiperbárica) evoluiu com taxa de viabilidade dos membros de 30% e é diferente estatisticamente dos grupos GM1, GM2, GM3, GM4 ( $p < 0,05$ ). Não é diferente estatisticamente do grupo GM5 (Tabela 2 e Gráfico 4).



**Gráfico 4 - Grupo experimental 3 x grupos modelos.**

## DISCUSSÃO

### O animal de experimentação

O animal escolhido para o estudo foi o rato (*Ratus norvegicus*) da linhagem Wistar devido a

facilidade em seu manejo. O rato é o mais conveniente animal para utilização e ensino de técnicas microcirúrgicas pois o tamanho de seus vasos é equivalente a vasos digitais humanos. Modelos microcirúrgicos em ratos têm sido descritos desde o início da década de 60. Desde então o desenvolvimento de modelos para cirurgias humanas, microcirurgia e reimplantes têm sido comuns. O rato tem sido utilizado amplamente nas últimas 3 décadas para desenvolvimento de modelos de reimplantes de membros e estudo do fenômeno de não reperfusão<sup>2,7,14,41,43,44,60</sup>.

### Modelo de reimplante após isquemia

Várias causas para o fenômeno de não reperfusão têm sido propostas. Ames et al em 1968 foi o primeiro autor a descrever o fenômeno de não reperfusão. Descreveu áreas de não reperfusão no cérebro e atribuiu estas áreas à obstrução arterial secundária a edema de células endoteliais<sup>4,60</sup>. Miller et al. observaram que “shuntings” arteriovenosos ocorriam em extremidades reimplantadas e isto poderia contribuir para áreas de pouca perfusão<sup>13</sup>. Chait et al.<sup>13</sup> e May et al.<sup>32</sup> sugeriram que a estase, perda de fluido intravascular, meio ácido e exposição do colágeno da sub-íntima poderiam levar a trombose após reimplante. Vários investigadores postulam a presença de microtrombos como fator contribuinte. O sistema fibrinolítico está alterado em vasos submetidos a isquemia prolongada e pode estar envolvido no processo da não reperfusão<sup>60</sup>. Urbaniak et al.<sup>52</sup> em 1997 agruparam os múltiplos fatores responsáveis pelo fenômeno de não reperfusão em 3 grupos: isquemia, lesão da íntima vascular e respostas sistêmicas e locais. Esta tríade da não reperfusão interage entre si levando a alterações histológicas e metabólicas na microcirculação: constrição de arteríolas, edema endotelial e leucocitário, estase regional, adesão e migração de leucócitos, hemorragia focal, agregação plaquetária, produção de radicais livres do oxigênio e acidose<sup>3,52</sup>.

Vários modelos têm sido utilizados e desenvolvidos para estudo deste fenômeno. Membros posteriores de gatos submetidos a isquemia de 6 horas por torniquete evoluíram para necrose em 33% e 100% quando submetidos a períodos maiores de isquemia<sup>17</sup>. Stock et al.<sup>45</sup> e Thomason e Matzke<sup>52</sup> observaram alterações metabólicas irreversíveis após 4 horas de isquemia em membros posteriores de ratos. Swartz et al.<sup>47</sup> obtiveram 100% de necrose em membros posteriores de ratos submetidos a isquemia de 6 horas.

Zdeblick et al.<sup>60</sup> em 1985, estudaram o reimplante de membros posteriores de ratos após tempos de isquemia variados e observou que a

viabilidade do membro após a isquemia era do tipo tudo ou nada. Após 2 e 3 horas de isquemia a viabilidade foi de 100%, após 4 horas foi de 50% e após 6 horas foi de 20%<sup>60</sup>. Edwards et al.<sup>16</sup> em 1991 também observaram o fenômeno de tudo ou nada na sobrevivência de membros posteriores de ratos após reimplante. Os membros eram submetidos a isquemia quente de 5 horas e a taxa de sobrevivência dos membros foi de 50%<sup>16</sup>. Concannon et al.<sup>14</sup> em 1991 obtiveram taxa de sobrevivência de 30% em membros posteriores de ratos submetidos a isquemia quente de 6 horas e esta resposta era do tipo tudo ou nada. Yokoyama et al. em 2000 estudaram modelos de reimplante de membro isquêmico e isquemia muscular isolada e propuseram estes modelos para estudo da formação de radicais livres após reperfusão<sup>58</sup>. Olivas et al.<sup>35</sup> em 2001 estudaram isquemia do músculo cremâster de ratos e observaram que 7 e 8 horas de isquemia é o tempo limite para reversibilidade das lesões por isquemia e reperfusão em músculos.

Diante da discordância de resultados quanto a taxa de sobrevivência de membros isquêmicos em trabalhos descritos na Literatura, o presente trabalho testou um novo modelo de reimplante de membro posterior de ratos após isquemia quente para estudar isquemia e reperfusão. O procedimento cirúrgico consistiu de amputação parcial mantendo o pedículo vascular e nervoso do membro semelhante ao modelo utilizado por Concannon et al.<sup>14</sup>. A manutenção do pedículo vascular evita anastomoses microvasculares e uma nova variável. A manutenção dos nervos evita a perda de sensibilidade e autofagia do membro.

Os grupos modelos foram submetidos a períodos de isquemia de 0 (GM1), 2 (GM2), 4 (GM3), 6 (GM4) e 8 horas (GM5) e observou-se, conforme dados da Literatura, uma resposta de tudo ou nada na sobrevivência dos membros isquêmicos. As taxas de sobrevivência dos membros foram de 100%, 80%, 63,6%, 50% e 20% respectivamente. Os grupos GM1 e GM2, GM2 e GM3, GM4 e GM5 são estatisticamente significantes e os grupos GM3 e GM4 não são diferentes. Estes resultados demonstram uma curva tempo de isquemia e sobrevivência dos membros, tornando o modelo de isquemia confiável.

Trabalhos anteriores utilizaram o tempo de isquemia de 5 e 6h para estudar a eficácia de agentes antioxidantes e terapia com oxigênio hiperbárico em reimplantes de membro<sup>14,16</sup>. No presente trabalho os GM3 e GM4 não foram diferentes e adotou-se o tempo de 6 horas de isquemia para o estudo da eficácia da estreptoquinase, alopurinol e terapia com oxigênio hiperbárico.

### **Eficácia da estreptoquinase**

Estreptoquinase é um agente fibrinolítico ativador indireto do plasminogênio. Ativa o sistema

fibrinolítico como um pró-ativador que converte o plasminogênio em plasmina, protease capaz de hidrolisar a plasmina e lisar o coágulo<sup>40</sup>.

Trombose microvascular é componente importante do fenômeno de não reperfusão. A estase sanguínea, lesão endotelial por isquemia e exposição do subendotélio ativa a cascata de coagulação e culmina na formação de fibrina e agregação plaquetária. Drogas fibrinolíticas têm sido utilizadas na microcirurgia profilaticamente para a prevenção de trombose em anastomoses. Urokinase, heparina e prostaglandina E1 fazem parte do protocolo de reimplante de Yamano<sup>57</sup> e Fukui e Tamai<sup>23</sup>. Vertos e Tsavissis usam estreptoquinase e dextran de baixo peso molecular rotineiramente após reimplantes<sup>53</sup>. Fibrinolíticos podem ser utilizados terapêuticamente para reduzir os efeitos da lesão por isquemia. Sua eficácia tem sido demonstrada no tratamento de uma variedade de patologias trombóticas como trombose arterial aguda coronariana, trombose venosa profunda e tromboembolismo pulmonar<sup>8</sup>.

Não existe um consenso na Literatura sobre a função dos agentes trombolíticos no salvamento de retalhos microcirúrgicos e reimplantes isquêmicos. Várias drogas foram testadas e os resultados são conflitantes<sup>8,40</sup>. A estreptoquinase e rt-PA foram utilizadas com sucesso em relatos clínicos de reimplantes e modelos experimentais de trombose<sup>8,40</sup>.

No presente trabalho, o grupo GE1 recebeu intravenosamente o fármaco estreptoquinase na dose de 20000 UL/Kg após isquemia quente de 6 horas. Esta dose foi escolhida baseado em doses utilizadas para fibrinólise sistêmica na prática clínica. Esta dose foi utilizada por Busnardo et al.<sup>11</sup> em 1997 para estudo da trombose em anastomoses microcirúrgicas.

A taxa de sobrevivência dos membros isquêmicos foi de 66,7% sendo diferente significativamente do grupo GM4 (isquemia 6 horas). Este resultado sugere uma melhora na sobrevivência dos membros isquêmicos após utilização da estreptoquinase. O GE1 evoluiu com uma taxa de sobrevivência significativamente maior que GM5 e significativamente menor que GM1 e GM2, porém não é diferente da taxa de sobrevivência de GM3 (isquemia de 4 horas). Este resultado sugere que os membros submetidos a 6 horas de isquemia e administração de estreptoquinase evoluíram com sobrevivência semelhante aos membros submetidos a isquemia de 4 horas.

### **Eficácia do alopurinol**

Os radicais superóxido e hidroxila, metabólitos do oxigênio extremamente reativos, são formados em situações de isquemia e reperfusão<sup>22</sup>. Podem causar lesão na membrana celular diretamente através da peroxidação lipídica ou através da degradação do colágeno intracelular. Estes radicais livres derivados

do oxigênio podem desempenhar um importante papel na etiologia microvascular do fenômeno da não reperfusão através da lesão citotóxica direta no endotélio vascular<sup>56</sup>.

O alopurinol atua como inibidor da enzima xantina oxidase, que exerce importante papel na formação de radicais livres durante a reperfusão. O alopurinol não permite a conversão das hipoxantinas derivadas do ATP em ácido úrico, reação onde o O<sub>2</sub> é transformado em O<sub>2</sub><sup>-37</sup>.

Existem várias referências na literatura sobre os efeitos benéficos do alopurinol e outros agentes antioxidantes em modelos de isquemia e reperfusão em retalhos fácio-cutâneos em ratos e porcos<sup>5,6,21,24,37,39,46,49</sup>.

Neste estudo o grupo GE2 foi submetido a isquemia dos membros por 6 horas e administração de alopurinol intravenoso na dose de 45mg/Kg. Esta dose foi utilizada por Concannon et al.<sup>14</sup> e administrada intravenosamente.

A taxa de sobrevivência dos membros no grupo GE2 foi de 70% e é significativamente maior que o GM4, sugerindo uma melhora na sobrevivência dos membros isquêmicos com utilização do alopurinol. A taxa de sobrevivência de GE2 foi significativamente maior que a do grupo GM5 e significativamente menor que a do grupo GM1, porém não foi diferente da taxa de sobrevida dos grupos GM2 e GM3. Este dado sugere que os membros isquêmicos por 6 horas e que receberam alopurinol evoluíram com taxa de sobrevida semelhante aos membros submetidos a isquemia de 2 e 4 horas.

Os dados são semelhantes aos da Literatura. Concannon et al observaram uma taxa de sobrevida de 60% em membros isquêmicos de ratos por 6 horas e administração de alopurinol<sup>14</sup>. Ferrari et al.<sup>18</sup> observaram redução na pressão compartimental de membros amputados em ratos com isquemia de tempos variados e administração de alopurinol. Alove et al.<sup>1</sup> relataram melhora na taxa de sobrevida de membros isquêmicos amputados de ratos após uso da superóxido dismutase. Weiss et al.<sup>56</sup> relataram melhora na patência vascular e sobrevida de células musculares e ósseas após um modelo de reimplante isquêmico e administração de superóxido dismutase. Waikakul et al.<sup>55</sup> utilizaram alopurinol em reimplantes digitais em humanos com evidências de melhores resultados.

### **Eficácia da terapia com oxigênio hiperbárico**

Existem várias hipóteses para o mecanismo de ação da terapia de oxigênio hiperbárico. Manson

et al.<sup>31</sup> e Zamboni et al.<sup>59</sup> relatam o efeito benéfico do oxigênio hiperbárico em retalhos isquêmicos com neoformação de capilares. A proliferação de capilares no retalho foi observado por Ramon et al.<sup>38</sup> através de microangiografia e este efeito poderia ser secundário à vasoconstricção que o oxigênio hiperbárico promove na artéria epigástrica, o que estimularia a formação de novos capilares no retalho. Outro mecanismo de ação seria o seqüestro de neutrófilos para o tecido pulmonar. Os neutrófilos são fonte conhecida de radicais livres do oxigênio e atuam como mediadores de eventos biológicos que levam à lesão tecidual durante a reperfusão<sup>9</sup>.

Alguns estudos experimentais demonstram melhora na sobrevida de retalhos cutâneos isquêmicos<sup>37</sup>. No entanto, outros trabalhos não obtiveram melhora na sobrevida de retalhos isquêmicos<sup>12</sup>. Edwards et al.<sup>16</sup> e Zimmel et al.<sup>61</sup> relataram evidências de que a preservação do membro amputado em oxigênio hiperbárico pode ser benéfico.

No presente estudo foram utilizadas 6 sessões nas primeiras 72 horas do período pós-operatório, com intervalo de 12 horas entre as sessões. Este mesmo esquema de sessões foi utilizado por Prada em 1998<sup>37</sup>.

A taxa de sobrevivência de membros isquêmicos por 6 horas que foram submetidos a terapia com oxigênio hiperbárico (GE3) foi de 30%. Esta taxa é significativamente menor que a taxa encontrada para o GM4. Este resultado sugere uma piora na taxa de sobrevida de membros isquêmicos após oxigênio hiperbárico. A taxa de sobrevida do grupo GE3 também foi significativamente menor que as taxas dos grupos GM1, GM2 e GM3, porém não foi diferente da taxa do GM5. Este resultado evidencia que os membros submetidos a isquemia de 6 horas e oxigênio hiperbárico evoluíram com taxa de sobrevida semelhante aos membros submetidos a 8 horas de isquemia.

Não foram encontrados trabalhos na Literatura que utilizaram membros reimplantados e terapia com oxigênio hiperbárico. Este resultado talvez se deva à grande quantidade de músculo isquêmico presente no atual modelo. Isto poderia levar, na presença do oxigênio hiperbárico e conseqüentemente vasoconstricção da artéria femoral e uma maior disponibilidade do O<sub>2</sub>, a uma piora na isquemia muscular e maior liberação de radicais livres do oxigênio. Este fato provavelmente não existiu em trabalhos que utilizaram retalhos cutâneos e que por não possuírem músculo suportaram mais o período isquêmico e os efeitos da reperfusão não foram tão intensos.



## CONCLUSÕES

1. O novo modelo de reimplante de membro em ratos após isquemia quente é confiável e se presta a estudos de isquemia e reperfusão com resposta do tipo tudo ou nada.

2. O fármaco estreptoquinase levou a uma melhora na taxa de sobrevida de membros isquêmicos reimplantados após 6 horas de 50% para 63,6% e mostrou uma evolução semelhante ao grupo de isquemia de 4 horas.

3. O fármaco alopurinol levou a uma melhora

na taxa de sobrevida de membros isquêmicos reimplantados após 6 horas de 50% para 70% e mostrou uma evolução semelhante aos grupos de isquemia de 4 e 2 horas.

4. A terapia com oxigênio hiperbárico levou a uma piora na taxa de sobrevida de membros isquêmicos reimplantados após 6 horas de 50% para 30% e mostrou uma evolução semelhante ao grupo de isquemia de 8 horas.

Silva JCF, Simão DT, Lima LG, Cunha MS, Wada A, Nakamoto H, Ferreira MC. Replantation model after warm ischemia in rats and the effectiveness of allopurinol, streptoquinase and hyperbaric oxygen therapy. *Rev Med (São Paulo)* 2001 abr./dez.;80(2/4):78-88.

**ABSTRACT:** Prolonged ischemia leads to alterations in the tucidual microcirculation and oxygen free radicals production. It was tested a new replantation model after warm ischemia in rats and the effectiveness of allopurinol, streptoquinase and hyperbaric oxygen therapy. Amputation with preservation of vessels and nerves of the right hind limb was proceeded in 110 rats. The groups MG1, MG2, MG3, MG4 and MG5 were submitted to 0, 2, 4, 6 and 8 hours of ischemia. The limbs were observed for 7 days and the survival limb rates in each group were 100%, 80%, 63,6%, 50% and 20% respectively. MG4 was elected control for experimental groups. The groups EG1, EG2 and EG3 were submitted to 6 hours of ischemia and were treated with streptoquinase, allopurinol and hyperbaric oxygen therapy. The survival limb rates were 66,7%, 70% and 30% respectively. The results suggest that the administration of streptoquinase and allopurinol may be helpful to improve limb salvage after ischemia while hyperbaric oxygen therapy may not.

**KEYWORDS:** Rats, Wistar; Replantation/methods; Extremities/surgery; Leg/transplantation; Ischemia/surgery; Allopurinol/therapeutic use; Hyperbaric Oxigenation/methods; Streptokinase/therapeutic use.

## REFERÊNCIAS

1. Ablove RH, Moy OJ, Peimer CA, Severin CM, Sherwin FM. Effect of high energy phosphates and free radical scavengers on replant survival in a ischemic extremity model. *Microsurgery* 1996;17:481-6.
2. Ad-el DD, Harper A, Hoffman LA. Digital replantation teaching model in rats. *Microsurgery* 2000;20:42-4.
3. Al-Qattan MM. Ischemia-reperfusion injury. Implications for the hand surgeon. *J Hand Surg* 1998;23B(5):570-3.
4. Ames A, Wright RL, Kowada M, Thurston JM, Majno G. Cerebral ischemia – the no-reflow phenomenon. *Am J Pathol* 1968;52:437-53.
5. Angel MF, Narayanan K, Swartz WM. The etiologic role of free radicals in hematoma-induced flap necrosis. *Plast Reconstr Surg* 1986;77(5):795-801.
6. Angel MF, Ramasastry SS, Swartz WM, Narayanan K, Basford RE, Futrell JW. Augmentation of skin flap survival with allopurinol. *Ann Plast Surg* 1987;18(6):494-8.
7. Ashur H, Owen ED. Reimplantation of completely amputated rat limb. *Int Surg* 1979;64(3):45-50.
8. Atiyeh BS, Hashim HA, Hamdan AM. Local Recombinant tissue plasminogen activator (rt-PA) thrombolytic therapy in microvascular surgery. *Microsurgery* 1999;19:265-271.
9. Barry BE, Crapo JD. Patterns of accumulation of platelets and neutrophils in rat lungs during exposure to 100% oxygen and 85% oxygen. *Am Rev Respir Dis* 1985;132:548-55.
10. Biemer E. Vein grafts in microvascular surgery. *Br J Plast Surg* 1977; 30:197-199.
11. Busnardo FF, Munhoz AM, Cunha M. Eficácia da estreptoquinase sistêmica na taxa de patência vascular em um modelo de trombose arterial em ratos. In: XXXIV Congresso Brasileiro de Cirurgia Plástica; 1997; Brazil; 1997. Resumos.
12. Caffee HH, Gallagher TJ. Experiments on the effects of hyperbaric oxygen on flap survival in the pig. *Plast Reconstr Surg* 1988;81(5):751-8.
13. Chait LA, May JW, O'Brien BM, Hurley JV. The effects of perfusion of various solutions of the no-reflow phenomenon in experimental free flaps. *Plast Reconstr Surg* 1978;61:421-30.

14. Concannon MJ, Dooley TW, Puckett CL. Improved survival in a replantation model containing ischemic muscle. *Microsurgery* 1991;12:18-22.
15. Daigle JP, Kleinert JM. Major limb replantation in children. *Microsurgery* 1991;12:221-31.
16. Edwards RJ, Im MJ, Hoopes JE. Effects of hyperbaric oxygen preservation on rat limb replantation: a preliminary report. *Ann Plast Surg* 1991;27:31-5.
17. Eriksson E, Anderson WA, Replogle RL. Effects of prolonged ischemia na muscle microcirculation in the cat. *Surg Forum* 1974;25:254-5.
18. Ferrari RP, Battiston B, Brunelli G, Casella A, Caimi L. The role of allopurinol in preventing oxygen free radical injury to skeletal muscle and endothelial cells after ischemia-reperfusion. *J Reconstr Microsurg* 1996;12(7):447-50.
19. Ferreira LM, Andrews JM, Laredo Filho J. Transplante homólogo de membro (tecido composto): perspectiva para o futuro. *Rev Assoc Med Bras* 1995;41(2):151-7.
20. Ferreira MC, Leão PP. Reimplante experimental de membro com microcirurgia vascular. *Rev Assoc Med Bras* 1977;23(1):3-6.
21. Fontana C. Efeito da N2- mercaptopropioniglicina na sobrevivência de retalhos cutâneos submetidos à oclusão temporária do pedículo vascular – estudo experimental em ratos. [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 1992.
22. Fridovich FI. Superoxide radical: na endogenous toxicant. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1983;23:239.
23. Fukui A, Tamai S. Present status of replantation in Japan. *Microsurgery* 1994;15:842-7.
24. Im MJ, Shen WH, Pak CJ. Effect of allopurinol on the survival of hyperemic island skin flaps. *Plast Reconstr Surg* 1984;73:276 .
25. Khouri RK, Cooley BC, Kenna DM, Edstrom L. Thrombosis of microvascular anastomosis in traumatized vessels: fibrin versus platelets. *Plast Reconstr Surg* 1990;86:110-7.
26. Khouri RK, Shaw WW. Reconstruction of lower extremity with microvascular free flaps: a 10-year experience with 304 consecutive cases. *J Trauma* 1989;29:1086-94.
27. Lantieri LA, Ozbek MR, Deune EG. Prevention of microvascular thrombosis by topical application of recombinant tissue factor pathway inhibitor. *Plast Reconstr Surg* 1996;97:587-94.
28. Lipson RA, Kawano H, Halloran PF. Vascularized limb transplantation in the rat. *Transplantation* 1983;35(4):293-9.
29. Lipson RA, Kawano H, Halloran PF. Vascularized limb transplantation in the rat. Results with allogeneic grafts. *Transplantation* 1983;35(4):300-4.
30. Manson PM, Anthenelli RM, Im MJ. The role of oxygen free radicals in ischemic tissue injury in island skin flaps. *Ann Surg* 1983;198:87.
31. Manson PN, Im MJ, Myers RM, et al. Improved capillaries by hyperbaric oxygen in skin flaps. *Surg Forum* 1908; 31:564.
32. May JW, Chait LA, O'Brien B. The no reflow phenomenon in experimental free flaps. *Plast Reconstr Surg* 1978;61(2):256-67.
33. May JW, Hergueter CA, Hansen RH. Seven-digit replantation: digit survival after 39 hours of cold ischemia. *Plast Reconstr Surg* 1986;78(4):522-5.
34. Morgan RF, Reisman NR, Curtis, RM. Preservation of upper extremity devascularizations and amputations and amputations for replantation. *Am Surg* 1982;48(9):481-3.
35. Olivas TP, Saylor TF, Wong HP, Stephenson LL, Zamboni WA. Timing of microcirculatory injury from ischemia reperfusion. *Plast Reconstr Surg* 2001;107:785-8.
36. Ozbek MR, Deune EC, Cooley BC, Khouri RK. Experimental reproduction of free flap errors: a new model of thrombosis. *Ann Plast Surg* 1994;32:474-7.
37. Prada FS. Efeito do alopurinol, da superóxido dismutase e da terapia com oxigênio hiperbárico em retalhos fásiocutâneos pediculados submetidos à oclusão temporária do pedículo vascular. Estudo experimental em ratos sobre isquemia e reperfusão [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 1998.
38. Ramon Y, Abramovich A, Shupak A, Ullman Y, Moscona RA, Shoshani O, et al. Effect of hyperbaric oxygen on a rat transverse rectus abdominis myocutaneous flap model. *Plast Reconstr Surg* 1998;102(2):416-22.
39. Rees R, Smith D, Li TD, Casner B, Garner W, Punch J, et al. The role of xantine oxidase and xanthine dehydrogenase in skin ischemia. *J Surg Res* 1994;56(2):162-7.
40. Rohrich RJ, Handren RN, Kersh R, Hergueter CA, May JW Jr. Prevention of microvascular thrombosis with short-term infusion of human tissue-type plasminogen activator. *Plast Reconstr Surg* 1996;98:118.
41. Rosenbaum TJ, Sundt TM. Neurovascular microsurgery: a model for laboratory investigation and the development of technical skills. *Mayo Clin Proc* 1976;51:301-6.
42. Sapega AA, Heppenstall RB, Sokolow DP. The bioenergetics of preservation of limbs before replantation. *J Bone Joint Surg* 1988;70(10):1500-13.
43. Seaver AV. Laboratory design in preparing for elective microvascular surgery. *Hand Clin* 1985;1:233-45.
44. Shapiro RI, Cerra FB. A model for reimplantation and transplantation of a complex organ: the rat hind limb. *J Surg Res* 1978;24:501-6.

45. Stock W, Bohn HJ, Isselhard W. Metabolic changes in rat skeletal muscle after acute arterial occlusion. *Vasc Surg* 1971;5:249-55.
46. Suzuki S, Matsushita Y, Isshiki N, Hamanaka H, Miyachi Y. Salvage of distal flap necrosis by topical superoxide dismutase. *Ann Plast Surg* 1991;27(3):253-7.
47. Swartz WM, Cha C-JM, Ambler M, Clowes GHA Jr. Prolonged ischemia in the replanted rat leg: a biochemical and morphologic study with microvascular techniques. *Surg Forum* 1976;27:565-8.
48. Tanner NSB, McGrouther DA, Webster MHC. Survival after replantation. *Br Med J* 1982;285(20):1481-3.
49. Tamir G, Yafee B, Pri-chen S, Hauben DJ, Tsur H. The effect of allopurinol on experimental island skin flap survival under prolonged periods of arterial ischaemia. *Br J Plast Surg* 1994;47:155-7.
50. Thomason PR, Matzke HA. Effects of ischemia on the hind limb of the rat. *Am J Phys Med* 1975; 54:113-31.
51. Tsai T, Jupiter JB, Serratoni F. The effect of hypothermia and tissue perfusion on extended myocutaneous flap viability. *Plast Reconstr Surg* 1982;70(4):444-52.
52. Urbaniak JR, Seaber AV, Chen L. Assessment of ischemia and reperfusion injury. *Clin Orthop* 1997; 334:30-6.
53. Vretos KA, Tsavissis AG. Antithrombotic and antiinflammatory drugs for protection of microvascular anastomosis. *Acta Orthop Scand* 1995;66(Suppl 264):48-9.
54. Waikukul S, Vanadurongwan V, Unnanantana A. Prognostic factors for major limb re-implantation at both immediate and long-term follow-up. *J Bone Joint Surg Br* 1998;80(6):1024-30.
55. Waikukul S, Unnanantana A, Vanadurongwan V. The role of allopurinol in digital replantation. *J Hand Surg* 1999;24B(3):325-7.
56. Weiss APC, Carey LA, Randolph MA. Oxygen Radical Scavengers improve vascular patency and bone-muscle cell survival in an ischemic extremity replant model. *Plast Reconstr Surg* 1989;84:117-23.
57. Yamano Y. Replantation of fingertips. *J Hand Surg* 1993;18:157-62.
58. Zhang F, Cheng C, Gerlach T. Effect of hyperbaric oxygen on survival of the composite ear graft in rats. *Ann Plast Surg* 1998;41(5):530-4.
59. Zamboni WA, Roth AC, Russel RC, Nemiroff PM, Casas L, Smoot EC. The effect of acute hyperbaric oxygen therapy on axial pattern skin flap survival when administered during and after total ischemia. *J Reconstr Microsurg* 1988;5(4):343-7, discussion 349-50.
60. Zdeblick TA, Shaffer JW, Field GA. An ischemia-induced model of revascularization failure of replanted limbs. *J Hand Surg* 1985;10A:125-31.
61. Zempel NJ, Amis LR, Sheppard FR. A temporal analysis of the effects of pressurized oxygen on the pH of amputated muscle tissue. *Ann Plast Surg* 1998;40:624-9.