

IEDA FRANCISCETTI

**Estudo da ação do ácido
trissódio-cálcio-dietileno-triaminopentaacético (CaNa₃DTPA) nas lesões de
isquemia-reperfusão
em membro posterior de rato**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Cirurgia - Área de Concentração em Bases Gerais da Cirurgia e Cirurgia Experimental para obtenção do Título de Mestre.

**Faculdade de Medicina de Botucatu
Universidade Estadual Paulista
2001**

IEDA FRANCISCETTI

**Estudo da ação do ácido
trissódio-cálcio-dietileno-triaminopentaacético (CaNa₃DTPA) nas lesões de
isquemia-reperfusão
em membro posterior de rato**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Cirurgia - Área de Concentração em Bases Gerais da Cirurgia e Cirurgia Experimental para obtenção do Título de Mestre.

Orientador: **Prof. Dr. Francisco Humberto de Abreu Maffei**

Ao Prof. Dr. Francisco Humberto de Abreu Maffei

que me proporcionou a honra de tê-lo como orientador, creditando-me confiança e dando-me todo o suporte necessário, o meu profundo agradecimento, admiração e respeito.

Aos meus pais, Julieta e Valdir,
por tantos caminhos abertos...

Ao meu esposo, José Bitu Moreno e
aos nossos filhos, Anna Carolina e André,
dedico este trabalho.

...und jedem Anfang wohnt ein Zauber inne...

(Hermann Hesse)

AGRADECIMENTOS

À todos que contribuíram para a realização deste trabalho, o registro do meu imenso reconhecimento.

Agradeço:

À *Faculdade de Medicina de Marília (FAMEMA)* pela definitiva participação em minha formação profissional e iniciação científica;

À *Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP*, por ter me acolhido entre seus pós-graduandos e em especial aos *docentes do Curso de Pós-Graduação - Bases Gerais da Cirurgia e Cirurgia Experimental*, que me permitiram crescimento nesta área;

Ao *Prof. Dr. Nathanael Ribeiro de Melo*, por seus ensinamentos, entusiasmo, amizade e estímulos constantes;

À *minha avó Anna Figlianni* pelo seu exemplo de amor e humildade, fortalecendo minha formação moral;

Ao *Prof. Dr. José Bitu Moreno* por sua valiosa colaboração técnica, sugestões, ponderações e no âmbito familiar, por me oferecer imensurável retaguarda e apoio na busca do aprimoramento;

Ao *Prof. Dr. Winston Bonetti Yoshida* por sua solicitude, interesse e ainda por sua inestimável ajuda nas dosagens do dialdeído malônico;

Ao *Prof. Dr. Julio Lopes Sequeira* por seu prestativo e excelente trabalho no preparo e leitura do material histológico, corado pelo PAS;

À *Universidade de Marília- UNIMAR*, na pessoa do *Prof. Dr. Bruno Soersen Cardoso*, diretor do Instituto de Pesquisas e Tecnologia, que de forma pronta e ímpar, entendendo o mérito deste estudo, nos forneceu animais, laboratório e parte do material necessário;

Ao *Dr. Martin Scholz* pelo fornecimento do CaNa_3DTPA , fundamental neste estudo, por suas orientações;

Ao *Dr. Everton Sandoval Giglio* e ao *Instituto de Patologia Clínica e Hematologia de Marília*, por sua prestativa colaboração nas dosagens enzimáticas;

À *Dra. Paula Garcia de Carvalho Garcia* pelo gentil empréstimo do material cirúrgico utilizado;

Aos acadêmicos de medicina da FAMEMA: *Mário Furmann Neto, Maria Paula Vilela Coelho, Fábio Hsu Tsu Kai, Vítor de Pádua Barion*, , que de forma solícita e responsável tanto me auxiliaram durante os experimentos;

Ao *Laboratório de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina de Botucatu- UNESP*, pela realização das dosagens de produtos da peroxidação lipídica;

À técnica *Maria Clara Ferreira Chaguri* e a auxiliar acadêmica *Maria Helena Spadot de Lima* que com grande competência e dedicação realizaram a dosagem do dialdeído malônico, valioso para o êxito deste estudo;

Ao auxiliar de documentação da FAMEMA, *Carlos Fernandes dos Santos*, pela atenciosa realização do registro fotográfico;

À histotécnica *Maria Iracilda de Oliveira*, que com sua dedicação, superou a escassez de tempo e foi responsável pelo imediato preparo do material histológico;

Ao Prof. Dr. *Sebastião M. R. de Carvalho* que competente e prestativamente, cuidou do tratamento estatístico dos nossos resultados;

À *Vera Lúcia Aparecida Mengue, Regina Célia Spadin Nathanael Pinheiro Salles, Lílian Cristina Nadal B. Nunes e Denise Ruiz Pedro Leme*, da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, incansáveis e competentes na função organizativa e orientação aos pós-graduandos;

À *Silvia Regina Zamunaro*, pelo grande cuidado que dispensou à forma final deste trabalho;

À *Dina de Fátima Ferro, Lucilene Pereira, Alice Gonçalves da Silva e Maricelda Gonçalves da Silva*, pela substituição na minha ausência;

À *Luzia Maria Pilon*, assim como à *Daniela Pilon*, pela atenção e disposição em ajudar;

À *Diolanda de Genova Pacheco* por sua valiosa presença, permitindo meu melhor desempenho na fase final de experimentação;

E, finalmente, aos meus irmãos *Valdir Francischetti Júnior e Iara Francischetti*, pelo constante apoio.

INTRODUÇÃO	1
RADICAIS LIVRES DO OXIGÊNIO	5
OBJETIVO	17
MATERIAL E MÉTODOS	18
1. ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO	18
2. GRUPOS EXPERIMENTAIS	18
3. FASES DA EXPERIMENTAÇÃO	20
3.1. PRIMEIRA FASE – ISQUEMIA	21
3.2. SEGUNDA FASE – REPERFUSÃO	22
4. ATRIBUTOS ESTUDADOS	22
5. MOMENTOS ESTUDADOS	23
6. TÉCNICAS UTILIZADAS	23
6.1. EXAME CLÍNICO	23
6.2. ANESTESIA	24
6.3. TÉCNICA CIRÚRGICA	24

6.3.1. SECÇÃO DA MUSCULATURA E OCLUSÃO ARTERIAL	24
6.3.2. RETIRADA DO CLAMPE ARTERIAL	28
6.3.3. BIÓPSIA MUSCULAR PARA MICROSCOPIA DE LUZ E DOSAGEM DO MDA	29
6.4. OBSERVAÇÃO CLÍNICA DA COLORAÇÃO DO PÉ	30
6.5. MEDIDA DA CIRCUNFERÊNCIA DO PÉ	30
6.6. DOSAGEM DA CPK	30
6.7. MICROSCOPIA DE LUZ	31
6.8. DOSAGEM DO MDA	31
6.8.1. QUANTIFICAÇÃO DO MDA NO MÚSCULO ESQUELÉTICO	31
6.8.2. DOSAGEM DA PROTEÍNA MUSCULAR	32
6.8.3. CÁLCULO DOS NÍVEIS DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA	33
7. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS	34
8. MÉTODOS ESTATÍSTICOS	35
RESULTADOS	37
1. PESO DO RATO	37
2. CIRCUNFERÊNCIA DO PÉ DO RATO	39

3. DOSAGEM DE CREATINOFOSFOQUINASE (CPK)	41
.....	
4. DOSAGEM DO DIALDEÍDO MALÔNICO (MDA)	43
DISCUSSÃO	48
1. MÉTODO	48
2. RESULTADOS	54
CONCLUSÃO	60
RESUMO	61
SUMMARY	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
APÊNDICE	89

A lesão celular é uma das respostas celulares mais comuns da doença, sendo a hipóxia, provavelmente a sua maior desencadeante. A hipóxia, perda de suprimento sanguíneo ou depleção da capacidade carreadora de oxigênio do sangue, pode também ser um mecanismo final de lesão e iniciado por uma variedade de agentes físicos, biológicos e químicos. A causa mais comum de hipóxia é a isquemia, impedimento do fluxo sanguíneo que pode ser parcial ou total, transitório ou definitivo e habitualmente causado por doença arterial primária, tromboembolia, coagulação intravascular, procedimentos cirúrgicos e outros. Destes, têm sido bastante estudada a isquemia miocárdica e a cerebral por serem as patologias mais freqüentes e fatais em muitas nações industrializadas (ROBBINS *et al.*, 1986).

O músculo esquelético, apesar de ser considerado como tendo uma grande tolerância à isquemia, pode desenvolver edema, aumento de permeabilidade celular, perda de função contrátil, acúmulo de cálcio, desarranjo de estrutura subcelular, liberação de enzimas, perda de fosfatos de alta energia, e outras alterações metabólicas, culminando inclusive com a morte celular, após períodos variados de isquemia e reperfusão (EKLÖF *et al.*, 1981; LONG *et al.*, 1988; YOKOTA *et al.*, 1989; BEYERSDORF, 1991).

A isquemia total das extremidades inferiores, seguida de revascularização, evolui em grande parte para complicações que podem colocar em risco a vida do paciente. Isto é, quando as inter-relações entre os danos musculares e o restante do organismo não forem interrompidas por uma amputação bem indicada.

A obstrução arterial aguda (OAA) é a emergência mais comum em cirurgia vascular, sendo em cerca de 70% dos casos devido a embolias e em 20% a trombozes. As causas traumáticas aproximam-se de 10% e o aneurisma dissecante e a *phlegmasia coerulea dolens* são raros (HIRNER *et al.*, 1987).

Data de 1911 a publicação do primeiro tratamento cirúrgico bem sucedido para OAA periférica, uma embolectomia direta realizada por Labey (BEYERSDORF *et al.*, 1989). Porém ainda em 1960 havia autores partidários do tratamento conservador devido ao mau prognóstico da cirurgia (METCALFE, 1960). Ainda nessa época, em 1963, Fogarty instituiu uma nova técnica cirúrgica, a embolectomia indireta com catéter, que por sua simplicidade e efetividade se tornou a terapêutica de escolha para as obstruções arteriais. Paralelamente, também desenvolveu-se a trombólise como tratamento alternativo (HIEMEYER *et al.*, 1965).

Em função da maior efetividade e simplicidade da embolectomia indireta, a indicação cirúrgica para as OAA aumentou significativamente e, com isto, as complicações decorrentes da revascularização tornaram-se mais evidentes. Haimovici, em 1960, definiu estas alterações, que guardavam relação com a reperfusão de extremidades isquêmicas, como uma síndrome caracterizada por altas taxas de morbidade e mortalidade (HAIMOVICI, 1973). Outros estudos, ainda nas décadas de 60 e 70, confirmaram esses achados pós embolectomias, com relatos de média de mortalidade de 21% (10% - 43%) e amputações entre 5 - 47% (BARKER *et al.*, 1966; KRAUSE *et al.*, 1966; BILLIG *et al.*, 1967; INBERG *et al.*, 1970; LEVY & BUTCHER, 1970; THOMPSON *et al.*, 1970; FOGARTY *et al.*, 1971; MAC GOWAN & MOONEERAM, 1973; GREEN *et al.*, 1975; SATIANI *et al.*, 1978; ERIKSSON & HOLMBERG 1977; SILVERS *et al.*, 1980).

Embora os fatores de pior prognóstico como faixa etária, patologias cardíacas de base, aterosclerose, embolias anteriores, lesões cerebrais (BALAS *et al.*, 1985) e a complexidade dos casos de OAA em jovens abaixo de 40 anos, pela ausência de colaterais e falsos diagnósticos (HALLETT *et al.*, 1985), fossem considerados; buscava-se ainda um fator

responsável pela alta morbi-mortalidade que em muitos casos manifestava-se primeiro com a revascularização de uma extremidade isquêmica ainda viável.

O consenso com relação à síndrome e sua severidade se manteve e esta foi descrita por vários autores. Foi denominada de síndrome do torniquete (EIGLER *et al.*, 1970); síndrome mionefropática (HAIMOVICI, 1973); síndrome de Legrain-Cormier (LARCAN, 1973); enquanto o próprio Cormier, havia se referido à síndrome das isquemias dos membros (CORMIER & DEVIN, 1969).

A frequência das complicações pós-isquêmicas como síndrome compartimental e edema de extremidades, fenômeno do “*no-reflow*”, acidose metabólica, hiperpotassemia, arritmias cardíacas e insuficiência renal aguda, o aumento das doenças vasculares periféricas associadas a *Diabetes Mellitus* e aterosclerose numa população mais longeva, ao lado do desenvolvimento de técnicas microcirúrgicas de reimplantação, transplante e reconstrução de órgãos, tornaram cada vez maior a importância da compreensão dos mecanismos relacionados à síndrome de isquemia-reperfusão (KORTHUIS *et al.*, 1985).

Progressivamente acumularam-se estudos demonstrando ser a reperfusão, a responsável por grande parte dos danos celulares nessa síndrome, naturalmente quando a isquemia por si não tenha sido definitiva (HAIMOVICI, 1960, 1973; GRANGER *et al.*, 1981; PRESTA & RAGNOTTI, 1981; FRANCISCO JR., 1983; McCORD, 1985; ROBERTS *et al.*, 1985; LANGER, 1986; PERRY & FANTINI, 1987; WALKER *et al.*, 1987; KORTHUIS *et al.*, 1989).

Na microcirculação de músculos pós-isquêmicos as seguintes alterações foram relatadas: 1) aumento da permeabilidade microvascular, edema intersticial e de células endoteliais; 2) quimiotaxia, adesão e infiltração de leucócitos; 3) reperfusão capilar deficiente e heterogênea, fenômeno do não refluxo (MENGER & MESSMER, 1993). Já foram referidos como fazendo parte da iniciação e propagação desse processo citotóxico: alterações no pO₂ celular e de íons H⁺, nos metabolismos de cálcio, lipídios e aminoácidos, a presença de oxigênio molecular (O₂) e suas espécies ativas, de histamina, endotelinas, citocinas,

distúrbios na produção de fator de relaxamento derivado do endotélio (*endothelium derived relaxing factor* - EDRF), e de fator ativador plaquetário (BEYERSDORF *et al.*, 1989; INAUEN *et al.*, 1989).

Em consequência dessa vasta investigação, várias substâncias têm sido utilizadas na tentativa de minorar essas lesões, entre as quais, as citadas por YOSHIDA, em revisão de 1996, os chamados antioxidantes endógenos enzimáticos hidrossolúveis como a superóxido dismutase, a catalase e glutationala peroxidase que neutralizam respectivamente o radical superóxido, o peróxido de hidrogênio e os peróxidos de ácidos graxos. Os lipossolúveis como tocoferóis, carotenóides e quinonas que interrompem a peroxidação lipídica. O alopurinol (inibidor da xantina oxidase), o manitol e o dimetilsulfóxido (neutralizadores de radical hidroxila), fazem parte dos antioxidantes exógenos assim como os bloqueadores de canais de cálcio e o propranolol.

BUSHELL *et al.*, em 1996, observou efeitos benéficos com o uso de corticosteróides. Contudo, até o momento não há uma droga de escolha, o que tem levado à utilização de associações de antioxidantes (RABL *et al.*, 1995) e uma tendência à abordagem multifatorial como a utilização da reperfusão controlada (BEYERSDORF *et al.*, 1989).

RADICAIS LIVRES DO OXIGÊNIO

A utilização de O_2 nas oxidações biológicas, indispensáveis para as funções normais das células, implica paradoxalmente em perigo potencial de toxicidade para o organismo, pela produção de radicais livres de oxigênio (RLO) (McCORD & FRIDOVICH, 1969; FRIDOVICH, 1978; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989a,b).

As espécies ativas de O_2 capazes de causar danos oxidativos incluem ânions superóxido radical alcoxi ($RO\cdot$), radical peroxi ($ROO\cdot$), hidroperóxidos orgânicos (ROOH) e oxigênio singlet (1O_2). Desses, H_2O_2 e 1O_2 não são radicais livres, por não apresentarem elétrons desemparelhados em sua órbita externa, mas são importantes do ponto de vista lesão celular. No processo de isquemia e reperfusão, RLO seriam produzidos em grande quantidade, através de diferentes fontes que incluem a cadeia de elétrons no transporte mitocondrial, a enzima xantina oxidase (XO) ativada, assim como os leucócitos polimorfonucleares (granulócitos) (GRANGER *et al.*, 1981; WEISS *et al.*, 1981; McCORD, 1985; ENGLER *et al.*, 1986; GRISHAM *et al.*, 1986; BELKIN *et al.*, 1989; SMITH *et al.*, 1989a; KAWASAKI *et al.*, 1993).

A cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria se constitui *in vivo* em importante fonte de RLO nas células aeróbicas. Durante a isquemia pode haver alteração da função mitocondrial, com acúmulo de equivalentes na forma de nicotinamida-adenina, dinucleotídeos e citocromos reduzidos, que durante a reperfusão, com o aumento súbito da oferta de O_2 , podem não sofrer redução tetravalente a água, levando à formação de radical superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (WALKER *et al.*, 1987; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989c).

Outra geradora biológica de RLO é a reação envolvendo a enzima XO (GRISHAM *et al.*, 1986). Em condições de isquemia, a xantina desidrogenase é convertida à forma oxidase, sendo o grau dessa conversão proporcional ao tempo de isquemia e ocorrendo de forma irreversível. A XO catalisa a conversão de hipoxantina à xantina somente na

presença de O_2 . Portanto, quando ocorre a reperfusão, a hipoxantina acumulada é oxidada a xantina com redução paralela do O_2 , acceptor de elétron nessa reação, formando o radical $O_2^{\cdot -}$ (BATELLI, 1980; ROY & McCORD, 1983; PARKS & GRANGER, 1986). A XO já foi relatada como envolvida na patogênese das lesões de isquemia-reperfusão em diferentes tecidos (GRANGER *et al.*, 1981; HANSSON *et al.*, 1983; KORTHUIS *et al.*, 1985; HEARSE *et al.*, 1986; FRIEDL *et al.*, 1990), apesar de alguns trabalhos questionarem o seu real papel na produção dessas lesões, dada a sua baixa concentração em alguns tecidos, como músculos (PARKS & GRANGER 1986; McKELVEY *et al.*, 1988; DORION *et al.*, 1993; BUSHELL *et al.*, 1996). (Fig. 1).

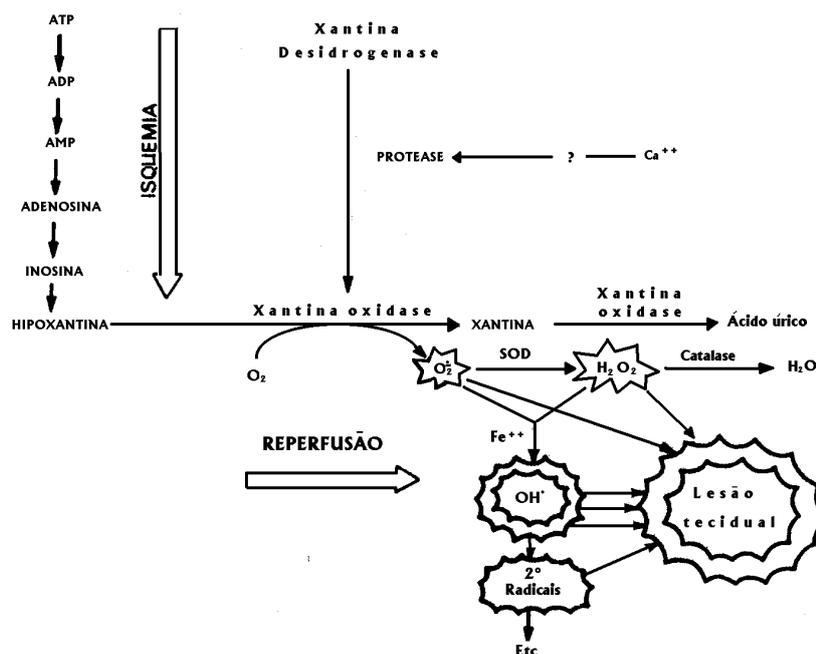


Figura 1: Mecanismo de geração de radicais livres em tecidos isquêmicos e reperfundidos. Extraído da revisão de KIRSCHNER & FANTINI (1994).

Os granulócitos são também produtores de RLO e de outras substâncias tóxicas nos tecidos pós-isquêmicos. Fisiologicamente esses oxidantes reativos gerados durante a quimiotaxia e a fagocitose, são primariamente antimicrobianos, essenciais para a

destruição intracelular de microorganismos. Contudo a atividade desses oxidantes não é restrita ao meio intracelular e sua fuga para o extracelular ocorre durante a ativação fagocitária. Os granulócitos ativados secretam enzimas proteolíticas (peroxidases, elastases, proteases, etc.), sintetizam prostaglandinas, liberam radicais livres e ainda em aglomerados ocluem a microcirculação (BABIOR, 1978; BJÖRK & ARFORS, 1984).

A ação de radicais livres ou os efeitos da própria isquemia, podem ativar a fosfolipase A das membranas celulares, com conseqüente formação de leucotrienos, dentre eles, o leucotrieno B₄. Este se liga a receptores específicos na superfície dos granulócitos, gerando uma série de respostas com formação ainda maior de radicais livres e de proteases.

Em tecidos reperfundidos, este leucotrieno e o complemento ativado C_{5a}, ativam os granulócitos, com exposição de moléculas de adesão na superfície celular, em particular as β_2 integrinas CD11 e CD18, que podem se ligar a ICAM-1 e E-selectina, no endotélio ativado, promovendo transmigração de granulócitos para este tecido (WEISS, 1989). Modelos de isquemia-reperfusão esplâncnica (KARASAWA *et al.*, 1991) e de extremidades (CRINNION *et al.*, 1996) em ratos, onde se usaram antagonistas específicos de leucotrieno B₄, demonstraram redução de acúmulo granulocítico e aumento na sobrevivência dos animais.

A interação de radicais livres com o endotélio vascular também pode levar à formação de outros mediadores do processo inflamatório, como PAF (fator ativador plaquetário), além de produtos de ativação do complemento. Em modelo experimental de isquemia-reperfusão de intestino, antagonistas específicos de receptores para o PAF, demonstraram efeito positivo na diminuição da adesão ao endotélio e na transmigração extravascular de granulócitos (KUBES *et al.*, 1991). Esses antagonistas protegeram também músculos esqueléticos de coelhos das lesões de reperfusão (LEPORE *et al.*, 1995) e miocárdio de ratos (STAHL *et al.*, 1988) e de coelhos (MONTRUCCHIO *et al.*, 1990), submetidos a infarto agudo.

Produtos de ativação do complemento, acompanhados por grande acúmulo de granulócitos, foram observados por ocasião da reperfusão em músculos esqueléticos isquêmicos (RUBIN *et al.*, 1990). Animais homocigotos com deficiência de C₃ e C₄, apresentaram, em experimentos de isquemia-reperfusão, menor grau de permeabilidade microvascular do que animais normais (WEISER *et al.*, 1996).

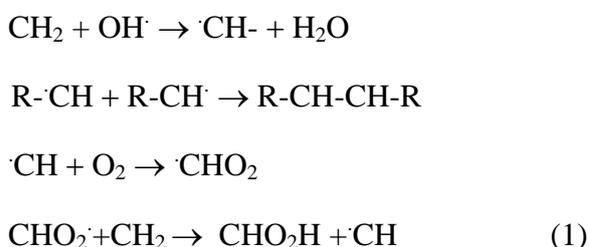
O óxido nítrico (NO), é uma substância liberada pelo endotélio vascular que parece desempenhar importante papel na manutenção da homeostase vascular, pelas suas atividades como vasodilatador (FURCHGOTT *et al.*, 1987), inibidor de agregação plaquetária (FURLONG *et al.*, 1987), de agregação e adesão neutrofílicas (McCALL *et al.*, 1988; KUBES *et al.*, 1991; LEFER *et al.*, 1993), e ainda como removedor direto de ânions O₂⁻ (GRYGLEWSKI *et al.*, 1986). O NO é sintetizado a partir da L-arginina, O₂ e NADPH, pela enzima óxido nítrico sintase. Foram demonstrados efeitos protetores do uso de L-arginina exógena, numa série de modelos de isquemia-reperfusão de miocárdio (NAKANISHI *et al.*, 1992; WEYRICH *et al.*, 1992; SATO *et al.*, 1995,1996). Em músculos esqueléticos de coelhos, a concentração de NO, quantificada pela relação NO₂/NO₃, chegou à 89% de seu valor inicial, logo após a isquemia, com posterior queda para 77% após uma hora de reperfusão, tendo havido ainda uma significativa correlação entre baixas concentrações de NO, diminuição de fluxo sanguíneo regional e alta mortalidade, por ocasião da reperfusão (BLEBEA *et al.*, 1996).

Existem evidências de que a estreita relação entre o NO e a endotelina, desempenha importante efeito na isquemia e reperfusão. A endotelina é um potente vasoconstrictor e estimula a adesão de granulócitos ao endotélio vascular, interferindo nas β₂-integrinas dos mesmos. Entre outros fatores, a isquemia e níveis reduzidos de NO, podem estimular a liberação de endotelina, com conseqüente vasoconstrição e piora da isquemia. Há relatos de que na isquemia-reperfusão ocorre aumento do número de receptores para a endotelina, através de um mecanismo cálcio-dependente e de que os níveis de endotelina

umentam em pacientes com infarto agudo do miocárdio, sendo também mais elevados quando é baixa a produção de NO (VAAGE & VALEN, 1993).

O NO pode reagir com o radical O_2^- , dando origem, via ânion peroxinitrito (ONOO⁻), ao forte oxidante dióxido de nitrogênio e ao radical OH, que podem iniciar a peroxidação lipídica (BECKMAN *et al.*, 1990; MATHEIS *et al.*, 1992).

A peroxidação lipídica é considerada como um dos principais mecanismos de lesão celular em organismos submetidos a estresse oxidativo (FRIDOVICH, 1978; POLI *et al.*, 1987; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989d). Os lipídios das membranas contêm uma grande quantidade de cadeias laterais de ácidos graxos polinsaturados (ROUSER *et al.*, 1968). Sob certas condições, esses ácidos graxos podem sofrer oxidação e formar peróxidos de lipídios. Os radicais livres formados durante o processo de isquemia e reperfusão, reagem com as membranas celulares fosfolipídicas, iniciando uma série de reações denominadas peroxidação lipídica (reações 1).



As reações de peroxidação lipídica (reações 1) são iniciadas com a retirada de um átomo de hidrogênio (H) de um grupo metileno (-CH₂-) dos ácidos graxos, deixando o grupo metileno com um elétron não pareado no carbono ($\cdot CH-$). O radical carbono tende a se estabilizar, através de um rearranjo das duplas ligações, o que resulta na formação de um dieno conjugado. No entanto, os dienos conjugados, em condições aeróbicas, reagem com o oxigênio molecular, formando um radical peroxil (ROO[·]). Este, por sua vez, é capaz de retirar um átomo de hidrogênio de um ácido graxo adjacente, propagando a reação em cadeia da lipoperoxidação (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1985). A menos que seja interrompida pelos antioxidantes, esta seqüência de reações resulta em destruição de membrana e morte

celular. O radical peroxil combina-se com o hidrogênio que ele retirou da cadeia lipídica e forma lipoidroperóxidos, e estes dão origem aos peróxidos e endoperóxidos cíclicos. Os hidroperóxidos são transformados em alcanos e aldeídos. Um dos produtos dessa degradação é o dialdeído malônico, cuja dosagem através do teste do ácido tiobarbitúrico é amplamente usada como indicadora da ocorrência de liperoxidação (Fig. 2) (BIRD & DRAPER, 1984).

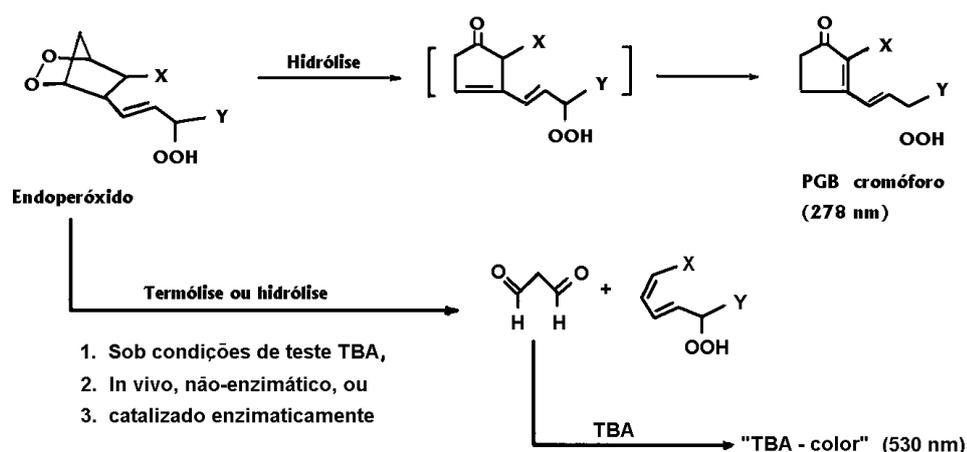
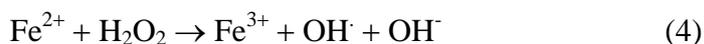
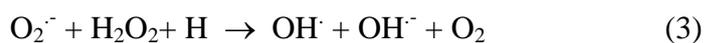


Figura 2: Decomposição hidrolítica e termolítica de endoperóxido e produção de PGB cromóforo ou dialdeído malônico. Extraído do artigo de PRYOR (1978).

Resultante da reperfusão, o radical O_2^- reage espontânea ou enzimaticamente (reação 2), formando H_2O_2 , que atua como substrato para reações mais lesivas e em cadeia. O radical livre OH^\cdot , gerado via reação de Haber-Weiss (reação 3) e de Fenton (reação 4) (BEAUCHAMP & FRIDOVICH, 1970), mediadas por quelatos de metal, é uma substância muito instável que reage com os fosfolípidios das membranas celulares, resultando em grande peroxidação lipídica e perda da integridade das membranas (DEL MAESTRO, 1980). O papel do ferro na iniciação da peroxidação lipídica foi descoberto por HOCHSTEIN *et al.*, em 1964.





O ferro oxidado Fe^{3+} produzido, pode, por sua vez, ser novamente reduzido a Fe^{2+} , através da reação 5. Como se pode observar nesse esquema, o ferro funciona tanto como um reagente redox, aceitando elétrons do $\text{O}_2^{\cdot-}$, quanto como um catalisador da reação de Fenton, promovendo a formação de OH^{\cdot} à partir do H_2O_2 . Na ausência de metal de transição, a reação de Haber-Weiss se dá muito lentamente para ter algum significado fisiológico, o que sugere o importante papel do ferro no mecanismo de lesão tissular provocado por essas reações (CHIAO *et al.*, 1994).

O radical OH^{\cdot} tem sido usado como iniciador da reação de peroxidação lipídica, desde quando se conheceu a sua capacidade de redução de átomos de hidrogênio das cadeias laterais de aminoácidos. Contudo, enzimas removedoras de H_2O_2 e quelantes de OH^{\cdot} , raramente inibem as reações de peroxidação lipídica ferro dependentes, sugerindo que o OH^{\cdot} tem um pequeno envolvimento nesse processo. Enquanto isso, tem-se demonstrado que a redução química do ferro é um importante fator na ocorrência e velocidade da peroxidação lipídica. Alguns estudos sustentam a hipótese de que o complexo $\text{Fe}^{2+} \dots \text{Fe}^{3+}$ é responsável pelo início da peroxidação lipídica ferro dependente (TANG *et al.*, 1997). Essa iniciação poderia ocorrer por reações em seus estados hipervalentes, tais como íons ferril e perferril, ou por reações com hidroperóxidos lipídicos formados durante a lipoperoxidação, levando à geração de radicais RO^{\cdot} e ROO^{\cdot} , capazes por si de propagarem as reações de lipoperoxidação (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1985; CHIAO *et al.*, 1994). Em função dessas propriedades, os mecanismos envolvidos na peroxidação lipídica ferro-dependente têm sido estudados em muitos modelos experimentais *in vitro*, como lipossomos e microssomos, inclusive com o uso de quelantes de ferro.

Muitos estudos têm demonstrado a liberação de ferro na circulação, seguindo-se à reperfusão de miocárdio (CHEVION *et al.*, 1993), intestino delgado (ROBINSON & HEDLUND, 1989), músculo esquelético (CHIAO *et al.*, 1994; FANTINI *et al.*, 1996), e na urina após isquemia renal (PALLER & HEDLUND, 1988). Outros estudos também demonstraram deslocamento do ferro em tecido cerebral pós-isquêmico (KRAUSE *et al.*, 1985; KOMARA *et al.*, 1986), miocárdio (HOLT *et al.*, 1986) e rins (GOWER *et al.*, 1990).

As evidências de que a deferoxamina (DFA) e outros quelantes de ferro atenuam lesões pós-isquêmicas numa variedade de sistemas orgânicos, inclusive em músculos esqueléticos, documentam a participação do ferro na patogênese da lesão tecidual pós-isquêmica (GUTTERIDGE *et al.*, 1979; LANGER, 1986; AMBROSIO *et al.*, 1987; BRAUGHLER *et al.*, 1988; PALLER & HEDLUND, 1988; OMAR *et al.*, 1989; SMITH *et al.*, 1989a; BOLLI *et al.*, 1990; FANTINI & YOSHIOKA, 1993; LE *et al.*, 1994; SARDINHA, 1994; SPENCER *et al.*, 1998).

DFA é um quelante hidrofílico que se liga ao ferro tanto no espaço intra quanto no extracelular (PETERS *et al.*, 1966; BRIDGES & CUDKOWICZ, 1984).

AMBROSIO *et al.* (1987), em trabalho experimental com coelhos, submeteram uma preparação isolada de coração a 30 minutos de isquemia normotérmica total e global, seguidos por 45 minutos de reperfusão. Nos animais em que usaram a DFA por ocasião da reperfusão, observaram uma recuperação total do conteúdo de fosfocreatina do miocárdio, do pH intracelular e da pressão ventricular esquerda, quando comparados com os animais do grupo sem tratamento. Em resumo, a administração de DFA resultou em maior recuperação funcional do miocárdio e do metabolismo energético.

LE *et al.* (1994), em cultura de células de coração de rato, submetidas a estresse oxidativo através de incubação por 90 minutos com 80 $\mu\text{mol/l}$ de cumeno hidroperóxido, concluíram que o pré-tratamento das células em cultura com DFA, previnha a

formação de radicais alcoxi (RO \cdot) e peroxi (ROO \cdot), ao quelar íons de ferro, protegendo assim os miócitos do estresse oxidativo.

SMITH *et al.* (1989a) testaram os efeitos da DFA e da apotransferrina sobre o aumento da permeabilidade vascular produzida pela isquemia seguida de reperfusão em músculo esquelético de rato, tendo verificado que as mesmas protegeram o músculo contra as lesões na microcirculação.

SARDINHA (1994) em trabalho experimental em que músculos *soleus* de ratos eram submetidos a 4 horas de isquemia total com torniquete, seguidas de reperfusão natural de 1, 2 e 4 horas, verificou que nos ratos que receberam DFA, a lipoperoxidação muscular, medida pelos níveis de dialdeído malônico, era significativamente menor do que naqueles que não receberam. FANTINI & YOSHIOKA em 1993, também observaram, dosando substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico, efeito protetor do pré-tratamento com deferoxamina sobre a peroxidação lipídica de músculos esqueléticos pós-isquêmicos.

Outros estudos relataram a ausência de efeito da DFA na atenuação de lesões em tecidos submetidos à isquemia-reperfusão (KOMARA *et al.*, 1986; FLEISCHER *et al.*, 1987; PIGOTT *et al.*, 1988).

WATANABE *et al.* (1993) estudaram o efeito da DFA na redução da área de infarto produzida pela oclusão da artéria coronária descendente anterior esquerda de coração de macaco e verificaram que nos animais tratados com DFA havia uma área 22% maior de infarto, comparada com a de animais do grupo controle sem tratamento.

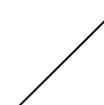
BORG & SCHAICH (1986) discutem que a DFA em altas doses mobilizando e quelando ferro de diferentes áreas, forma altas concentrações de ferrioxamina que inicia uma reação tipo Fenton, com produção de radicais hidroxil. BRAUGHLER *et al.* (1988), demonstraram, em tecido cerebral de ratos, a capacidade da DFO de inibir ou estimular a peroxidação lipídica ferro-dependente segundo o tampão utilizado ser fosfato de potássio ou solução de cloreto de sódio 0,9%.

Um outro quelante o ácido dietilenotriaminopentaacético (DTPA) foi desenvolvido ao mesmo tempo que o EDTA para tratamento de pacientes com sobrecarga de ferro (FAHEY *et al.*, 1961). O DTPA atua em meio extracelular e tem grande afinidade por íons de metais trivalentes e bivalentes, incluindo o ferro (AISEN & LISTOWSKY, 1980). Já foi utilizado em triagens clínicas (FAHEY *et al.*, 1961; MULLER-EBERHARD *et al.*, 1963), sempre na forma de sal de cálcio (CaNa_3DTPA), para se evitarem os efeitos calciopênicos causados por suas múltiplas cargas negativas. Contudo, foram associadas ao seu uso, deficiências de zinco levando a reações tóxicas como náusea, vômito e diarreia. Efeito espoliador sobre o magnésio e zinco, também foi evidenciado por PIPPARD *et al.* (1986).

A eficácia do quelante depende de sua constante de estabilidade e farmacocinética: distribuição e excreção. Devido sua alta constante de estabilidade (CHABEREK & MARTELL; 1959), quase total excreção renal (ADAMS *et al.*, 1991) e baixa toxicidade (CATSCH & HARMUTH-HOENE, 1975), o CaNa_3DTPA tem sido muito utilizado em forma de complexos com isótopos radioativos na medicina nuclear, como radiofármaco e experimentalmente como marcador de isquemia (SCHLEGEL *et al.*, 1979; WIENER *et al.*, 1994; WENDLAND *et al.*, 1993; DE JONG *et al.*, 1998).

CLETON *et al.* (1963) observaram que em meio equimolecular, a capacidade da transferrina em remover ferro dos quelantes EDDHA (ácido hidroxifenilacético), DTPA e EDTA, foi respectivamente de 41, 21 e 78%, demonstrando ser o DTPA mais estável nessas condições.

A dose tóxica em animais é 100 vezes maior que a dose clínica (CATSCH & HARMUTH-HOENE, 1975). Para tratamento crônico usam-se doses de 20 a 25 mg/kg (MULLER-EBERHARD *et al.*, 1963).



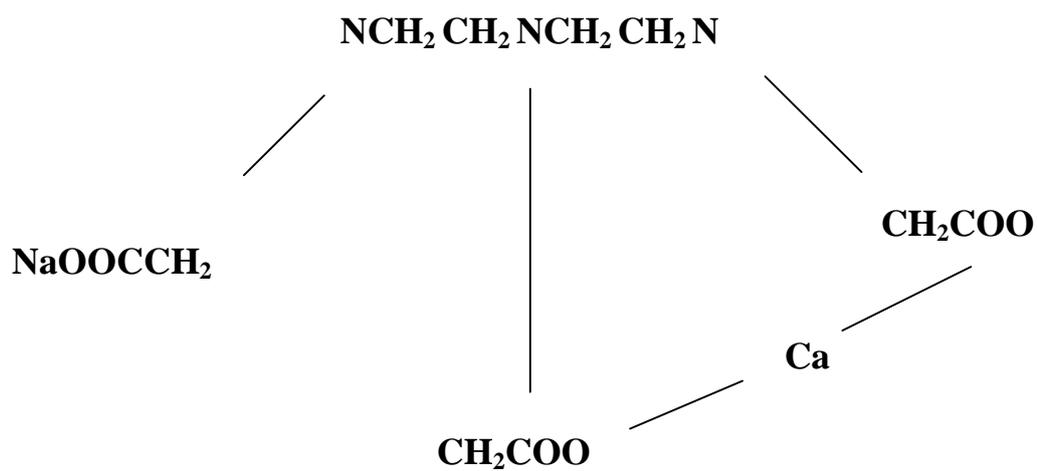


Figura 3: Estrutura química do CaNa₃DTPA. Extraído do artigo de FAHEY *et al.* (1961).

O CaNa_3DTPA , parece ter ação menos deletéria ao metabolismo das células que a quelação promovida pela DFA. CINATL *et al.* (1996) encontraram ação inibitória do CaNa_3DTPA na replicação do citomegalovírus em células fibroblásticas humanas e em células endoteliais em concentrações que asseguravam a síntese de DNA e o crescimento celular. Enquanto os outros quelantes DFA e 2,2,-bipiridina (BPD), foram efetivos somente em concentrações que interferiram na síntese de DNA e crescimento celular.

BRAWN & FRIDOVICH (1980), demonstraram *in vitro*, que o CaNa_3DTPA previne a quebra do DNA pelo $\text{O}_2\cdot$ e pelo H_2O_2 . Em estudo buscando diminuir a mortalidade de ratos submetidos a choque séptico experimental, o CaNa_3DTPA apresentou maior proteção, quando comparado a DFO (KAZMIERSKI *et al.*, 1996).

SCHOLZ *et al.* (1997) compararam os efeitos da administração isolada de DFA e do CaNa_3DTPA sobre cultura de células endoteliais. Estudaram as expressões de molécula de adesão intercelular (*intercellular adhesion molecule-1* ICAM-1), molécula de adesão leucócito endotelial-1 (ELAM-1), molécula de adesão celular vascular-1 (*vascular cell adhesion molecule-1* VCAM-1), HLA classe I (-A, -B, -C) e HLA classe II (DR), nestes meios. Verificaram na cultura tratada com $\text{CaNa Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+}$ DTPA, expressões significativamente menores de HLA e de moléculas de adesão nas células endoteliais, assim como menor proliferação linfocitária, quando comparada à cultura tratada com DFA.

Por sua ação como quelante de ferro e pelas demais propriedades citadas, acrescido ao fato, segundo PIPPARD *et al.* (1986), de ser o quelante sintético mais viável economicamente, resolvemos testar o potencial efeito antioxidante do CaNa_3DTPA na atenuação das lesões de isquemia-reperfusão em músculos esqueléticos.

OBJETIVO

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito do CaNa_3DTPA na atenuação das lesões de reperfusão de membro posterior de ratos, submetidos à isquemia total.

O experimento foi desenvolvido no laboratório de cirurgia experimental do hospital veterinário da Universidade de Marília (UNIMAR).

1. ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Foram utilizados 52 ratos de linhagem Wistar (*Rattus Novergius Albinus*, *Rodentia*, *Mammalia*), fornecidos pelo Biotério Central da Universidade de Marília. Desses animais, 12 foram utilizados na padronização da técnica empregada e na experiência piloto, e 40 animais na experiência definitiva. Destes, 2 animais foram excluídos em função de problema técnico ou morte do animal, de modo a se manter o delineamento inicial. A média dos pesos dos animais empregados na experiência definitiva foi de 188 ± 22 gramas.

2. GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram divididos, por sorteio, em 4 grupos: 3 controles e 1 tratamento.

GRUPO 1 (G1) - CONTROLE ANESTESIA

Grupo constituído por 10 animais, nos quais os tempos cirúrgicos dos demais grupos não foram executados. Os animais foram anestesiados e receberam heparina. Os parâmetros foram medidos da mesma forma que nos demais grupos.

GRUPO 2 (G2) - CONTROLE CIRURGIA: SEM ISQUEMIA

Grupo constituído por 10 animais, nos quais os tempos cirúrgicos dos demais grupos foram executados, excetuando-se a oclusão arterial com a indução da isquemia seguida por reperfusão. A estes animais foi administrado solução de cloreto de sódio 0,9%, via intramuscular, no membro anterior direito, após 3 horas e 50 minutos do isolamento e dissecação dos vasos femorais. O volume da solução de cloreto de sódio 0,9% injetada foi correspondente àquele de CaNa_3DTPA para um animal do mesmo peso no grupo isquemia- tratamento.

GRUPO 3 (G3) - CONTROLE ISQUEMIA/REPERFUSÃO

Grupo constituído por 10 animais, nos quais todos os tempos cirúrgicos foram realizados, incluindo-se a oclusão arterial com isquemia por 4 horas e 2 horas de reperfusão. Estes animais receberam solução de cloreto de sódio 0,9%, por via intramuscular 10 minutos antes da reperfusão.

GRUPO 4 (G4) - ISQUEMIA/REPERFUSÃO E TRATAMENTO COM CaNa_3DTPA

Grupo constituído por 10 animais, nos quais todos os tempos cirúrgicos dos demais grupos foram executados, incluindo-se a oclusão arterial com 4 horas de isquemia seguida por 2 horas de reperfusão. A estes animais foi ministrado CaNa_3DTPA , por via intramuscular, 10 minutos antes da reperfusão, no membro anterior direito.

O sorteio dos animais para cada grupo, e a aplicação do CaNa_3DTPA e da solução de cloreto de sódio 0,9%, foi realizado por um técnico de laboratório, sendo o

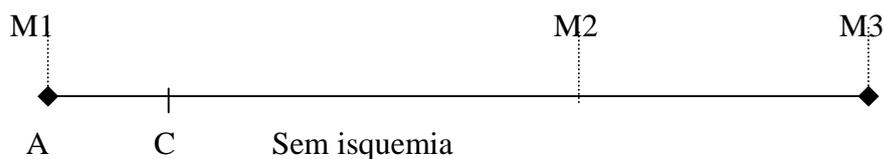
experimento realizado sem que se tivesse conhecimento do tipo de tratamento a que o animal seria submetido.

3. FASES DA EXPERIMENTAÇÃO

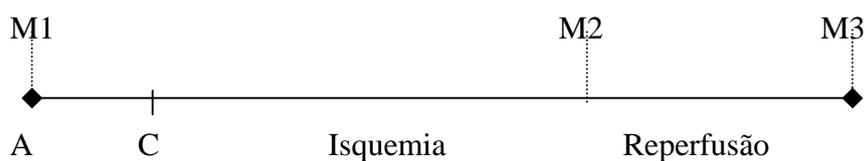
G1



G2



G3 e G4



Esquema 1: A= anestesia; C= cirurgia; M1= início do experimento;

M2= início da segunda fase do experimento;

M3= término da segunda fase.

3.1. PRIMEIRA FASE - ISQUEMIA

- Exame clínico e pesagem do rato.

- Anestesia e heparinização (150 UI/kg peso, via subcutânea).
- Tricotomia da região inguinal direita.
- Marcação de pontos com caneta de retroprojctor sobre o maléolo lateral do membro posterior direito e 1 cm distal a este, para medida da circunferência do pé.
- Procedimento cirúrgico até a exposição da artéria femoral direita.
- Início da fase de isquemia, nos grupos G3 e G4, com a oclusão da artéria femoral, sendo a isquemia mantida por 4 horas.
- 3 horas e 50 minutos após a oclusão arterial, injeção intramuscular da solução de cloreto de sódio 0,9% ou do CaNa_3DTPA no membro anterior direito, respectivamente nos G3 e G4. No G2, injetou-se solução de cloreto de sódio 0,9% no momento equivalente, utilizando-se como referência o término da dissecação dos vasos femorais.
- Ao final das 4 horas do procedimento anestésico no grupo G1; após 4 horas do completo isolamento vascular no grupo G2 e depois das 4 horas de isquemia nos grupos G3 e G4, realizou-se nova medida da circunferência do pé do membro posterior direito nos pontos já marcados na primeira fase, e pesou-se novamente os animais.
- Retirada imediata do clampe arterial com início da segunda fase ou fase de reperfusão.

3.2. SEGUNDA FASE - REPERFUSÃO

- Início com a retirada do clampe arterial e com a subsequente reperfusão do membro isquêmico.
- Duas horas após a reperfusão, ou 6 horas após o início do experimento no grupo G1 e 6 horas após a dissecação vascular no grupo G2, medida da circunferência do pé direito.
- Pesagem do rato.
- Punção cardíaca para coleta de sangue (1 ml) e dosagem da CPK
- Retirada dos músculos *soleus* direito e esquerdo para microscopia de luz e para dosagem de produtos da peroxidação lipídica; dialdeído malônico, através do teste com o ácido tiobarbitúrico.
- Eutanásia do animal.

4. ATRIBUTOS ESTUDADOS

Foram mensurados :

- Peso corpóreo;
- Circunferência do pé;
- Concentração de CPK sérico;
- Quantificação de produtos de dialdeído malônico (MDA) nos músculos biopsiados.

Fizeram-se os seguintes estudos morfológicos:

- Alterações de coloração dos pés durante o período de isquemia e de reperfusão, segundo parâmetros clínicos: palidez, cianose e hiperemia reativa.
- Estudo histológico dos músculos biopsiados.

5. MOMENTOS ESTUDADOS

M1 - após a anestesia, pesagem dos animais e medida da circunferência do pé direito.

M2 - ao final do período da isquemia (grupos G3 e G4), 4 horas após o início da anestesia (grupo G1), ou ainda 4 horas após dissecação dos vasos femorais (grupo G2). Nova pesagem dos animais e medida da circunferência do pé direito.

M3 - ao final da fase da reperfusão, 6 horas após o início da anestesia ou 6 horas após o isolamento vascular, nos respectivos grupos referidos acima, foram verificados o peso, a circunferência do pé direito e colhidos o sangue e as biópsias musculares.

6. TÉCNICAS UTILIZADAS

6.1. EXAME CLÍNICO

Os animais foram retirados do Biotério Central e deixados em jejum por 12 horas antes do início do experimento, porém com livre ingestão de água. Imediatamente antes do início do experimento, foram submetidos a um exame clínico sumário, verificando-se a atividade e o aspecto geral dos mesmos, incluindo uma inspeção cuidadosa das regiões inguinais e dos membros posteriores, visando afastar os animais que eventualmente apresentassem sinais de comprometimento nas regiões estudadas. Após, foram pesados, marcados e sorteados.

6.2. ANESTESIA

Os ratos foram anestesiados com o pentobarbital sódico (Hypnol®), diluído a 3% em solução de cloreto de sódio 0,9% e na dose de 30 mg/kg de peso

corpóreo por via intraperitoneal. A anestesia foi complementada, com o mesmo anestésico, 15 mg/kg, pela mesma via, segundo a resposta positiva ao reflexo sensitivo de pinçamento da orelha e falanges. A dose cumulativa de 75 mg/kg, não foi ultrapassada.

6.3. TÉCNICA CIRÚRGICA

6.3.1. SECÇÃO DA MUSCULATURA E OCLUSÃO ARTERIAL

- Colocação do rato anestesiado sobre a placa de cortiça, inicialmente em decúbito ventral.
- Incisão semicircular na face póstero-lateral da coxa, tendo como ponto de referência, a topografia correspondente à articulação coxo-femoral direita, estendendo-se deste ponto tanto a incisão posterior quanto a anterior, acompanhando uma linha imaginária de transição do membro posterior para o tronco.
- Secção semicircular dos músculos da face posterior da coxa, ao nível da incisão, incluindo o nervo ciático, até o fêmur, com hemostasia por compressão.
- Desinserção das estruturas musculares do fêmur com bisturi.
- Secção por via posterior, de parte da musculatura anterior.
- Fechamento da incisão da pele com pontos separados de fio de algodão 4-0.
- Colocação do animal em decúbito dorsal, com fixação dos pés em abdução e colocação de um coxim de gazes sob o membro posterior direito na região coxo-femoral.
- Incisão da pele a partir dos extremos lateral e medial da incisão posterior, ao longo da concavidade entre o abdome e o membro.
- Secção do coxim de gordura inguinal.
- Identificação dos vasos femorais na sua bainha perivascular.

- Dissecção do feixe vâsculo-nervoso do tecido circundante.
- Secção transversa de toda a musculatura e tecidos circundantes ao feixe vâsculo-nervoso, com hemostasia cuidadosa por compressão, até o femur, em nível correspondente à exposicao de sua face posterior.
- Desinsercao de toda a musculatura da face anterior, lateral e medial do femur.
- Abertura da bainha perivascular, disseccao da artéria femoral, seccao dos nervos femorais.
- Confirmacao da seccao de todas as estruturas existentes a esse nível, com excecao da artéria e veia femoral, e do femur.
- Revisão da hemostasia.
- Colocacao de um clampe microcirúrgico tipo venoso de Acland na artéria femoral dissecada, dando-se início à fase de isquemia por 4 horas seguidas nos animais dos grupos G3 e G4.
- Sutura da pele com pontos separados de fio de algodão 4-0.



Figura 4: Linha de demarcação da incisão anterior.

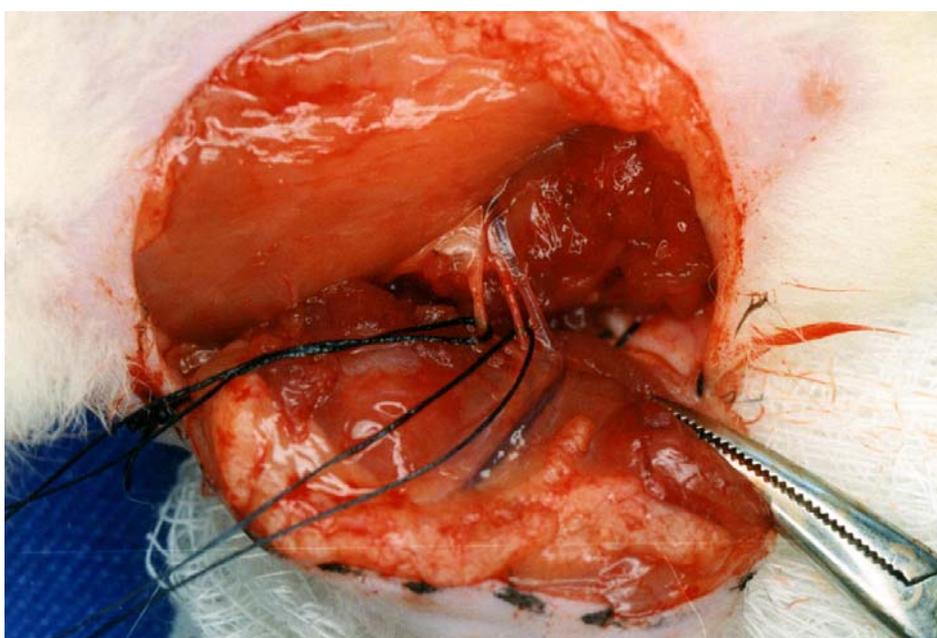


Figura 5: Feixe v\u00e1sculo-nervoso dissecado e reparado.



Figura 6: Fase de isquemia. Incisão cirúrgica suturada.



Figura 7: Fase de isquemia, artéria femoral clampeada, palidez no pé direito.

6.3.2. RETIRADA DO CLAMPE ARTERIAL

- Retirada do ponto central da incisão na região inguinal anterior.
- Retirada do clampe arterial.
- Observação dos seguintes parâmetros: presença de fluxo na artéria desclampeada, presença de fluxo na veia femoral e presença de hiperemia reativa no membro pós-isquêmico.



Figura 8: Fase de reperfusão, hiperemia reativa no pé direito do rato.

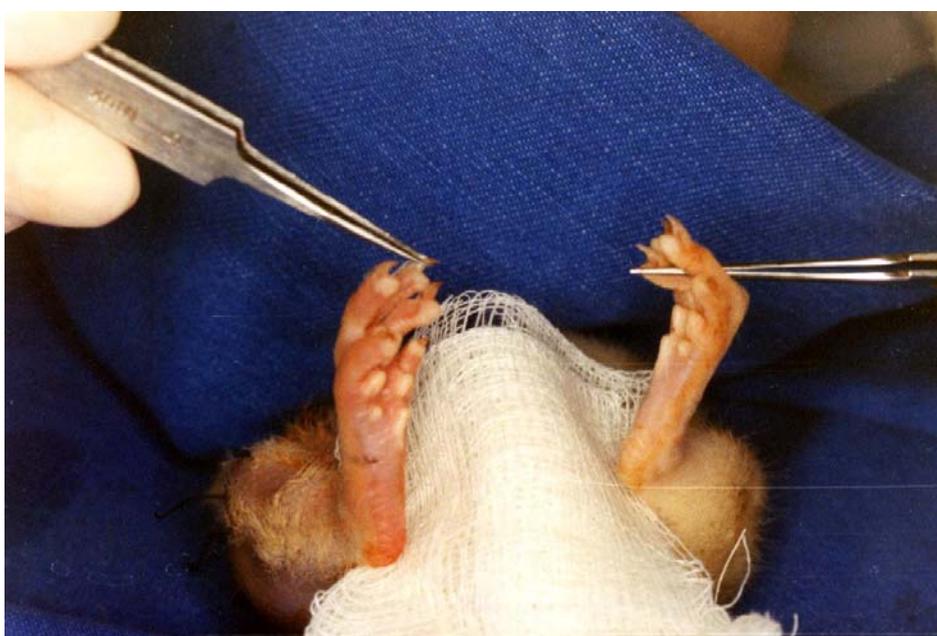


Figura 9: Fase final de reperfusão, grande edema do pé direito do rato.

6.3.3. BIÓPSIA MUSCULAR PARA MICROSCOPIA DE LUZ E DOSAGEM DO MDA

- Animal posicionado em decúbito ventral.
- Fixação das patas posteriores, direita e esquerda em leve abdução e hiperextensão.
- Incisão da pele desde o calcâneo até o cavo poplíteo, em linha longitudinal, mediana, sobre o músculo gastrocnêmio direito.
- Identificação do músculo *soleus* direito. Fixação de suas origens e inserções para evitar o encurtamento resultante da secção de suas fibras.
- Retirada do músculo *soleus* e divisão do mesmo em dois fragmentos, um para microscopia de luz e o outro para a dosagem de MDA.
- Realização do mesmo procedimento no membro contra-lateral.
- Preparo dos fragmentos .
- Após a retirada dos fragmentos dos músculos, sucedeu-se à eutanásia do animal.

6.4. OBSERVAÇÃO CLÍNICA DA COLORAÇÃO DO PÉ

Os efeitos da isquemia e da reperfusão foram verificados clinicamente pelo aspecto e coloração dos pés durante e após a isquemia.

6.5. MEDIDA DA CIRCUNFERÊNCIA DO PÉ

Com o rato em decúbito ventral e com o membro posterior direito em hiperextensão, foi marcado um ponto com caneta de retroprojeter, distal 1 cm do maléolo

lateral. Nesse local, a circunferência foi tomada por meio de um fio de algodão 4-0 e pinças microcirúrgicas. O comprimento do fio foi então medido em milímetros sobre uma régua.

6.6. DOSAGEM DA CPK

Com o animal em decúbito dorsal, punção cardíaca, transparietal, para a retirada de cerca de 1 ml de sangue.

Centrifugação do sangue a 3.000 rotações por minuto, por 10 minutos. Após a centrifugação, a dosagem da CPK foi realizada pelo CKC (NAC); Granutest 2.5, no aparelho analisador automático (CLinLINE 150 - *Vitek Sytems*) no Instituto de Patologia Clínica e Hematologia de Marília - SP.

As amostras que apresentaram hemólise visível foram excluídas.

6.7. MICROSCOPIA DE LUZ

Os fragmentos biopsiados dos músculos *soleus* direito e esquerdo foram fixados em álcool absoluto por aproximadamente 30 horas. Após essa fixação, o material foi clivado, incluído em parafina e montado em resina (Entellan). A coloração usada foi HE (hematoxilina-eosina) segundo a técnica de Harris e o ácido periódico de Schiff (P.A.S.).

Os cortes foram feitos com micrótomo rotativo numa espessura de 4 a 5 μ , no laboratório de patologia da Faculdade de Medicina de Marília.

Nas lâminas coradas pelo P.A.S., a apreciação do número de fibras que apresentaram material positivo no seu interior, foi feita de forma semiquantitativa, utilizando-se como marcador de intensidade uma escala que variou de 0 (zero), para a ausência de positividade até (+++), para a positividade acentuada.

6.8. DOSAGEM DO MDA (dialdeído malônico)

As biópsias eram mantidas em nitrogênio líquido e encaminhadas ao Laboratório de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia e Ortopedia da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, onde eram estocadas à -80°C para posterior processamento. Para a medida da peroxidação lipídica (dosagem do MDA), o processo se iniciava ainda com os músculos congelados.

6.8.1. QUANTIFICAÇÃO DO MDA NO MÚSCULO ESQUELÉTICO

Foi utilizado o método do ácido tiobarbitúrico modificado por CECCHINI *et al.*, 1990. Os músculos, congelados, eram pesados e homogeneizados na proporção de 1 grama de tecido para 9 mililitros de KCl 1,15% em homogeneizador tipo Ultra-Turrax, por 30 segundos, com intervalo de 1 minuto entre cada etapa de homogeneização. Eram colocados em banho de gelo e as etapas repetidas por 3 vezes.

Tomavam-se alíquotas de 0,2 e 0,4 ml, em duplicata, do homogenato acima e colocavam-se em tubos de ensaio, completando-se para um volume final de 1 ml com KCl 1,15%. Em seguida adicionava-se 1 ml de ácido tiobarbitúrico a 1%, em 50 milimoles de NaOH e 1 ml de ácido tricloroacético a 2,8%. Agitava-se então a mistura vigorosamente. Os tubos de ensaio eram então aquecidos por 30 minutos em banho de água a 95°C . Após resfriamento em banho

de gelo, adicionavam-se 2 ml de n-butanol em cada tubo, agitava-se vigorosamente por 30 segundos, seguindo-se a centrifugação das amostras a 3000 rotações por minuto, durante 30 minutos. A quantificação das substâncias reativas ao teste do ácido tiobarbitúrico presentes na fase orgânica, foi realizada em espectrofotômetro Varian 634 S, duplo feixe, a 532 nanômetros.

6.8.2. DOSAGEM DA PROTEÍNA MUSCULAR

Foi utilizado o método de LOWRY et al. (1951), com algumas modificações, que consta de:

Reagentes - **Solução A:** Carbonato de sódio a 20% em hidróxido de sódio 0,5N.

Solução B: tartarato de sódio e potássio a 2% em água destilada.

Solução C: sulfato de cobre a 1% em água destilada. **Solução D:**

Reagente de Folin em água destilada 1:11. **Reativo cúprico:** no momento da dosagem misturou-se 10 ml da solução A, 0,5 ml da solução B e 0,5 ml da solução C.

Procedimento - O homogenato muscular foi diluído 1:100 em água destilada. À 1 ml desta suspensão diluída ou 1 ml da solução padrão de soroalbumina bovina (100 µg/ml) ou 1 ml de água destilada, foi adicionado 1 ml de reagente cúprico, agitado e deixado em repouso durante 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida foram adicionados 3 ml de solução D, os tubos agitados vigorosamente e incubados em banho maria, a uma temperatura de 50°C por 10 minutos. A intensidade de cor desenvolvida na reação foi estimada em espectrofotômetro Varian 634S duplo feixe a 660 nm, tendo o branco como referência em que a suspensão de proteína foi substituída por 1 ml de água destilada. A concentração de proteína muscular foi determinada

comparando-se as absorvências das amostras com a absorvência obtida para uma solução padrão de soroalbumina bovina a 100 mg/ml conduzida nas mesmas condições crescentes de soroalbumina bovina (25 a 200 mg/ml) e foram comparadas com as absorvências correspondentes.

6.8.3. CÁLCULO DOS NÍVEIS DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

Os níveis de peroxidação lipídica foram expressos em nanomoles de dialdeído malônico/miligrama de proteína, utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\text{nM(dialdeídomalônico)/mg(proteína)} = \frac{\text{Absorvência} \times 1000}{*156 \times \text{proteína}}$$

*156 = extinção molar do dialdeído malônico (BUEGE & AUST, 1978)

7. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

- 7.1. Balança (0-1000gr) B.Braun, Manheim, Alemanha.
- 7.2. Centrífuga Biofug 13, Heraeus Sepatech, Heraeus Instruments GmbH, Alemanha.
- 7.3. Analisador automático para dosagem de CPK: Clin Line 150; Vitek Systems, Estados Unidos da América.
- 7.4. Espectrofotômetro Varian 634S, duplo feixe a 532 nanômetros; Zeiss PM-2A.
- 7.5. Homogeneizador para dosagem do dialdeído malônico; Ultra-Turrax, Janke&Kunkel; IKA-Labortechnik, Alemanha.

7.6. Kit de creatinoquinase - CKC(NAC); Granutest 2.5. Fabricante: Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha.

7.7. Anestésicos: Hypnol 3%®, pentobarbital sódico, frascos com 50 ml de solução injetável. Laboratório: Fontoveter.

7.8. Anticoagulante; Heparin®, frasco 10 ml com 1000 UI/ml, Laboratório: Cristália.

7.9. CaNa₃DTPA, 100 mg/ml, frascos com 100 ml, Laboratório: Astrapin, Pfaffen-Schwabenheim, Alemanha.

7.10. Solução de Cloreto de Sódio 0,9%, frascos com 250 ml, Laboratório: Alcon, São Paulo, Brasil.

8. MÉTODOS ESTATÍSTICOS

Para as variáveis peso e circunferência do pé direito, avaliadas no mesmo conjunto de animais, em 3 momentos (M1: após a anestesia; M2: ao final da isquemia ou no tempo correspondente nos outros grupos; M3: ao final da reperfusão ou no mesmo momento nos outros grupos), utilizou-se Análise de Perfil, com os testes de:-

- H01 - Similaridade dos Perfis; interação entre os grupos e momentos, para se verificar se os perfis dos 4 grupos podem ser aceitos como similares ao longo do tempo.
- H02 - Igualdade dos Perfis; só é válido quando há similaridade dos perfis e visa verificar se além de similares, os perfis dos grupos podem ser aceitos como iguais.
- H03 - Efeito de Momento, caso os perfis sejam similares e compara as médias dos momentos considerando-se o conjunto dos 4 grupos.
- H04 - Efeito de Grupo. Compara os grupos em cada um dos momentos separadamente;

- H05 - Efeito de Momento. Em cada grupo, compara a média dos 3 momentos, separadamente.

A tendência central foi indicada pela média (\bar{x}) e a variabilidade, pelo desvio padrão (s), calculados para cada momento e grupo.

Para a variável CPK, avaliada no final do experimento, a tendência central foi indicada pela mediana (Md) em cada grupo. A comparação entre os 4 grupos foi efetuada pela prova não paramétrica de Kruskal-Wallis, com o cálculo da estatística H e da Diferença Mínima Significante para contraste entre pares de grupos.

Em todas as análises efetuadas, as estatísticas calculadas (F na Análise de Perfil e H na prova de Kruskal Wallis) foram consideradas significantes quando $p < 0,05$ onde p é o nível de significância associado à estatística calculada.

Na análise da variável, MDA, utilizamos para a comparação dentro dos grupos (MPD com MPE), o “teste t pareado” e para a comparação após juntar grupos (G1 e G2; MPD+MPE), para as alíquotas de 0,2 e 0,4 ml, o “teste t para grupos independentes”. Para realizarmos a comparação após a aplicação dos testes “t pareado” e “t independente” dos agrupamentos permitidos, utilizou-se a “Análise de variância de um fator”, complementada pelo teste de comparações múltiplas “t de Bonferroni”. Para todos os testes adotou-se o nível de significância de 5% de probabilidade para rejeição da hipótese de nulidade.

RESULTADOS

Os valores individuais dos atributos dos animais estudados e as análises estatísticas dos resultados encontram-se no Apêndice.

1. PESO DO RATO

Tabela 1 – Peso dos animais: médias (ξ) e desvios padrão (s) para cada um dos grupos G1, G2, G3 e G4.

GRUPO	n	PESO		
		M1 $\xi \pm s$	M2 $\xi \pm s$	M3 $\xi \pm s$
G1	10	186,0 \pm 22,5	182,0 \pm 21,4	179,0 \pm 18,8
G2	10	182,5 \pm 21,6	175,0 \pm 22,0	173,0 \pm 20,0
G3	9	186,7 \pm 22,4	182,8 \pm 20,9	181,9 \pm 21,6
G4	9	198,3 \pm 19,7	192,2 \pm 17,7	184,7 \pm 17,0

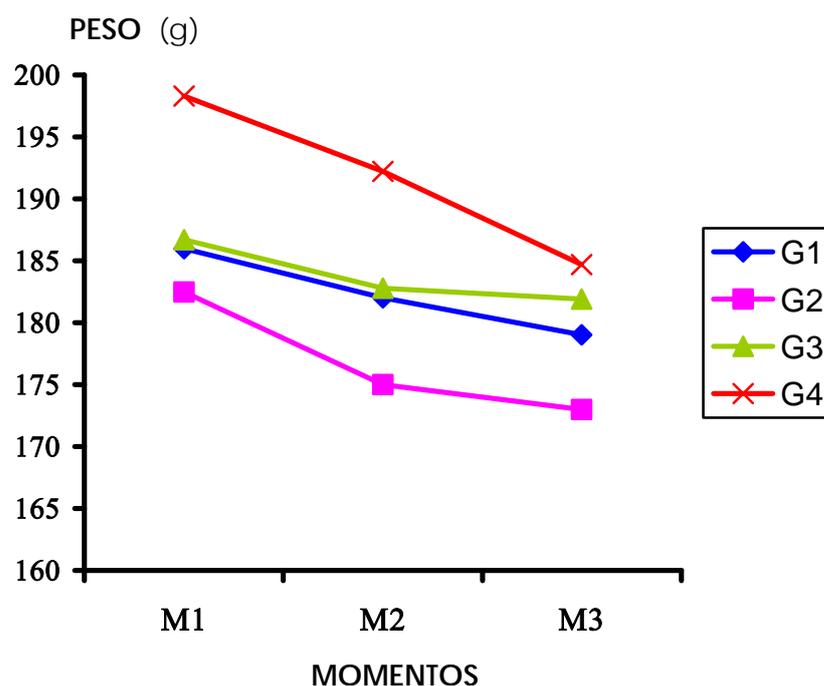


Figura 11 – Peso do rato: médias (ξ) dos grupos em cada um dos momentos.

Tabela 2 – Peso dos animais: hipóteses testadas, estatísticas calculadas e comentários.

HIPÓTESE	ESTATÍSTICA	COMENTÁRIO
Interação entre grupos e momentos	F = 1,30 p = 0,2345	Não existe interação significativa. Os perfis dos grupos são similares.
Efeito do momento em cada grupo	G1: F = 0,531 p = 0,7668	M1 = M2 = M3
	G2: F = 2,23 p = 0,3275	M1 = M2 = M3
	G3: F = 0,124 p = 0,8839	M1 = M2 = M3
	G4: F = 2,46 p = 0,2920	M1 = M2 = M3
Efeito do grupo em cada momento	M1: F = 4,04 p = 0,2574	G1 = G2 = G3 = G4
	M2: F = 1,11 p = 0,3597	G1 = G2 = G3 = G4
	M3: F = 0,791 p = 0,5072	G1 = G2 = G4 = G3

Nos quatro grupos estudados não houve variação estatisticamente significante nos pesos dos animais nem entre os grupos, nem entre os três momentos estudados.

2. CIRCUNFERÊNCIA DO PÉ DO RATO

Tabela 3 – Circunferência do pé do rato: médias (ξ) e desvios padrão (s) para cada um dos grupos G1, G2, G3 e G4.

GRUPO	n	CIRCUNFERÊNCIA		
		M1	M2	M3
		$\xi \pm s$	$\xi \pm s$	$\xi \pm s$
G1	10	2,10 \pm 0,07	2,08 \pm 0,10	2,08 \pm 0,11
G2	10	2,18 \pm 0,06	2,23 \pm 0,13	2,23 \pm 0,09
G3	9	2,11 \pm 0,09	2,18 \pm 0,12	2,39 \pm 0,15
G4	9	2,19 \pm 0,09	2,19 \pm 0,01	2,29 \pm 0,11

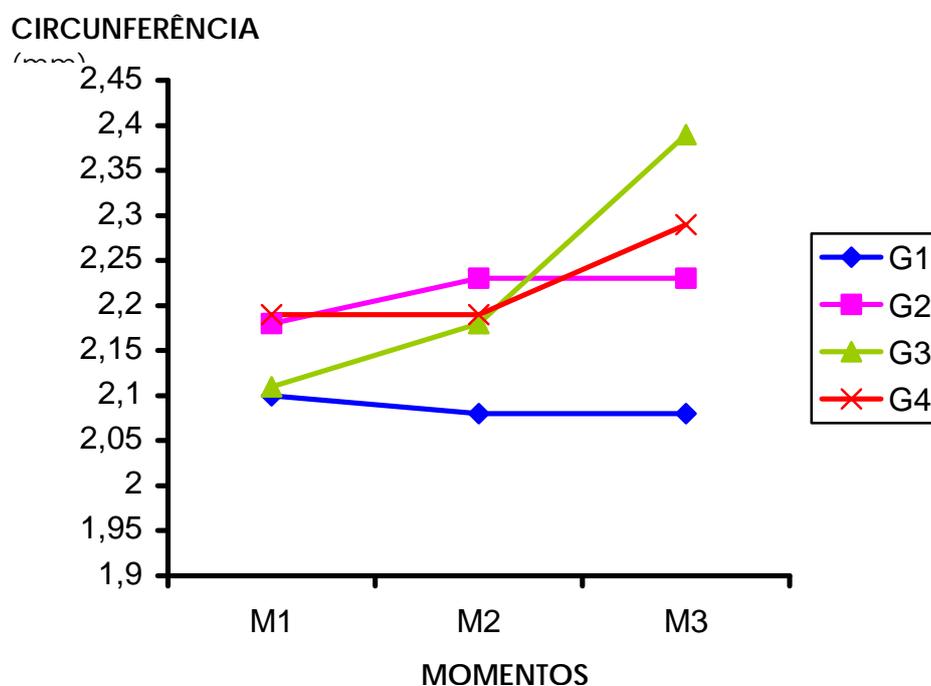


Figura 12 – Circunferência do pé do rato: médias (ξ) dos grupos em cada um dos momentos.

Tabela 4 – Circunferência do pé do rato: hipóteses testadas, estatísticas calculadas e comentários. (Adotou-se o nível de significância de 5% para a rejeição da hipótese de nulidade).

HIPÓTESE	ESTATÍSTICA	COMENTÁRIO
Interação entre grupos e momentos	F = 7,14 p < 0,05	Existe interação significativa. Os perfis dos grupos não são similares.
Efeito do momento em cada grupo	G1: F = 0,25 p = 0,8675	M1 = M2 = M3
	G2: F = 1,55 p = 0,4295	M1 = M2 = M3
	G3: F = 22,74 p < 0,05	M1 = M2 < M3
	G4: F = 3,38 p = 0,0597	M1 = M2 = M3
Efeito do grupo em cada momento	M1: F = 1,10 p = 0,1164	G1 = G2 = G3 = G4
	M2: F = 3,41 p < 0,05	G4 = G3 = G1 < G2 G2 não difere significativamente dos grupos G3 e G4.
	M3: F = 10,95 p < 0,05	G1 < G2 ≤ G4 ≤ G3 G4 é intermediário, não difere significativamente de G2 e G3.

Dentro de cada grupo; G1, G2 e G4, não houve variação estatisticamente significante da circunferência dos pés dos animais nos diferentes momentos estudados. No G3, por ocasião da reperusão, houve um aumento estatisticamente significante da circunferência dos pés dos animais entre os momentos M2 e M3. No momento M1, verificou-se que não houve diferença na circunferência dos pés dos animais nos quatro grupos. No momento M2, verificou-se $G4=G3=G1 < G2$, $G2=G3=G4$, mostrando que não houve diferença nos grupos cirúrgicos entre si, mas que o grupo cirúrgico G2 foi maior que o controle G1, o que não aconteceu entre os outros grupos cirúrgicos e o controle anestesia G1. No momento M3 observou-se $G1 < (G2 = G3 = G4)$, mostrando que houve uma diferença estatisticamente significante na circunferência dos pés dos animais com cirurgia, comparando-se com o grupo controle G1. Portanto, ao longo do tempo, houve um aumento na circunferência dos pés dos animais submetidos a cirurgia, sendo esse aumento superior nos animais submetidos a isquemia-reperusão e tratados com solução de cloreto de sódio à 0,9% (G3).

3. DOSAGEM DE CREATINOFOSFOQUINASE (CPK)

Tabela 5 – CPK. Tamanho amostral (n), mediana (Md), médias (ξ) e desvios padrão (s) de cada grupo.

GRUPO	n	MEDIANA (Md)	$\xi \pm s$
G1	10	534	576 \pm 401
G2	10	908	1426 \pm 1358
G3	8	4070	3853 \pm 2146
G4	9	5005	5005 \pm 2803

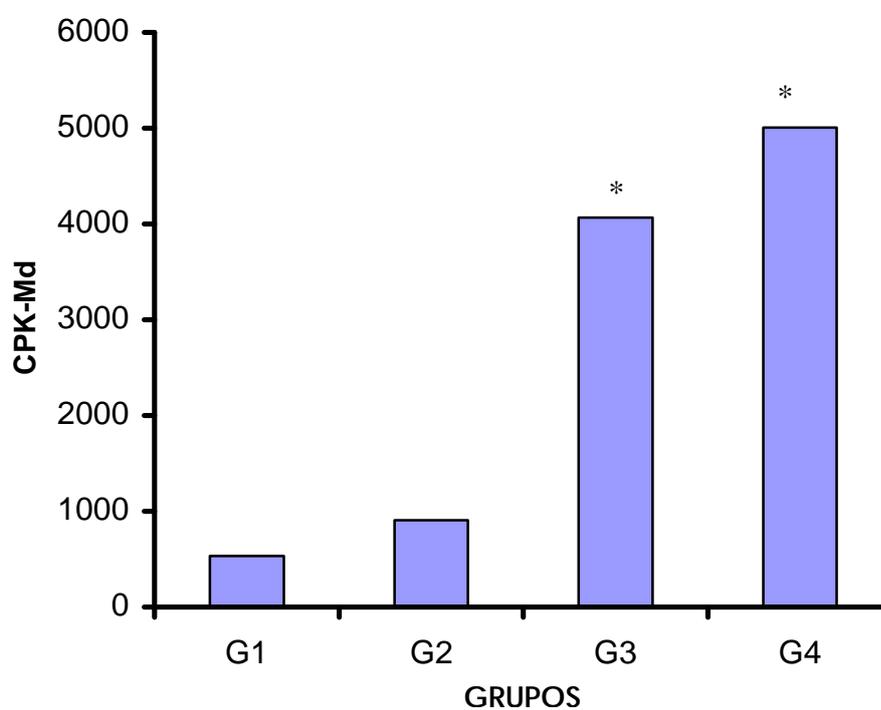


Figura 13 – CPK. Mediana (Md) de cada grupo. (* $p < 0,0001$, significante, $G1 = G2 < G3 = G4$)

Tabela 6 – CPK. Estatística (H de Kruskal-Wallis) calculada para a comparação dos grupos e comentários.

ESTATÍSTICA H	p	RESULTADO	COMENTÁRIO
22,54	< 0,0001	Significante	G1 = G2 < G3 = G4

Ao final do experimento, os valores de CPK sérico nos animais do G4 foram superiores aos dos animais dos G1 e G2. Os valores do G3 foram também superiores aos do G1. Não houve entretanto diferença significativa entre os animais do G2 e G3.

Portanto, houve um aumento significativo da CPK nos animais submetidos a isquemia-reperfusão, comparados aos animais do grupo controle sem cirurgia.

4. DOSAGEM DO DIALDEÍDO MALÔNICO (MDA)

Tabela 7 – Dosagem do dialdeído malônico (MDA) em alíquotas de 0,2 ml: médias (ξ) e desvios padrão (s) das amostras referentes ao Membro submetido à isquemia/reperfusão (MPD) e ao Membro contralateral (MPE), nos diferentes grupos.

GRUPO	AMOSTRA	n	$\xi \pm s$
G1	MPD	7	0,1564 \pm 0,0428
	MPE	7	0,1680 \pm 0,0690
G2	MPD	8	0,1402 \pm 0,0603
	MPE	8	0,1494 \pm 0,0329
G3	MPD	9	0,1202 \pm 0,0604
	MPE	9	0,2429 \pm 0,0900
G4	MPD	9	0,1911 \pm 0,1786
	MPE	9	0,2774 \pm 0,1299

MPD = Membro submetido à isquemia/reperfusão

MPE = Membro contralateral

Tabela 8 – Dosagem do dialdeído malônico (MDA) em alíquotas de 0,4 ml: médias (ξ) e desvios padrão (s) das amostras referentes ao Membro submetido à isquemia/reperfusão (MPD) e ao Membro contralateral (MPE), nos diferentes grupos.

GRUPO	AMOSTRA	n	$\xi \pm s$
G1	MPD	7	0,2234 \pm 0,0422
	MPE	6	0,2378 \pm 0,0960
G2	MPD	8	0,2310 \pm 0,1207
	MPE	8	0,2178 \pm 0,0637
G3	MPD	9	0,1892 \pm 0,0822
	MPE	9	0,3593 \pm 0,1298
G4	MPD	9	0,2790 \pm 0,2449
	MPE	9	0,4658 \pm 0,2883

MPD = Membro submetido à isquemia/reperfusão

MPE = Membro contralateral

Tabela 9 – Dosagem do dialdeído malônico (MDA): comparação entre os membros posteriores direito e esquerdo (MPD e MPE) nos diferentes grupos. Resultados dos testes t pareado e t para amostras independentes em alíquotas de 0,2 ml, no nível de significância de 5% de probabilidade para rejeição de nulidade.

t pareado				
CONTRASTES	t_{calculado}	g.l.	p	RESULTADO
G1 (MPDxMPE)	- 0,3508	6	0,7377	n.s.
G2 (MPDxMPE)	- 0,5698	7	0,5866	n.s.
G3 (MPDxMPE)	- 2,9985	8	0,0171	Significante
G4 (MPDxMPE)	- 1,0754	8	0,3136	n.s.

t independente				
CONTRASTES	t_{calculado}	g.l.	p	RESULTADO
[G1 (MPD+MPE) x G2 (MPD+MPE)]	0,8358	13	0,4184	n.s.

MPD = Membro submetido à isquemia/reperfusão
MPE = Membro contralateral **g.l.** = grau de liberdade

Tabela 10 – Dosagem do dialdeído malônico (MDA): comparação entre os membros posteriores direito e esquerdo (MPD e MPE) nos diferentes grupos. Resultados dos testes t pareado e t para amostras independentes em alíquotas de 0,4 ml, no nível de significância de 5% de probabilidade para rejeição de nulidade.

t pareado				
CONTRASTES	t_{calculado}	g.l.	p	RESULTADO
G1 (MPDxMPE)	- 0,9499	6	0,3788	n.s.
G2 (MPDxMPE)	0,3237	7	0,7556	n.s.
G3 (MPDxMPE)	- 2,8799	8	0,0205	Significante
G4 (MPDxMPE)	- 1,2469	8	0,2477	n.s.

t independente				
CONTRASTES	t_{calculado}	g.l.	p	RESULTADO
[G1 (MPD+MPE) x G2 (MPD+MPE)]	0,6516	13	0,5260	n.s.

MPD = Membro submetido à isquemia/reperfusão
MPE = Membro contralateral **g.l.** = grau de liberdade

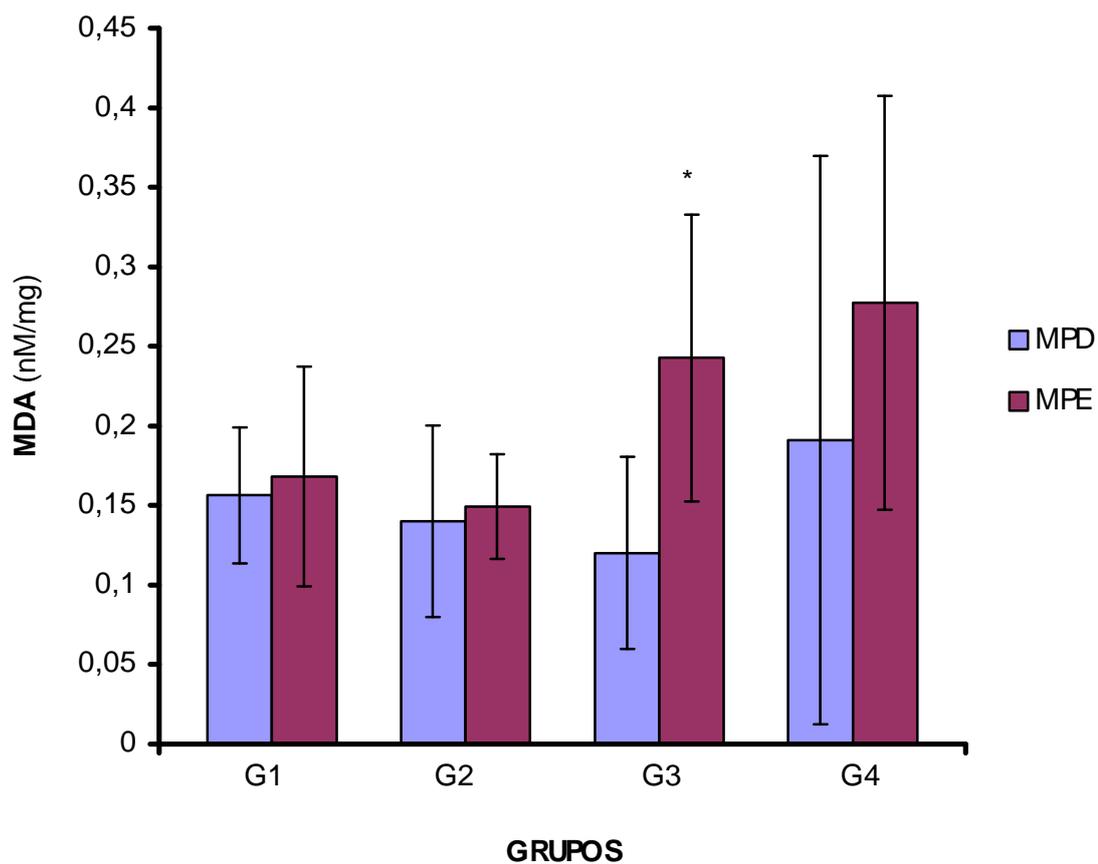


Figura 14 – Dialdeído malônico (MDA): médias (ξ) e desvios padrão (s) dos valores de MDA no membro submetido à isquemia/reperfusão (MPD) e no membro contralateral (MPE) de cada grupo. Alíquotas de 0,2 ml.

* (MPE > MPD; $p = 0,01$)

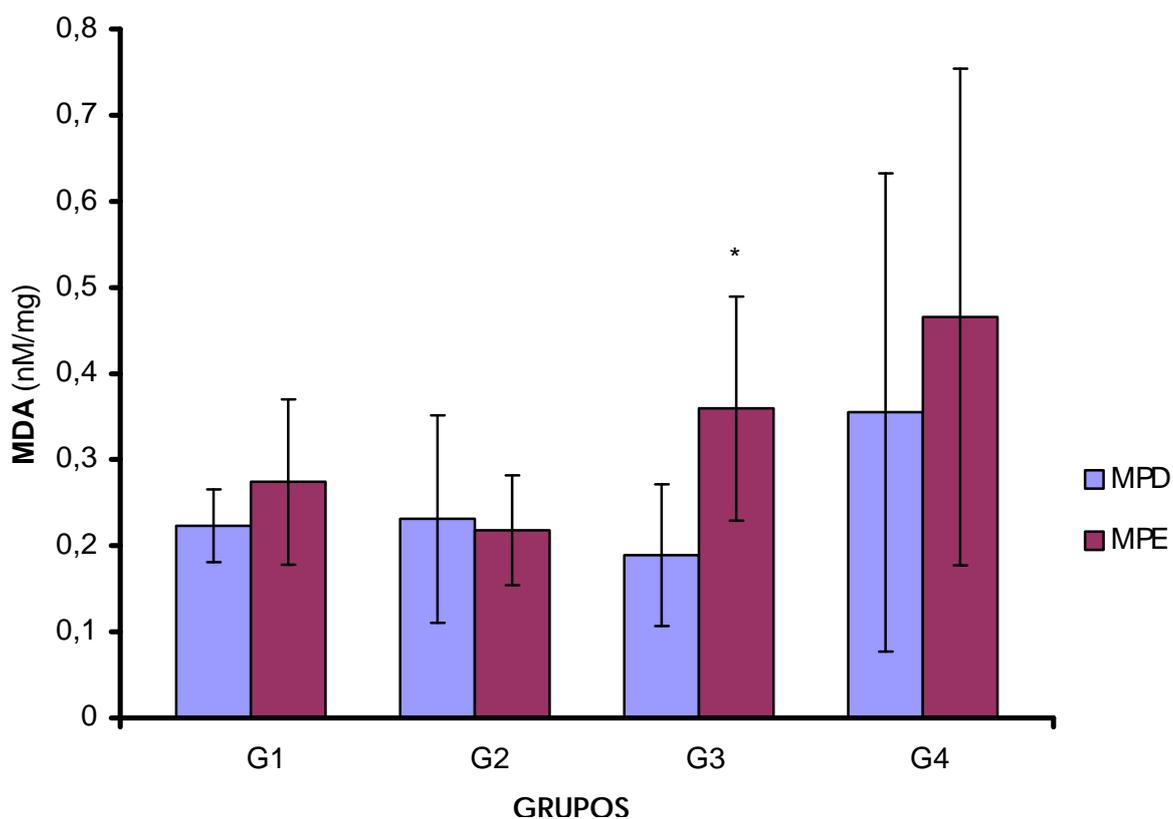


Figura 15 – Dialdeído malônico (MDA): médias (ξ) e desvios padrão (s) dos valores de MDA no membro submetido à isquemia/reperfusão (MPD) e no membro contralateral (MPE) de cada grupo. Alíquotas de 0,4 ml.

* (MPE > MPD; $p = 0,02$)

A comparação entre os grupos e entre os membros direito e esquerdo dos diferentes grupos foi realizado utilizando-se o teste estatístico “t” de Bonferroni (Apêndice, Tabelas 7A e 8A).

Comparando os resultados da dosagem do MDA, alíquota de 0,2 ml, entre os membros posteriores direito e esquerdo, apenas no grupo isquemia/reperfusão não tratado (G3) apresentou diferença significativa. As dosagens do MDA do MPE dos animais do G3 foram significativamente maiores que aquelas dos MPD e MPE dos animais dos grupos G1 e G2. As dosagens de MDA do MPD dos animais do grupo G3 foram significativamente diferentes apenas do grupo G4.

Comparando os resultados da dosagem do MDA, alíquota de 0,4 ml, entre os MPD e MPE, apenas o grupo isquemia/reperfusão não tratado (G3) apresentou diferença significativa. As dosagens de MDA do MPD dos animais do grupo G3 foram significativamente diferentes apenas do grupo G4. As dosagens do MDA do MPE dos animais do grupo G3 foram significativamente maiores que aquelas dos MPD e MPE dos animais dos grupos G1 e G2. As dosagens do MDA dos MPD e MPE dos animais dos grupos G1 e G2 foram estatisticamente menores que aquelas dos MPD e MPE dos animais do grupo G4.

1. MÉTODO

Escolhemos o rato como animal de experimentação, por ser muito utilizado em estudos de musculatura esquelética (GOLDSPINK, 1972), susceptível às alterações da isquemia e reperfusão (BELKIN *et al.*, 1989; FANTINI & YOSHIOKA, 1993). Seu pequeno porte e fácil manuseio são fatores relevantes. O seu baixo custo favorece a aquisição e permite adequada representatividade.

Foi evitada medicação pré-anestésica ou associações, a fim de se diminuir a chance de interferência e interação medicamentosas, na aferição de nossos parâmetros enzimáticos e de peroxidação lipídica. A não necessidade de recuperação pós-anestésica descartou o uso de anestesia inalatória. Assim, realizamos a anestesia com pentobarbital sódico a 3% (FANTINI *et al.*, 1987; BELKIN *et al.*, 1989; FANTINI & YOSHIOKA, 1993), sendo essa ainda uma droga de eleição para ratos e camundongos em cirurgia experimental. A via de administração foi a intraperitoneal (BELKIN *et al.*, 1989; YOKOTA *et al.*, 1989; FANTINI *et al.*, 1996), apesar da possibilidade de maior latência, devido a sua ampla aceitação e facilidade técnica.

Para se reproduzir um quadro de isquemia e reperfusão *in vivo*, optamos por um modelo de isquemia total, o que nos permitiu um confiável controle do afluxo de sangue para a extremidade em estudo, sem o imponderável da circulação colateral. Nesse modelo, todas as estruturas que compõem o membro foram seccionadas na raiz da coxa, com exceção do feixe vascular femoral e do fêmur, o que possibilitou

uma análise mais precisa dos resultados, quando comparados aos modelos de isquemia parcial (MORENO, 1992). Esse modelo mostrou-se simples, efetivo e reprodutivo.

Nos modelos de isquemia total, as ligaduras vasculares como as realizadas por PETRASEK *et al.* (1994), podem, ocasionalmente, manter algum fluxo sanguíneo. Os torniquetes (BUSHELL *et al.*, 1996), têm o inconveniente de não assegurarem uma drenagem venosa livre, enquanto que o modelo subcutâneo de LUDATSCHER *et al.* (1981), mantém o risco de fluxo proveniente da rede vascular subcutânea, muito rica em ratos. SKJELDAL *et al.* (1991), utilizou tubos de silicone para proteger o fluxo vículo-nervoso, mas não conseguiu evitar os artefatos de compressão. O modelo de reimplantação de membro (CONCANNON *et al.*, 1991), requer técnicas microcirúrgicas e acrescenta maior risco de complicações, como as trombozes vasculares.

Os modelos com músculo grácil isolado de cães (KORTHUIS *et al.*, 1985, 1988, 1989; PERRY & FANTINI, 1987; CHOUDHURY *et al.*, 1991; LINDSAY, 1994), não se adequaram a animais de pequeno porte.

Ao se optar por um modelo de membro inteiro, uma maior área para estudos foi obtida, incluindo maior massa muscular. Isso permitiu valores mais expressivos nos parâmetros avaliados, assim como um ponto anatômico favorável para o isolamento do feixe vículo-nervoso.

Vários autores já detectaram lesões de reperfusão com tempos de isquemia relativamente curtos. FORMIGLI *et al.* (1992) já observaram lesões de reperfusão, em pacientes submetidos à cirurgia de aneurisma de aorta, com tempo de oclusão aórtica variando de 45 a 60 minutos. Experimentalmente, essas lesões já foram observadas seguindo diferentes períodos isquêmicos, como 60 minutos (FANTINI *et al.*, 1987), 90 minutos (YOKOTA *et al.*, 1989), 2 horas (SEYAMA, 1993), 2 horas e meia (STROCK & MAJNO, 1969), 3 horas (BELKIN *et al.*, 1989; KAWASAKI *et al.*, 1993; FANTINI *et al.*, 1996), e 4 horas (RAHMER *et al.*, 1977; BEYERSDORF *et al.*,

1989; KORTHUIS *et al.*, 1989; SMITH *et al.*, 1989b; REIKERAS & YTREHUS, 1992; SARDINHA, 1994; BUSHELL *et al.*, 1996). Tempos de isquemia de 5 (CHOUDHURY *et al.*, 1991) e 6 horas (BLEBEA *et al.*, 1987; CONCANNON *et al.*, 1991), foram usados em músculo grácil de cães, enquanto RICCI *et al.* (1989), estudando síndrome compartimental, utilizaram tempo de isquemia de 8 horas.

Segundo estudos realizados por KAWASAKI *et al.* (1993), onde quantificaram o nível de ATP muscular de ratos submetidos à isquemia, o período de 4 horas foi longo o suficiente para que o depósito de ATP muscular estivesse reduzido a 3,5% daquele mensurado no grupo controle, denotando grande oferta de substrato para as reações de reperfusão. BEYERSDORF *et al.*, 1989, também registraram queda dos níveis de ATP (14,7% do controle) após este mesmo tempo isquêmico.

A queda do ATP celular durante a isquemia, foi relacionada por CRINNION *et al.* (1993), com a extensão da subsequente necrose muscular.

A porcentagem de necrose em músculo tibial anterior de ratos após 4 horas de isquemia foi quantificada por SKJELDAL *et al.* em 1991, chegando a 46% da área muscular e não foi observado fenômeno de não-refluxo com 2 horas de reperfusão, o que passou a ocorrer quando o período isquêmico se estendeu a 4 horas e meia.

Em coelhos, QUIÑONES-BALDRICH (1989), identificou queda de fluxo sanguíneo e fenômeno do não-refluxo em períodos superiores a 4 horas de isquemia.

Desta forma, optamos por um intervalo isquêmico que nos permitisse boa quantificação das lesões de peroxidação lipídica sem que tivéssemos o já citado não refluxo e extensa morte celular.

SANDERSON *et al.*, em 1975, demonstraram que em músculo esquelético, o tempo de reperfusão de 2 horas, após períodos de isquemia de 2 a 4 horas, leva a intensa reação inflamatória aguda com notável edema associado.

Apesar de alguns autores terem encontrado níveis mais elevados de produtos da peroxidação lipídica, medidos pelo teste do TBA, nos primeiros minutos após iniciada a reperfusão, outros autores encontraram valores ainda muito elevados e estatisticamente significantes, quando comparados aos controles, após 4 horas de isquemia seguidas por 2 horas de reperfusão. Tempo este, ainda necessário, para que os valores adicionais de CPK, oriundos de lesões de reperfusão, atingissem picos sorológicos (MORENO, 1992).

No presente trabalho, seguindo aqueles de KORTHUIS *et al.* (1985), MORENO (1992) e OREDSSON *et al.*, (1994), utilizamos 4 horas de isquemia, seguidas por 2 horas de reperfusão.

Optamos por injetar o CaNa_3DTPA 10 minutos antes da reperfusão uma vez que FAHEY *et al.* em 1961, testando diferentes doses e vias, demonstraram que sua absorção por via intramuscular é completa e rápida.

A dose utilizada de 50 mg/kg foi sugerida pessoalmente por Martin Scholz, à partir de trabalho em que doses que variaram de 6,25 a 100 mg/kg, foram utilizadas em cultura de células, sendo esta dose considerada não tóxica (CINATL *et al.*, 1996).

Como atributos, mensuramos o peso dos animais em cada momento, para análise de alteração em seu perfil, sujeito entre outros ao efeito diurético das drogas utilizadas.

A medida da circunferência do pé foi usada para avaliação indireta de edema no membro em cada momento estudado, e anteriormente já utilizada por MORENO (1992). Este autor comparou os resultados destas medidas com os da pletismografia de volume, demonstrando correlação entre as mesmas.

A dosagem de CPK plasmática, enzima citoplasmática que é exteriorizada com a morte celular, funciona como um marcador de lesão celular. A CPK é concentrada nas células musculares e, por esse motivo, uma indicadora de lesão de

isquemia-reperfusão em músculo esquelético bastante utilizada (CHOUDHURY *et al.*, 1991; REIKERAS & YTREHUS, 1992; SEYAMA, 1993). As amostras de sangue que apresentaram hemólise visível foram excluídas, uma vez que a lise de eritrócitos resulta em liberação da enzima adenilatoquinase e esta enzima pode causar uma aparente elevação de CPK no soro, quando essa é testada em mistura com adenosina difosfato (STATLAND & WINKEL, 1984). Foi encontrado por LAESSIG *et al.* (1976), em estudo de soro de indivíduos normais, que continha em torno de 1% de hemácias lisadas (3 g), um aumento de até 98% de CPK.

Utilizamos a dosagem do MDA, como medida indireta da peroxidação lipídica apesar deste teste apresentar algumas restrições como riscos de artefatos (KELLOG & FRIDOVICH, 1975), porque tem sido muito utilizado em vários modelos de isquemia-reperfusão (FANTINI & YOSHIOKA, 1993; SEYAMA, 1993; FANTINI *et al.*, 1996)

Para as biópsias realizadas, escolhemos o músculo *soleus*, por tratar-se de músculo de metabolismo aeróbico, rico em mitocôndrias e com alto consumo de ATP, portanto mais sensível aos mecanismos de isquemia-reperfusão (BEYERSDORF *et al.*, 1989; LOCKHART, 1972).

O estudo histológico foi realizado com microscopia de luz e com duas colorações específicas: hematoxilina-eosina e Ácido Periódico de Schiff. Na primeira, buscou-se ilustrar as alterações no conteúdo de água tecidual e inflamação. FORMIGLI *et al.* (1992), em estudo com isquemia variando de 45 a 60 minutos em humanos, verificaram grande infiltração granulocítica após 30 minutos de reperfusão.

As alterações nos vacúolos de glicogênio, representam esgotamento das fontes aeróbicas e ativação do mecanismo anaeróbico celular para produção de ATP (SARDINHA, 1994), substrato para a obtenção de energia via hipoxantina, com acúmulo de xantina oxidase e produção de radicais livres. À medida que ocorre a reperfusão, o metabolismo celular retoma as vias aeróbicas de produção energética, ao

mesmo tempo que sofre as agressões dos radicais livres circulantes. Neste ponto, as células ainda aptas retomam a produção e estocagem de glicogênio através do Ciclo de Cori. Assim, a coloração pelo P.A.S. nos traduz pela intensidade de glicogênio, a viabilidade celular, aqui representada pela integridade do retículo sarcoplasmático. Este método foi utilizado por SARDINHA (1994), em modelo de isquemia-reperfusão.

2. RESULTADOS

Embora não tenha havido diferença estatística para o peso dos animais entre os diferentes grupos e momentos, houve uma tendência à diminuição do peso dos animais em todos os grupos entre M1, M2 e M3 que creditamos à perda fisiológica durante esse período de 6 horas, sem reposição hídrica. Uma perda maior, porém também estatisticamente não significativa, foi observada no grupo isquemia/reperfusão com tratamento (G4), que pode ter sido devido ao possível efeito diurético do CaNa_3DTPA , administrado 10 minutos antes do término da isquemia, efeito já referido por MORGAN & SMITH (1974) e por ser sua excreção exclusivamente renal (CATSCH & HARMUTH-HOENE, 1975; PIPPARD *et al.*, 1986; ADAMS *et al.*, 1991).

Quanto às alterações de circunferência do pé ao longo do experimento, os animais do grupo G1 não apresentaram variações entre os momentos estudados. No grupo G2, houve uma tendência à discreta elevação entre os momentos M1 e M2, que pode ser consequência do ato cirúrgico, sem outras alterações significativas. Já nos grupos G3 e G4, ocorreu variação entre os momentos M2 e M3, quando houve um aumento de circunferência do pé, sendo estatisticamente significativo no grupo G3. Esse edema pode ser atribuído a lesões de reperfusão, tendo como causa provável o aumento de permeabilidade microvascular que ocorre nesse processo. No grupo G4, porém, esse aumento de circunferência não foi significativo, o que poderia ser devido ao efeito diurético do CaNa_3DTPA , minimizando o edema de reperfusão. Não podemos, porém, afastar um eventual efeito sobre o tecido revascularizado, diminuindo a permeabilidade vascular desde que esta permeabilidade sofre influência da presença de óxido nítrico que parece ser quelado pelo CaNa_3DTPA (KAZMIERSKI *et al.*, 1996).

Nas medidas de CPK, observamos aumento significativo dessa enzima nos animais dos grupos G3 e G4, quando comparados com o grupo G1. Os níveis

séricos de CPK nos animais do grupo G2, guardaram valores intermediários, sendo mais elevados do que no grupo G1, apesar de não apresentar diferença estatística, e menores do que nos grupos G3 e G4, sem significância com relação ao grupo G3, mas com valores significativamente menores quando comparados ao grupo G4. Esses resultados refletem indiretamente o grau de necrose muscular nos animais submetidos ao processo de isquemia e reperfusão, com valores mais altos nos animais do grupo G4, indicando que o CaNa_3DTPA não protegeu os animais da necrose muscular. Os valores obtidos dos animais do grupo G2, refletem provavelmente o componente do trauma cirúrgico.

Acreditamos que o CaNa_3DTPA , por não atravessar membranas celulares, pudesse apresentar vantagem sobre o DFA no tratamento de lesão de isquemia-reperfusão, sendo menos deletérico para o metabolismo celular do que a DFA (CINATL *et al.* 1996), entretanto, essa propriedade talvez o impeça de atuar a nível mitocondrial e de cadeia transportadora de elétrons, que como se sabe é importante fonte de RLO *in vivo* na maioria das células aeróbicas (HALLIWEL & GUTTERIDGE, 1989c).

Os resultados das medidas de MDA revelaram valores estatisticamente semelhantes entre os grupos, tanto para as alíquotas 0,2 como 0,4 ml. Porém, valores estatisticamente mais elevados, foram encontrados no músculo do membro posterior esquerdo (MPE) dos animais do grupo G3, onde a isquemia não foi provocada, quando comparados com o músculo do membro posterior direito (MPD) dos mesmos animais do grupo G3. O músculo do membro posterior esquerdo (MPE) dos animais do grupo G4, também apresentou valores de MDA mais elevados, porém devido a uma maior variação individual dos valores entre os animais do próprio grupo, não houve diferença estatisticamente significativa com o músculo do membro posterior direito (MPD). Esses resultados podem estar refletindo lesões resultantes de agressão secundária, já disseminada, causadas por produtos gerados no processo de isquemia e reperfusão

(MUKAI & GOLDSTEIN, 1976; PRYOR, 1978). Valores também altos no membro contralateral foram encontrados por SARDINHA (1994).

Importante considerar que o comportamento das medidas cromatográficas responde a reações seqüenciais que aparecem em forma de picos (LINDSAY *et al.*, 1988) e não como um resultado somatório. Assim, o momento da medida passa a ter grande importância na quantificação da biópsia única, uma vez que reflete apenas aquele momento, que eventualmente pode estar entre os picos ou na descendente. LINDSAY *et al.* (1988), encontraram, em biópsias musculares de cães submetidos a 3 e 5 horas de isquemia, que os níveis mais altos de dienes conjugados ocorreram nos primeiros minutos de reperfusão.

No presente trabalho poderíamos levantar a hipótese de já haver passado o pico de resposta primária no lado da lesão e estar ocorrendo mais tardiamente a resposta secundária no membro contralateral.

LINDSAY *et al.* (1988), observaram também, que o tempo de aparecimento de picos desses produtos de peroxidação variava de uma preparação para outra e que parecia ser dependente de muitos fatores: (1) durante a reperfusão, ocorreria uma variação, dentro do próprio músculo, na quantidade e distribuição do fluxo sanguíneo, variando assim a distribuição e oferta local de oxigênio, de forma que a formação de radicais livres lesivos não transcorreria de forma simultânea em todas as partes do músculo, e a consequência disso seria que a extensão da reperfusão poderia variar de um músculo para outro, ou de um animal para outro; (2) poderia também ocorrer uma resposta bifásica, envolvendo inicialmente a lesão mediada por radicais livres, seguida por um influxo secundário de neutrófilos, explicando o aparecimento de outros picos mais tardios de dienos conjugados; e (3) outro fator de variabilidade nas respostas, segundo os autores, seria a diferença na localização do sítio de biópsia dentro do próprio músculo, no sentido de que seria impossível prever a priori quais locais de biópsias, que apresentariam os sítios de lesões mais extensas.

Por outro lado, as lesões musculares pós-isquêmicas parecem ser de natureza multifatorial e os radicais livres participam como componentes de um processo maior. Além disso, os produtos de peroxidação lipídica por nós mensurados, representam só um estágio parcial num espectro mais amplo de produtos de oxidação dos lipídios gerados pela ação de radicais livres em membranas, sendo talvez necessária a mensuração dos demais produtos, para se ter uma noção mais exata do grau de peroxidação lipídica.

A observação de que alguns animais do grupo G1 apresentaram valores altos de MDA, que o aproximaram estatisticamente dos demais grupos, chamou-nos a atenção para a possibilidade de interação do anestésico utilizado, pentobarbital sódico, com a reação do ácido tiobarbitúrico, uma vez que à semelhança do fenobarbital, o pentobarbital sódico, durante sua metabolização sofre desulfuração e abre o anel do ácido barbitúrico (RALL, 1990).

As médias dos produtos de peroxidação lipídica do grupo G4, apesar de estatisticamente semelhantes aos demais grupos, foram elevadas, principalmente no músculo contralateral, podendo refletir até uma maior severidade das reações de peroxidação, não fosse a grande variação individual, desvio padrão, na resposta ao teste. De qualquer forma os valores individuais mais altos foram encontrados nos animais do grupo G4, que apresentaram também os valores mais altos de CPK, o que pode significar ausência de proteção do CaNa_3DTPA às lesões de necrose muscular e de peroxidação lipídica.

Outro ponto a ser discutido, uma possível toxicidade do CaNa_3DTPA .

CINATL *et al.* (1996), observaram uma maior afinidade de CaNa_3DTPA pelo Fe^{2+} . Comparando vários quelantes de ferro, BAKER & GEBICKI (1984), demonstraram a geração de OH^\cdot à partir de O_2 na presença de Fe^{2+} -DTPA. HAMAZAKI *et al.* (1989), também observaram os efeitos de quelantes de ferro na auto-

oxidação de Fe^{2+} e verificaram *in vitro* que o DTPA era capaz de iniciar importante auto-oxidação, com continuada reação de peroxidação lipídica.

O efeito espoliador do magnésio provocado pelo CaNa_3DTPA , também pode levar à inibição de formação do óxido nítrico, segundo PEARSON *et al.* (1998), em experimento com artérias coronárias de cães.

Esses efeitos tóxicos parecem também ser dependentes da dosagem empregada, desde que experiências anteriores já apontaram para uma provável resposta bifásica de quelantes de ferro, ou seja, em doses pequenas podem atuar como agentes quelantes. Em altas doses, entretanto, mais ferro é mobilizado e quelado de diferentes áreas, o que pode resultar em grande quantidade de ferro na forma de ferrioxamina, disponível para reações redox (BORG & SCHAICH, 1986). Desde que não havia experiência anterior de uso de CaNa_3DTPA em modelos de isquemia-reperfusão em músculos esqueléticos, talvez tenhamos usado doses suficientemente altas para produzir um efeito tóxico direto sobre as células (PIGOTT *et al.*, 1988; WATANABE *et al.*, 1993).

Outros estudos também relataram ausência de efeito ou até presença de efeito tóxico paradoxal da DFA em trabalhos de isquemia-reperfusão (BORG & SCHAICH, 1986; FLEISCHER *et al.*, 1987; BRAUGHLER *et al.*, 1988; PIGOTT *et al.*, 1988). *In vitro*, GRAF *et al.*, 1984, estudando outros quelantes como EDTA ou ADP, com afinidade menor pelo ferro, observaram que estes não impediram a formação de OH^\cdot . Esses quelantes podem inclusive promover a formação de OH^\cdot , por disporem temporariamente o ferro durante a transição entre os estados de ligação e não-ligação, ou por impedirem a hidrolização de íon férrico em condições de pH e de tensão de oxigênio fisiológicos (McCORD & DAY, 1978).

No estudo da microscopia de luz, corada pelo HE, não observamos alterações significativas no grupo G1 enquanto no grupo G2 houve presença de edema intersticial nos cortes do tecido muscular mas sem infiltrado inflamatório expressivo quando comparado aos grupos G3 e G4. No G3, a presença de edema intersticial foi

mais notável que nos outros grupos e o infiltrado inflamatório foi mais intenso no grupo G4. Não observamos alterações representativas nos membros contralaterais em nenhum dos grupos.

Na avaliação do P.A.S., positividade moderada foi observada nos grupos G1 e G2 , tendo sido um pouco maior no membro posterior direito o que foi compatível com o seu grau de integridade muscular, uma vez que não foram submetidas a isquemia ou reperfusão. Tanto no grupo G3 quanto no grupo G4, observou-se positividade discreta em ambos os membros estudados.

Ao analisarmos a presença de glicogênio nestes cortes, não podemos aferir sobre um efeito atenuante do CaNa_3DTPA sobre as lesões de isquemia e reperfusão, mas a semelhança de resultados entre os grupos G3 e G4, nos leva a pensar na não ocorrência de um efeito tóxico deste.

Apesar de indícios positivos, a utilização de drogas requer muita perspicácia, cautela e experimentação científica, até que suas interações e efeitos sejam conhecidos. Nossos resultados nos levaram a acreditar em interações outras, que podem contra-indicar a utilização deste quelante como atenuador de lesões de isquemia e reperfusão, contudo fica um grande terreno para especulações.

CONCLUSÃO

No modelo utilizado de isquemia-reperfusão em membro posterior de rato, o CaNa_3DTPA , na dosagem empregada, levou a menor edema do pé lesado, avaliado pela medida de sua circunferência, entretanto não interferiu nas medidas de CPK sérico e de MDA muscular, nem nas alterações morfológicas do músculo *soleus* observadas à microscopia de luz, utilizando as colorações com hematoxilina-eosina e ácido periódico de Schiff.

A reperfusão de membros submetidos à isquemia pode provocar graves alterações estruturais e de metabolismo tecidual, que se acompanham de altas taxas de mortalidade e de morbidade.

A peroxidação lipídica é considerada como sendo um dos principais mecanismos de lesão celular em tecidos pós-isquêmicos e o ferro tem sido reconhecido como potenciador nas reações de Fenton e Haber Weiss, que resultam na produção entre outros do radical $\text{OH}\cdot$, altamente lesivo para as membranas celulares.

As evidências de que a deferoxamina (DFA) e outros quelantes de ferro atenuaram lesões pós-isquêmicas numa variedade de sistemas orgânicos documentam a participação do ferro na patogênese da lesão tecidual pós-isquêmica.

O ácido trissódio-cálcio-dietilenotriaminopentaacético (CaNa_3DTPA), outro quelante de ferro com habilidade de quelar íons somente do espaço extracelular, parece ter ação menos deletéria ao metabolismo das células, que a quelação promovida pela DFA. Experimentos também relataram a sua potente ação anti-viral e propriedades antiinflamatórias e imunológicas.

Tendo em vista sua ação como quelante de ferro e seu provável papel na resposta inflamatória, já que crescem as evidências da participação lesiva de agentes pró-inflamatórios em tecidos pós-isquêmicos, foi realizado o presente trabalho com o objetivo de testar o efeito de CaNa_3DTPA na atenuação das lesões de isquemia-reperfusão em músculos esqueléticos.

Utilizamos 52 ratos, raça Wistar, pesando 188 ± 22 g, que foram anestesiados com pentobarbital intraperitoneal e submetidos a procedimento cirúrgico onde pele, tecido subcutâneo e músculos foram incisados, ficando intactos apenas fêmur, artéria e veia femorais.

Esses animais foram distribuídos de forma randomizada nos seguintes grupos: Grupo G1 – grupo controle anestesia, sem cirurgia e sem isquemia; Grupo G2 – grupo controle cirurgia, sem isquemia; Grupos G3 e G4 – com isquemia-reperfusão em que a artéria femoral foi clampeada por 4 horas. Após esse período, o clampe foi retirado, iniciando-se a fase de reperfusão por 2 horas, quando os animais foram submetidos à eutanásia. Os animais do grupo G3 foram tratados, ao final da isquemia, com solução de cloreto de sódio 0,9% e os do grupo G4 com CaNa_3DTPA .

Os parâmetros utilizados foram: peso; circunferência do pé, com o objetivo de se medir indiretamente o desenvolvimento de edema ao longo do experimento; dosagem sérica de CPK; dosagem muscular de malonaldeído e avaliação histológica de tecido muscular por microscopia de luz utilizando as colorações HE e PAS.

Resultados: observou-se aumento da medida da circunferência do pé nos grupos G3 e G4, estatisticamente significante no grupo G3 quando comparado ao grupo controle G1. As dosagens de CPK apresentaram-se elevadas nos grupos G3 e G4, submetidos à isquemia/reperfusão, com relação aos grupos controles. Nos resultados da dosagem de MDA, observaram-se valores mais altos no membro contralateral do grupo G4, quando comparados ao músculo reperfundido deste grupo e aos músculos do grupo G1. O estudo histológico (HE) constatou presença de edema intersticial maior no grupo G3 e infiltrado inflamatório significativo no grupo G4 e ao PAS, a recuperação dos níveis de glicogênio foram semelhantes nos grupos G3 e G4. Em conclusão, apesar do

menor aumento do edema no grupo G4, não houve influência do CaNa_3DTPA sobre as dosagens de CPK sérico, MDA muscular e alterações morfológicas da musculatura esquelética dos animais submetidos à isquemia/reperfusão.

SUMMARY

Acute ischemia and reperfusion of a limb, specially if revascularization is delayed, can induce tissue metabolic and structural changes that can lead to significant morbidity, mortality and amputation rates.

It has become increasingly apparent that the central events resulting in cellular injury occur primarily during reperfusion. On reestablishment of reperfusion to postischemic skeletal muscle, reactive oxygen metabolites are liberated, resulting in accelerated oxidative parenchymal injury, much of which is focused at the cellular membrane

Hydroxyl radicals generated from a reaction involving O_2^- and H_2O_2 via the superoxide-driven Fenton reaction, which is catalyzed by iron, readily attacks membrane-associated polyunsaturated fatty acids in a free radical process and is believed to be responsible for much of the resulting phospholipid peroxidation and loss of membrane integrity. This reactions suggests that oxygen-mediated damage could be blunted by limiting the availability of iron during reperfusion. Several reports have demonstrated that iron chelators may interfere with the iron-dependent formation of hydroxyl radicals and interrupt this process on reoxygenation in postischemic skeletal muscle.

$CaNa_3DTPA$, a hydrophilic extracellular chelator, binds iron and other ions from the extracellular spaces with extremely high affinity. Experiments have suggested that it could be less deleterious for cell metabolism than chelation from

intracellular compartments with others chelators, and that is a more potent anti-viral agent than DFO or BPD, with some immunological and anti-inflammatory properties.

In the present study we tested the hypothesis that administration of the iron chelator CaNa_3DTPA at the time of reflow after a period of global ischemia in a rat model of high-grade total acute hindlimb ischemia results in improved protection of skeletal muscle.

Fifty two male Wistar rats weighing 188 ± 22 were anesthetized with intraperitoneal pentobarbital, and the skin, subcutaneous tissue and muscles around the hip joint of the right hindlimb were incised. The femur and the femoral artery and vein were left intact.

The animals were randomly allocated in one of the following groups: Group G1- control anesthesia group, in which no surgery and no ischemia was induced. Group G2- control surgery group, in which no ischemia was produced. Groups G3 and G4, with ischemia/reperfusion, in which the femoral artery was closed by a microvascular clamp for four hours. After this period the clamp was withdrawn, and reperfusion of the limb was allowed for two hours, when the animals were killed. The animals of group G3 were treated with saline, 10 minutes before clamp release and those of the group G4, treated with CaNa_3DTPA .

Alterations were evaluated by the measurement of foot circumference to evaluate the presence and intensity of edema before the induction of ischemia, four hours later, and two hours after reperfusion. Muscle cells alterations were evaluated by the measurement of creatine-phosphokinase. Lipid peroxidation in skeletal muscle was assessed by determination of malondialdehyde by the thiobarbituric acid method.

Results: There was a significant post-ischemic increase in foot circumference of the animals treated with saline. CPK measurements were significantly increased in the animals with ischemia/reperfusion when compared to the animals of the controls groups, but there were no differences between the ischemic groups. MDA

measurements were increased in the left no-ischemic muscles of the animals treated with saline, when compared to contralateral muscles of this group and of control anesthesia group. The histological evaluation showed at H and E, inflammatory cell infiltrate in G4 and edema in G3. With PAS, the glycogen recovery was similar in both groups (G3 and G4).

In conclusion, there was less edema in the animals with ischemia-reperfusion treated group and there were no differences between the ischemia-reperfusion group and the controls groups in relations with CPK, MDA managements and histological alterations.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ADAMS, P.C., LIN, E., BARBER, K.R. *et al.* Enhanced biliary iron excretion with amphiphilic diethylenetriaminepentaacetic acid. *Hepatology*, v.14, n.6, p.1230-4, 1991.

AISEN, P., LISTOWSKY, I. Iron transport and storage proteins. *Ann. Rev. Biochem.*, v.49, p.367-93, 1980.

AMBROSIO, G., ZWEIER, J.L., JACOBUS, W.E. *et al.* Improvement of postischemic myocardial function and metabolism induced by administration of deferoxamine at the time of reflow: the role of iron in the pathogenesis of reperfusion injury. *Circulation*, v.76, n.4, p.906-15, 1987.

BABIOR, B.M. Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. *N. Engl. J. Med.*, v.298, p.659-68, 1978.

BAKER, M.S., GEBICKI, J.M. The effect of pH on the conversion of superoxide to hydroxyl free radicals. *Arch. Biochem. Biophysics*, v.254, n.1, p.258-64, 1984.

BALAS, P., BONATSOS, G., XEROMERITIS, N. *et al.* Early surgical results on acute arterial occlusion of the extremities. *J. Cardiovasc. Surg.*, v.26, p.262-9, 1985.

* UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. Coordenadoria Geral de Bibliotecas, Editora UNESP. Normas para publicações da UNESP. São Paulo: Editora UNESP, 1994. 4v. v.2: Referências Bibliográficas.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Comissão de Estudos de Documentação, Rio de Janeiro. Referências bibliográficas; NB-66. IN: Normas ABNT sobre documentação. Rio de Janeiro, 1989. p.13-30.

- BARKER, C., ROSATO, F., ROBERTS, B. Peripheral arterial embolism. *Surg. Gynec. Obstet.*, v.123, p.22-6, 1966.
- BATELLI, M.G. Enzymic conversion of rat liver xanthine oxidase from dehydrogenase (D Form) to oxidase (O Form). *FEBS. Lett.*, v.113, p.47-51, 1980.
- BEAUCHAMP, C., FRIDOVICH, I. A mechanism for the production of ethylene from methional. The generation of hydroxy radical by xanthine oxidase. *J. Bio. Chem.*, v. 245, p.4641-6, 1970.
- BECKMAN, J.S., BECKMAN, T.W., CHEN, J. *et al.* Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.87, p.1620-4, 1990.
- BELKIN, M., LAMORTE, M.L., WRIGHT, J.G., *et al.* The role of leukocytes in the pathophysiology of skeletal muscle ischemia injury. *J. Vasc. Surg.*, v.10, n.1, p.14-9, 1989.
- BEYERSDORF, F. Protection of the ischemic skeletal muscle. *Thorac. Cardiovasc. Surg.*, v.39, p.19-28, 1991.
- BEYERSDORF, F., MATHEIS, G., KRÜGER, S. *et al.* Avoiding reperfusion injury after limb revascularization.: Experimental observations and recommendations for clinical application. *J. Vasc. Surg.*, v.9, p.757-66, 1989.
- BILLIG, D.M., HALLMAN, G.L., COOLEY, D.A. Arterial embolism. Surgical treatment and results. *Arch. Surg.*, v.95, p.1-6, 1967.
- BIRD, R.P., DRAPER, H.H. Comparative studies on different methods of malondialdehyde determination. *Methods Enzymol.*, v.105, p.299-305, 1984.

- BJÖRK, J.; ARFORS, K.E. Oxygen radicals and leucotriene B₄ induced increase in vascular leakage by PMN-leukocytes. *Agents Actions*, v.11, suppl.1, p.63-73, 1984.
- BLEBEA, J., KERR, B.A., SHUMKO, J.Z. *et al.* Quantitative histochemical evaluation of skeletal muscle ischemia and reperfusion injury. *J. Surg. Res.*, v.43, p.311-21, 1987.
- BLEBEA, J., BACIK, B., STROTHMAN, G. *et al.* Decreased nitric oxide production following extremity ischemia and reperfusion. *Am. J. Surg.*, v.172, n.2, p.158-61, 1996.
- BOLLI, R., PATEL, B.S., JEROUDI, M.O. *et al.* Iron-mediated radical reactions upon reperfusion contribute myocardial "stunning". *Am. J. Physiol.*, v.259, p.H1901-1, 1990.
- BORG, D.C., SCHAICH, K.M. Pro-oxidant action of desferrioxamine: fenton like production of hydroxyl radicals by reduced ferrioxamine. *J. Free Rad. Biol. Med.*, v. 2, p.237, 1986.
- BRAUGHLER, J.M., CHASE, R.L., PREGENZER, J.F. Stimulation and inhibition of iron dependent lipid peroxidation by desferrioxamine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.153, p.933, 1988.
- BRAWN, K., FRIDOVICH, I. Superoxide radical and superoxide dismutases: threat and defense. *Acta Physiol. Scand. Suppl.*, v.492, p.9-18, 1980.
- BRIDGES, K.R., CUDKOWICZ, A. Effect of iron chelators on the transferrin receptor in K562 cells. *J. Biol. Chem.*, v.259. p.12970-7, 1984.
- BUEGE, J.A., AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.*, v.52, p.302-10, 1978.

- BUSHELL, A., KLENERMAN, L., DAVIES, H. *et al.* Ischemia-reperfusion-induced muscle damage. Protective effect of corticosteroids and antioxidants in rabbits. *Acta Orthop. Scand.*, v.67, n.4, p.393-8, 1996.
- CATSCH, A., HARMUTH-HOENE, A-E. New developments in metal antidotal properties of chelating agents. *Biochem. Pharmacol.*, v.24, p.1557-1562, 1975.
- CECCHINI, R., ARUOMA, O.I., HALLIWELL, B. The action of hydrogen peroxide on the formation of thiobarbituric acid-reactive material from microsomes or from DNA damage by beomycin or phenanthroline: artefacts in the thiobarbituric acid test. *Free Rad. Res. Comms.*, v. 10, n. 4-5, p. 245-58, 1990.
- CHABEREK, S., MARTELL, A.E. *Organic sequestering agents*. New York: John Wiley & Sons. Inc., 1959. p. 572-80.
- CHEVION, M.Y.J., HAR-EL, R., BERENSHTEIN, E. *et al.* Copper and iron are mobilized following myocardial ischemia: possible predictive criteria for tissue injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.90, p.1102-6, 1993.
- CHIAO, J.J.C., KIRSCHNER, R.E., FANTINI, G.A. Iron delocalization occurs during ischemia and persists on reoxygenation of skeletal muscle. *J. Lab. Clin. Med.*, v.124, p. 432-8, 1994.
- CHOUDHURY, N.A., SAKAGUCHI, S., KOYANO, K. *et al.* Free radical injury in skeletal muscle ischemia and reperfusion. *J. Surg. Res.*, v.51, n.5, p.392-8, 1991.
- CINATL, J.Jr., HOFFMANN, F., CINATL, J. *et al.* In vitro inhibition of human cytomegalovirus replication by calcium trisodium diethylenetriaminepentaacetic acid. *Antiviral Res.*, v.31, n.1-2, p.23-34, 1996.

- CLETON, F., TURNBULL, A., FINCH, C.A. *et al.* Synthetic chelating agents in iron metabolism. *J.Clin. Invest.*, v. 42, n.3, p.327-37, 1963.
- CONCANNON, M.J., DOOLEY, T.W., PUCKETT, C.L. Improved survival in a replantation model containing ischemic muscle. *Microsurgery*, v.12, n.1, p.18-22, 1991.
- CORMIER, J.M., DEVIN, R. Traitement des obliterations arterielles aigues des membres. *J. Chir.*, v.98, p.101-28,1969.
- CRINNION, J.N., HOMER-VANNIASINKAM, S., GOUGH, M.J. Skeletal muscle reperfusion injury: pathophysiology and clinical considerations. *Cardiovasc. Surg.*, v.1, n.4, p.317-24, 1993.
- CRINNION, J.N., HOMER-VANNIASINKAM, S., PARKIN, S.M. *et al.* Role of neutrophil-endothelial adhesion in skeletal muscle reperfusion. *Br. J. Surg.*, v.83, n.2, p.251-4, 1996.
- DE JONG, M., BAKKER, W.H., BREEMAN, W.A. *et al.* Pre-clinical comparison of [DTPAO] octreotide, [DTPAO, Tyr3] octreotide and [DOTAO,Tyr3] octreotide as carriers for somatostatin receptor-targeted scintigraphy and radionuclide therapy. *Int. J. Cancer*, v. 74, n3, p.406-11, 1998.
- DEL MAESTRO, R.F. An approach to free radicals in medicine and biology. *Acta Physiol. Scand.*, v.492, p.153-68, 1980.
- DORION, D., ZHONG, A., CHIU, C. *et al.* Role of xanthine oxidase in reperfusion injury of ischemic skeletal muscles in the pig and human. *J. Appl. Physiol*, v.75, n.1, p.246-55, 1993.

- EIGLER, F.W., KRISTEN, H., STOCK, W. *et al.* The proteinase inhibitor trasyolol as therapeutic principle in the tourniquet syndrome. *Bull. Soc. Int. Chir.*, v.29, n.4, p.197-203, 1970.
- EKLÖF, B. NEGLÉN, P., THOMSON, D. Temporary incomplete ischemia of the legs induced by aortic clamping in man: effects on central hemodynamics and skeletal muscle metabolism by adrenergic block. *Ann. Surg.*, v.193, p.89-98, 1981.
- ENGLER, R. L., DAHLGREN, M.D., MORRIS, D.D. *et al.* Role of leukocytes in response to acute myocardial ischemia and reflow in dogs. *Am. J. Physiol.*, v.251, p.H314-23, 1986.
- ERIKSSON, I., HOLMBERG, J. Analysis of factors affecting limb salvage and mortality after embolectomy. *Acta Chir. Scand.*, v.143, p.237-40, 1977.
- FAHEY, J.L., RATH, C.E., PRINCIOTTO, J.V. *et al.* Evaluation of trisodium calcium diethylenetriaminepentaacetate in iron storage disease. *J. Lab. Clin. Med.*, v.57, p.436-48, 1961.
- FANTINI, G.A., YOSHIOKA, T. Deferoxamine prevents lipid peroxidation and attenuates reoxygenation injury in postischemic skeletal muscle. *Am. J. Physiol.*, v. 264, p. H1953-H1959, 1993.
- FANTINI, G.A., KIRSCHNER, R.E., CHIAO, J.J.C. Reperfusion injury of postischemic skeletal muscle is attenuated by the 21-aminosteroids U-74389F and U-74500A independent of iron binding. *Surg.*, v.120, n.5, p.859-65, 1996.
- FANTINI, G.A., MINEI, J.P., PERRY, M.O. *et al.* Reperfusion with superoxide dismutase improves cellular membrane function in postischemic skeletal muscle. *Surgical Forum*, v.38, p.317-9, 1987.

- FLEISCHER, J.D., LANIER, W.L., MILDE, J.H., *et al.* Failure of deferoxamine, an iron chelator, to improve neurological outcome following complete cerebral ischemia in dogs. *Stroke*, v.18, p. 124, 1987.
- FOGARTY, T.J., DAILY, P., SHUMWAY, N. *et al.* Experience with balloon catheter technic for arterial embolectomy. *Am. J. Surg.*, v.122, p. 231-7, 1971.
- FORMIGLI, L., LOMBARDO, L.D., ADEMBRI, C., *et al.* Neutrophils as mediators of human skeletal muscle ischemia-reperfusion syndrome. *Hum. Pathol.*, v.23, n.6, p.627-34, 1992.
- FRANCISCO JR., J. *Embolectomia arterial tardia*. São Paulo, 1983. Dissertação (Mestrado) - Escola Paulista de Medicina.
- FRIDOVICH, I. The biology of oxygen radicals. *Science*, v.201, p.875-80, 1978.
- FRIEDL, H.P., SMITH, D.J., TILL, G.O. *et al.* Ischemia-reperfusion in humans. Appearance of xanthine oxidase activity. *Am. J. Pathol.*, v.136, n.3, p.491-5, 1990.
- FURCHGOTT, R.F., CARVALHO, M.H., KHAN, M.T. *et al.* Evidence of endothelium-dependent vasodilation of resistance vessels by acetylcholine. *Blood Vessels*, v.24, n.3, p.145-9, 1987.
- FURLONG, B., HENDERSON, A.H., LEWIS, M.J. *et al.* Endothelium-derived relaxing factor inhibits in vitro platelet aggregation. *Br. J. Pharmacol.*, v.90, n.4, p.687-92, 1987.
- GOLDSPINK, G. Postembryonic growth and differentiation of striated muscle. In: BOURNE, G.H. *The structure and function of muscle*. New York: Academic Press, 1972, cap. 5, p.179-228.

- GOWER, J.D., HEALING, G., FULLER, B.J. *et al.* Iron redistribution and lipid peroxidation in the cold ischaemic kidney. *Adv. Exp. Med. Biol.*, v.264, p.393-6, 1990.
- GRAF, E., MAHONEY, J.R., BRYANT, R.G. *et al.* Iron-catalyzed hydroxyl radical formation: stringent requirement for free iron coordination site. *J. Biol. Chem.*, v.259, p.3620, 1984.
- GRANGER, D.N., RUTILI, G., Mc CORD, J.M. Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. *Gastroenterology*, v.81, p. 22-30, 1981.
- GREEN, R.N., DE WEESE, J.A., ROB, C.G. Arterial embolectomy before and after the fogarty catheter. *Surg.*, v.77, p. 24-33, 1975.
- GRYGLEWSKI, R.J., PALMER, R.M., MONCADA, S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature*, v.320, n.6061, p.454-6, 1986.
- GRISHAM, M.B., HERNANDEZ, L.A., GRANGER, D.N. Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischemia. *Am. J. Physiol.*, v.251, p.G567-74, 1986.
- GUTTERIDGE, J.M.C., RICHMOND, R., HALLIWELL, B. Inhibition of the iron-catalyzed formation of hydroxyl radicals from superoxide and lipid peroxidation by desferrioxamine. *Biochem. J.*, v.184, p.469-72, 1979.
- HAIMOVICI, H. Arterial embolism with acute massive ischemic myopathy and myoglobinuria. *Surg.*, p.739-47, 1960.
- HAIMOVICI, H. Myopathic-nephrotic-metabolic syndrome associated with massive acute arterial occlusions. *J. Cardiovasc. Surg.*, v.14, p.589-600, 1973.

- HALLET, J.W., GREENWOOD, L.H., ROBSON, J.G. Lower extremity arterial disease in young adults. *Ann. Surg.*, v.202, p.647-52, 1985.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. *Mol. Aspects Med.*, v.8, p.89-193, 1985.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. Lipid peroxidation: a radical chain reaction. In: _____. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford: Clarendon Press, 1989a, cap. 4, p.188-276.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. Oxygen is poisonous: an introduction to oxygen toxicity and free radicals. In: _____. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford: Clarendon Press, 1989b. cap. 1, p.1-21.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. Protection against oxidants in biological systems: the superoxide theory of oxygen toxicity. In: _____. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford: Clarendon Press, 1989c. cap. 1, p.86-186.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. The chemistry of oxygen radicals and other oxygen-derived species. In: _____. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford: Clarendon Press, 1989d. cap. 2, p.22-58.
- HAMAZAKI, S., OKADA, S., LI, J.L., *et al.* Oxygen reduction and lipid peroxidation by iron chelates with special reference to ferric nitrilotriacetate. *Arch. Biochem. Bioph.*, v.272, n.1, p.10-7, 1989.
- HANSSON, R.O, JONSSON, O., LUNDSTAM, S. *et al.* Effects of free radical scavengers on renal circulation after ischemia in the rabbit. *Clin. Sci.*, v.65, p.605-10, 1983.

- HEARSE, D.J., MANNING, A.S., DOWNEY, J.M. *et al.* Liver xanthine oxidase: a critical mediator of myocardial injury during ischemia and reperfusion. *Acta Physiol. Scand. Suppl.*, v.548, p.65-78, 1986.
- HIMEYER, V., SCHOOP, W., WINCKELMANN, G. Erfahrungen mit der thrombolytischen behandlung akuter verschlüsse von extremitätenarterien. *Med. Klin.*, v.60, p.583-6, 1965.
- HIRNER, A., HARING, R., HOFMEISTER, M. Acute mesenteric vascular occlusions. *Chirurg.*, v. 58, suppl.9, p. 577-84, 1987.
- HOCHSTEIN, P., NORDENBRAND, K., ERNSTER, L. Evidence for the involvement of iron in the ADP-activated peroxidation of lipids in microsomes and mitochondria. *Biochem. Biophys. Res.*, v.14, p.323-8, 1964.
- HOLT, S., GUNDERSON, M., JOYCE, K. *et al.* Myocardial tissue iron delocalization and evidence for lipi peroxidation after two hours of ischemia. *Ann. Emerg. Med.*, v.15, p.1155-9, 1986.
- INAUEN, W., SUZUKI, M., GRANGER, D.N. Mechanisms of cellular injury: potencial sources of oxygen free radicals in ischemia/reperfusion. *Microcir. Endoth. Lymphatics*, v.5, p. 143-55, 1989.
- INBERG, M.V., SCHEININ, T.M., VÄNTTINEN, E.A. Surgical experiences in acute peripheral ischemia. *J. Cardiovasc. Surg.*, v.11, p.114-21, 1970.
- KARASAWA, A., GUO, J.P., MA, X.L. *et al.* Protective actions of a leukotriene B4 antagonist in splanchnic ischemia and reperfusion in rats. *Am. J. Physiol.*, v.261, p.G191-8, 1991.

- KAWASAKI, S., SUGIYAMA, S., ISHIGURO, N. *et al.* Implication of superoxide radicals on ischemia-reperfusion-induced skeletal muscle injury in rats. *Eur. Surg. Res.*, v.25, n.3, p.129-36, 1993.
- KAZMIERSKI, W.M., WOLBERG, G., WILSON, J.G. *et al.* Iron chelates bind nitric oxide and decrease mortality in an experimental model of septic shock. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.93, p.9138-41, 1996.
- KELLOG, E.W., FRIDOVICH, I. Superoxide, hydrogen peroxide and singlet oxygen in lipid peroxidation by a xanthine oxidase system. *J. Biol. Chem.*, v.250, p.8812-7, 1975.
- KIRSCHNER, R.E., FANTINI, G.A. Role of iron and oxygen-derived free radicals in ischemia-reperfusion injury. *J. Am. Col. Surg.*, v.179, p.103-17, 1994.
- KOMARA, J.S., NAYINI, N.R., BIALICK, H.A. *et al.* Brain iron delocalization and lipid peroxidation following cardiac arrest. *Ann. Emerg. Med.*, v.15, p.384-9, 1986.
- KORTHUIS, R.J., GRISHAM, M.B., GRANGER, D.N. Leukocyte depletion attenuates vascular injury in postischemic skeletal muscle. *Am. J. Physiol.*, v.254, n.5, p.H823-7, 1988.
- KORTHUIS, R.J., SMITH, J.K., CARDEN, D.L. Hypoxic reperfusion attenuates postischemic microvascular injury. *Am J. Physiol.*, v.256, p.H315-9, 1989.
- KORTHUIS, R.J., GRANGER, D.N., TOWNSLEY, M.I. *et al.* The role of oxygen-derived free radicals in ischemia-induced increases in canine skeletal muscle vascular permeability. *Circ. Res.*, v.57, p.599-609, 1985.
- KRAUSE, R.J., CRANLEY, J., STRASSER, E.S. *et al.* Further experience with a new embolectomy catheter. *Surg.*, v.59, p. 81-7, 1966.

- KRAUSE, G.S., JOYCE, K.M., NAYINI, N.R., *et al.* Cardiac arrest and resuscitation: brain iron delocalization during reperfusion. *Ann. Emerg. Med.*, v.14, p.1037-43, 1985.
- KUBES, P., SUZUKI, M., GRANGER, D.N. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.88, p.4651-5, 1991.
- LAESSIG, R.H., HASSEMER, D.J., PASKEY, T.A. *et al.* The effects of 0.1 and 1.0 per cent erythrocytes and haemolysis on serum chemistry values. *Am. J.Clin. Pathol.*, v.66, n.4, p.639-44, 1976.
- LANGER, B. Radicais livres, isquemia e inflamação. *Rev. Paul. Med.*, v. 104, suppl. 6, p.305-10, 1986.
- LARCAN, A., MATHIEU, P., HELMER, J. *et al.* Severe metabolic changes following delayed revascularization: legrain-cormier syndrome. *J. Cardiovasc. Surg.*, v. 14, p.609-14, 1973.
- LE, C.T., HOLLAAR, L., VAN DER VALK, E.J.M. *et al.* Desferrioxamine protects myocytes against peroxide-induced myocyte damage without affecting glutathione redox cycle turnover. *J. Mol. Cell Cardiol.*, v.26, p. 877-87, 1994.
- LEFER, D.J., NAKANISHI, K., JOHNSTON, W.E. *et al.* Antineutrophil and myocardial protecting actions of a novel nitric oxide donor after acute myocardial ischemia and reperfusion in dogs. *Circulation*, v.88, n.1, p.2337-50, 1993.
- LEPORE, D.A., KNIGHT, K.R., STEWART, A.G. *et al.* Platelet-activating factor (PAF) receptor antagonism by WEB 2170 improves the survival of ischaemic skeletal muscle. *Ann. Acad. Med.*, v. 24, n.4, p.63-7, 1995.

- LEVY, J.F., BUTCHER, H.R. Arterial emboli: an analysis of 125 patients. *Surg.*, v.68, p.968-73, 1970.
- LINDSAY, T.F. The in vivo gracilis muscle model of skeletal muscle ischemia. *J. Invest. Surg.*, v.7, n.1, p.17-26, 1994.
- LINDSAY, T., WALKER, P.M., MICKLE, D.A.G. *et al.* Measurement of hydroxy-conjugated dienes after ischemia-reperfusion in canine skeletal muscle. *Am. J. Physiol.*, v.254, p.H578-83, 1988.
- LOCKHART, R.D. Anatomy of muscles and their relation to movement and posture. In: BOURNE, G.H. *The Structure and Function of Muscle*. New York: Academic Press, 1972. cap. 1, p.1-21.
- LONG, J.W. Jr., LASTER, J.L., STEVENS, R.P. *et al.* Postischemic reperfusion injury in skeletal muscle: role of oxygen free radicals. *Surg. Forum*, v.39, p.342-4, 1988.
- LOWRY, O.H., ROSENBROUGH, N.S., FARR, A.L. *et al.* Protein measurement with folin phenol reagent. *J. B. C.*, v.193, p.265-75, 1951.
- LUDATSCHER, R.M., HASHMONAI, M., MONIES-CHASS, I. *et al.* Progressing alterations in transient ischemia of skeletal muscles: an ultrastructural study. *Acta Anatomica*, v.111, n.4, p.320-7, 1981.
- MAC GOWAN, W.A.; MOONEERAM, R. A review of 174 patients with arterial embolism. *Br J. Surg.*, v.60, p.894-8, 1973.
- MATHEIS, G., SHERMAN, M.P., BUCKBERG, G.D. *et al.* Role of L-arginine-nitric oxide pathway in myocardial reoxygenation injury. *Am. J. Physiol.*, v.262, p.H616-20, 1992.

- McCALL, T., WHITTLE, B.J.R., BROUGHTON-SMITH, N.K. *et al.* Inhibition of FMLP-induced aggregation of rabbit neutrophils by nitric oxide. *Br. J. Pharmacol.*, v.95, p.617P, 1988.
- McCORD, J.M. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N. Engl. J. Med.*, v.312, n.3, p.159-63, 1985.
- McCORD, J.M., DAY, E.D. Jr. Superoxide-dependent production of hydroxyl radicals catalyzed by the iron-EDTA complex. *FEBS Lett.*, v. 86, p.139, 1978.
- McCORD, J.M., FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte (hemocuprein). *J. Biol. Chem.*, v.254, p.6049-55, 1969.
- McKELVEY, T.G., HOLLWARTH, M.E., GRANGER, D.N. *et al.* Mechanisms of conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase in ischemic rat liver and kidney. *Am. J. Physiol.*, v.254, p. G753-60, 1988.
- MENGER, M.D., MESSMER, K. Die mikro-zirkulation des skelettmuskels nach ischämie und re-perfusion. *Wiener Medizinische Wochenschrift*, v.143, n.7-8, p.148-58, 1993.
- METCALFE, W.J. Arterial embolism in the lower limbs. *Ann. Roy. Coll. Surg. Engl.*, v.27, p. 407-26, 1960.
- MONTRUCCHIO, G., ALLOATTI, G., MARIANO, F. *et al.* Role of platelet-activating factor in the reperfusion injury of rabbit ischemic heart. *Am. J. Pathol.*, v.137, n.1, p.71-83, 1990.
- MORENO, J.B. *Efeito do alfatocoferol na atenuação de lesões de isquemia-reperusão em membro posterior de ratos.* Botucatu, 1992. Dissertação (Mestrado em Cirurgia) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

- MORGAN, R.M., SMITH, H. Histological changes in kidney, liver and duodenum of the mouse following the acute and subacute administration of diethylenetriaminepentaacetic acid. *Toxicology*, v. 2, suppl. 2, p.153-63, 1974.
- MUKAI, RH., GOLDSTEIN, B.D. Mutagenicity of malonaldehyde, a decomposition product of peroxidized polyunsaturated fatty acids. *Science*, v.191, p.868-9, 1976.
- MULLER-EBERHARD, U., ERLANDSON, M.E., GLINN, H.E. *et al.* Effect of trisodium calcium diethylenetriaminepentaacetate on bivalente cations in thalassemia major. *Blood*, v.22, p.209-17, 1963.
- NAKANISHI, K., VINTEN-JOHANSEN, J., LEFER, D.J. *et al.* Intracoronary L-Arginine during reperfusion improves endothelial function and reduces infarct size. *Am. J. Physiol.*, v.263, p.H1650-8, 1992.
- OMAR, R., NOMIKOS, I., PICCORELLI, G. *et al.* Prevention of postischemic lipid peroxidation and liver cell injury by iron chelation. *Gut*, v.30, p.510-4, 1989.
- OREDSSON, S., PLATE, G., QVARFORDT, P. Experimental evaluation of oxygen free radical scavengers in the prevention of reperfusion injury in skeletal muscle. *Eur. J. Surg.*, v.160, n. 2, p. 97-103, 1994.
- PALLER, M.S., HEDLUND, B.E. Role of iron in postischemic renal injury in the rat. *Kidney Int.*, v.34, p.474-80, 1988.
- PARKS, D.A., GRANGER, D.N. Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology. *Acta. Physiol. Scand. Suppl.*, v.548, p.87-99, 1986.

- PEARSON, P.J., EVORA, P.R., SECCOMBE, J.F. *et al.* Hypomagnesemia inhibits nitric oxide release from coronary endothelium: protective role of magnesium infusion after cardiac operations. *Ann. Thorac. Surg.*, v.65, n.4, p.967-72, 1998.
- PERRY, M.O., FANTINI, G. Ischemia: profile of an enemy: reperfusion injury of skeletal muscle. *J. Vasc. Surg.*, v.6, p. 231-4, 1987.
- PETERS, G., KEBERLE, H., SCHMID, K. *et al.* Distribution and renal excretion of desferrioxamine and ferrioxamine in the dog and in the rat. *Biochem. Pharmacol.*, v.15, n.1, p. 93-109, 1966.
- PETRASEK, P.F., HOMER-VANNIASINKAM, S., WALKER, P. M. Determinants of ischemic injury to skeletal muscle. *J. Vasc. Surg.*, v.19, n.4, p.623-31, 1994.
- PIGOTT, J.P., DONOVAN, D.L., FINK, J.A. *et al.* Experimental pharmacologic cerebroprotection. *J. Vasc. Surg.*, v.7,p. 625, 1988.
- PIPPARD, M.J., JACKSON, M.J., HOFFMAN, K. *et al.* Iron chelation using subcutaneous infusion of diethylene triamine penta-acetic acid (DTPA). *Scand. J. Haematol.*, v.36, p.466-72, 1986.
- POLI, G., ALBANO, E., DIANZANI, M.U. The role of lipid peroxidation in liver damage. *Chem. Phys. Lipids*, v. 45, p.117, 1987.
- PRESTA, M., RAGNOTTI, G. Quantification of damage to striated muscle after normothermic or hypothermic ischemia. *Clin. Chem.*, v.27, p.297-302, 1981.
- PRYOR, W.A. The formation of free radicals and the consequences of their reactions in vivo. *Photochem. Photobiol.*, v.28, n.4-5, p.787-801, 1978.

- QUIÑONES-BALDRICH, W.J. The role of fibrinolysis during reperfusion of ischemic skeletal muscle. *Microcirc. Endoth. Lymphatics*, v.5, p.299-314, 1989.
- RABL, H., KHOSCHSORUR, G., PETEK, W. Antioxidative vitamin treatment: effect on lipid peroxidation and limb swelling after revascularization operations. *World J. Surg.*, v.5, n.19, p.738-44, 1995.
- RAHMER, H., DURST, J., SCHUBERT, G.E. Correlation between local oxygen tension in muscle tissue and survival time in tourniquet shock. *Circ. Shock.*, v.4, n.1, p.35-40, 1977.
- RALL, T.W. Hypnotics and sedatives: ethanol. In: GILMAN, A.G., RALL, T.W., NIES, A.S., *et al.* *The pharmacological basis of therapeutics*. New York: McMillan Publishing Co., 1990. cap. 17, p.345-82.
- REIKERAS, O., YTREHUS, K. Oxygen radicals and scavenger enzymes in ischaemia-reperfusion injury of skeletal muscle. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, v.52, n.2, p.113-8, 1992.
- RICCI, M.A., GRAHAM, A.M., CORBISIERO, R. *et al.* Are free radical scavengers beneficial in the treatment of compartment syndrome after acute arterial ischemia? *J. Vasc. Surg.*, v.9, n.2, p.244-50, 1989.
- ROBBINS, S.L., COTRAN, R.S., KUMAR, V. Lesão e adaptação celulares. In: _____. *Patologia Estrutural e Funcional*, 3ed. Rio de Janeiro: Interamericana, 1986. cap.1, p.1-37.
- ROBERTS, J. P., PERRY, M.O., HARIRI, R.J., *et al.* Incomplete recovery of muscle cell function following partial but not complete ischemia. *Circ. Shock*, v.17, p.253-8, 1985.
- ROBINSON, E., HEDLUND, B. Role of iron in ischemia and reperfusion. *Circ. Shock*, v. 27, p. 367, 1989.

- ROUSER, G., NELSON, G.J., FLEICHER, S. *et al.* Lipid composition of animal cell membranes, organelles and organs. In: CHAPMAN, D. *Biological membranes: physical fact and function*. New York: Academic Press, 1968. v.1, p.5-69.
- ROY, R.S., McCORD, J.M. Superoxide and ischemia: conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase. In: GREENWALD, R.A., COHEN, G. *Oxy radicals and their scavenger systems*. New York: Elsevier/North Holland Biomedical Press, 1983. v.2, p.14-153.
- RUBIN, B.B., SMITH, A., LIAUW, S. *et al.* Complement activation and white cell sequestration in post-ischemic skeletal muscle. *Am. J. Physiol.*, v.259, p.H525-31, 1990.
- SANDERSON, R.A, FOLEY, R.K., McIVOR, G.W.D. *et al.* Histological response on skeletal muscle to ischemia. *Clin. Ortho. Relat. Res.*, v.113, p.27-35, 1975.
- SARDINHA, W.E. *Isquemia e reperfusão da musculatura esquelética em ratos*. Inibição das lesões lipoperoxidativas mediadas por radicais livres pela deferoxamina. São Paulo, 1994. Tese (Doutorado) - Escola Paulista de Medicina.
- SATIANI, B., GROSS, W.S., Evans, W.E. Improved limb salvage after arterial embolectomy. *Ann. Surg.*, v.188, p.153-7, 1978.
- SATO, H., ZHAO, Z-Q, McGEE, D.S. *et al.* Supplemental L-Arginine during cardioplegic arrest and reperfusion avoids regional postischemic injury. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, v.110, p.302-14, 1995.
- SATO, H., ZHAO, Z-Q, VINTEN-JOHANSEN, J. L-Arginine inhibits neutrophil adherence and coronary artery dysfunction. *Cardiovasc. Res.*, v.31, p.63-72, 1996.

- SCHLEGEL, J.U., HALIKIOPOULOS, H.L., PRIMA, R. Determination of filtration fraction using the gamma scintillation camera. *J. Urol.*, v.122, n.4, p.447-50, 1979.
- SCHOLZ, M., BLAHETA, R.A., MARKUS, B.H. *et al.* Immunomodulation and anticytomegalovirus activity of antioxidant metal chelators. *Transplant Proc.*, v.29, n.1-2, p.1272-3, 1997.
- SEYAMA, A. The role of oxygen-derived free radicals and the effect of free radical scavengers on skeletal muscle ischemia/reperfusion injury. *Surg. Today*, v.23, n.12, p.1060-7, 1993.
- SILVERS, L.W., ROYSTER, T.S., MULCARE, R. J. Peripheral arterial emboli and factors in their recurrence rate. *Ann. Surg.*, v.192, p.232-6, 1980.
- SKJELDAL, S., GRØGAARD, B., REIKERÄS, O. Model for skeletal muscle ischemia in rat hindlimb: evaluation of reperfusion and necrosis. *Eur. Surg. Res.*, v.23, p.355-65, 1991.
- SMITH, J.K., CARDEN, D.L., GRISHAM, M.B. *et al.* Role of iron in postischemic microvascular injury. *Am. J. Physiol.*, v.256, p.H1472-7, 1989a.
- SMITH, J.K., GRISHAM, M.B., GRANGER, D.N. *et al.* Free radicals defense mechanisms and neutrophil infiltration in postischemic skeletal muscle. *Am. J. Physiol.*, v.256, p.II789-93, 1989b.
- SPENCER, K.T., LINDOWER, P.D., BUETTNER, G.R., *et al.* Transition metal chelators reduce directly measured myocardial free radical production during reperfusion. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, v.32, p.343-8, 1998.

- STAHL, G.L., TERASHITA, Z., LEFER, A.M. Role of platelet activating factor in propagation of cardiac damage during myocardial ischemia. *J. Pharmacol. Exper. Therap.*, v.244, n.3, p.898-904, 1988.
- STATLAND, B.E., WINKEL, P. Pre-instrumental sources of variation. In: HENRY, J.B. *Clinical diagnosis and management by laboratory methods*. 17ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1984. cap.5, p.61-73.
- STROCK, P.E., MAJNO, G. Microvascular changes in acutely ischemic rat muscle. *Surg. Gynecol. Obstet.*, v.129, n.6, p.1213-24, 1969.
- TANG, L.X., YANG, J.L., SHEN, X. Effects of additional iron-chelators on Fe⁽²⁺⁾-initiated lipid peroxidation: evidence to support the Fe²⁺...Fe³⁺ complex as the initiator. *J. Inorg. Biochem.*, v.68, n.4, p.265-72, 1997.
- THOMPSON, J.E., SIGLER, L., RAUT, P.S. *et al.* Arterial embolectomy: a 20 year experience with 163 cases. *Surg.*, v.67, p.212-20, 1970.
- VAAGE, J., VALEN, G. Pathophysiology and mediators of ischemia-reperfusion injury with special reference to cardiac surgery. *Scand. J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, v.41, p.1-18, 1993.
- WALKER, P.M., LINDSAY, T.F., LABBE, R., *et al.* Salvage of skeletal muscle with free radical scavengers. *J. Vasc. Surg.*, v.5, p.68-75, 1987.
- WATANABE, B.I., LIMM, W., SUEHIRO, A, *et al.* Failure of deferoxamine to reduce myocardial infarct size in a primate model of ischemia-reperfusion injury. *J. Surg. Res.*, v.55, p.537-42, 1993.

- WENDLAND, M.F., SAEED, M., MASUI, T. *et al.* First pass of an MR susceptibility contrast agent through normal and ischemic heart: gradient-recalled echo-planar imaging. *J. Magn. Reson. Imaging.*, v.3, n.5, p.755-60, 1993.
- WEYRICH, A.S., MA, X-I, LEFER, A.M. The role of L-Arginine in ameliorating reperfusion injury after myocardial ischemia in the cat. *Circulation*, v.86, p.279-88, 1992.
- WEISER, M.R., GIBBS, S.A., VALERI, C.R. *et al.* Anti-selectin therapy modifies skeletal muscle ischemia and reperfusion injury. *Shock*, v.5, n.6, p.402-7, 1996.
- WEISS, S.J. Tissue destruction by neutrophils. *N. Eng. J. Med.*, v.320, suppl.6, p.316-76, 1989.
- WEISS, S.J., YOUNG, J., LoBUGLIO, A.F. *et al.* Role of hydrogen peroxide in neutrophil-mediated destruction of cultured endothelial cells. *J. Clin. Invest.*, v.68, p.714-21, 1981.
- WIENER, E.C., BRECHBIEL, M.W., BROTHERS, H. *et al.* Dendrimer-based metal chelates: a new class of magnetic resonance imaging contrast agents. *Magn. Reson. Med.*, v.31, n.1, p.1-8, 1994.
- YOKOTA, J., MINEI, J.P., FANTINI, G.A., *et al.* Role of leukocytes in reperfusion injury of skeletal muscle after partial ischemia. *Am. J. Physiol.*, v. 257, suppl.26, p.H1068-75, 1989.
- YOSHIDA, W.B. Radicais livres na síndrome da isquemia e reperfusão. *Cir. Vasc. Angiol.*, v.12, p. 82-95, 1996.

Valores individuais dos atributos dos animais dos grupos estudados.

Tabela 1A - Controle Anestesia

No.	Data	C1	C2	C3	P1	P2	P3	CPK	MDA	MDA	MDA	MDA
									e 0,2 ml	e 0,4 ml	d 0,2 ml	d 0,4 ml
1	8,05	2,1	2,1	2,1	175	160	155	231	0,1153	0,1833	0,2842	*
2	8,05	2,1	2,1	2,1	210	200	190	1606	0,2084	0,2677	0,1599	0,2277
3	11,05	2,2	2,1	2,2	235	230	220	352	0,1270	0,1930	0,1399	0,1994
4	16,05	2,1	2,1	2,0	160	160	160	572	0,1873	0,2401	0,0767	0,1061
5	22,05	2,0	2,1	2,1	185	185	185	308	0,1270	0,2073	0,1864	0,3404
6	22,05	2,1	2,1	2,1	180	180	175	759	0,1216	0,1847	0,1120	0,1939
7	23,05	2,1	2,1	2,1	160	160	160	572	0,2084	0,2878	0,2172	0,3592
8	16,05	2,2	2,2	2,2	180	180	180	253	*	*	*	*
9	11,05	2,0	1,8	1,8	190	185	185	616	*	*	*	*
10	23,05	2,1	2,1	2,1	185	180	180	495	*	*	*	*

* = amostras insuficientes para MDA

Tabela 2A - Controle Cirurgia

No.	Data	C1	C2	C3	P1	P2	P3	CPK	MDA	MDA	MDA	MDA
									e 0,2 ml	e 0,4 ml	d 0,2 ml	d 0,4 ml
1	11,05	2,1	2,0	2,0	170	160	160	1166	0,0862	0,1216	0,1184	0,1744
2	12,05	2,2	2,4	2,2	185	165	165	3355	0,0732	0,1180	0,1176	0,1620
3	8,05	2,2	2,4	2,2	210	200	190	1881	0,2556	0,3858	0,1928	0,2412
4	22,05	2,3	2,3	2,3	160	155	155	407	0,1800	0,2412	0,1772	0,1167
5	22,05	2,2	2,2	2,3	180	170	170	484	0,0903	0,1221	0,1737	0,2935
6	11,05	2,2	2,2	2,3	165	160	155	484	0,1581	0,2809	0,1748	0,2809
7	16,05	2,1	2,1	2,2	170	160	160	4279	0,1512	0,4156	0,1180	0,2700
8	12,05	2,2	2,3	2,3	230	225	220	770	0,1270	0,1625	0,1228	0,2040
9	23,05	2,2	2,2	2,3	180	180	180	1045	*	*	*	*
10	23,05	2,1	2,2	2,2	175	175	175	385	*	*	*	*

* = amostras insuficientes para MDA

Tabela 3A - Isquemia/Reperusão com solução fisiológica

No.	Data	C1	C2	C3	P1	P2	P3	CPK	MDA	MDA	MDA	MDA
									e 0,2 ml	e 0,4 ml	d 0,2 ml	d 0,4 ml
1	12,05	2,1	2,1	2,4	230	220	220	5280	0,0794	0,1164	0,4239	0,6413
2	12,05	2,1	2,3	2,2	180	180	180	1166	0,1104	0,1841	0,2381	0,3541
3	16,05	2,0	2,1	2,5	160	160	160	4147	0,1270	0,1702	0,3271	0,3772
4	16,05	2,2	2,4	2,6	170	165	165	1199	0,0836	0,1697	0,1878	0,3174
5	22,05	2,2	2,2	2,6	200	200	200	7755	0,1529	0,2730	0,1318	0,1909
6	22,05	2,2	2,2	2,4	200	195	192		0,0928	0,1684	0,2433	0,3982
7	11,05	2,0	2,0	2,3	190	180	180	4015	0,0635	0,1015	0,2679	0,4057
8	23,05	2,2	2,1	2,3	160	155	150	4125	0,1077	0,1527	0,1521	0,2090
9	8,05	2,0	2,2	2,2	190	190	190	3135	0,2646	0,3667	0,2128	0,3696

Obs.: 01 animal convulsionou – hemólise CPK

Tabela 4A - Isquemia/Reperusão com Tratamento

No.	Data	C1	C2	C3	P1	P2	P3	CPK	MDA	MDA	MDA	MDA
									e 0,2 ml	e 0,4 ml	d 0,2 ml	d 0,4 ml
1	8,05	2,3	2,3	2,1	190	190	170	5357	0,2602	0,3514	0,2531	0,3328
2	8,05	2,3	2,3	2,5	240	240	230	3135	0,1066	0,1270	0,3879	0,6543
3	11,05	2,2	2,2	2,3	220	200	195	4444	0,0874	0,1430	0,1017	0,2019
4	11,05	2,3	2,1	2,2	240	230	220	1859	0,2401	0,4181	0,1084	0,2092
5	12,05	2,1	2,2	2,3	170	170	170	3179	0,0683	0,1593	0,4724	0,9288
6	16,05	2,1	2,2	2,4	190	180	170	5005	0,6308	0,8615	0,2757	0,3367
7	16,05	2,1	2,1	2,3	180	180	170	6512	0,1415	0,2197	0,1968	0,1909
8	22,05	2,1	2,1	2,2	190	175	175	5709	0,0920	0,7590	0,4124	0,8776
9	23,05	2,2	2,2	2,3	200	200	195	11583	0,0934	0,1550	0,2878	0,4597

Obs.: 01 animal com trombose da artéria femoral

Tabela 5A – Peso dos animais: comparações entre os momentos sem considerar os grupos, entre os grupos sem considerar os momentos e dentro de cada grupo entre momentos, utilizando análise de variância um fator.

Entre os momentos sem considerar grupos						
Momentos	Média	s	n	F	p	Resultado
M1	188,2	21,5	38	1,7489	0,1787	n.s.
M2	182,2	20,7	38			
M3	179,4	19,1	38			

Entre os grupos sem considerar momentos						
Grupos	Média	s	n	F	p	Resultado
G1	182,3	20,4	30	1,7489	0,1787	n.s.
G2	176,8	20,9	30	2,6224	0,0542	
G3	183,8	20,9	27			
G4	191,7	18,4	27			

Dentro de cada grupo sem considerar os momentos						
Grupo/Momentos	Média	s	n	F	p	Resultado
G1M1	186,0	22,5	10	0,2813	0,7570	n.s.
G1M2	182,0	21,4	10			
G1M3	179,0	18,8	10			
G2M1	182,5	21,6	10	0,5564	0,5794	n.s.
G2M2	175,0	22,0	10			
G2M3	173,0	20,0	10			
G3M1	186,7	22,4	9	0,1241	0,8839	n.s.
G3M2	182,8	20,9	9			
G3M3	181,9	21,6	9			
G4M1	198,3	19,7	9	1,2793	0,2965	n.s.
G4M2	192,2	17,7	9			
G4M3	184,7	17,0	9			

Tabela 6A – Resultado da análise de variância um fator e complementação das comparações múltiplas por meio do teste t de Bonferroni dos grupos em estudo G (1+2) (MPD+MPE), G3 (MPD), G3 (MPE) e G4 (MPD+MPE), segundo o MDA, para as alíquotas de 0,2 ml, adotando-se o nível de significância de 5% de probabilidade para a rejeição da hipótese de nulidade.

Análise de variância						
Causa variação	S.Q.	g.l.	Q.M.	F	p	Resultado
Tratamento	0,1048	3	0,0349	6,7739	0,0009	Significante
Resíduo	0,1960	38	0,052			
Total	0,3008	41				

S.Q. = Somas de Quadrados Q.M. = Quadrados Médios g.l. = grau de liberdade

Teste t de Bonferroni: 6 grupos em comparação: $\alpha_{\text{crítico}} = 0,0083$; g.l. = 38					
Contraste	Diferença médias	t_{calculado}	p	Resultado	
G (1+2) (MPD+MPE) x G3 (MPD)	0,0327	1,0809	0,1433	n.s.	
G (1+2) (MPD+MPE) x G3 (MPE)	- 0,0898	- 2,9662	0,0026	Significante	
G (1+2) (MPD+MPE) x G4 (MPD+MPE)	- 0,0813	- 2,6853	0,0053	n.s.	
G3 (MPD) x G3 (MPE)	- 0,1225	- 3,6198	0,0004	Significante	
G3 (MPD) x G4 (MPD+MPE)	- 0,1140	- 3,3686	0,0009	Significante	
G3 (MPE) x G4 (MPD+MPE)	0,0085	0,2512	0,4015	n.s.	

MPD = Membro submetido à isquemia/reperfusão

MPE = Membro contralateral

Tabela 7A – Resultado da análise de variância um fator e complementação das comparações múltiplas por meio do teste t de Bonferroni dos grupos em estudo G (1+2) (MPD+MPE), G3 (MPD), G3 (MPE) e G4 (MPD+MPE), segundo o MDA, para as alíquotas de 0,4 ml, adotando-se o nível de significância de 5% de probabilidade para a rejeição da hipótese de nulidade.

Análise de variância						
Causa variação	S.Q.	g.l.	Q.M.	F	p	Resultado
Tratamento	0,2368	3	0,789	7,0035	0,0007	Significante
Resíduo	0,4282	38	0,0113			
Total	0,6650	41				

S.Q. = Somas de Quadrados Q.M. = Quadrados Médios g.l. = grau de liberdade

Teste t de Bonferroni – 6 grupos em comparação: $\alpha_{\text{crítico}} = 0,0083$; g.l. = 38				
Contraste	Diferença médias	t_{calculado}	p	Resultado
G (1+2) (MPD+MPE) x G3 (MPD)	0,0466	1,0418	0,1520	n.s.
G (1+2) (MPD+MPE) x G3 (MPE)	- 0,1235	- 2,7582	0,0044	Significante
G (1+2) (MPD+MPE) x G4 (MPD+MPE)	- 0,1366	- 3,0511	0,0021	Significante
G3 (MPD) x G3 (MPE)	- 0,1701	- 3,988	0,0008	Significante
G3 (MPD) x G4 (MPD+MPE)	- 0,1832	- 3,6608	0,0004	Significante
G3 (MPE) x G4 (MPD+MPE)	- 0,0131	- 0,2620	0,3974	n.s.

MPD = Membro submetido à isquemia/reperfusão

MPE = Membro contralateral