

AÇÃO DO ÁCIDO TRISSÓDIO-CÁLCIO-DIETILENO- TRIAMINOPENTAACÉTICO (CaNa₃DTPA) NAS LESÕES DE ISQUEMIA-REPERFUSÃO EM MEMBRO POSTERIOR DE RATO¹

Ieda Francischetti²Francisco Humberto de Abreu Maffei³Jose Bitu-Moreno⁴Mário Fuhrmann Neto⁵Maria Paula Villela Coelho⁵Fábio Hsu Tsu Kai⁵Julio Lopes Sequeira⁶Winston Bonetti Yoshida⁷

Francischetti I, Maffei FHA, Bitu-Moreno J, Fuhrmann Neto M, Coelho MFV, Kai FHT, Sequeira JL, Yoshida WB. Ação do ácido trissódio-cálcio-dietileno-triaminopentaacético (CaNa₃DTPA) nas lesões de isquemia-reperfusão em membro posterior de rato. Acta Cir Bras [serial online] 2002 Set-Out;17(5). Disponível em URL: <http://www.scielo.br/acb>.

RESUMO – Objetivo: Ação do ácido trissódio-cálcio-dietileno-triaminopentaacético (CaNa₃DTPA), quelante de ferro com ação anti-viral, antiinflamatória e imunológica, na atenuação de lesões de isquemia/reperfusão induzidas em músculos esqueléticos de ratos. **Métodos:** 52 ratos Wistar, pesando 188±22g, foram anestesiados e submetidos a semi-amputação de membro posterior direito (MPD), poupando-se o fêmur, artéria e veia femorais. Foram então randomizados e distribuídos: G1-CTAN – controle anestesia, sem cirurgia e sem isquemia; G2-CTCIR – controle cirurgia, sem isquemia; G3-IRCT e G3-IRDTPA – com isquemia (4 hora) e reperfusão (2 horas). O G3-IRCT foi tratado, ao final da isquemia, com cloreto de sódio 0,9% e G3-IRDTPA com (CaNa₃DTPA). **Parâmetros:** Circunferência do pé direito e peso do rato, dosagem sérica de CPK, dosagem de malonaldeído e microscopia óptica de músculos soleus bilateral. **Resultados:** Aumento da circunferência nos G3-IRCT e G3-IRDTPA (significante no G3-IRCT quando comparado ao G1-CTAN); CPK elevado nos G3-IRCT e G3-IRDTPA comparados aos controles; MDA mais alto no membro contralateral do G3-IRDTPA, comparado ao MPD do G3-IRDTPA e ao G1-CTAN; maior edema intersticial em G3-IRCT, maior infiltrado inflamatório em G3-IRDTPA e recuperação dos níveis de glicogênio semelhantes em G3-IRCT e G3-IRDTPA. **Conclusão:** Apesar do menor edema no G3-IRDTPA comparado ao G3-IRCT, o CaNa₃DTPA não alterou CPK sérico, MDA muscular e morfologia muscular dos animais.

DESCRITORES – Isquemia. Reperfusão. Músculo esquelético. CaNa₃DTPA. Ratos.

INTRODUÇÃO

A isquemia total dos membros inferiores seguida de reperfusão, evolui em grande parte para complica-

ções que podem colocar em risco a vida do paciente. Isto, quando as interrelações entre os danos musculares e o restante do organismo não forem interrompidas por uma amputação bem indicada.¹⁻⁵

1. Trabalho realizado no Laboratório de Técnica Cirúrgica do Instituto de Pesquisas e Tecnologia da Universidade de Marília – SP.
2. Professora colaboradora da Faculdade de Medicina de Marília – FAMEMA, SP.
3. Professor Titular da Disciplina de Cirurgia Vascular da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, SP.
4. Professor Assistente Doutor, Chefe da Disciplina de Cirurgia Vascular e Angiologia da Faculdade de Medicina de Marília – FAMEMA, SP.
5. Graduandos do Curso de Medicina da Faculdade de Medicina de Marília – FAMEMA, SP.
6. Professor Assistente Doutor da Disciplina de Cirurgia Vascular da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, SP.
7. Professor Assistente Doutor da Disciplina de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, SP.

A peroxidação lipídica é considerada como um dos principais mecanismos de lesão celular em organismos submetidos a estresse oxidativo. Os lipídios das membranas contêm uma grande quantidade de cadeias laterais de ácidos graxos polinsaturados.⁶ 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. O ferro tem sido reconhecido como potenciador nas reações de Fenton e Haber Weiss, que resultam na produção entre outros do radical hidroxila (OH) altamente lesivo para as membranas celulares.

O radical OH parece ser um dos principais envolvidos na reação de peroxidação lipídica, dada a sua capacidade de redução de átomos de hidrogênio das cadeias laterais de aminoácidos. Por outro lado, tem-se também demonstrado, que a redução química do ferro é importante fator na ocorrência e velocidade dessa reação e que pode inclusive iniciar a peroxidação lipídica ferro dependente.⁷

Muitos estudos têm demonstrado a liberação de ferro na circulação, seguindo-se à reperfusão de miocárdio⁸, intestino delgado⁹, músculo esquelético^{10, 11}, e na urina após isquemia renal¹². Outros estudos também demonstraram deslocamento do ferro em tecido cerebral pós-isquêmico¹³, miocárdio¹⁴ e rins¹⁵.

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.^{12, 16-18}

O ácido dietilenotriaminopentaacético (DTPA) foi desenvolvido para tratamento de pacientes com sobrecarga de ferro¹⁹. O DTPA atua em meio extracelular e tem grande afinidade por íons de metais trivalentes e bivalentes, incluindo o ferro²⁰. Já foi utilizado em triagens clínicas^{19, 21}, sempre na forma de sal de cálcio (CaNa₃DTPA), 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 (1986)²².

O CaNa₃DTPA, parece ter ação menos deletéria ao metabolismo das células que a quelação promovida pela DFA. CINATL et al. (1996)²³ encontraram ação inibitória do CaNa₃DTPA 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)²⁴, demonstraram in vitro, que o CaNa₃DTPA previniu a quebra do DNA pelo O₂ e pelo H₂O₂. Em estudo buscando diminuir a mortalidade de ratos submetidos a choque séptico experimental, o CaNa₃DTPA apresentou maior proteção, quando comparado a DFO.²⁵

SCHOLZ et al. (1995)²⁶ compararam os efeitos da administração isolada de DFA e do CaNa₃DTPA 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 CaNa Fe²⁺ + H₂O₂ @ Fe³⁺ + 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 antiinflamatória, nosso objetivo no presente estudo foi testar a hipótese de que o CaNa₃DTPA agiria atenuando as lesões de isquemia-reperfusão induzidas em músculos esqueléticos de ratos.

MÉTODOS

Foram utilizados 40 ratos Wistar, machos, adultos, pesando entre 190 gramas e 300 gramas, que foram divididos, por sorteio, em quatro grupos: **G1-CTAN** (controle anestesia), n= 10: onde foram anestesiados, mas não foram operados. Os parâmetros foram medidos da mesma forma que nos demais grupos. **G2-CTCIR** (controle cirurgia sem anestesia), n=10: em que todos os tempos cirúrgicos foram executados, excetuando-se a oclusão arterial. **G3-IRCT** (controle isquemia), n=10: com oclusão arterial, isquemia por 4 horas, soro fisiológico (SF) por via intramuscular (IM) no membro anterior direito (MAD) 10 minutos antes da reperfusão e 2 horas de reperfusão. **G3-IRDTPA** (isquemia/reperfusão e tratamento com CaNa₃DTPA), n=10: com oclusão arterial por 4 horas, CaNa₃DTPA IM no MAD 10 minutos antes da reperfusão e 2 horas de reperfusão.

O experimento foi desenvolvido, em três fases subsequentes, sem intervalos entre as mesmas. Na primeira fase, os ratos foram anestesiados com o pentobarbital sódico, na dose de 30mg/Kg de peso corpóreo, por via intra – peritoneal, receberam heparina (150 unidades/Kg de peso corpóreo subcutânea) e, a seguir, foram tomadas as medidas de circunferência, na pata posterior direita. Seguiu – se a secção de uma forma circular toda a musculatura proximal e demais estruturas da raiz da coxa direita e, por fim, a dissecação e o isolamento da artéria femoral, ficando intactos a artéria e veias femorais, além do fêmur. Na segunda fase, iniciou-se a fase da isquemia total e imediata do membro, através do

clameamento arterial, por um período de 4 horas. Ao final da fase de isquemia, foram realizadas novamente as medidas de circunferência da pata direita. Procedeu-se, a seguir, à retirada do clampe, para a restauração do fluxo arterial, iniciando – se a terceira fase que teve duração de duas horas. Ao final da reperfusão, nova medida da circunferência da pata foi tomada. Em seguida, por meio de punção cardíaca, transparietal, foi coletado 3 ml de sangue para a dosagem da enzima creatino – fosfoquinase (CPK), que sabidamente se eleva à medida que o músculo estriado é lesado.

A dosagem da enzima CPK foi realizada pelo método CK – Nac – creatina – quinase, método UV otimizado, no aparelho analisador automático (Clinline – Vitek Sytems).

Após a retirada de sangue para CPK, foram retirados os músculos soleus bilaterais para microscopia óptica e para quantificação de dialdeído malônico (MDA), produto derivado da peroxidação lipídica das membranas celulares causada pela ação dos radicais livres do oxigênio, utilizando-se o método do ácido tiobarbitúrico, o qual mede o nível de MDA.

Os fragmentos musculares biopsiados para microscopia de luz foram corados pela hematoxilina-eosina (HE) segundo a técnica de Harris e pelo ácido periódico de Schiff (P.A.S).

O sorteio dos animais para cada grupo e a aplicação do CaNa_3DTPA e do SF, 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.

Na análise estatística utilizamos Análise de Perfil, para a medida de circunferência da pata e peso do rato. 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, a tendência central foi indicada pela mediana (Md) em cada grupo e a comparação entre os 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. Na análise da variável, MDA, utilizamos para a comparação dentro dos grupos (MPD com MPE), o “teste t pareado”, seguidos da “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

1. PESO DO RATO. (Tabela 1; Figura 1)

TABELA 1 – Peso dos ratos: médias (\bar{x}) e desvio padrão (s) dos momentos para cada um dos grupos G1-CTAN, G2-CTCIR, G3-IRCT, G3-IRDTPA.

| Grupo | n | M1 ($\bar{x} \pm s$) | Peso | |
|-----------|----|------------------------|------------------------|------------------------|
| | | | M1 ($\bar{x} \pm s$) | M1 ($\bar{x} \pm s$) |
| G1-CTAN | 10 | 186 ± 23 | 182 ± 21 | 179 ± 19 |
| G2-CTCIR | 10 | 183 ± 22 | 175 ± 22 | 173 ± 20 |
| G3-IRCT | 9 | 187 ± 22 | 183 ± 21 | 182 ± 22 |
| G3-IRDTPA | 9 | 198 ± 20 | 192 ± 18 | 185 ± 17 |

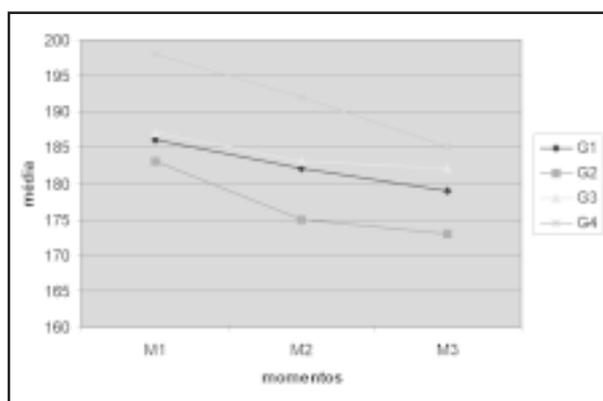


FIGURA 1 – Peso do rato. Média (\bar{x}) dos grupos em cada um dos momentos.

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

2. CIRCUNFERÊNCIA DO PÉ DO RATO. (Tabela 2; Figura 2)

TABELA 2 – Circunferência do pé do rato: médias (\bar{x}) e desvio padrão (s) dos momentos para cada um dos grupos G1-CTAN, G2-CTCIR, G3-IRCT, G3-IRDTPA.

| Grupo | n | Circunferência | | |
|-----------|----|------------------------|------------------------|------------------------|
| | | M1 ($\bar{x} \pm s$) | M2 ($\bar{x} \pm s$) | M3 ($\bar{x} \pm s$) |
| G1-CTAN | 10 | 2,10 \pm 0,07 | 2,08 \pm 0,10 | 2,08 \pm 0,11 |
| G2-CTCIR | 10 | 2,18 \pm 0,06 | 2,23 \pm 0,13 | 2,23 \pm 0,09 |
| G3-IRCT | 9 | 2,11 \pm 0,09 | 2,18 \pm 0,12 | 2,39 \pm 0,15 |
| G3-IRDTPA | 9 | 2,19 \pm 0,09 | 2,19 \pm 0,01 | 2,29 \pm 0,11 |

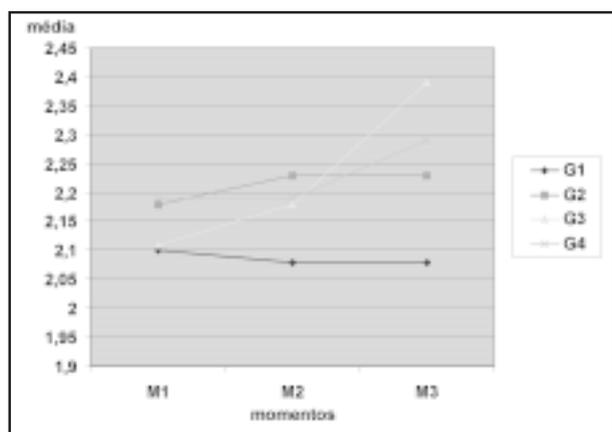


FIGURA 2 - Circunferência do pé. Média (\bar{x}) dos grupos em cada um dos momentos.

Dentro de cada grupo; G1-CTAN, G2-CTCIR e G3-IRDTPA, não houve variação estatisticamente significativa da circunferência dos pés dos animais nos diferentes momentos estudados.

No G3-IRCT, por ocasião da reperfusão, houve um aumento estatisticamente significativo 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 G3-IRDTPA=G3-IRCT=G1-CTAN < G2-CTCIR, G2-CTCIR=G3-IRCT=G3-IRDTPA, mostrando que não houve diferença nos grupos cirúrgicos entre si, mas que o grupo cirúrgico G2-CTCIR foi maior que o controle G1-CTAN, o que não aconteceu entre os outros grupos cirúrgicos e o controle anestesia G1-CTAN.

No momento M3 observou-se G1-CTAN < (G2-CTCIR = G3-IRCT = G3-IRDTPA), mostrando que houve uma diferença estatisticamente significativa na circunferência dos pés dos animais com cirurgia, comparando-se com o grupo controle G1-CTAN.

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-reperfusão e tratados com cloreto de sódio à 0,9% (G3-IRCT).

3. DOSAGEM DE CREATINOFOSFOQUINASE (CPK). (Tabelas 3 e 4; Figura 3)

TABELA 3 – CPK. Tamanho amostral (n), mediana (Md), média (\bar{x}) e desvio padrão (s) de cada grupo.

| Grupo | n | MEDIANA(Md) | $\bar{x} \pm s$ |
|-----------|----|-------------|-----------------|
| G1-CTAN | 10 | 534 | 576 \pm 401 |
| G2-CTCIR | 10 | 908 | 1426 \pm 1358 |
| G3-IRCT | 8 | 4070 | 3853 \pm 2146 |
| G3-IRDTPA | 9 | 5005 | 5005 \pm 2803 |

TABELA 4 – CPK. Estatística (H de Kruskal-Wallis) calculada para a comparação dos grupos e comentários

| Estatística | p | Resultado | Comentário |
|-------------|---------|--------------|--------------------------------------|
| H = 22,54 | <0,0001 | Significante | G1-CTAN=G2-CTCIR < G3-IRCT=G3-IRDTPA |

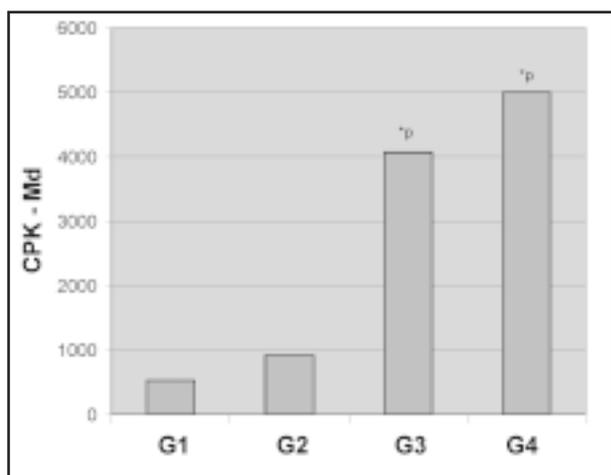


FIGURA 3 - CPK. MEDIANA (Md) de cada grupo. *p < 0,0001, significativo, G1-CTAN=G2-CTCIR<G3-IRCT=G3-IRDTPA.

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

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.

(Tabelas 5, 6, 7 e 8; Figuras 4 e 5)

TABELA 5 – Dosagem do dialdeído malônico (MDA) em alíquotas de 0,2 ml: médias (x) e desvio padrão (s) das amostras referentes ao membro submetido a isquemia/reperfusão (MPD) e ao membro contralateral (MPE) nos diferentes grupos.

| Grupo | Amostra | n | x ± s |
|-----------|---------|---|-----------------|
| G1-CTAN | MPD | 7 | 0,2234 ± 0,0422 |
| G1-CTAN | MPE | 7 | 0,2743 ± 0,1305 |
| G2-CTCIR | MPD | 8 | 0,2310 ± 0,1207 |
| G2-CTCIR | MPE | 8 | 0,2178 ± 0,0637 |
| G3-IRCT | MPD | 9 | 0,1892 ± 0,0822 |
| G3-IRCT | MPE | 9 | 0,3593 ± 0,1298 |
| G3-IRDTPA | MPD | 9 | 0,2790 ± 0,2449 |
| G3-IRDTPA | MPE | 9 | 0,4658 ± 0,2883 |

TABELA 6 – Dosagem do dialdeído malônico (MDA) em alíquotas de 0,4 ml: médias (x) e desvio padrão (s) das amostras referentes ao membro submetido a isquemia/reperfusão (MPD) e ao membro contralateral (MPE) nos diferentes grupos.

| Grupo | Amostra | n | x ± s |
|-----------|---------|---|-----------------|
| G1-CTAN | MPD | 7 | 0,2234 ± 0,0422 |
| G1-CTAN | MPE | 7 | 0,2743 ± 0,1305 |
| G2-CTCIR | MPD | 8 | 0,2310 ± 0,1207 |
| G2-CTCIR | MPE | 8 | 0,2178 ± 0,0637 |
| G3-IRCT | MPD | 9 | 0,1892 ± 0,0822 |
| G3-IRCT | MPE | 9 | 0,3593 ± 0,1298 |
| G3-IRDTPA | MPD | 9 | 0,2790 ± 0,2449 |
| G3-IRDTPA | MPE | 9 | 0,4658 ± 0,2883 |

TABELA 7 – Dosagem do MDA: Comparação entre os MPD e MPE nos diferentes grupos. Resultados dos testes t pareado e t para amostras independentes em alíquotas de 0,2 ml.

| t pareado | | | | |
|----------------------|------------------------------|-------------|----------|------------------|
| Contrastes | t_{calculado} | g.l. | p | Resultado |
| G1-CTAN(MPD X MPE) | -0,3508 | 6 | 0,7377 | n.s. |
| G2-CTCIR(MPD X MPE) | -0,5698 | 7 | 0,5866 | n.s. |
| G3-IRCT(MPD X MPE) | -2,9985 | 8 | 0,0171 | Signif. |
| G3-IRDTPA(MPD X MPE) | -1,0754 | 8 | 0,3136 | n.s. |

| t independente | | | | |
|--|--------|----|--------|------|
| [G1-CTAN(MPD+MPE) X G2-CTCIR(MPD+MPE)] | 0,8358 | 13 | 0,4184 | n.s. |

MPD = Membro submetido a isquemia/reperfusão

MPE = Membro contralateral

g.l. = grau de liberdade

TABELA 8 - Dosagem do MDA: Comparação entre os MPD e MPE nos diferentes grupos. Resultados dos testes t pareado e t para amostras independentes em alíquotas de 0,4 ml.

| t pareado | | | | |
|-------------------------|------------------------------|-------------|----------|------------------|
| Contrastes | t_{calculado} | g.l. | p | Resultado |
| G1-CTAN(MPD X MPE)0,4 | -0,9499 | 6 | 0,3788 | n.s. |
| G2-CTCIR(MPD X MPE)0,4 | 0,3237 | 7 | 0,7556 | n.s. |
| G3-IRCT(MPD X MPE)0,4 | -2,8799 | 8 | 0,0205 | Signif. |
| G3-IRDTPA(MPD X MPE)0,4 | -1,2469 | 8 | 0,2477 | n.s. |

| t independente | | | | |
|--|--------|----|-------|-----|
| [G1-CTAN(MPD+MPE) X G2-CTCIR(MPD+MPE)] 0,4 | 0,6516 | 13 | 0,526 | n.s |

MPD = Membro submetido a isquemia/reperfusão

MPE = Membro contralateral

g.l. = grau de liberdade

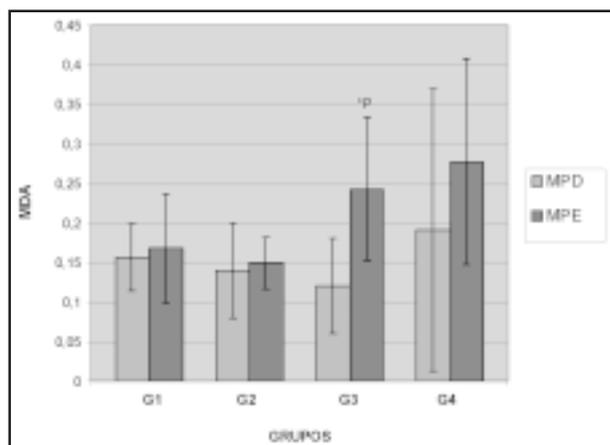


FIGURA 4 - Dialdeído malônico (MDA): médias (\bar{x}) e desvios padrão (s) dos valores de MDA no membro submetido a isquemia/reperfusão (MPD) e no membro contralateral (MPE) de cada grupo. Alíquotas 0,2 ml. * (MPE > MPD; p= 0,01)

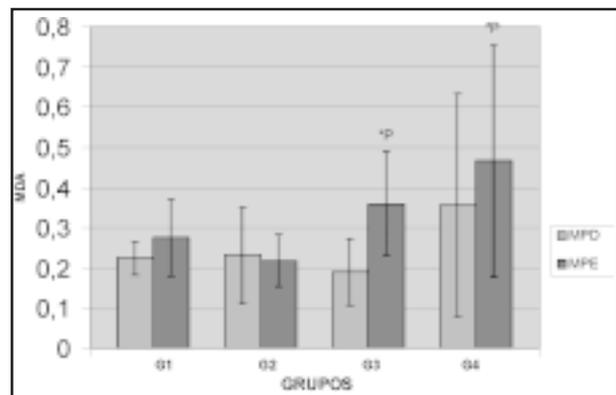


FIGURA 5 - Dialdeído malônico (MDA): médias (\bar{x}) e desvios padrão (s) dos valores de MDA no membro submetido a isquemia/reperfusão (MPD) e no membro contralateral (MPE) de cada grupo. Alíquotas 0,4 ml. * (MPE > MPD; p= 0,02).

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.

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

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

5. Microscopia de Luz

No estudo da microscopia de luz, corada pelo HE, não observamos alterações significativas no grupo G1-CTAN, enquanto no G2-CTCIR houve presença de edema intersticial nos cortes do tecido muscular, mas sem infiltrado inflamatório expressivo quando comparado aos grupos G3-IRCT e G3-IRDTPA. No G3-IRCT, a presença de edema intersticial foi maior que nos outros grupos e o infiltrado inflamatório foi mais intenso no G3-IRDTPA. Não observamos alterações representativas nos membros colaterais em nenhum dos grupos (Figuras 6,7,8,9)

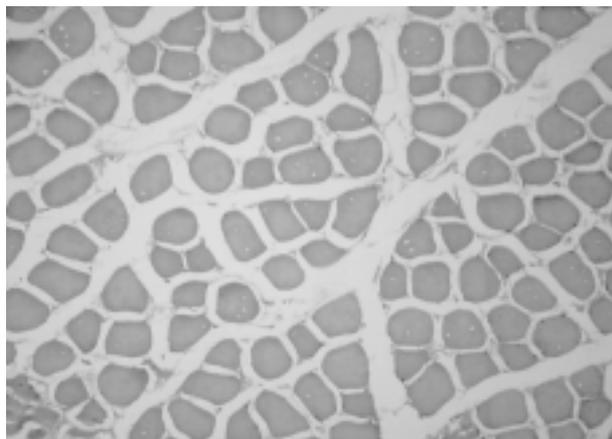


FIGURA 6 – Microscopia de luz (HE). Corte de músculo estriado esquelético; fibras musculares esqueléticas e tecido conjuntivo. Grupo G1-CTAN – controle anestesia. (100X)

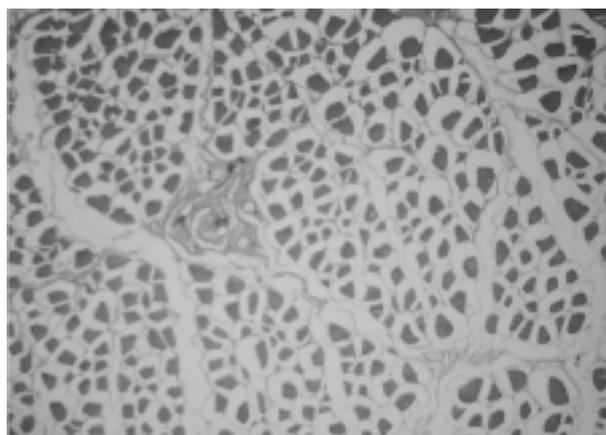


FIGURA 7 - Microscopia de luz (HE). Corte de músculo estriado esquelético; tecido conjuntivo. G2-CTCIR – controle cirurgia sem isquemia. (100X)



FIGURA 8 - Microscopia de luz (HE). Corte de músculo estriado esquelético; presença de edema intersticial e infiltrado inflamatório acentuados. G3-IRCT – controle isquemia/reperfusão. (100X)

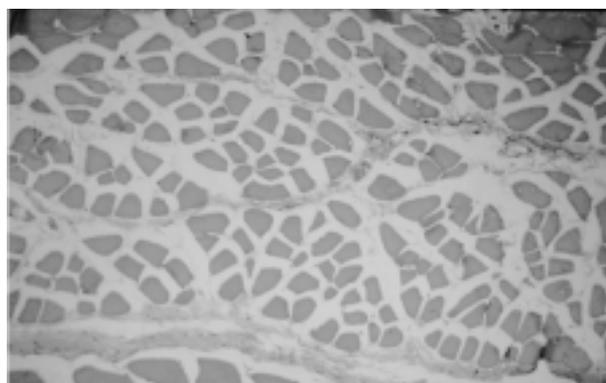


FIGURA 9 - Microscopia de luz (HE). Corte de músculo estriado esquelético; presença de edema intersticial moderado e infiltrado inflamatório acentuado. G3-IRDTPA – isquemia/reperfusão e tratamento com CaNa₃DTPA. (100X)

Na avaliação do PAS, positividade moderada (++) foi observada nos cortes musculares pertencentes aos grupos G1-CTAN e G2-CTCIR. Nos cortes dos grupos G3-IRCT e G3-IRDTPA observou-se positividade discreta (+) nos cortes musculares dos membros submetidos à isquemia e reperfusão (Figuras 10 e 11).

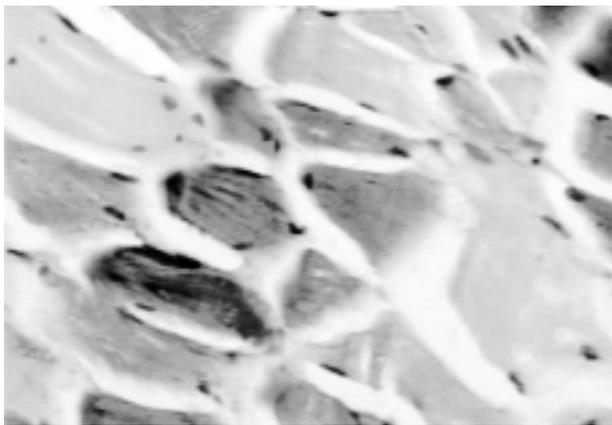


FIGURA 10 – Microscopia de luz (P.A.S.). Corte de músculo estriado esquelético evidenciando presença moderada (++) de glicogênio corado pelo P.A.S. Grupo G2-CTCIR (controle cirurgia sem isquemia). (400X)

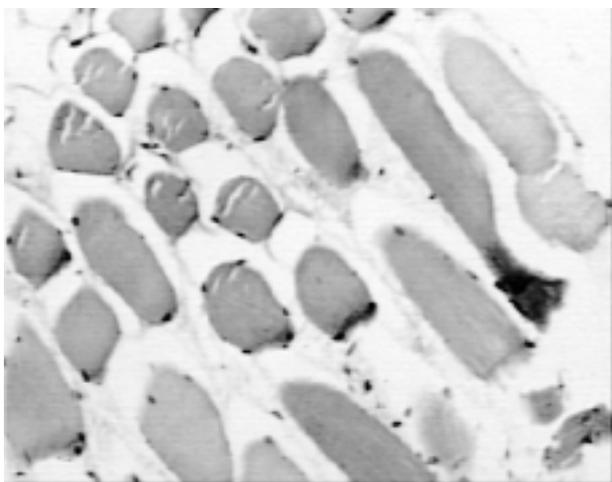


FIGURA 11 – Microscopia de luz (P.A.S.). Corte de músculo estriado esquelético evidenciando presença moderada (+) de glicogênio corado pelo P.A.S. Grupo G3-IRDTPA (controle cirurgia com tratamento). (200X)

DISCUSSÃO

O edema observado nos animais dos G3-IRCT e G3-IRDTPA pode ser atribuído a lesões de reperfusão, tendo como causa provável o aumento de permeabilidade microvascular que ocorre nesse processo. No G3-IRDTPA, porém, esse aumento de circunferência não foi significativo, o que poderia ser devido ao efeito diurético do CaNa_3DTPA , minimizando o edema de reperfusão.

O aumento significativo da CPK nos animais dos grupos G3-IRCT e G3-IRDTPA, quando comparados com o G1-CTAN, refletem indiretamente o grau de necrose muscular nos animais submetidos a isquemia e reperfusão, com valores mais altos nos animais do G3-IRDTPA, indicando que o CaNa_3DTPA não prote-

geu os animais da necrose muscular. Os valores dos animais do G2-CTCIR, 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 DFA²⁷, entretanto, em compensação, 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 aeróbicas²⁸.

Os valores muito elevados do MDA no músculo do MPE do G3-IRCT, quando comparados com o músculo do MPD do G1-CTAN e do próprio G3-IRCT, podem refletir lesões resultantes de agressão secundária, já disseminada, causadas por produtos gerados no processo de isquemia e reperfusão.^{28,29} Outro autor também encontrou valores altos no membro contralateral.¹⁸

Importante que se considere que o comportamento das medidas cromatográficas responde a reações sequenciais que aparecem em forma de picos e não como um resultado somatório. Esses autores observaram 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) dependente da quantidade e distribuição de fluxo de sangue, 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 seria a diferença na localização da biópsia dentro do próprio músculo, sendo impossível prever a priori quais locais de biópsias representariam os sítios de lesões mais extensas.²⁸

A observação de que alguns animais do G1-CTAN tiveram valores altos de MDA, 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.²⁹

As médias dos produtos de peroxidação lipídica do G3-IRDTPA, apesar de estatisticamente semelhantes aos demais grupos, foram elevadas, principalmente no músculo contralateral, podendo refletir até uma maior intensidade 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 G3-IRDTPA,

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.

Nesse contexto deve-se discutir até sobre uma possível toxicidade do CaNa_3DTPA . Estudos demonstraram que o DTPA era capaz de iniciar importante auto-oxidação, com continuada reação de peroxidação lipídica, tanto *in vitro* como em experimentos de isquemia-reperusão.³⁰⁻³⁴

O efeito espoliador de magnésio provocado pelo CaNa_3DTPA , levou à inibição de formação do óxido nítrico, em experimento com artérias coronárias de cães.³⁵

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.³⁴ Desde que não havia experiência anterior de uso de CaNa_3DTPA em modelos de isquemia-reperusão em músculos esqueléticos, talvez tenhamos usado doses suficientemente altas para produzir um efeito tóxico direto sobre as células.

O fato é que, mesmo com 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 contraindicar a utilização deste quelante como atenuador de lesões de isquemia e reperusão, contudo fica um grande terreno para especulações.

CONCLUSÃO

No modelo utilizado de isquemia-reperusão em membro posterior de rato, o CaNa_3DTPA , na dosagem empregada, levou a menor edema da pata lesada, entretanto não interferiu nas medidas de CPK sérico e de MDA muscular, nem nas alterações morfológicas do músculo soleus observadas a microscopia de luz.

REFERÊNCIAS

1. Menger MD, Messmer K. Die mikrozkulation des skelettmuskels nach Ischaemie und reperfusion. Wiener Medizinische Wochenschrift 1993; 143:148-58.
2. Beyersdorf R, Matheis G, Krüger S, et al. Avoiding reperfusion injury after limb revascularization: Experimental observations and recommendations for clinical application. J Vasc Surg 1989; 9: 757-66.
3. Inauen W, Suzuki M, Granger DN. Mechanisms of cellular injury: potential sources of oxygen free radicals in ischemia/reperfusion. Microcir. Endoth. Lymphatics 1989; 5: 143-55.

4. Schlensak D, Doenst T, Bitu-Moreno J, Beyersdorf F. Controlled limb reperfusion with a simplified perfusion system. Thorac Cardiovasc Surg 2000; 48(5):274-8.
5. Martin J, Lutter G, Sarai K, Senn-Grossberger M, Takahashi N, Bitu-Moreno J, Haberstroh J, Beyersdorf F. Investigations on the new free radical scavenger polynitroxyl-albumin to prevent ischemia and reperfusion injury after orthotopic heart transplantation in the pig model. Eur J Cardiothorac Surg 2001; 19(3): 321-5.
6. Rouser G, Nelson GJ, Fleicher S et al. Lipid composition of animal cell membranes, organelles and organs. In: CHAPMAN, D. (ed) Biological membranes: physical fact and function. New York: Academic Press, 1968, v.1, p.5-69.
7. Tang LX, Yang JL, Shen X. Effects of additional iron-chelators on $\text{Fe}(2+)$ -initiated lipid peroxidation: evidence to support the $\text{Fe}^{2+}\dots\text{Fe}^{3+}$ complex as the initiator. J Inorg Biochem.1997; 68 (4): 265-72.
8. Chevion MYJ, Har-Ei R, Berenshtein E et al. Copper and iron are mobilized following myocardial ischemia: possible predictive criteria for tissue injury. Proc. Natl. Acad. Sci 1993; 90: 1102-6.
9. Robinson E, Hedlund B. Role of iron in ischemia and reperfusion. Circ. Shock 1989; 27: 367.
10. Chiao JJC, Kirschner RE, Fantini GA. Iron delocalization occurs during ischemia and persists on reoxygenation of skeletal muscle. J Lab Clin Med 1994;124:432-8.
11. Fantini GA, Kirschner RE, Chiao JJC. Reperfusion injury of postischemic skeletal muscle is attenuated by the 21-aminosteroids U-74389F and U-74500A independent of iron binding. Surgery 1996; 120 (5): 859-65.
12. Paller MS, Hedlund BE. Role of iron in postischemic renal injury in the rat. Kidney Int 1988; 34:474-80.
13. Krause GS, Joyce KM, Nayini NR et al. Cardiac arrest and resuscitation: brain iron delocalization during reperfusion. Ann Emerg Med 1985; 14: 1037- 43.
14. 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. 1986; 15: 1155-9.
15. Gower JD, Healing G, Fuller BJ, et al. Iron redistribution and lipid peroxidation in the cold ischaemic kidney. Adv Exp Med Biol 1990, 264: 393-96.
16. Ambrosio G, Zweier JL, Jacobus WE 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 1987; 76(4): 906-15.
17. Fantini GA, Yoshioka T. Deferoxamine prevents lipid peroxidation and attenuates reoxygenation injury in postischemic skeletal muscle. Am J Physiol 1993; 264: H1953-59.
18. Sardinha WE. Isquemia e reperusão da musculatura esquelética em ratos. Inibição das lesões lipoperoxidativas mediadas por radicais livres pela deferoxamina. São Paulo, 1994. Tese, doutorado, Escola Paulista de Medicina.
19. Fahey JL, Rath CE, Princiotto JV et al. Evaluation of trisodium calcium diethylenetriaminepentaacetate in iron storage disease. J Lab Clin Med 1961; 57: 436-48.
20. Aisen P, Listowsky I. Iron transport and storage proteins. Annu Rev Biochem 1980; 49: 367-93.
21. Muller-Eberhard U, Erlandson ME, Glinn HE et al. Effect of trisodium calcium diethylenetriaminepenta acetate on bivalent cations in thalassemia major. Blood 1963; 22: 209-17.
22. Pippard MJ, Jackson MJ, Hoffman K et al. Iron chelation using subcutaneous infusion of diethylene triamine penta-acetic acid (DTPA). Scand J Haematol 1986; 36: 466-72.

23. Cinatl Jr, Hoffmann F, Cinatl J et al. In vitro inhibition of human cytomegalovirus replication by calcium trisodium diethylenetriaminepentaacetic acid. *Antiviral Res* 1996; 31 (1-2): 23-34.
24. Brawn K, Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases: threat and defense. *Acta Physiol. Scand. Suppl* 1980; 492: 9-18.
25. Kazmierski WM, Wolberg G, Wilson JG et al. Iron chelates bind nitric oxide and decrease mortality in an experimental model of septic shock. *Proc Natl Acad Sci* 1996; 93: 9138-41.
26. Scholz M, Cinatl J, Markus BH. Immunomodulation and anticytomegalovirus activity of antioxidant metal chelators. *Transplant Proc* 1997; 29 (1-2): 1272-3.
27. Pryor WA. The formation of free radicals and the consequences of their reactions in vivo. *Photochemistry & Photobiology* 1978; 28 (4-5): 787-801.
28. Lindsay T, Walker PM, Mickle DAG, et al. Measurement of hydroxy-conjugated dienes after ischemia-reperfusion in canine skeletal muscle. *Am. J. Physiol* 1988; 254: H578- 83.
29. Rall TW. 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.
30. Hamazaki S, Okada S, Li J-L, et al. Oxygen reduction and lipid peroxidation by iron chelates with special reference to ferric nitrilotriacetate. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1989; 272 (1): 10-7.
31. Baker MS, Gebicki JM. The effect of pH on the conversion of superoxide to hydroxyl free radicals. *Archives of Biochemistry & Biophysics* 1984; 254 (1): 258-64.
32. Watanabe BI, Limm W, Suehiro A, et al. Failure of deferoxamine to reduce myocardial infarct size in a primate model of ischemia-reperfusion injury. *Journal of Surgical Research* 1993; 55: 537-42.
33. McCord JM, Day ED Jr. Superoxide-dependent production of hydroxyl radicals catalyzed by the iron-EDTA complex. *FEBS Lett* 1978; 86: 139.
34. Borg DC, Schaich KM. Pro-oxidant action of desferrioxamine: Fenton like production of hydroxyl radicals by reduced ferrioxamine. *J Free Radical Biol Med* 1986; 2: 237.
35. Pearson PJ, Evora PR, Seccombe JF. et al. Hypomagnesemia inhibits nitric oxide release from coronary endothelium: protective role of magnesium infusion after cardiac operations. *Annals of Thoracic Surgery* 1998; 65 (4): 967-72.

Francischetti I, Maffei FHA, Bitu-Moreno J, Neto MF, Coelho MFV, Kai FHT, Sequeira JL, Yoshida WB. Effect of CaNa₃DTPA on ischemia/reperfusion lesions induced in the hindlimb of rats. *Acta Cir Bras* [serial online] 2002 Sept-Oct; 17(5). Available from URL: <http://www.scielo.br/acb>.

ABSTRACT – Objective: Our purpose was to elucidate whether calcium trisodium diethylenetriaminepentaacetic acid (CaNa₃DTPA), a hydrophilic extracellular chelator with some immunological and anti-inflammatory properties, protects skeletal muscle submitted to ischemia/reperfusion. **Methods:** Fifty two male Wistar rats were randomly allocated in the following groups: G1-CTAN- control anesthesia without surgery. G2-CTCIR - control surgery without ischemia. G3-IRCT and G3-IRDTPA: four hours ischemia and two hours reperfusion. The animals of group 3 were treated with saline and those of the group 4, treated with CaNa₃DTPA. Parameters were: foot circumference, rats weight, plasmatic creatine-phosphokinase (CPK), muscular malondialdehyde (MDA), and optic microscopy of muscle cells. **Results:** There was a significant post-ischemic increase in foot circumference in G3-IRCT. CPK measurements were significantly increased in G3-IRCT and G3-IRDTPA, when compared to G1-CTAN and G2-CTCIR, but there were no differences between G3-IRCT and G3-IRDTPA. MDA was increased in the left nonischemic muscles in G3-IRCT, when compared to contralateral muscles of G3-IRCT and of G1-CTAN. The histological evaluation showed inflammatory cell infiltrate in G3-IRDTPA and edema in G3-IRCT. The glycogen recovery was similar in both groups. **Conclusion:** There was less edema in the animals with ischemia-reperfusion treated group, but CaNa₃DTPA don't protect muscle cells from injury in relations with CPK, MDA managements and histological alterations.

KEY WORDS - Ischemia. Reperfusion. Skeletal muscle. Diethylenetriaminepentaacetic acid. Rats.

Conflito de interesse: nenhum
 Fonte de financiamento: nenhuma

Endereço para correspondência:

José Bitu-Moreno
 Pça Athos Fragata, 25/502
 17501-220 Marília – SP
 jbmoreno@famema.br

Data do recebimento: 15/05/2002
 Data da revisão: 11/06/2002
 Data da aprovação: 11/07/2002