

KLEDER GOMES DE ALMEIDA

**EFEITOS DO DIMETILSULFÓXIDO E DA OXIGENOTERAPIA
HIPERBÁRICA EM RETALHOCUTÂNEO: AVALIAÇÃO
MACROSCÓPICA E CELULAR.**

CAMPO GRANDE
2015

KLEDER GOMES DE ALMEIDA

**EFEITOS DO DIMETILSULFÓXIDO E DA OXIGENOTERAPIA
HIPERBÁRICA EM RETALHO CUTÂNEO: AVALIAÇÃO
MACROSCÓPICA E CELULAR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, objetivando a obtenção do título de Doutor.

Área de Concentração: Tecnologia e Saúde, Modelos Animais de Doença.

Orientador: Prof. Dr. Albert Schiaveto de Souza.

Co-orientador: Prof. Dr. Rodrigo Juliano Oliveira.

CAMPO GRANDE
2015

ALMEIDA, Kleider Gomes de

Efeitos do dimetilsulfóxido e da oxigenoterapia hiperbárica em retalho cutâneo: avaliação macroscópica e celular. Campo Grande MS, 2015

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Effects of dimethylsulfoxide and hyperbaric therapy in skin flap: assessment macroscopic and cellular.

1. Retalho cirúrgico 2. Dimetilsulfoxido 3. Oxigenação Hiperbárica 4. Ratos

KLEDER GOMES DE ALMEIDA

**EFEITOS DO DIMETILSULFÓXIDO E DA OXIGENOTERAPIA HIPERBÁRICA EM
RETALHO CUTÂNEO: AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA E CELULAR.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso de Sul, objetivando o título de Doutor.

Resultado: Aprovado

Campo Grande (MS), 11 de Fevereiro de 2015.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Doutor Albert Schiaveto de Souza (Presidente)
Universidade Federal de Mato Grosso de Sul (UFMS)

Prof. Doutor Marcelo Rosseto
Universidade Federal de Mato Grosso de Sul (UFMS)

Prof. Doutor Daniel Nunes e Silva
Universidade Federal de Mato Grosso de Sul (UFMS)

Prof^a. Doutora Renata Matuo
Universidade Federal de Mato Grosso de SUL (UFMS)

Prof^a. Doutora Doroty Mesquita Dourado
Universidade Anhanguera-Uniderp

SUPLENTE

Prof. Doutor Rodrigo Juliano Oliveira
Universidade Federal de Mato Grosso de Sul (UFMS)

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese a Deus, a minha família, em especial minha esposa Paulete, e aos meus maiores tesouros: meus filhos Enzo e Paula, com meu amor incondicional.

À Edna Maria Nukariya, amiga e companheira em todas as horas de nossas vidas.

Sem eles nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

Ao **Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste**, através de seus professores e funcionários que possibilitaram a concretização deste grande sonho.

Ao **Professor Doutor Ricardo Dutra Aydos**, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste.

Ao meu Orientador, **Professor Doutor Albert Schiaveto de Souza**, pela sua incansável dedicação e amizade. Além de um excelente Professor, é um exemplo a ser seguido.

Ao meu Co-orientador **Professor Doutor Rodrigo Juliano de Oliveira**, pesquisador do Centro de Estudos em Células Troncos, Terapia Celular e Genética Toxicológica, brilhante biólogo que me despertou o conhecimento da Biologia Molecular.

À **Professora Doroty Mesquita Dourado**, Doutora em Biologia Celular e Estrutural da Universidade Anhanguera-Uniderp, pela responsabilidade e competência dispensada ao estudo microscópico neste trabalho.

Ao **Médico Residente** em Cirurgia Plástica da Santa Casa, **Dr. Elson Adorno Filho**, e ao **Biólogo Wagner de Souza Fernandes**, companheiros constantes nesta tarefa.

Ao **Claudio Gonçalves Alves**, Técnico do Laboratório de Histologia da UFMS.

À **Maria Helena Fermiano**, Técnica do Laboratório de Toxilogia e Plantas Medicinais da Universidade Anhanguera-Uniderp Agrárias-MS.

Ao **Centro de Medicina Hiperbárica de Campo Grande**, que permitiu utilizar sua câmara hiperbárica para a realização dos experimentos.

À **Professora Mestra Telma Bazzano da Silva Carvalho**, bióloga e Chefe do Biotério da UFMS, por permitir que pudesse realizar a etapa prática desta pesquisa.

À **Professora Dra. Maria Araújo Teixeira**, Responsável Técnica do Biotério Central da UFMS.

Ao Mestrando do Programa de Farmácia da UFMS, **Flávio Henrique de Souza Araújo**, pelo auxílio nos testes histológicos.

À empresa **TOTALMAT(SP)**, que construiu a caixa de experimentação, adaptada para uso na câmara multiplace.

Ao **CETROGEN**, Centro de Células Troncos, Terapia Celular e Genética Toxicológica da UFMS, a todos os seus funcionários, minha admiração, respeito e gratidão pelo empenho e grande ajuda na concretização deste sonho.

À **Dra. Zuleica Shimado Tatibana**, pela preparação das lâminas.

Às secretárias do Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro Oeste, **Vera Nascimento Silva e Áurea Soares Gobi**, que sempre me receberam com educação e profissionalismo.

A todos que, direta ou indiretamente, auxiliaram na realização deste trabalho, sem os quais seria impossível alcançar o objetivo final.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

A minha mãe, **Elza Gomes de Almeida** e ao meu pai, **Francisco de Assis de Almeida**, *in memoriam*, pela vida e seus exemplos que fizeram de mim uma pessoa melhor. É com muito orgulho que os tenho eternamente... Obrigado.

RESUMO

Almeida, KG. Efeitos do dimetilsulfóxido e da oxigenoterapia hiperbárica em retalho cutâneo: avaliação macroscópica e celular. Campo Grande, 2015. [Tese- Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

Objetivo: O presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos da oxigenoterapia hiperbárica (OHB) e do dimetilsulfóxido (DMSO) na necrose tecidual, genotoxicidade e na apoptose celular em retalhos cutâneos randômicos em ratos.

Método: cinquenta ratos Wistar machos foram divididos aleatoriamente em cinco grupos: grupo controle (CT), onde o retalho de pele retangular de (2x8cm) foi dissecado a partir da camada muscular dorsal, preservando o pedículo cranial, elevado e fixado ao leito. Grupo água destilada (AD) injetou-se AD na metade distal do retalho, assim como grupo DMSO onde foi injetado DMSO a 5%, o grupo OHB onde foi realizado apenas o tratamento com OHB e grupo DMSO+OHB (DMSO associado a OHB) onde foi acrescentado o tratamento com oxigênio a 100% a 2,5 atmosferas absolutas (ATA) por uma hora, duas horas após o experimento, diariamente, por dez dias consecutivos. No décimo dia, os animais foram fotografados e realizado a coleta de tecido da porção central do terço distal do retalho viável para avaliação microscópica.

Resultados: Não houve diferença entre os grupos em relação ao percentual de necrose do retalho cutâneo (ANOVA, $p=0,249$). O percentual e o escore de dano do DNA foi menor nos grupos OHB e DMSO+OHB, quando comparado com os demais grupos estudados (Tukey, $p<0,05$). O percentual de células viáveis (91,00%) e o índice de viabilidade celular (91,00%) no grupo OHB foi maior do que aquele para os demais grupos ($p<0,05$). Por outro lado, o percentual de células em apoptose inicial (6,80%) e final (2,20%), bem como o índice apoptótico (9,00%), foi menor no grupo OHB, quando comparado aos demais grupos experimentais ($p<0,05$).

Conclusão: O tratamento com OHB, DMSO ou sua combinação não foi capaz de diminuir a área de necrose no retalho cutâneo. Por outro lado, a terapia hiperbárica aumentou a viabilidade celular e diminuiu o dano no DNA e a apoptose das células do retalho cutâneo.

Palavras-chave: oxigenação hiperbárica, retalhos cirúrgicos, dimetilsulfóxido, ratos.

ABSTRACT

Almeida, KG. **Effects of dimethyl sulfoxide and hyperbaric oxygen therapy in skin flap: macroscopic and cellular evaluation.** Campo Grande, 2015. [Tese-Graduate Program in Health and Development in the Midwest Region of the Federal University of Mato Grosso do Sul].

Purpose: This study aimed to investigate the effects of hyperbaric oxygen therapy and dimethyl sulfoxide (DMSO) in tissue necrosis, genotoxicity and cell apoptosis in random skin flaps.

Method: Fifty male Wistar rats were randomly divided into five groups: control group (CT), where the retail rectangular skin (2x8cm) was dissected from the dorsal muscle layer, preserving the cranial vessels, high and fixed to the bed. Group distilled water (AD), AD injected himself in the distal half of the flap, as well as dimethyl sulfoxide group (DMSO) where 5% DMSO was injected, the HBOT group where it was held only treatment with HBO and HBO + DMSO group added treatment with 100% oxygen at 2,5 atmospheres absolute (ATA) for an hour, two hours after the experiment, daily for ten consecutive days. On the tenth day, the animals were photographed and performed at the central portion of tissue collected from distal flap viable for microscopic evaluation.

Results: The percentage of necrosis at the end of the experiment the groups were: CT = 43,83 %, AD= 46,79 %, DMSO = 47,19 % OHB = 38,30% and DMSO + OHB = 45,94 % with $p= 0,249$. The average weight gain between groups at the end of the experiment was 22,98 g with $p= 0,266$ We found a cell viability index of 87,40% (CT), 86,20% (AD), 84,60 % (DMSO), 86,60 % (DMSO + OHB) and 91% (OHB) with $p < 0,001$, and cell viability index of 12.60 (CT), 12.00 (AD), 15.40 (DMSO), 9.00 (OHB) and 12,00 (DMSO + OHB) with $p < 0,001$ genotoxicity test found a percentage of cells with DNA damage 22,80 (CT), 22,60 (AD), 26,00 (DMSO), 8,80 (DMSO + OHB), and 7,20 (OHB), with $p < 0,001$.

Conclusion: There was statistically significant effect of reduced area of necrosis between groups but there was a reduction in the cellular DNA damage and apoptosis index in the OHB group, statistically significant.

Keywords: hyperbaric oxygenation, surgical flaps, dimethyl sulfoxide, rats.

LISTAS DE TABELAS

- Tabela 1-** Resultados referentes ao ganho de peso ao final do experimento, em cada um dos grupos estudados.....57
- ..
- Tabela 2 -** Valores médios \pm erro padrão da média da frequência de células com dano no DNA, distribuição entre as classes de danos e escore referentes aos testes de genotoxicidade nos diferentes grupos estudados.....58
- Tabela 3 -** Valores médios \pm erro padrão da média da frequência de células apoptóticas e necróticas em animais nos diferentes grupos estudados.....59

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Distribuição dos animais nos diferentes grupos e subgrupos.....42
- Figura 2** - Dissecção do retalho cutâneo dorsal do rato na dimensão de 2cm de largura por 8cm de comprimento, com base cranial (AD-6).....44
- Figura 3** - Elevação do retalho cutâneo do seu leito (AD-6).....44
- Figura 4** - Sutura do retalho ao leito com fio de poliamida 4.0 (AD-1).....45
- Figura 5** - Demarcação da área a ser infiltrada em cada centímetro quadrado, na metade distal do retalho, com AD e DMSO (AD-2).....46
- Figura 6** - Injeção subcutânea da droga com um seringa de 1 ml com agulha de insulina 0,45x13mm (DMSO-3).....46
- Figura 7** - Caixa de acrílico com capacidade para 10 animais de pequeno porte (TOTALMAT-SP/BR).....47
- Figura 8** - A: Fluxômetro no interior na câmara, para controle do volume de oxigênio na entrada. B: Oxímetro digital do painel de controle da câmara onde é observada a saturação de oxigênio a 100% no interior da caixa de experimento. C: Câmara multiplace(OXIMED-MS). Ano e modelo 2001, Metalúrgica União – ES..... 48
- Figura 9**- Local de ressecção de tecido (0,5X0,5 cm) para avaliação histológica (DMSO-8).....49
- Figura 10** - Câmara de CO₂, para eutanásia dos animais.....49
- Figura 11** - Cálculo de área de necrose, realizado pelo programa *imageJ*.(AD-)....50
- Figura 12** -Classificação do teste do cometa levando em consideração o diâmetro do nucleóide e tamanho da cauda. Onde A=Classe 0, B=Classe 1, C=Classe 2 e D=Classe 3. Aumento total de 400x.....53
- Figura 13** - Classificação do teste de viabilidade celular.Análise de microscopia de fluorescência dos núcleos das células com aumento de 400x.Onde A= Células normais ou viáveis, B= Apoptose inicial, C= Apoptose final e D= Necrose.....54
- Figura 14** - Gráfico do percentual de necrose ao final do experimento, em cada um dos grupos experimentais. Cada coluna representa o valor percentual de necrose e a barra o erro padrão da média. CT= Controle, AD= Água destilada, DMSO= Dimetilsulfóxido, OHB= Oxigenoterapia hiperbárica, DMSO+OHB= Dimetilsulfóxido associado à oxigenoterapia hiperbárica.....56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Alaranjado de acridina
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AD	Água destilada
ATA	Atmosfera absoluta
ATP	Trifosfato de adenosina
BNip3	Gene da família da proteína, pró-apoptótica, BNIP
Bcl-2	Família de proteína inibidora da apoptose
BE	Brometo de etídio
CAT	Capacidade antioxidante
CO ₂	Gás carbônico
CFM	Conselho Federal de Medicina
CT	Controle
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiamina tetra-acético
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
ERTO	Espécies reativas tóxicas do oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
FAZ ligante	Ligante da proteína Faz (TNF Superfamília ligante, membro 6)
FDA	Food and drug administration
HIF-1a	Fator de indução à hipóxia
HE	Hematoxilina-eosina
HCL	Ácido clorídrico
ID	Índice de dano
LPM	Agarose de baixo ponto de fusão
MDA	Malondialdeído
MEC	Membrana extracelular

MET	Microscópico eletrônico de transmissão
NAC	N-acetilcisteína
OH	Hidroxila
OHB	Oxigenoterapia hiperbárica
PDS	Tampão fosfato
PH	Potencial de hidrogeniônico
PR	<i>PicrosiriusRed</i>
RGB	<i>Sistema red, green, blue</i>
RLs	Radicais livres
RNA	Ácido ribonucléico
TGO	Transaminase glutâmico-oxalacético
TP53	Gene TP53
TNF	Fator de necrose tumoral
UA	Unidade arbitrária
UFMS	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

LISTAS DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
nº	Número
mg	Miligrama
®	Marca registrada
g	Gramma
cm	Centímetro
Kg	Quilograma
µg	Micrograma
°	Graus
mL	Mililitro
mmHg	Milímetro de mercúrio
nm	Nanômetro
cm ²	Centímetro quadrado
cm ³	Centímetro cúbico
µL	microlitro
mm	Milímetro
V	Volts
mA	Miliâmpere
mg/mL	Miligrama por mililitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 Trabalhos Experimentais.....	25
2.2 Oxigenoterapia Hiperbárica (OHB).....	27
2.3 Estudos Experimentais	28
2.4 Apoptose e Necrose	33
2.5 Ensaio do Cometa	39
2.6 Ensaio de Viabilidade Celular.....	40
3 OBJETIVOS	41
3.1 Geral.....	41
3.2 Específicos	41
4 MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1 Aprovação	42
4.2 Amostra	42
4.3 Delineamento Experimental	43
4.4 Procedimentos	43
4.4.1 Procedimento Anestésico	43
4.4.2 Procedimento Cirúrgico	43
4.4.3 Procedimentos de Administração	45
4.4.4 Procedimento de OHB.....	47
4.5 Amostras Coletadas	48
4.6 Eutanásia	49
4.7 Estudo Macroscópico	50
4.7.1 Avaliação do Percentual de Área de Necrose	50
4.8 Estudo Microscópico	50
4.8.1 Ensaio do Cometa.....	50
4.8.2 Análise da Viabilidade Celular e Contagem Diferencial de Apoptose e Necrose	53
4.9 Análise Estatística	55
5 RESULTADOS	56

6 DISCUSSÃO	60
7 CONCLUSÕES	68
8 REFERÊNCIAS.....	69
9 APÊNDICES.....	76
9.1 APÊNDICE A - Variação de peso dos animais.....	76
9.2 APÊNDICE B - Resultados da variação de área e percentual de necrose dos grupos.	77
9.3 APÊNDICE C - Resultado da análise da viabilidade celular e contagem diferencial de apoptose e necrose.....	78
9.4 APÊNDICE D - Resultados do ensaio do cometa.	79
10 ANEXO.....	80
10.1 ANEXO A – Certificado CEUA	80
10.2 ANEXO B - Normas adotadas	81

1 INTRODUÇÃO

O reparo de lesões do sistema tegumentar com perda de substâncias após traumatismo, ressecção tumoral, infecção ou isquemia tecidual pode envolver o uso de retalhos cutâneos. Para a confecção dos chamados retalhos randomizados, a relação entre a área do retalho pretendido e a extensão do pedículo vascular que irá manter a irrigação arterial e drenagem venosa continua sendo um desafio para os cirurgiões (LEITE *et al.*, 2007).

A isquemia a que fica submetido o retalho, principalmente nas primeiras horas após sua confecção, é fundamental para determinar a extensão de sua viabilidade. Estudos experimentais em ratos demonstraram que o tempo para a formação do pedículo secundário ocorre em torno de nove dias. A formação de hematoma edema e a própria relação pedículo versus área do retalho podem acarretar necrose da porção distal em porcentagens que variam de 9% a 65%, de acordo com o modelo experimental testado (FREDERICK , MICHAEL, 1978).

Considerando que o retalho randômico está exposto, logo após sua confecção, aos fenômenos de isquemia que levarão ao aparecimento de espécies reativas de oxigênio, a utilização de uma medicação que tenha ação de remover esses radicais poderá ser de extrema valia nessa fase. A medicação deve estar disponível no sítio operatório em níveis farmacológicos e tempo adequado para exercer a ação desejada (MITRIEVY *et al.*, 2012).

Outra característica desejável é que ela possa ser aplicada em dose única (ALMEIDA *et al.*, 2004).

Uma revisão da literatura das últimas duas décadas em trabalhos publicados nas áreas de farmacologia básica demonstra que o dimetilsulfóxido (DMSO) possui a propriedade de varredor de radicais livres (RLs) que, quando aplicado antes, durante ou algumas horas após a lesão tecidual, mostrou ter efeitos benéficos, aumentando a viabilidade dos retalhos cutâneos em diferentes modelos experimentais, em diferentes concentrações e vias de administração (BAKAR *et al.*, 2012)

Uma droga como o DMSO pareceu ser uma escolha factível considerando suas características de agente antioxidante, sua facilidade de aplicação e sua solubilidade em líquidos orgânicos, permitindo a sua adequada concentração em níveis farmacológicos (SUMIDA *et al.*, 2011)

Para se obter, de modo rápido e seguro, nível adequado de concentração da droga no local desejado, tem-se a opção da via subcutânea, o que possibilita também que a aplicação seja realizada em dose única durante ou logo após o ato operatório (ALMEIDA *et al.*, 2004).

Para aumentar o efeito protetor sob os tecidos optamos por associar a oxigenoterapia hiperbárica (OHB), que é uma modalidade terapêutica usada há mais de 50 anos no mundo e reconhecida pelo Conselho Federal de Medicina (Resolução CFM nº 147/99). A OHB consiste na respiração de oxigênio puro a 100%, sob pressões atmosféricas de 2.0 a 3.0 atmosferas ou atmosfera absoluta (atm ou ATA), dentro de uma câmara de pressão (LARSON *et al.*, 2013).

A OHB exerce benefícios no tratamento de lesões isquêmicas agudas de partes moles e em feridas de difícil cicatrização (ROTH. *et al.*, 2011), havendo na literatura trabalhos que comprovam sua eficácia protetora em retalhos isquêmicos axiais e randomizados (BAYNOSA; ZAMBONI 2012, MCFARLANE; WENNUTH 1996).

Este oxigênio dissolvido no plasma pode proporcionar a maior parte do oxigênio necessário para manter a viabilidade de órgãos vitais como cérebro, rins e músculo cardíaco (BERTOLLOTO *et al.*, 2007).

Sua utilização experimental em retalhos cutâneos randomizados tem sido testada em vários modelos experimentais de animais e doença, mostrando sua eficácia protetora na diminuição da isquemia e necrose tecidual, porém, nenhum modelo associando ao efeito protetor da OHB com do DMSO intra-lesional foi encontrado na revisão bibliográfica realizada (ROCHA *et al.*, 2013).

A proposta é o estudo do DMSO subcutâneo e OHB e sua associação, em um modelo de retalho cutâneo randomizado, em ratos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Reconstruir defeitos por perda de substância é um dos grandes desafios que os cirurgiões enfrentam na tentativa de devolver a função e a estética, onde encontram barreiras e limitações, muitas vezes intransponíveis, dependendo do tipo de reconstrução que lhe é solicitada (RAPOSIO *et al.*, 2002)

Na grande maioria das vezes, são utilizados retalhos que podem ser simples ou compostos, seja com pele e gordura ou associados com músculos e ossos, para cobertura ou reconstrução de unidades funcionais e estéticas do corpo (CHEM *et al.*, 1982).

No emprego dessa técnica, a microcirculação é de suma importância. Sabe-se existir territórios que possuem vasos ou pedículos que mantêm uma vascularização dominante chamada de retalhos axiais e que facilitam as reconstruções; em outras ocasiões, lança-se mão de retalhos que não possuem uma vascularização dominante que são chamados retalhos de fluxo ao acaso ou randômicos, os quais, dependendo de fatores determinantes, podem influenciar direta ou indiretamente na reconstrução, agravando a perfusão da microcirculação, levando à isquemia e necrose do tecido nas reconstruções, limitando sua utilização (GALLA *et al.*, 1991).

Inúmeras drogas têm sido utilizadas para tentar melhorar a perfusão dos retalhos, algumas realizando vasodilatação, outras procedendo à chamada varredura dos radicais livres (RLs) (FREDERICCK; MICHAEL 1978).

Os radicais livres são citotóxicos e capazes de participar de reações em cadeia que culminam com a necrose tecidual (MOURA, SANTOS, 1998)

A droga utilizada neste estudo, o DMSO, é um antioxidante não enzimático que atua sobre o radical hidroxila (OH), tendo sido utilizado inicialmente como conservante, antes que a sua atividade antioxidativa fosse conhecida (STANLEY, HERSCHLER 1985).

O DMSO é um composto orgânico simples, pouco viscoso, umequitante, com capacidade de atravessar membranas (células e organelas) e com várias ações biológicas, carreador de substâncias associadas e antiinflamatório e varredor de RLs (COSTA 1996). Sua estrutura química é uma molécula pequena cuja sua fórmula é C_2H_6OS (C-30, 74%, H-7,7%, O-20,5%, S-41,0%), apresentando uma estrutura

piramidal com enxofre central, dois grupos metila e um átomo de oxigênio, com par de elétrons não ligados nos ápices (JACOB *et al.*, 1964).

Esta estrutura confere ao DMSO uma propriedade solvente excepcional, o par de elétrons livre permite que participem na transferência de elétrons tornando o DMSO um potente varredor de radicais livres com alto grau de especificidade principalmente para o nocivo radical hidroxila (OH), tendo sido utilizado em 1866, na Rússia, como um subproduto utilizado na indústria madeireira (ARTURSON, KHANNA, 1970).

Em 1959, o DMSO foi usado na criopreservação de tecidos (órgão, células e sêmen de búfalo. Embora não seja considerado mais uma droga “maravilhosa”, o DMSO ainda é muito vendido e, após sua introdução na década de 60, vem sendo usado em processos degenerativos, em tratamento tópico para entorses, distensões, contusões e artrite (STANLEY; HERSCHLER, 1985).

O *Food and Drug Administration* (FDA) após proibir as pesquisas com o DMSO, por medo de que a substância química pudesse causar danos oculares sérios, permitiu posteriormente que as investigações continuassem e, em 1978, aprovou o uso do DMSO no tratamento dos sintomas da cistite intersticial (fibrose da parede da bexiga) que ocorrem principalmente em mulheres com mais de 40 anos (GALLEGO-VILAR *et al.*, 2013).

O DMSO está sendo estudado, mas ainda não foi aprovado para uso em inúmeras doenças da pele, doenças nervosas e auto-imunes, também está sendo verificado seu efeito sobre algumas formas de câncer e em pacientes com danos cerebrais, vítimas de problemas da medula espinhal e derrame cerebral. Alguns estudos revelaram descobertas negativas, mas ao mesmo tempo, não relataram efeitos colaterais sérios nos olhos ou rins após um tratamento prolongado com uma dose baixa do DMSO (KLIGMAN 1993).

Há indícios preliminares de que a administração intravenosa do DMSO pode ser útil no tratamento de indivíduos com danos cerebrais, mas o uso do DMSO para este fim, bem como para a maioria dos outros, continua especulativo necessitando de estudos bem controlados (SHIGETOSHI *et al.*, 1997).

São características do DMSO, a preservação de unidades biológicas, desde unidades subcelulares até um embrião intacto e, quando penetra em um sistema biológico, ele se torna uma molécula ubíqua, capaz de eliminar os RLs intracelulares (STANLEY; HERCHLER, 1985).

O DMSO é eliminado do organismo no máximo em 48 horas principalmente pela via renal (mais demorada), pulmonar e pele (perspiração), sendo encontrados apenas 2% da substância restante dentro do organismo; a dose letal em ratos de experimentação é 21.400 mg/kg quando administrado via oral; 3.820mg/kg , quando administrado via endovenosa; e 20.500 mg/kg quando administrado via subcutânea (ALI, 2002).

Tem-se demonstrado várias indicações clínicas do DMSO, porém a única indicada pela FDA é para a cistite intersticial. Contudo, após várias experiências, tem se estendido estas indicações para inúmeras patologias tais como: doenças vasculares (insuficiência venosa: varizes, úlceras varicosas, úlceras arteriais, doenças cardíacas diferenciadas, problemas vasculares cerebrais), doenças reumáticas (artrite reumatóide, osteoartrose; tendinite, bursite, mialgias inespecíficas, espondilite anquilosante, esclerodermia; compressão radicular nos processos de hérnia de disco, alterações no desenvolvimento neurológico de crianças (retardo mental, síndrome de Down), doenças da retina, tinnitus subjetivo, insuficiência respiratória broncopulmonar crônica, esterilidade por obstrução das trompas de falópio e bronquiolite (SILVEIRA *et al.*, 2012).

O DMSO tem a capacidade de atravessar membranas celulares e organelas intracelulares, sem causar alteração ou lesão, permanente ou reversível, por mecanismo de ligação com a água, determinando presença de ligações com hidrogênio. Sua concentração ideal é de 70 a 90%. Acima de 90% não há carreamento, abaixo de 70%, não cria pressão osmótica suficiente para atravessar a membrana. Quando utilizados por via endovenosa, as baixas concentrações são suficientes, porque são lançadas diretamente no meio onde atuarão terapêuticamente. Atua também como carreador no transporte de outras substâncias para dentro de células e organelas. Este carreamento depende do peso molecular, da forma estrutural e da eletroquímica das moléculas (STANLEY; HERCHLER 1985).

O DMSO pode carrear: agentes antitumorais, antivirais, corticosteróides, antibióticos tópicos. Algumas substâncias como a hidrocortisona e hexaclorofeno são carreadas pelo DMSO para camadas mais profundas do extrato córneo e são armazenadas, tendo também uma função de reserva, podendo permanecer até 16 dias, resistindo à depleção por lavagem de superfície da pele com água, sabão e álcool (LESLIE *et al.*, 1996).

O uso endovenoso requer experiência para definir a dose necessária para obtenção do efeito terapêutico. A utilização como analgésico mais freqüente é a solução de DMSO a 70% em 30% de água. O mecanismo não está totalmente elucidado, parece que ocorre uma diminuição na condução dos estímulos nervosos do cérebro até o local da dor - bloqueio das fibras periféricas tipo C - que conduziriam dor somática (pele, músculos, cápsula arterial), atuando sobre os canais de sódio e potássio; seu efeito é rápido, estável e reversível, semelhante à morfina, com as vantagens de ter maior duração (morfina 4 horas; DMSO 6 horas) e não causar dependência (ALI, 2002).

O mecanismo em reduzir a velocidade de condução da fibra C não é claro. Detectável em baixas concentrações, talvez o DMSO altere o estado da hidratação do íon K^+ e, conseqüentemente, sua capacidade de penetrar nos canais; uma segunda possibilidade é que um aumento na resistência da membrana, devido ao bloqueio dos canais de K^+ , possa afetar a velocidade de condução; neste caso, a magnitude e direção do efeito não são facilmente previsíveis, sendo a velocidade de condução reduzida pelo aumento da resistência elétrica extracelular (KIM *et al.*, 1999).

O DMSO reduz a resistência de várias espécies de bactérias, fungos e parasitas, em concentrações de 30 a 50%. Em concentrações de 80%, inativou viroses causadas por RNA vírus, influenza A vírus, Influenza A₂ vírus e DNA vírus. O bacilo da tuberculose, resistente a 2.000 μ g de estreptomicina e isoniazida, tornou-se sensível a 10 μ g das medicações em tratamento prévio com DMSO de 0,5 a 5%. O mecanismo ocorreria por uma perda da conformação estrutural do RNA, durante a síntese protéica (STANLEY; HERSCHELER, 1985).

O uso tópico promove efeito leve a moderado. A administração por via endovenosa proporciona melhor ação, com rápida diurese, importante em situações em que correções rápidas de edema são necessárias, como em traumas raqui-medular e cerebral. Dois mecanismos podem estar envolvidos no aumento do volume urinário: ação de um efeito osmótico sobre as células renais e alteração do fluxo dos fluídos, através da membrana de filtração renal (JACOB *et al.*, 1964).

A função de regular a liberação de acetilcolina é importante em várias atividades do Sistema Nervoso. O efeito potencial do DMSO, aumentando os níveis de acetilcolina, justificaria a melhora dos movimentos musculares de pacientes

tetraplégicos tratados com DMSO e de crianças com retardo mental (SHIGETOSHI *et al.*, 1997).

Os efeitos do DMSO em músculos esqueléticos, lisos e cardíacos na concentração de 0,6 a 6%, podem estar relacionados com depressão da resposta do diafragma por ação direta (muscular) e indireta (nervosa) e por estímulo elétrico, causando fasciculação espontânea da musculatura esquelética (JACOB *et al.*, 1964).

O DMSO melhora a irrigação sanguínea, com aumento da oferta de nutrientes e oxigênio para os tecidos. O efeito vasodilatador ocorre por inibição da histamina, justificando uma rápida melhora em luxações, lesões medulares e do Sistema Nervoso Central (WERKER *et al.*, 1995).

A aplicação tópica proporciona um aumento na viabilidade dos retalhos de pele. A administração intraperitoneal ou intravenosa aumentou a viabilidade dos retalhos randomizados e pediculados (JEROME *et al.*, 1967). Outra ação do DMSO a 5% é sua atuação sobre as plaquetas: diminui a agregação plaquetária e atua contra substâncias vasoativas que determinam obstrução do lúmen (antitrombótico, diminuindo a adesividade plaquetária) e, no diâmetro do vaso (dilatador), é importante em quadros isquêmicos cerebrais. No transporte de outras substâncias para dentro do organismo, de forma seletiva, o DMSO até 90% tem atuação melhor do que a 100%. Ao transportar substâncias também determina uma maior ou menor ação terapêutica da substância (WERKER *et al.*, 1995).

O DMSO parece controlar os mecanismos que desencadeiam as doenças autoimunes: artrites, miastenia grave, câncer e envelhecimento. O DMSO é capaz de neutralizar, parcial ou totalmente, a ação destes autoanticorpos e acredita-se, ainda, que o DMSO não altere a resposta imune, apenas promoveria uma leucocitose e intensificação da resistência às infecções bacterianas (STANLEY, HERSCHELER, 1985).

O DMSO influi na característica do tecido muscular; normalmente o tecido muscular tem duas funções: contração e relaxamento; no entanto, algumas circunstâncias acarretam a perda da capacidade de relaxamento, permanecendo em constante estado de espasmo muscular, sendo que seu efeito de relaxamento está relacionado com a permeabilidade celular, eliminando os metabólitos dos músculos, associados ao trabalho muscular de contração (OKAMOTO, 2001).

O DMSO induz a diferenciação morfológica e funcional das células leucêmicas em humanos e ratos. Blastos e células leucêmicas podem ser induzidos por agentes químicos externos a se maturarem em neutrófilos e monócitos. O fenótipo das células leucêmicas resulta, ainda, de duas aberrações genéticas internas e da resposta das células leucêmicas ao seu meio (KRYGER *et al.*, 2000)

Quando as células da leucemia mielóide são expostas, *in vitro*, a vários agentes (vitamina A e DMSO), ocorre perda do potencial proliferativo dos blastos, diminuição dos produtos de expressão da oncogênese, maturação das células leucêmicas em neutrófilos funcionais, após 5 dias (WERKER *et al.*, 1995).

O DMSO pode ser administrado em concentração de 70 a 90%. Se houver muita irritação na pele, é conveniente utilizá-lo em gel a 50% associado a um analgésico ou antiinflamatório. A sensação inicial é de queimação e picada e diminui espontaneamente após 1 a 2 semanas de tratamento. Essas reações podem ser minimizadas com o DMSO na concentração de 30 a 50% nas primeiras 2 semanas e aumento gradual até atingir 75%. Efeitos colaterais, como náuseas, pruridos, halitose, podem ser minimizados com o uso do DMSO modificado por uréia. Uma fórmula típica em peso com uréia: 60 partes de DMSO, 20 partes de uréia e 20 partes de água, pode ser transformada em gel ou ser mantida líquida, para alterações do sistema músculo-esquelético e é aplicada em pacientes que não responderam satisfatoriamente à aplicação tópica durante 3 meses. Usado principalmente para mão e punhos, com concentração máxima de 75%, sendo que a 50% já é muito eficaz (KIM *et al.*, 1999).

Durante o tratamento, a pele torna-se seca, grossa e enrugada. O tratamento poderá ser interrompido quando se restaurar a mobilidade e flexibilidade articular. A pele readquire seu aspecto normal em 4 a 6 semanas (KIM *et al.*, 1999).

Pode ser efetuado com DMSO de 1 a 5% diluído em 5 a 10mL de solução salina, com aplicações em calcinose intersticial circunscrita, contratura tendinosa, adesão capsular em todos os pacientes que não obtiveram melhora satisfatória com DMSO tópico. As injeções são feitas a cada 4 dias, de 2 a 4 semana, de 1 a 10 injeções. A dose total do DMSO em administração subcutânea é de 0,1 a 5 mg/dia; a aplicação intravenosa é o meio de eleição para administração, sendo o tópico raramente utilizado. Este é indicado quando houver patologias que inviabilizem o seu uso endovenoso, sendo eficaz e seguro, na concentração a 99%, diluído em 250mL de soro fisiológico ou soro glicosado e infundido em 2 horas. Durante a fase

de ataque (doença reumáticas), este tratamento é realizado 2 a 3 vezes por semana e, na fase de manutenção, 1 vez por semana ou a cada 15 dias, dependendo da evolução terapêutica obtida durante o tratamento. Observam-se respostas mais rápidas em osteoartroses e mais lentas em artrite reumatóide, principalmente se estiver sob o uso de imunorreguladores (corticóides), levando até 1 ano para reintegração à sociedade. O tipo de patologia determinará a melhor via de administração. Em processos reumáticos a administração endovenosa é mais segura e isenta de efeitos colaterais, 2 a 3 vezes por semana ou em dias alternados. Em acometimentos localizados (bursite, tendinite), o uso tópico através de pomadas diariamente é mais eficaz (STANLEY. HERSCHELER, 1985).

Os efeitos colaterais locais são eritema e irritação com sensação de ardência, evidenciados apenas em aplicação tópica; prurido generalizado persistente em pacientes portadores de esclerose sistêmica; edema angioneurótico com prurido e eritema (em aplicação tópica do DMSO a 80%). Para atenuar essas reações, deve-se diluir o produto a 50% e ir aumentando gradualmente até chegar a 80%, em 30 dias. O odor é de alho ou milho doce e ocorre devido à formação do metabólito do DMSO: dimetilsulfoxido, que tem odor de éter, mas intensifica outros odores, bons ou ruins; o odor permanece de 4 a 12 horas (RAPOSIO *et al.*, 2002).

Com as mesmas características da halitose, a perspiração ocorre e não desaparece com o banho. Observa-se também letargia, fraqueza muscular, elevação transaminase glutâmico-oxalacético (TGO) isoladamente, sem outras alterações da função hepática. Todos estes sintomas são mais freqüentes na esclerodermia, cuja causa provável seja uma reação inflamatória muscular característica da patologia (SUAREZ *et al.*, 1999).

2.1 Trabalhos Experimentais

Jerome e cols., (1967) realizaram estudo experimental em ratos com uso de DMSO a 70%, via tópica, em retalhos de dorso de ratos com base distal 3:1, três vezes ao dia por 7 dias, tendo se referido que o mecanismo que caracteriza o benefício no uso do DMSO é sua fácil e rápida absorção pela pele, que tem efeito diluente ou hidroscópico, sugerindo que o DMSO aumente a permeabilidade celular

pois possui potente efeito histamínico protetor aumentando o suporte vascular circulatório quando usado topicamente.

Koehnein, (1970) estudou o efeito do DMSO em retalhos cutâneos via tópica a 89%, com base cranial, e concluiu que a expectativa no uso tópico do DMSO aumentaria a sobrevida do retalho pode ser falso.

Artuson e Khanna, (1970) estudaram o efeito da oxigenoterapia hiperbárica (OHB) e o dimetilsulfóxido e o complamin® em retalhos cutâneos de ratos, concluindo que o efeito protetor do retalho pelo DMSO pode ser resultado do efeito anti edematoso; os melhores resultados foram observados quando tratado com OHB, porém de efeito limitado, sugerindo um período de tratamento maior com possíveis resultados significantes.

Grossman *et al.*,(1983) estudaram o efeito da hialuronidase e dimetil sulfóxido na proteção de retalhos cutâneos e seu mecanismo de ação, demonstraram que tanto a hialuronidase quanto o DMSO aumentaram a sobrevida do retalho, supondo que estas substâncias exercem os seus efeitos através da redução do edema do tecido e auxiliando o transporte de substâncias nutritivas para o tecido na fase aguda.

Jeffrey *et al.*, (1987) utilizaram 1.5mg/kg de DMSO administrado intraperitoneal em retalhos pediculados, 3x6cm, e avaliaram a velocidade de perfusão com Laser Doppler até o terceiro dia de pós-operatório; a sobrevida dos retalhos foi significativamente maior no grupo tratado com DMSO quando comparado ao grupo controle com aumento significativo da perfusão no terceiro dia .

Robert *et al.*,(1994) estudaram o efeito do DMSO em retalhos pendiculados submetido à isquemia na dose de 1.5 mg/kg , intraperitoneal e observaram que o DMSO administrado na reperfusão e no pós-operatório, por 5 dias, diminui significativamente a necrose dos retalhos.

Duarte e Ferreira, (1997) estudaram a ação do DMSO via enteral em retalhos cutâneos randomizados de ratos na dose de 2ml/kg/dia de DMSO a 60% por gavagem, por 7 dias, demonstrando que o DMSO foi eficiente na redução da área de necrose comparado com um grupo controle.

Raposio *et al.*,(2002) utilizaram o DMSO em aplicação tópica em retalhos miocutâneos de coelhos, não achando significância estatística entre os grupos testados, porém quando associado ao peróxido de hidrogênio, o percentual de proteção foi de vinte por cento a mais, comparado ao grupo controle.

Hsu *et al.*,(2002) estudaram o efeito do DMSO e o Ácido Oleico aplicado por via tópica em retalhos miocutâneos de ratos sob isquemia, encontrando valores estatísticos mais significantes com o uso do ácido oléico (vol. 10%) na proteção do retalho, sendo que no DMSO e sua associação não houve uma resposta satisfatória, e suas razões são desconhecidas, questionando-se a adequada concentração tópica do DMSO (50%).

Almeida *et al.*,(2004) avaliaram a ação do DMSO via subcutânea na concentração de 5% em retalhos cutâneos randômicos de ratos, mostrando sua eficácia na proteção do retalho, comparado ao grupo controle, expressando valores estatísticos significantes e com aspecto histológico de reparação tecidual mais precoce.

Sumer *et al.*,(2005), estudaram a tolerância de retalhos fasciocutâneos de ratos divididos em três grupos tratados com um inibidor da caspase (Q-VD-OPH), associados ao DMSO, o DMSO isoladamente e uma solução salina: concluíram que o pré-tratamento do DMSO ou associado ao inibidor da caspase aumentou significativamente a tolerância do retalho à isquemia.

Leite *et al.*,(2007), estudaram o efeito da nicotina em retalhos cutâneos de ratos associado ao tratamento com o DMSO via oral; amostras de sangue e pele foram coletadas para permitir a determinação dos níveis de malondialdeídos (MDA), comprovando que os níveis de malondialdeídos em ambas as amostras de soro e de pele foram menores nos animais que receberam o DMSO, mostrando que o efeito deletério da nicotina foi bloqueado pelo DMSO.

2.2 Oxigenoterapia Hiperbárica (OHB)

Em Cirurgia Plástica, a OHB está indicada em tratamento de pacientes grandes queimados e em retalhos isquêmicos (randomizados, pediculados ou livres) quando da utilização de técnicas microcirúrgicas; em reparações complexas proporcionando hiperoxigenação dos tecidos, ativação dos fibroblastos, modulação da resposta inflamatória, aceleração dos fatores de crescimento, além de apresentar efeito antibacteriano (ZAMBONI *et al.*, 1992).

A terapia com OHB não é necessária nem recomendada no auxílio de enxertias ou rotações de tecidos normais e não comprometidos. Entretanto, em

tecidos comprometidos por irradiação, ou em casos onde há diminuição da perfusão capilar ou hipóxia, a OHB tem se mostrado extremamente útil na recuperação do retalho. A OHB pode ajudar a maximizar a viabilidade do tecido comprometido tanto reduzindo a necessidade de re-enxertar quanto de repetir os procedimentos de rotação de tecidos. Vários estudos têm mostrado a eficácia da OHB no aumento da viabilidade das enxertias e rotações de tecidos em uma variedade de situações clínicas e experimentais (SUMER *et al.*, 2005).

O tratamento é feito a uma pressão de 2,0-2,5 ATA e administrado oxigênio a 100% de 90 a 120 minutos, dependendo do tipo de equipamento de OHB disponível. O tratamento inicial pode ser realizado duas vezes ao dia, e uma vez que o enxerto ou retalho apresentam-se mais viáveis e estáveis, uma vez ao dia pode ser suficiente. Para ser maximamente efetivo a OHB deverá ser iniciada tão logo os sinais de comprometimento do retalho apareçam. A viabilidade do retalho pode ser detectada por observação clínica assim como por uma variedade de técnicas invasivas e não invasivas, incluindo oximetria transcutânea e estudos através de laser Doppler com insuficiência arterial, venosa e as duas combinadas (GAMMPER *et al.*, 2002).

2.3 Estudos Experimentais

Champion e cols., (1967), usando um modelo pediculado de rotação de retalho em coelhos, foram capazes de obter 100% de sobrevivência dos tecidos tratados com OHB (2 ATA por 2 horas, duas vezes ao dia por 5 dias). Todas as rotações de controle tiveram áreas significantes de necrose maiores que 40%.

Shulman e Krohn (1967), em um estudo de cicatrização de feridas profundas ou parcialmente profundas em camundongos, evidenciaram que a aplicação de OHB reduziu o tempo de cicatrização significativamente. Em seguida, foi demonstrado que a combinação de repetidas enxertias e OHB reduziu pela metade o tempo de cicatrização de feridas parcialmente profundas comparadas aos controles não tratados com OHB. Não foi feita nenhuma tentativa de esterilização das feridas na realização destas cirurgias. Ocorreu contaminação superficial em todos os animais, mas a infecção foi absolutamente ausente em todos os grupos tratados com OHB.

Nimikoski (1970, constatou melhora em 51% da extensão da porção viável de retalhos randomizados em camundongos tratados com OHB, (2.5 ATA por 2 horas, duas vezes ao dia por 2 dias), comparados aos controles que respiravam ar ambiente ($p < 0.001$). O autor propôs que o aumento da difusão de oxigênio na área onde há distúrbio da circulação foi o mecanismo para a melhora da viabilidade do tecido.

Gruber *et al.*, (1970), mostraram que em retalhos realizados em camundongos, no emprego da OHB, a 3 ATA aumentou a pressão média de oxigênio para 600 mmHg, enquanto que, ao nível do mar, a administração de 100% de oxigênio não aumentou a pressão média de oxigênio nesses modelos de retalho.

Arturson e Khanna (1970), em um estudo experimental randomizado padrão em retalhos de dorso em camundongos, desenhados para haver um grau de necrose previsível e constante, revelaram que a OHB teve papel significante na melhora da sobrevida dos retalhos se comparados aos controles não tratados com OHB ($p < 0,05$). Outros agentes supostamente protetores foram estudados e, em alguns casos, aumentaram a sobrevida do retalho. Entretanto, os melhores resultados foram obtidos em camundongos tratados com OHB.

Jurell e Kaijser (1973), usando um retalho pediculado em crânio de camundongos, demonstraram que camundongos tratados com OHB tiveram a sobrevida do retalho significativamente maior se comparados aos controles ($p < 0,001$). A área sadia do grupo que recebeu OHB foi, aproximadamente, duas vezes maior que a do grupo controle. Mesmo quando o início do tratamento com OHB demorou 24 horas após a cirurgia, havia ainda uma área sadia significativamente maior dos retalhos tratados com OHB quando comparados com os controles ($P < 0,01$). Entretanto, o aumento da área sadia foi maior quando a OHB foi iniciada imediatamente após a cirurgia. Este estudo enfatiza a importância de iniciar a OHB tão logo algum problema no retalho é suspeitado.

Greenwood e Gilchrist, (1973), demonstraram a eficácia da OHB em reduzir a extensão da necrose isquêmica em enxertos dermcutâneos em camundongos previamente irradiados. A média de enxertos que necrosaram foi significativamente maior ($p < 0,05$) no grupo controle (ar comprimido) em comparação com o grupo submetido à OHB.

Kivisari e Niinikoski (1975), em um estudo em camundongos, mostraram que a OHB a 2 ATA não teve efeito na velocidade de cicatrização de feridas abertas não

comprometidas em que a vascularização estava intacta. Entretanto, quando os bordos da lesão estavam desvascularizados, a OHB aumentou significativamente a velocidade de fechamento da ferida comparado ao grupo controle.

Manson *et al.*,(1980), em um estudo usando uma substância com ATPase para visualizar pequenos vasos sanguíneos, demonstraram que os capilares tinham seu comprimento aumentado 3 vezes em rotação de retalho de porcos que eram tratados com OHB, comparados aos controles de mesma idade.

Tan *et al.*,(1984) compararam dois grupos de ratos, utilizando retalhos neurocutâneos em ilha, tratados com OHB e com a pressão ambiente normal: os tratados com OHB exibiram um aumento significativo de sobrevivência dos retalhos.

Nemiroff *et al.*,(1984), investigaram os efeitos da OHB e irradiação em retalhos cutâneos sob condições variáveis, e seus estudos indicaram claramente que, para ser eficaz, deve-se administrar OHB sempre logo após o tratamento cirúrgico.

Nemiroff e Lungu (1987),elucidaram alguns dos mecanismos onde a OHB aumentou a sobrevida de retalhos randomizados; rotações de retalhos de animais tratados com OHB em comparação com o grupo controle foram analisadas em um método controlado padronizado. O número e o tamanho dos vasos sanguíneos da microvascularização foram documentados. O número absoluto de vasos sanguíneos na microcirculação foi significativamente maior para todos os grupos submetidos à OHB quando comparados com os grupos-controle ($p < 0,01$). A área média de superfície dos vasos dos retalhos dos grupos submetidos à OHB foi também significativamente maior que os controles em todos, menos em um dos grupos ($P < 0,01$). Os autores concluíram que a OHB aumentou significativamente a sobrevida do retalho por aumentar e/ou manter o número e, possivelmente, o tamanho dos vasos da microcirculação. Para ter maior eficácia, os autores estabeleceram que a OHB devesse ser administrada tão logo a cirurgia esteja concluída.

Nemiroff (1988), em estudos controlados com animais usando modelos de retalhos axiais e randomizados, demonstrou claramente que a OHB pode aumentar significativamente o aumento da viabilidade do retalho. O estudo de Nemiroff investigou os efeitos da pentoxifilina e da OHB em retalhos cutâneos em camundongos dentro de quatro condições. Sessenta animais foram ao acaso divididos em 4 grupos: 1) Grupo controle; 2) Pentoxifilina; 3) Grupo tratado com

OHB; 4) Grupo tratado com pentoxifilina e OHB. Camundongos que foram tratados com OHB receberam um total de 14 sessões, por 2 horas de tratamento a 2,5 ATA diárias. Os resultados indicaram que a extensão viável dos retalhos no grupo tratado com pentoxifilina ou OHB foi significativamente maior do que o grupo controle. Entretanto, animais tratados com ambas as terapias, pentoxifilina e OHB, tiveram aumento significativo da viabilidade do retalho do que os animais dos outros três grupos ($p < 0,001$). Isto refletiu uma melhora de 30-39% sobre a terapia com pentoxifilina apenas ou a OHB apenas, e uma melhora de 86% sobre os animais controle.

Zamboni *et al.*,(1989), examinaram o efeito da OHB administrada durante e imediatamente depois de prolongada isquemia total em retalhos cutâneos de padrão axial em camundongos. Os animais foram divididos em um Grupo Controle e três grupos experimentais: Grupo Controle, 8 horas de isquemia no retalho e sem OHB; Grupo 1, OHB durante a isquemia; Grupo 2, OHB logo após a isquemia; Grupo 3, OHB durante a isquemia, mas com o retalho colocado sob uma capa de metal a fim de prevenir a difusão do oxigênio. A área de necrose média para os controles foi de 28% enquanto que a OHB durante a isquemia ou durante a reperfusão reduziu significativamente esta necrose para 9 e 12%, respectivamente ($p < 0,01$). A porcentagem da necrose para o Grupo 3, com qualquer efeito local da OHB no retalho sendo bloqueado pela difusão do oxigênio, foi de 5%. Isto foi significativamente melhor que os controles ($p < 0,0005$), mas nenhuma diferença foi detectada nos outros dois grupos tratados com OHB. Assim, a OHB aumentou significativamente porcentagem de viabilidade dos retalhos cutâneos padrão axial quando administrada durante ou imediatamente após total isquemia do retalho.

Erdmann *et al.*,(1995), também avaliaram o efeito da OHB como tratamento de rejeição de enxertos alogênicos. Usando um modelo de rejeição de enxertos alogênicos em camundongos, estes autores demonstraram que o tratamento apenas com OHB ou em combinação com ciclosporina alongava o tempo até a rejeição dos enxertos alogênicos. Este efeito era mais evidente em animais que recebiam mais freqüentemente OHB comparado aos animais que recebiam menores doses de OHB.

Stevens *et al.*,(1996), usando um modelo de retalho cutâneo padrão axial em camundongos, induziram uma isquemia primária de 6 horas seguidas de 2 horas de reperfusão e então uma isquemia secundária de 6, 10 e 14 horas. O tempo de

isquemia secundária, no qual 50% dos retalhos sobreviveram (D50), tanto nos grupos tratados com ar comprimido quanto nos tratados com 100% de oxigênio foi de 6 horas. O tempo de isquemia secundária para D50 no grupo tratado com OHB foi significativamente aumentado para 10 horas.

Wong *et al.*,(1996), usaram modelo axial de retalho de músculo esquelético em camundongos. A necrose percentual, seguida a 2 horas da isquemia primária, foi significativamente reduzida de 40% para 24% pela OHB. Adicionando uma isquemia secundária de 2 horas, aumentou significativamente a necrose nos controles para 85% que foi significativamente reduzida nos grupos tratados com OHB para 58%. Estes estudos têm importantes implicações em transferências de tecidos livres complicadas por trombose pós-operatória.

Lozano *et al.*,(1999), avaliaram o efeito da OHB e sanguessugas medicinais em retalhos cutâneos axiais submetidos à oclusão venosa total. O protocolo do oxigênio hiperbárico consistiu de sessões de 90 minutos, duas vezes ao dia, com 100% de oxigênio a 2,5 ATA por 4 dias. Este estudo demonstrou que a OHB sozinha não foi um tratamento efetivo para retalhos cutâneos comprometidos pela oclusão venosa total. A combinação de tratamento com sanguessugas e OHB para tratar oclusão venosa total resultou em aumento significativo na viabilidade do retalho (67%), sobrepondo-se ao já descoberto com o tratamento apenas com as sanguessugas.

Yucel e Bayramicli (2000), investigaram os efeitos da OHB e heparina na sobrevivência de retalhos venosos da epigástrica inferior em camundongos. Eles concluíram que este tipo de retalho pode ser um retalho isquêmico com a microcirculação seguindo através de um único pedículo venoso que necessita de OHB para ter viabilidade, especialmente durante o período agudo. O tratamento com OHB e heparina reduziu a necrose dos retalhos, e a presença de um leito vascularizado da ferida também melhorou as taxas de viabilidade do tecido.

Gampper *et al.*,(2002), estudaram os efeitos benéficos da OHB em retalhos em ilhas submetidos à isquemia venosa secundária em um modelo de retalho epigástrico superficial em camundongos. Eles concluíram que a OHB aumentou significativamente a viabilidade dos retalhos submetidos a uma isquemia secundária, mesmo se a administração da OHB tenha sido feita antes da primeira isquemia. O efeito de administrar OHB previamente à isquemia secundária foi parcial, já que pode ser atribuído ao fato de que o efeito da OHB não dura mais do que 5 horas.

Ulkur *et al.*,(2002), avaliaram o efeito da OHB em retalhos pediculados com insuficiência arterial, venosa e as duas combinadas. Seus achados indicam que a OHB aumenta o percentual de viabilidade da extensão do retalho e o fluxo sanguíneo médio medido pelo laser Doppler neste modelo padrão axial de retalho cutâneo com todos os tipos de insuficiência vascular. Este efeito, entretanto, foi maior em retalhos onde houve insuficiência arterial.

Zhang *et al.*,(2007), desenvolveram estudos em ratos diabéticos utilizando retalhos cutâneos de fluxo randomizados com e sem tratamento com OHB por sete dias a 2.5 ATA demonstrando achados com melhora do grupo tratados com OHB com redução da área de necrose de 50,5% contra 38,5% do grupo controle.

Rocha *et al.*,(2012), investigaram o papel da OHB e da N-acetilcisteína (NAC) e sua associação na proteção dos retalhos cutâneos randomizados de ratos, concluindo que a OHB isoladamente está relacionada à redução da área de necrose; o NAC foi associado a maus resultados quando usada isoladamente e sua associação não potencializou os resultados observados favoráveis com o uso isolado da OHB.

Selçuk *et al.*,(2012), avaliaram o efeito da nicotina nos retalhos cutâneos associado com o tratamento com OHB, demonstrando que tem efeito benéfico na sobrevivência dos retalhos submetidos à nicotina.

ROCHA *et al.*,(2013), avaliaram o efeito protetor da OHB em retalhos cutâneos randômicos na apoptose celular e no fator de crescimento endotelial, concluindo que a OHB está associada à expressão reduzida de apoptose e que a expressão de VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) em camadas da pele e vasos não demonstrou diferença significativa entre os grupos tratados com OHB e N-acetilcisteína (NAC) e na associação dos dois (OHB+NAC) e que a associação não mostrou efeito protetor, exercendo efeito negativo na apoptose celular.

Os resultados de trabalhos na literatura mostram claramente a eficácia da OHB com respeito ao aumento da viabilidade de enxertos e retalhos cutâneos. De importância é que diferentes tipos de retalhos têm sido analisados nestes estudos incluindo retalhos cutâneos livres, retalhos pediculados, retalhos randomizados, retalhos e feridas irradiadas, enxertos e enxertos compostos. Mesmo que cada problema com o retalho seja único, o fator chave para necrose do retalho é a hipóxia tecidual. Os resultados indicam que a viabilidade dos retalhos pode ser melhorada pela OHB pela redução da lesão por hipóxia. Outros mecanismos de ação onde a

OHB aumenta a viabilidade do retalho incluem o estímulo de fibroblastos e a síntese de colágeno, a neovascularização, a possibilidade de fechamento de shunts arterio-venosos e os efeitos favoráveis na micro circulação.

2.4 Apoptose e Necrose

A célula muitas vezes está exposta a condições que podem levar à lesão celular. Essas podem ser reversíveis- e a célula volta ao ciclo normal- ou irreversíveis, e, nesse caso, pode determinar o desenvolvimento de doenças ou a morte celular. A morte celular pode ocorrer por necrose ou apoptose, sendo a primeira sempre patológica, enquanto que a segunda pode acontecer também em processos fisiológicos do organismo (COTRAN *et al.*, 2010).

As lesões celulares podem ser causadas por ausência ou redução do teor de oxigênio (hipóxia); agentes físicos (traumas, temperatura, radiação, choque); agentes químicos e drogas; agentes infecciosos; reações imunológicas; distúrbios genéticos e desequilíbrios nutricionais. Esses estímulos nocivos podem desencadear vários processos intracelulares, como danos à membrana, que afetam a mitocôndria, levando à diminuição da produção de ATP e morte celular; aos lisossomos, causando digestão enzimática dos componentes celulares; à membrana plasmática em si, culminando na perda do conteúdo celular; perda de material genético, alterações cromossômicas e/ou alterações gênicas que podem levar à instabilidade genética/genômica e desencadear o desenvolvimento de doenças e morte celular por apoptose, (COTRAN *et al.*, 2010).

Dentre outras formas que podem causar danos celulares, há também o aumento do cálcio intracelular e das espécies reativas de oxigênio (radicais livres, como H_2O_2 , OH), o que pode levar a proteólise a dano no DNA. O cálcio ativa muitas enzimas que levam à degradação celular, como as endonucleases e as proteases, culminando em diminuição da quantidade de ATP, levando à perda das funções celulares dependentes de energia. Um exemplo é a atividade da bomba de sódio e potássio ATPase na membrana plasmática que, ao diminuir sua atividade, permite o acúmulo de sódio intracelular levando à perda de potássio para o meio externo. Esse fato leva ao edema celular e à dilatação do retículo endoplasmático, acontecendo a formação de bolhas. O metabolismo energético alterado contribuirá

para o aumento da glicólise anaeróbica e diminuição das reservas de glicogênio, aumentando o ácido lático e fosfatos inorgânicos. Esse aumento de produção ácida causa diminuição do pH, prejudicando a atividade de muitas enzimas celulares. E é a deficiência na bomba de cálcio, devido à falta de energia, que leva ao aumento intracelular dessa substância. Por fim, a diminuição da síntese protéica resultaram em dano às membranas mitocondriais e lisossomais (JEWEEL *et al.*, 2013).

O termo apoptose foi introduzido em 1972, mas somente no início da década de 90 começou a ser intensamente investigado. "Apoptose" origina-se do grego e significa "cair fora", ou seja, é o mecanismo pelo qual a célula promove a sua autodestruição de modo programado. Esse fenômeno já foi observado, dentre outros processos, durante a embriogênese, (principalmente nas fases de organogênese e de involução), durante os processos de metamorfose (relacionados principalmente a metaplasias), em quadros de alteração hormonal, como a menopausa, (envolvendo as células endometriais), em tumores com fases de regressão ou de intensa proliferação e em algumas doenças virais (como a hepatite viral). A importância desse mecanismo, em primeira instância considerado normal, relaciona-se primeiramente ao controle da densidade populacional de células normais. Mas, pode ser interpretado também como o instrumento de eliminação de células danificadas por toxinas, radiação ou outros estímulos (COTRAN *et al.*, 2010) Os eventos celulares que fazem parte da apoptose incluem, inicialmente, a condensação da cromatina, oriunda da fragmentação do DNA por endonucleases. Há também diminuição do volume celular, decorrente de ligações interprotéicas no citoplasma. As células em apoptose manifestam receptores para macrófagos, os quais fagocitam essas células. Todos esses eventos são controlados por genes responsáveis pelo crescimento e diferenciação celular. A apoptose é a via de morte celular programada e controlada intracelularmente através da ativação de enzimas que degradam o DNA nuclear e as proteínas citoplasmáticas. A membrana celular permanece intacta, (o que difere bastante das situações de necrose), com alteração estrutural para que a célula seja reconhecida como um alvo fagocitário. A célula é eliminada rapidamente, de maneira a não dar tempo de o seu conteúdo extravasar, causando uma reação inflamatória que poderia assemelhar-se à necrose tecidual. A lesão caracteriza-se como reversível enquanto houver alterações na membrana plasmática, (bolhas; redução e distorções nas microvilosidades; ligações

intracelulares mais frouxas), alterações mitocondriais (edema, densidades amorfas), dilatação do retículo endoplasmático, (separação e desagregação dos polissomos), e alterações nucleares (desagregação dos elementos granulares e fibrilares) (COTRAN *et al.*, 2010).

A apoptose acontece tanto em eventos patológicos como em eventos fisiológicos. São exemplos de apoptose fisiológica: a morte de células nos processos embrionários; involução dependente de hormônios nos adultos; eliminação celular em populações celulares em proliferação; neutrófilos e outros leucócitos após término de reações inflamatórias ou imunológicas; eliminação de linfócitos auto reativos potencialmente danosos; morte celular induzida por células T citotóxicas. Já a patológica ocorre principalmente na presença de vírus, estímulos nocivos (como radiação e drogas citotóxicas anticancerosas), atrofia patológica dos órgãos e tumores (GRIVICICH *et al.*, 2007).

Morfologicamente, nas células corada com HE, as células apoptóticas apresentam encolhimento celular caracterizado por um citoplasma denso e organelas mais agrupadas; condensação da cromatina que se agrega na periferia do núcleo, em massas densas de várias formas e tamanhos, podendo inclusive o núcleo se romper em dois ou mais fragmentos; formação de bolhas citoplasmáticas e de corpos apoptóticos. No processo apoptótico ainda destaca-se a degradação intracelular de proteínas que ocorre por meio de enzimas denominadas caspases, outrora inativas. Elas clivam muitas proteínas nucleares vitais e do citoesqueleto, além de ativarem DNAases. As células apoptóticas e/ou corpos apoptóticos em geral são fagocitadas principalmente pelos macrófagos. Simultaneamente, as células saudáveis do tecido migram e proliferam para ocupar o espaço da célula morta; esse processo anteriormente descrito pode ocorrer por duas vias: a intrínseca e a extrínseca (COTRAN *et al.*, 2010).

A via intrínseca ou mitocondrial ocorre quando da retirada de fatores de crescimento ou de hormônios, ou quando acontece lesão ao DNA por radiação, toxinas ou radicais livres dentre outros. Essa é regulada por membros da família *Bcl-2*, ativando moléculas pró-apoptóticas, como o citocromo C. Além disso, há a participação do gene supressor *TP53*. Tudo isso culmina na ativação de caspases iniciadoras e efetoras, levando às alterações celulares e à morte por apoptose (GRIVICICH *et al.*, 2007).

A via extrínseca acontece por meio da interação receptor-ligante, isso ativará uma cascata de proteínas adaptadoras, que também culminará na ativação das caspases. Logo, a apoptose pode acontecer após a privação de fatores de crescimento; mediada por danos ao DNA; induzida pela família de receptores do Fator de Necrose Tumoral ou mediada pelo linfócito T citotóxico. A apoptose e a necrose, por vezes, coexistem e compartilham mecanismos e características. A necrose pode ser uma manifestação final de uma célula que sofreu lesão irreversíveis. A necrose é a morte celular ou tecidual acidental em um organismo ainda vivo, ou seja, que ainda conserva suas funções orgânicas (COTRAN *et al.*, 2010).

O dano passa a ser irreversível na medida em que a célula é incapaz de reverter os danos mitocondriais (ausência de fosforilação oxidativa e geração de ATP) e há alterações profundas na função da membrana. A lesão isquêmica apresenta uma tendência para lesionar os tecidos mais rapidamente do que a hipóxia. As células sofrem essas alterações bioquímicas e morfológicas conforme a lesão progride, evoluindo para morte celular e necrose, ou pode fazer apoptose e não evoluir para necrose. Deve se definir necrose como as alterações morfológicas que acontecem após a morte celular em um tecido vivo, devido à ação progressiva de enzimas nas células que sofreram uma lesão letal. A necrose é o correspondente macroscópico e histológico da morte celular causada por uma lesão exógena irreversível (COTRAN *et al.*, 2010).

Morfologicamente, as células necróticas apresentam um aumento da eosinofilia devido à perda da basofilia causada pelo RNA no citoplasma normal e devido também ao aumento da ligação da eosina às proteínas plasmáticas desnaturadas. O citoplasma apresenta vacúolos com um aspecto corroído, podendo haver calcificações. As células mortas podem ser substituídas por grandes massas de fosfolípidios, denominadas figuras de mielina, que serão posteriormente fagocitadas por outras células ou degradadas em ácidos graxos. As células necróticas são vistas ao microscópio eletrônico com descontinuidade de membranas plasmáticas e organelas, dilatação acentuada das mitocôndrias, com densidades amorfas e figuras de mielina intracitoplasmática. Há vários padrões morfológicos de necrose, sendo os principais: necrose de coagulação, necrose liquefativa, necrose caseosa e necrose gordurosa (COTRAN *et al.*, 2010).

A necrose de coagulação acontece caracteristicamente quando da morte celular por hipóxia em todos os tecidos, à exceção do cérebro. Nesse tipo de necrose, predomina a coagulação protéica e tende a acontecer em tecidos com alto teor de proteínas. Os tecidos afetados apresentam uma textura firme. A acidose intracelular desnatura proteínas e enzimas, bloqueando a proteólise celular. Há manutenção da arquitetura básica e contorno das células por, pelo menos, alguns dias. A necrose de liquefação é característica de infecções, pois essas promovem o acúmulo de células inflamatórias, e também da morte por hipóxia do sistema nervoso. Esse tipo de necrose ocorre quando há o predomínio de liquefação enzimática; acontece quando o tecido tem grande teor gorduroso. As células mortas são completamente digeridas e há transformação do tecido em uma massa viscosa. A necrose caseosa é uma forma distinta de necrose de coagulação, encontrada comumente em focos de tuberculose. Esse termo é derivado da aparência branca, semelhante a queijo, da área necrótica. Essa área, nos focos tuberculosos, é cercada por uma borda inflamatória (reação granulomatosa). A necrose gordurosa se refere a áreas de destruição de gordura que ocorre como resultado da liberação de lipases pancreáticas ativadas na cavidade abdominal, quando de uma pancreatite aguda, por exemplo (COTRAN *et al.*, 2010).

Estudos moleculares têm mostrado que o primeiro evento observado é a alteração na bomba de sódio e potássio, provocando edema intracelular. O metabolismo celular é mantido graças à glicólise; acabando-se a reserva de glicogênio, ácidos são acumulados no interior da célula (principalmente ácido láctico), o que leva à diminuição do pH; a acidez provoca a liberação de enzimas lisossomais, o que gera a hidrólise de proteínas essenciais para a célula (processo denominado de autólise); observa-se que a perda da homeostase envolve o sistema respiratório celular (as mitocôndrias), o sistema enzimático (os lisossomas) e o sistema de membranas, o qual parece ter um papel crucial para o estabelecimento de lesões irreversíveis na célula. As mudanças celulares dão, principalmente, nos núcleos, os quais apresentam alteração de volume e de coloração à microscopia óptica (COTRAN *et al.*, 2010).

Já as modificações citoplasmáticas observadas ao microscópio óptico (essas modificações são secundárias às nucleares, sendo visíveis mais tardiamente) consistem na presença de granulações e espaços irregulares no citoplasma. Este se

torna opaco, grosseiro, podendo estar rompida a membrana citoplasmática. Intensa eosinofilia é característica, decorrente de alterações lisossomais e mitocondriais, (JEWEEL *et al.*, 2013).

A etiologia da necrose envolve todos os fatores relacionados às agressões podendo ser agrupadas em agentes físicos tais como ação mecânica, temperatura, radiação, efeitos magnéticos dentre outros; agentes químicos que envolvem substâncias tóxicas e não-tóxicas tais como tetracloreto de carbono, álcool, medicamentos, detergentes e fenóis, por exemplo); e agentes biológicos onde se destacam as infecções virais, bacterianas, micóticas e parasitárias provocando comprometimento celular em níveis tais como a respiração aeróbica, síntese protéica, manutenção da integridade das membranas celulares e manutenção da capacidade de multiplicação celular. A ação das causas sobre esses sistemas provoca a perda da homeostase celular de tal forma que a célula perde a sua vitalidade, iniciando-se o processo de desintegração (COTRAN *et al.*, 2010).

2.5 Ensaio do Cometa

O ensaio do cometa é assim denominado porque evidencia a corrida de fragmentos de DNA em relação ao nucleóide, em formato de cometa, quando a célula, após lisada, é submetida a uma corrente eletroforética. Essa técnica de eletroforese em lâminas e de análise de células individuais foi primeiramente desenvolvida por Rydenberg e Johanson (1978). Já mais tarde, Östling e Johanson (1984) modificaram o teste usando um tampão de eletroforese em pH semi neutro (pH 9,5), o que aumentou a sensibilidade do teste (TICE, 1995). Logo em seguida, Singh *et al.*, (1988), fizeram a proposta do uso de tampão de pH alcalino (pH > 13), o que determinou o uso do ensaio do cometa de forma muito importante para a detecção de quebras no DNA e também de danos em sítios álcilábies tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Essa técnica hoje é compreendida como rápida, simples e sensível para quantificar danos genéticos em um pequeno número de células que não precisam estar em processo de divisão celular. Também é empregada para avaliação dos processos de reparo. Tais procedimentos podem ser desenvolvidos em, praticamente, qualquer célula eucariótica onde seja possível obter uma suspensão celular, mesmo em quantidades reduzidas. Destaca-se ainda

que os resultados possam ser obtidos em um único dia e o custo para a realização da técnica é relativamente baixo (ROSS *et al.*, 1999).

O ensaio do cometa é muito utilizado para avaliar danos causados por agentes físicos e químicos, no monitoramento ambiental e até mesmo na área clínica (ANDERSON, PLEWA, 1998).

Esse teste baseia-se na deposição de células em uma lâmina de vidro pré coberta com agarose, seguida de lise, desnaturação do DNA, eletroforese em pH alcalino (pH > 13) e análise dos cometas gerados pelo DNA fragmentado em microscopia de imunofluorescência (se corados com brometo de etídeo (BE), por exemplo (KOBAYASHI *et al.*, 1995, OLIVE *et al.*, 1992).

Uma forma de análise é a visual, descrita por Kobayashi *et al.*, (1995). Segundo esses autores os cometas podem ser classificados em:

classe 0 – Nucleóides não danificados e que não apresentam cauda;

classe 1 – Nucleóides com cauda menor que o diâmetro do nucleóide;

classe 2 – Nucleóides com cauda de tamanho entre 1 a 2 vezes o diâmetro do nucleóide;

classe 3 – Nucleóides com cauda 2 vezes maior que o diâmetro do nucleóide. Nessa análise, nucleóides totalmente fragmentados, característicos de células apoptóticas, geralmente, não são contabilizados (SPEIT; HARTMANN, 1996).

2.6 Ensaio de Viabilidade Celular

McGahon *et al.*, (1995), descreveram o uso conjunto de Laranja de Acridina (LA) e Brometo de Etídio (BE) para a determinação de células viáveis e inviáveis a partir de uma técnica que permite a diferenciação de células necróticas, apoptóticas e viáveis.

Destaca-se ainda que a técnica permite a identificação de células em apoptose inicial e final, com base na integridade da membrana plasmática. Em geral, o Laranja de Acridina, ao se intercalar no DNA, proporciona coloração verde sob microscopia de imunofluorescência. Já como tal corante não intercala ao RNA, o mesmo é corado em vermelho-alaranjado. Assim, uma célula viável apresenta um núcleo esverdeado. Já o Brometo de Etídio penetra somente em células mortas. Este corante também se intercala no DNA, dando uma aparência alaranjada, mas se

liga fracamente ao RNA, o qual pode aparecer ligeiramente vermelho (POERSCH, 2005).

A partir desses padrões anteriormente referidos, define-se que células vivas com membrana funcional serão visualizadas em verde uniforme, incluindo o seu núcleo. Células em apoptose inicial com membrana funcional, mas com fragmentação de seu DNA, serão visualizadas em verde, tanto o núcleo quanto o citoplasma. No entanto, será notória a marginalização do seu conteúdo nuclear. Células em apoptose final serão visualizadas em alaranjado tanto no citoplasma como nos locais onde a cromatina está condensada no núcleo, o que as distingue de células necróticas, que têm uma coloração alaranjado-vermelho uniforme no núcleo e citoplasma (POERSCH, 2005).

OBJETIVOS

3.1 Geral

3.1.1 Analisar o efeito do dimetilsulfóxido 5% associado ou não à oxigenoterapia hiperbárica, em retalhos cutâneos randomizados, em ratos.

3.2 Específicos

3.2.1 Avaliar o grau de necrose de retalhos cutâneos randomizados submetidos à ação do DMSO 5%, via subcutânea, associado ou não ao tratamento com oxigenoterapia hiperbárica a 100% sob 2.5 atmosferas absolutas (ATA).

3.2.2 Avaliar os efeitos genotóxicos e apoptóticos da terapia com DMSO, OHB e DMSO associado ao OHB, em retalhos cutâneos de fluxo randômicos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aprovação

O projeto de pesquisa foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), sob protocolo número 309/2011, de acordo com os princípios éticos adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, com a legislação vigente e demais disposições da ética em investigação que envolve diretamente os animais (Anexo A).

4.2 Amostra

Foram utilizados 50 ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*), da linhagem *Wistar*, com massa média de 300 g, fornecidos pelo Biotério da UFMS, com idade média de 3 meses. Os animais foram mantidos em ambiente controlado (ciclo de luz de 12 horas claro e 12 horas escuro, temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade de 55%), em gaiolas de polipropileno de 14x40x60 cm, alimentados com ração comercial Nuvlab-Nuvtal® e água filtrada *ad libitum*. O período de adaptação dos animais foi de 5 dias antes do experimento, no Laboratório de Cirurgia Experimental da UFMS.

Os animais foram distribuídos, por sorteio, em cinco grupos com 10 ratos em cada grupo (Figura 1).

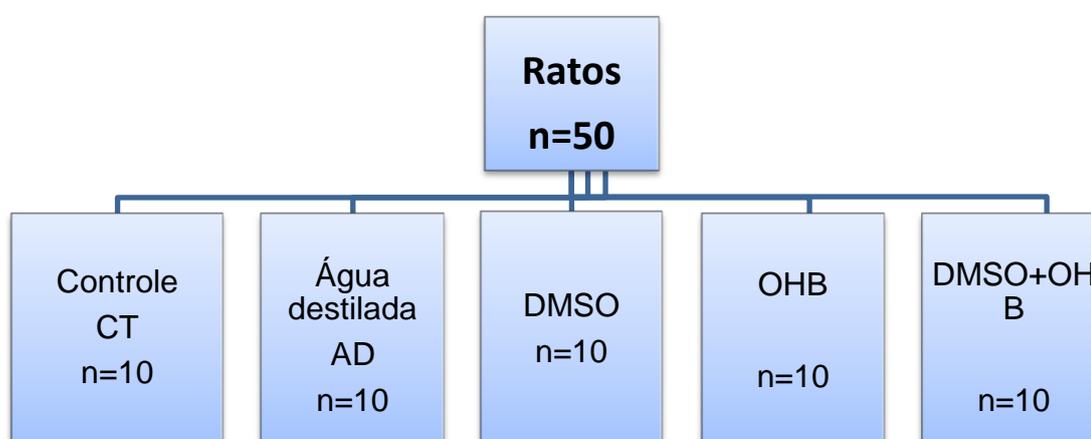


Figura 1 - Distribuição dos animais nos diferentes grupos.

4.3 Delineamento experimental

Grupo CT (n=10): Os animais foram submetidos a procedimento cirúrgico para confecção de um retalho dorsal de 2 cm de base proximal por 8 cm de comprimento, o qual foi elevado do seu leito e reposicionado imediatamente.

Grupo AD (n=10): Os animais foram submetidos ao mesmo procedimento do grupo CT e receberam a injeção subcutânea de 0,8ml de água destilada (AD), na metade distal do retalho.

Grupo DMSO (n=10): (Dimetilsulfóxido - DGE importação de Produtos Químicos Ltda São Paulo). Os animais foram submetidos ao mesmo procedimento do grupo CT e receberam a injeção de 0,8ml de DMSO 5%, na metade distal do retalho.

Grupo OHB (n=10): Os animais foram submetidos ao mesmo procedimento do grupo CT, associado ao tratamento com OHB.

Grupo DMSO+OHB (n=10): Os animais foram submetidos ao mesmo procedimento do grupo CT, associado à injeção subcutânea de DMSO a 5% e ao tratamento com OHB.

4.4 Procedimentos

4.4.1 Procedimento Anestésico

Para anestesia foi utilizada uma solução anestésica 1:1 de xilazina(20 mg. ml⁻¹) e quetamina (50 mg. ml⁻¹), na dosagem de 0,1ml. 100g⁻¹ de peso, por via intraperitoneal, aguardado o tempo necessário para o animal apresentar o plano anestésico com abolição do reflexo corneano e perda do tônus muscular.

4.4.2 Procedimento Cirúrgico

Após pesagem, os animais foram colocados em decúbito ventral e submetidos à tricotomia da região dorsal, sendo então fixados em posição de pronação. Depois de demarcada uma área de, aproximadamente, 27cm², isto é, 2cm de base cranial e 8 cm de comprimento (2cmx8cm), segundo Mc FARLANE

et.al., (1966), foi realizada uma incisão com bisturi (lâmina 15), sendo então dissecado o retalho, incluindo epiderme e derme até o plano muscular (Figura 2). Em seguida, foi elevado do leito (Figura 3), realizada a síntese do retalho em sua posição original com fio de poliamida 4.0, interrompida a cada 2cm (Figura 4).

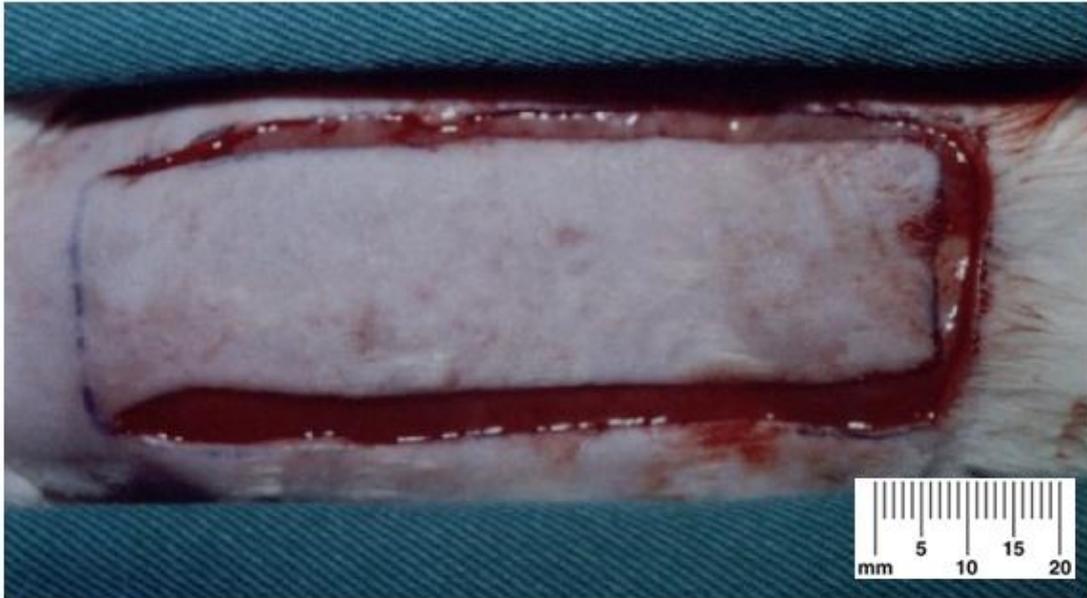


Figura 2 - Dissecção do retalho cutâneo dorsal do rato na dimensão de 2cm de largura por 8cm de comprimento, com base cranial (AD-6).

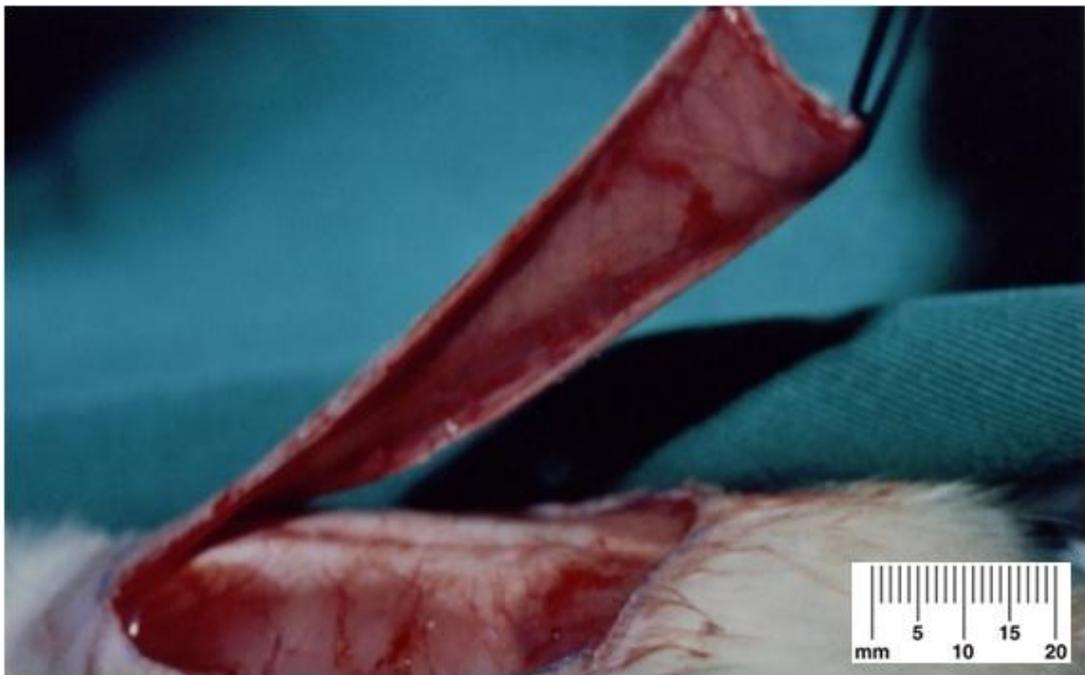


Figura 3 - Elevação do retalho cutâneo do seu leito (AD-6).



Figura 4 - Retalho suturado ao leito com fio de poliamida 4.0 pontos contínuos interrompidos a cada 2 centímetros (AD-1).

4.4.3 Procedimentos de Administração

Foram injetados, nos animais dos grupos AD, DMSO e DMSO+OHB, o volume de 0,1 ml a cada centímetro quadrado na metade distal (Figura 5), de água destilada no grupo AD e DMSO a 5% no grupo DMSO e DMSO+OHB (volume total de 0,8 ml) com uma seringa de 1 ml e agulha de insulina 0,45x13mm (Figura 6).

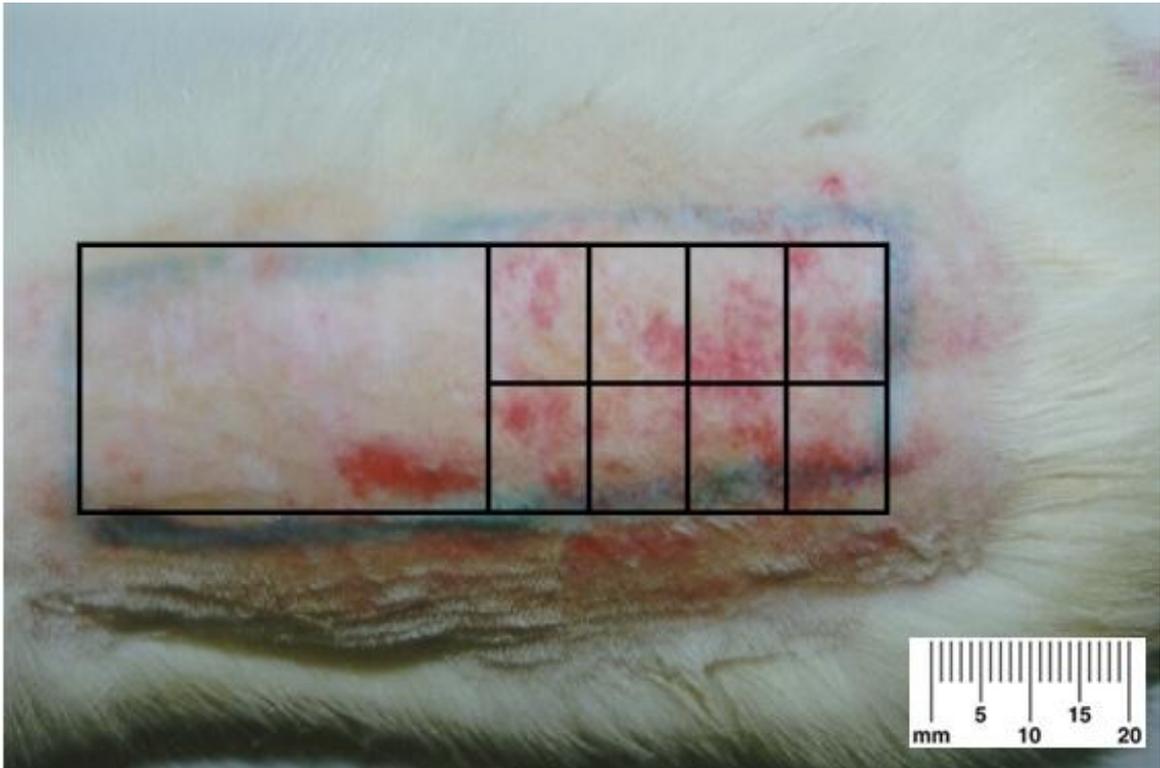


Figura 5 - Demarcação da área que será feita a injeção do DMSO e AD (na metade distal do retalho) a cada centímetro quadrado (AD-2).

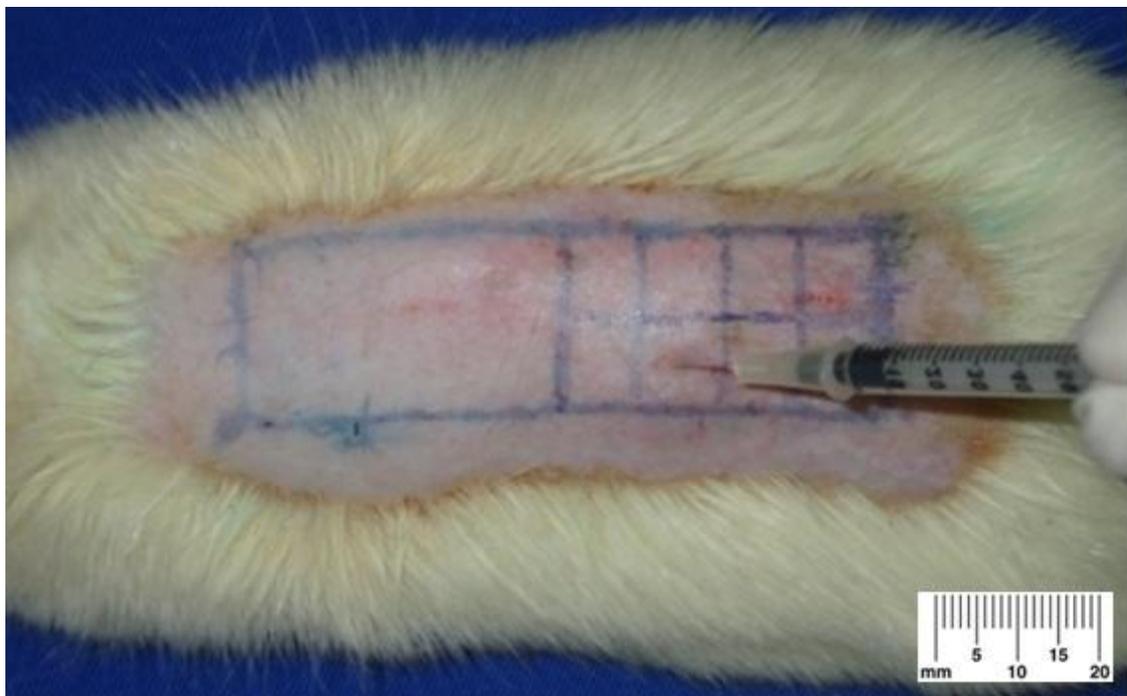


Figura 6 - Injeção subcutânea da droga com um seringa de 1 ml com agulha de insulina 0,45x13mm (DMSO-3).

4.4.4 Procedimento de OHB

Os animais do grupo DMSO + OHB e OHB, após duas horas do experimento, foram colocados em uma caixa de acrílico (Figura 7) com entrada e saída de oxigênio controlado pelo fluxômetro (Figura 8-A) no interior da câmara hiperbárica, onde a saturação de oxigênio era registrada diretamente no painel de controle (Figura 8-B). A caixa foi adaptada para ser colocada em uma câmara multiplace (Figura 8-C), onde os animais foram submetidos a uma pressão de 2,5 atmosferas absolutas (ATA) com oxigênio a 100% por 60 minutos, após pressurização por 15 minutos até atingir 2,5 ATA e mais 15 minutos para despressurização, uma vez ao dia, por 10 dias consecutivos.



Figura 7 - Caixa de acrílico com capacidade para 10 animais de pequeno porte (TOTALMAT-SP/BR).



Figura 8 - A: Fluxômetro no interior na câmara, para controle do volume de oxigênio na entrada. B: Oxímetro digital do painel de controle da câmara onde é observada a saturação de oxigênio a 100% no interior da caixa de experimento. C: Câmara multiplace (OXIMED-MS). Ano e modelo 2001 Metalúrgica União – ES.

4.5 Amostras Coletadas

No 10^o dia após os experimentos, os animais foram novamente anestesiados, pesados, fotografados e coletados por biópsia incisional, um fragmento de tecido incluindo toda a espessura do retalho de 0,5 x 05 cm na região central do terço distal do retalho (área sem necrose) (Figura 9).



Figura 9 - Local de ressecção de tecido, sem necrose, (0,5X0,5 cm) para avaliação histológica (DMSO-8).

4.6 Eutanásia

Sob anestesia e após coleta das amostras, os animais foram submetidos à eutanásia em câmara de gás carbônico (Figura 10)



Figura 10 - Câmara de CO₂, para eutanásia dos animais.

4.7 Estudo Macroscópico

4.7.1 Avaliação do Percentual de Área de Necrose

Após anestesia e imobilização dos animais, no 10^o dia, os animais foram fotografados com uma máquina digital da marca SONY com óptica de 4 vezes de aumento, lente de 30 mm com 12.1 *Mega pixels*, obedecendo a uma distância focal de 30 cm. As fotografias foram digitalizadas com resolução de 640 pontos na horizontal e 480 pontos na vertical, 24 bits de cores (16 milhões de cores), demarcada a área de necrose e calculado o seu percentual pelo programa *ImageJ*. (Figura 11).

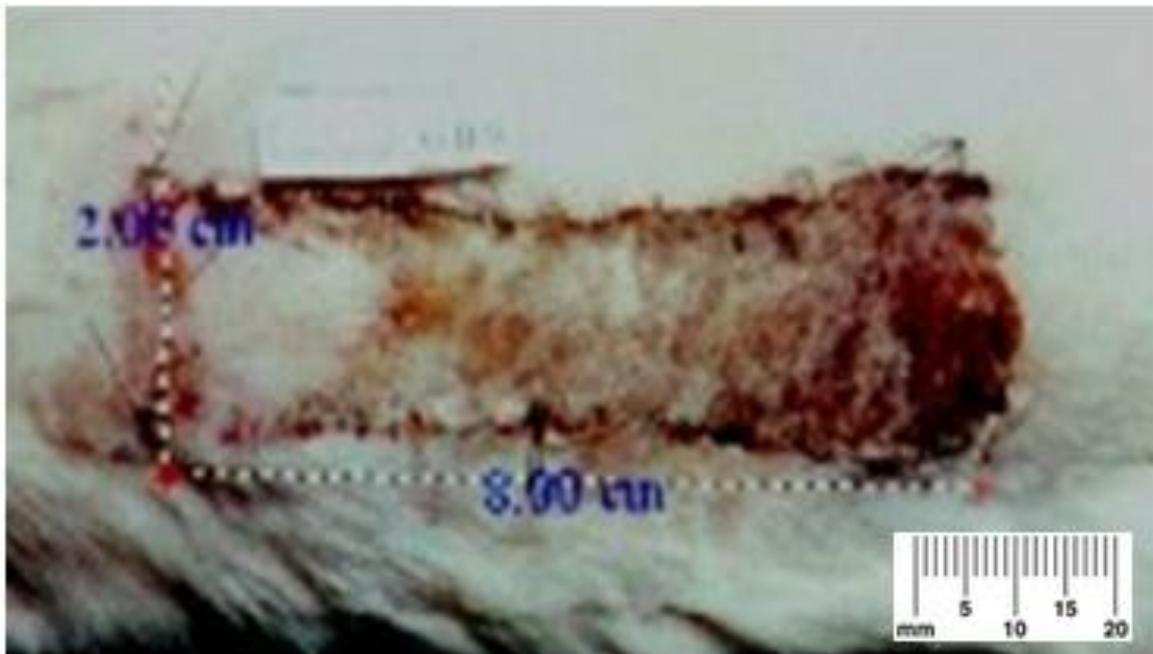


Figura 11 - Cálculo de área de necrose, (AD-5) realizado pelo programa *imageJ*¹.

4.8 Estudo Microscópico

4.8.1 Ensaio do Cometa

O ensaio do cometa foi realizado segundo as descrições de SINGH *et al.* (1988), com modificações. Para tanto, um fragmento de pele (0,5 cm³) foi picotado

¹*Image-J* – Sistema de Processamento e análise de imagem Sofitium informática

em 100µl de solução fisiológica (NaCl 0,9%) até a completa homogeneização em 100µl de solução fisiológica (NaCl 0,9%). Em seguida, 40µL da suspensão celular foi homogeneizada com 120µL de agarose de LPM (0,75%). Essa solução foi depositada em lâminas pré-cobertas com agarose normal (1,5%). Recobriu-se o material biológico com lamínula de vidro. Posteriormente, as lâminas foram resfriadas a 4°C por 20 minutos. Fez-se então a remoção das lamínulas e a imersão das mesmas em solução de lise recentemente preparada (89,0ml de estoque de lise – 2,5M NaCl, 100,0mM EDTA, 10,0mM Tris, pH 10,0 corrigido com NaOH sólido; 1,0mL de Triton X-100 e 10,0mL de DMSO). A lise ocorreu por 1 hora, à temperatura de 4°C, protegida da luz. Em seguida, as lâminas foram levadas à cuba de eletroforese com tampão de pH >13,0 (300,0mM NaOH e 1,0mM EDTA, preparado a partir de uma solução estoque de NaOH 10,0N e EDTA 200,0mM pH10,0) por um período de 20 minutos à 4°C para desnaturação do DNA. Após, realizou-se a eletroforese a 25 V e 300 mA (1,25V/cm) por 20 minutos. Em seguida, as lâminas foram neutralizadas com tampão pH 7,5 (0,4M Tris-HCl), durante 3 ciclos de cinco minutos cada, secas ao ar livre e fixadas em álcool etílico absoluto por 10 minutos. O material foi corado *a posteriori* (100,0µL de brometo de etídio - 20×10^{-3} mg/mL) e 100 células foram analisadas em microscópio de epifluorescência (*Bioval*®, Modelo L2000A) *em aumento de 40x, com filtro de excitação 420-490nm e filtro de barreira 520nm. Os cometas foram classificados visualmente, segundo Kobayashi et al., (1995), em: classe 0 – nucleóides não danificados e que não apresentam cauda; classe 1 – nucleóides com cauda menor que o diâmetro do nucleóide; classe 2 – nucleóides com cauda de tamanho entre 1 a 2 vezes o diâmetro do nucleóide; classe 3 – nucleóides com cauda 2 vezes maior que o diâmetro do nucleóide (Figura 12). Nucleóides de células apoptóticas não foram contabilizados. O escore total foi calculado pela somatória dos valores resultantes da multiplicação do total de células observadas em cada classe de lesão as quais pertenciam pelo valor da classe. A proporção de redução de danos foi calculada dividindo-se a frequência de células com danos no DNA do grupo controle pela frequência de danos no DNA dos demais grupos (SPEIT ; HARTMANN, 1996, FEDEL-MIYASATO *et al.*, 2014, OLIVEIRA *et al.*, 2007):

A captura de imagens foi utilizada em microscópio *MOTIC® Série BA410**, acoplado com câmera digital *LEICA® ICC 50 HD*, com *LAS software version4.0.0*, 2011.

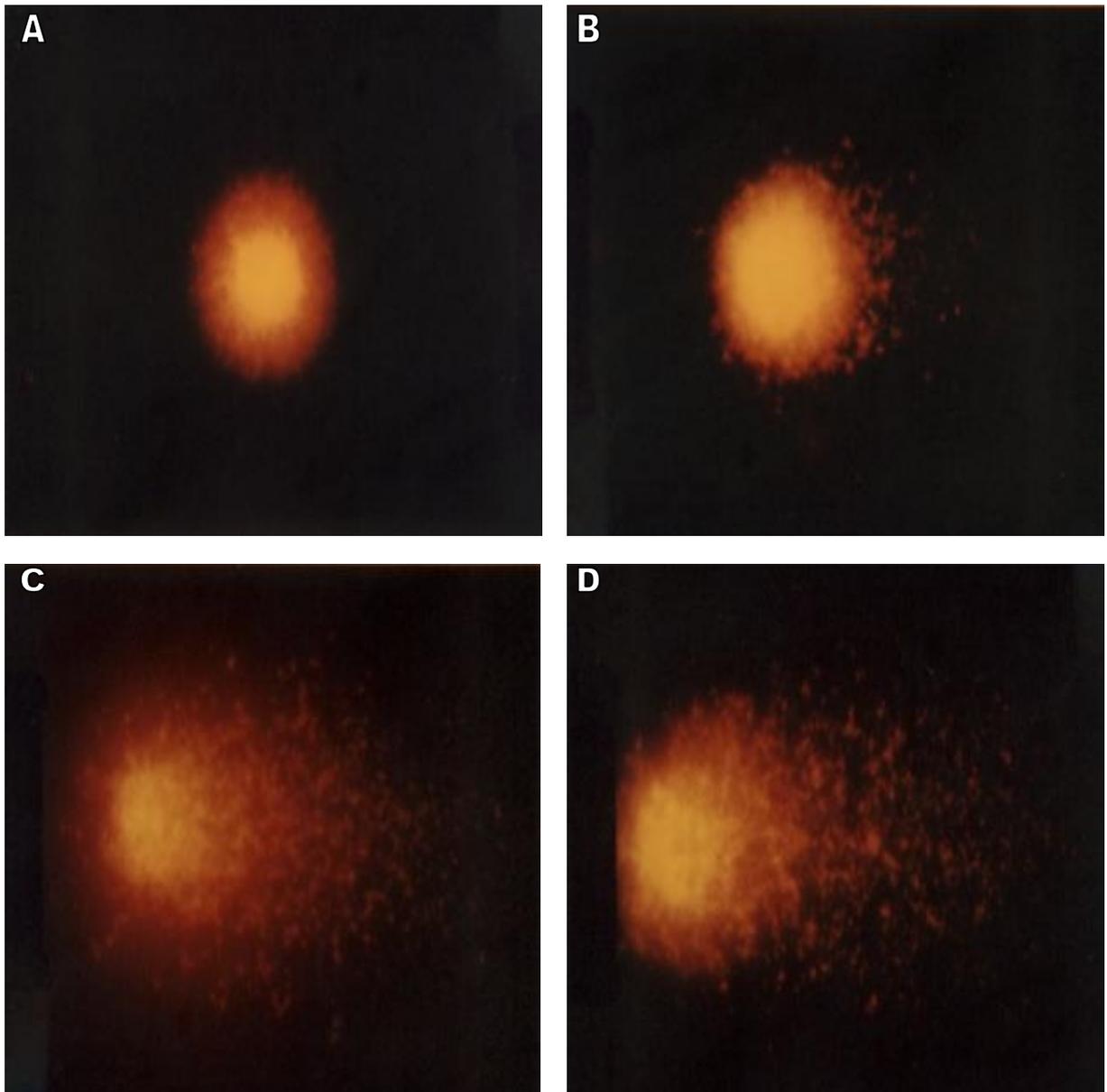


Figura 12- Classificação do teste do cometa levando em consideração o diâmetro do nucleóide e tamanho da cauda. Onde A=Classe 0, B=Classe 1, C=Classe 2 e D=Classe 3. Aumento total de 400x. Fonte: Poersch [mestrado] 2005.

4.8.2 Análise da Viabilidade Celular e Contagem Diferencial de Apoptose e Necrose

Uma alíquota de 50,0 μ L de suspensão celular, obtida no teste do cometa, anteriormente descrito, foram homogeneizados com 2,0 μ L de corante (100,0 μ g/mL de Laranja de Acridina e 100,0 μ g/mL de Brometo de Etídeo, ambos diluídos em PBS). Analisaram-se 100 células em microscópio de epifluorescência (Bioval®) em aumento de 40x, com filtro de excitação 420-490nm e filtro de barreira 520nm. A classificação das células foi realizada segundo a descrição: (I) células vivas com membrana funcional possuem coloração verde uniforme em seu núcleo; (II) células

em apoptose inicial com membrana funcional, mas com fragmentação de DNA, demonstram uma coloração verde no núcleo e citoplasma, sendo visível uma marginalização do seu conteúdo nuclear; (III) células em apoptose final apresentam áreas coradas em alaranjado, tanto no citoplasma como nos locais onde a cromatina está condensada no núcleo, o que as distingue de células necróticas; (IV) células necróticas têm coloração alaranjada uniforme no núcleo (Figura 13) (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

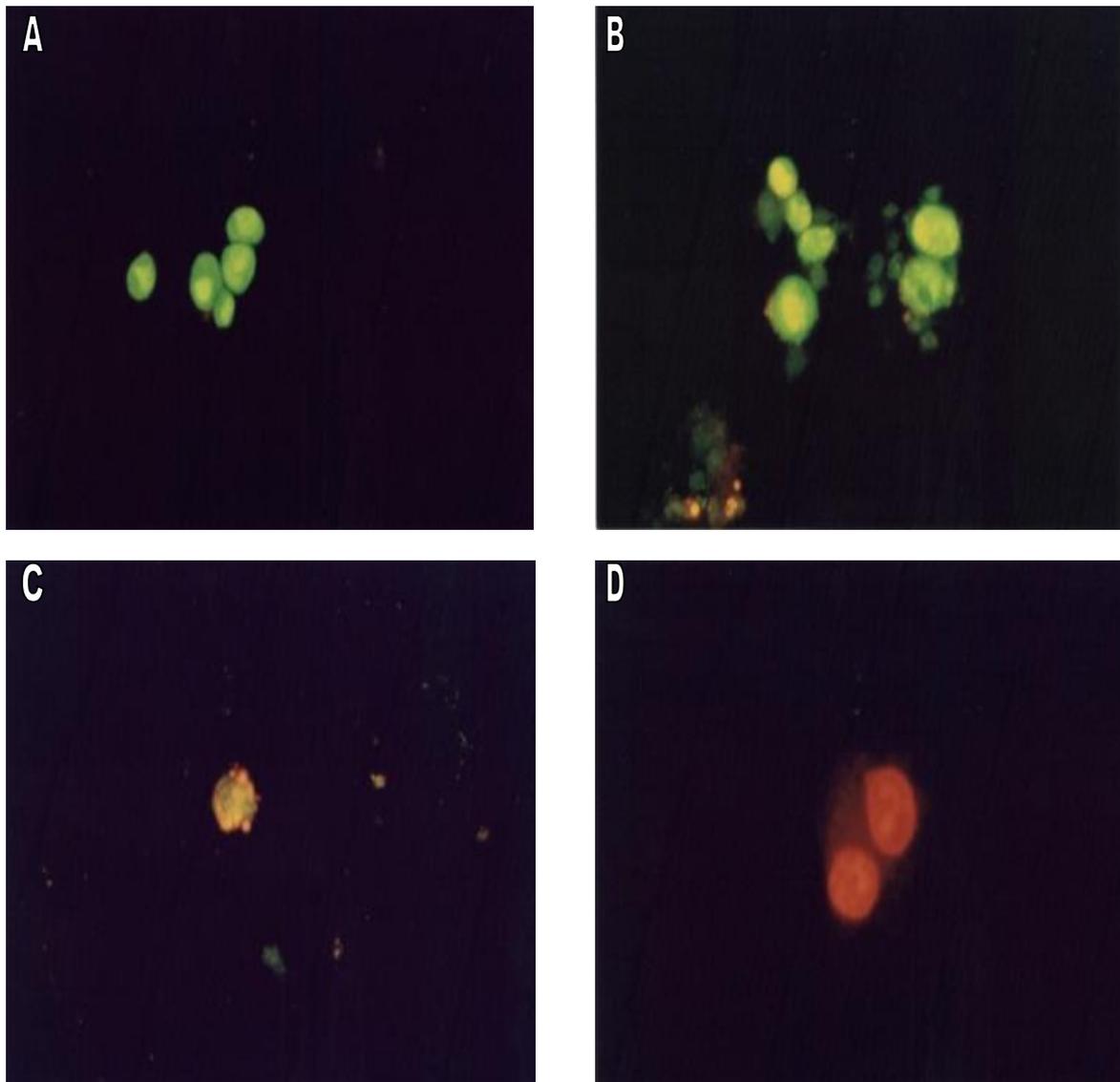


Figura 13 - Classificação do teste de viabilidade celular. Análise de microscopia de fluorescência dos núcleos das células. Onde A= Células normais ou viáveis, B= Apoptose inicial, C= Apoptose final e D= Necrose. Aumento de 400x. Fonte:Poersch [mestrado] 2005.

O índice de viabilidade celular foi calculado pela relação do número de células normais x 100 e o número de células analisadas. Para o índice de apoptose, calculou-se a relação entre a soma de células em apoptose inicial e final x 100 e o

número de células analisadas. Já para o índice de necrose, fez-se a relação entre o número de células necróticas x 100 e o número de células analisadas e o escore é a soma da multiplicação da classe de dano vezes o valor da classe. (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

4.9 Análise Estatística

Na comparação entre os grupos experimentais, a relação do ganho de peso, percentual de necrose, lesão celular, quantidade de células normais, apoptóticas e necróticas, viabilidade celular, bem como ao índice de apoptose e necrose foi realizada por meio do teste ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey.

Na análise estatística foi utilizado o software Sigmaplot versão 12.5 considerando um nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

Os resultados referentes ao ganho de peso, em cada um dos grupos estudados, estão apresentados na Tabela 1. Não houve diferença significativa entre os grupos experimentais em relação ao ganho de peso dos animais (teste ANOVA de uma via, $p=0,266$), sendo que este ganho foi negativo para todos os grupos (variando em média entre -14,50 e -30,89 gramas).

Tabela 1 - Resultados referentes ao ganho de peso, em cada um dos grupos estudados.

Variável	Grupo experimental					Valor de p*
	CT	AD	DMSO	OHB	DMSO+OHB	
Ganho de peso (g)	-16,10±5,60	-14,50±3,27	-27,80±8,87	-30,89±3,11	-25,63±8,71	0,266

CT= Controle, AD=Água destilada, DMSO=Dimetilsulfóxido, OHB=Oxigenoterapia hiperbárica, DMSO+OHB=Dimetilsulfóxido associado à oxigenoterapia hiperbárica. Os resultados estão apresentados em média±erro padrão da média. * Valor de p no teste ANOVA uma via.

Na Figura 14 estão apresentados os resultados referentes ao percentual de necrose da área da pele avaliada, ao final do experimento, em cada um dos grupos estudados, sendo que também não houve diferença significativa entre os grupos, em relação a esta variável ($p=0,249$).

Os resultados obtidos no ensaio do cometa, referentes ao percentual de células com dano no DNA, distribuição entre as classes de danos, escore referentes aos testes de genotoxicidade e proporção de redução de danos, nos diferentes grupos estudados, estão apresentados na Tabela 2. Houve diferença significativa entre os grupos, em relação ao percentual de células e ao escore de dano no DNA ($p<0,001$), sendo que o percentual de dano e o escore observado nos grupos OHB e DMSO+OHB foi menor do que aquele para os grupos CT, AD e DMSO (pós-teste de Tukey, $p<0,05$). Além disso, a proporção de redução de danos observado nos grupos OHB e DMSO+OHB foi de 3,17 e 2,59 vezes maior nestes grupos, em relação ao grupo controle.

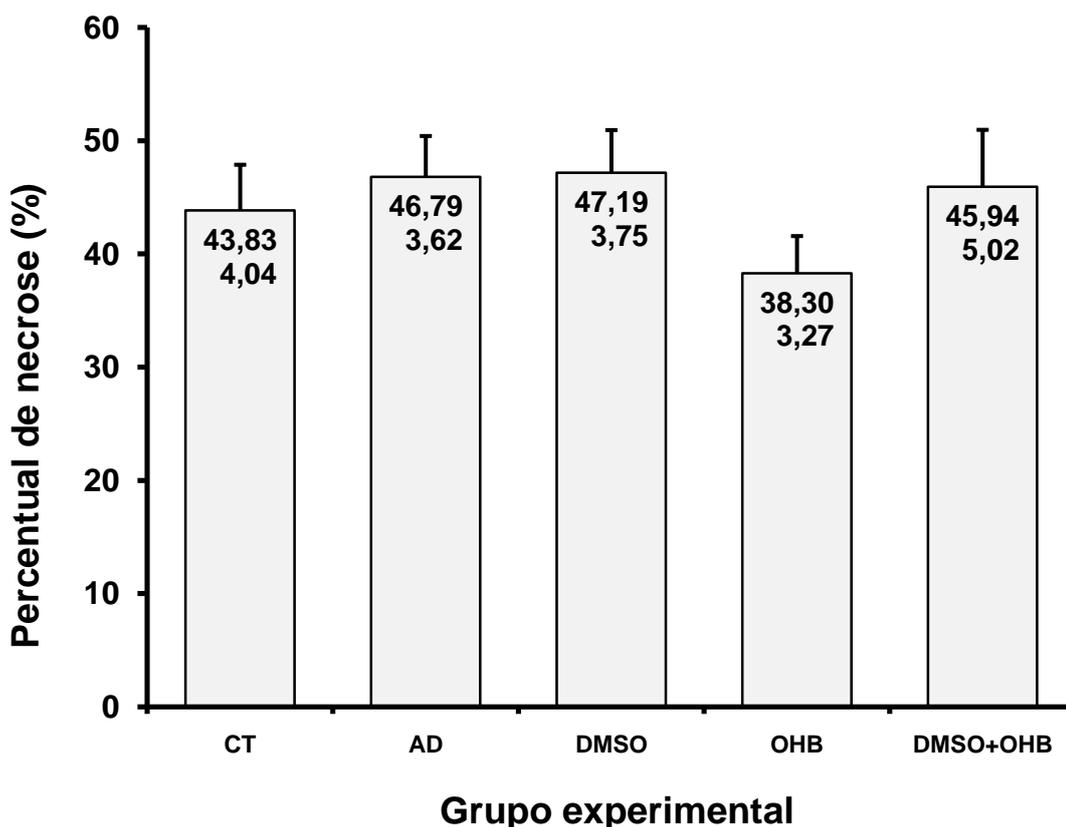


Figura 14 -Gráfico apresentando o percentual de necrose ao final do experimento, em cada um dos grupos experimentais. Cada coluna representa o valor percentual de necrose e a barra o erro padrão da média. CT= Controle, AD= Água destilada, DMSO= Dimetilsulfóxido, OHB= Oxigenoterapia hiperbárica, DMSO+OHB= Dimetilsulfóxido associado à oxigenoterapia hiperbárica.

Na Tabela 3 estão apresentados os resultados dos percentuais de células viáveis, células apoptóticas, células necróticas e seus respectivos índices, em animais submetidos ao procedimento cirúrgico nos diferentes grupos estudados. Para todas estas variáveis, houve diferença significativa entre os grupos experimentais (valor de p variando entre $<0,001$ e $0,002$), sendo que o percentual de células viáveis no grupo OHB foi maior do que aquele observado para os demais grupos (pós-teste de Tukey, $p<0,05$). Quanto à apoptose inicial, o percentual de células apoptóticas observado no grupo OHB foi menor do que aquele para os demais grupos estudados. Além disso, o percentual de apoptose inicial nos grupos água destilada e DMSO foi maior do que aquele para os grupos controle e DMSO+OHB ($p<0,05$). Já quanto à apoptose final, o percentual de células neste estágio nos grupos água destilada e OHB foi menor do que aquele para os grupos controle, DMSO e DMSO+OHB ($p<0,05$). Em relação ao percentual de células necróticas, ele foi maior nos grupos água destilada e DMSO+OHB, quando

comparado com os grupos controle, DMSO e OHB ($p < 0,05$). O índice de viabilidade celular no grupo OHB foi maior do que aquele observado para os demais grupos experimentais ($p < 0,05$). Por outro lado, o índice de apoptose no grupo OHB foi menor do que aquele para os demais grupos estudados ($p < 0,05$). Além disso, este índice foi maior no grupo DMSO, quando comparado com os grupos controle, água destilada e DMSO+OHB ($p < 0,05$). Finalmente, foi observado um índice de necrose maior nos grupos água destilada e DMSO+OHB, quando comparado com os grupos controle, DMSO e OHB ($p < 0,05$).

Tabela 2- Valores médios \pm erro padrão da média do percentual de células com dano no DNA, distribuição entre as classes de danos, escore referentes aos testes de genotoxicidade e proporção de redução de danos, nos diferentes grupos estudados.

Variável	Grupo experimental					Valor de p*
	CT	AD	DMSO	OHB	DMSO+OHB	
Células com dano no DNA (%)						
	22,80 \pm 0,80 ^a	22,60 \pm 2,98 ^a	26,00 \pm 1,41 ^a	7,20 \pm 1,79 ^b	8,80 \pm 4,025 ^b	<0,001
Classe de danos						
0	77,60 \pm 1,17	77,40 \pm 2,98	74,00 \pm 1,41	92,80 \pm 0,80	91,20 \pm 1,80	
1	16,40 \pm 1,50	16,60 \pm 1,50	23,00 \pm 0,84	6,80 \pm 0,73	6,00 \pm 1,34	
2	5,80 \pm 1,65	3,60 \pm 1,03	3,00 \pm 0,71	0,40 \pm 0,24	2,40 \pm 0,24	
3	0,60 \pm 0,24	2,40 \pm 1,36	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,40 \pm 0,24	
Escore						
	29,80 \pm 2,67 ^a	31,00 \pm 5,90 ^a	29,00 \pm 2,07 ^a	7,60 \pm 0,93 ^b	12,00 \pm 2,50 ^b	<0,001
Proporção de Redução de danos						
	-	1,00	-0,88	3,17	2,59	

CT=Controle, AD=Água destilada, DMSO=Dimetilsulfóxido, OHB=Oxigênoterapia hiperbárica, DMSO+OHB=Dimetilsulfóxido associado à oxigenoterapia hiperbárica. Os resultados estão apresentados em média \pm erro padrão da média. * Valor de p no teste ANOVA uma via. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$; ANOVA/Tukey).

Tabela 3- Valores médios±erro padrão da média do percentual de células viáveis, células apoptóticas, células necróticas e seus respectivos índices, em animais submetidos ao procedimento cirúrgico nos diferentes grupos estudados.

Variável	Grupo experimental					Valor de p*
	CT	AD	DMSO	OHB	DMSO+OHB	
Tipos celulares						
Viável	87,40±0,40 ^b	86,20±0,74 ^b	84,60±0,98 ^b	91,00±0,63 ^a	86,6±0,75 ^b	<0,001
Apoptose inicial	8,00±0,55 ^b	9,80±0,37 ^a	9,80±0,37 ^a	6,80±0,38 ^c	7,20±0,37 ^b	<0,001
Apoptose final	4,60±0,24 ^a	2,20±0,49 ^b	5,60±0,81 ^a	2,20±0,38 ^b	4,80±0,49 ^a	0,002
Necrose	0,00±0,00 ^b	1,80±0,58 ^a	0,00±0,00 ^b	0,00±0,00 ^b	1,40±0,25 ^a	<0,001
Índice de viabilidade celular						
	87,40 ^b	86,20 ^b	84,60 ^b	91,00 ^a	86,60 ^b	<0,001
Índice de apoptose						
	12,60 ^b	12,00 ^b	15,40 ^a	9,00 ^c	12,00 ^b	<0,001
Índice de necrose						
	0,00 ^b	1,80 ^a	0,00 ^b	0,00 ^b	1,40 ^a	<0,001

CT=Controle, AD=Água destilada, DMSO=Dimetilsulfóxido, OHB=Oxigenoterapia hiperbárica, DMSO+OHB=Dimetilsulfóxido associado à oxigenoterapia hiperbárica. Os resultados estão apresentados em média±erro padrão da média. * Valor de p no teste ANOVA uma via. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas (p<0,05; ANOVA/Tukey).

6 DISCUSSÃO

As lesões de pele e anexos com perda de substância são correntemente tratadas com uso de retalhos. Nos retalhos randômicos não estão presentes no pedículo uma artéria e veia dominantes previamente escolhidas de acordo com as particularidades anatômicas da região doadora. Assim, infere-se que a vascularização ocorra de modo aleatório, a partir de vasos comumente encontrados na área doadora e preservados no pedículo (CHEN *et al.*, 1982).

O estudo criterioso da lesão e da área doadora é, portanto, fundamental na escolha da extensão do retalho proposto no tocante a sua relação largura da base e extensão. Logo, a relação entre a largura do pedículo e o comprimento do retalho é fundamental no estabelecimento de sua viabilidade. Destaca-se ainda que a isquemia e conseqüente necrose estejam na dependência do aporte sanguíneos destes retalhos permitidos pelos vasos do pedículo. Destaca-se ainda que para atenuar a isquemia tecidual ainda seja necessário o uso de técnica operatória apropriada com manipulação adequada dos tecidos, evitando a formação de hematoma e edema (HON, GODING, 2009).

Em relação aos processos de neovascularização, estudos indicam que somente a partir do terceiro dia de pós-operatório começam a ser identificados sinais nos retalhos, e esses podem ser encontrados desde o leito até a área cutânea vizinha. Salienta-se ainda que o pedículo secundário se completa por volta do nono dia (CHEN *et al.*, 1982).

Haja vista a importância do processo de irrigação sanguínea, seja pelos vasos preservados ou pela neovascularização, verifica-se que a mesma pode ser incrementada com uso de drogas vasoativas que possibilitem melhor vascularização do retalho em sua fase inicial crítica (KOMAROWSKA *et. al*, 1999).

A hipóxia é um sinal de estímulo à cicatrização e essa pode ser determinada, por exemplo, pela diminuição da irrigação sanguínea, porém se a diminuição da irrigação perdurar, essa situação será um fator de impedimento à cicatrização e poderá levar à necrose tecidual (HON, GODING, 2009).

A média de tensão de oxigênio em retalhos isquêmicos é de, aproximadamente, 30mmhg. Durante o período de isquemia, os retalhos randômicos

ficam submetidos, além da hipóxia, à hipoglicemia. Essas condições podem causar disfunção e morte celular. No entanto, quando o fluxo sanguíneo é restaurado, um segundo evento, conhecido como: não reperfusão determinará o acúmulo de células polimorfonucleares aderidas ao endotélio que produzem espécies reativas tóxicas do oxigênio (ERTO), que podem associar-se a danos celulares tais como alterações mitocondriais, depleção de adenosina trifosfato, aumento do cálcio intracelular e ativação de proteases, fosfatase, lipases e nucleares, resultando na perda da integridade celular além de danos no DNA que determinam instabilidade genética (COTRAN *et al.*, 2010).

Considerando que o processo oxidativo tem início precoce, já aos cinco minutos de pó-operatório, e que a capacidade antioxidante na região próxima ao retalho esteja prejudicada pela dificuldade em se atingir nível local e eficaz de substâncias endógenas antioxidantes, surgiu a proposta de se buscar um composto antioxidante com ação quando precocemente administrada no sítio operatório associada a uma terapia coadjuvante que não utilizasse a mesma via de administração, a via subcutânea. A proposição ainda considerou a injeção de um volume mínimo de substância para não agravar a isquemia por compressão local e com uso de agulha tipo insulina para provocar o mínimo de trauma de inserção, fatos estes que demonstram a continuidade do ineditismo deste estudo (ALMEIDA *et al.*, 2004).

Na confecção dos retalhos isquêmicos, a literatura refere modelos variáveis de proporção entre o tamanho do retalho e o tamanho do pedículo. A proporção varia de 2,5: 1 à 5:1 e os retalhos têm dimensão (em centímetros) de 7x2, 10x4, 2x8, 9x4 e 10x2. Neste estudo, optamos pelo modelo experimental já plenamente consagrados em vários estudos onde as dimensões do retalho foram estabelecidas em 8x2cm com proporção de 4:1 (MCFARLANE , WENNUTH, 1966).

A via de administração subcutânea foi a que se mostrou mais viável para dispersão do volume injetado da droga-teste, em detrimento da via intradérmica, visto que essa última poderia aumentar a isquemia por compressão do complexo vascular intradérmico do retalho. As vias de administração enteral (oral ou retal) e parenteral (intravenosa, intrarterial e intraperitoneal) não foram testadas porque a intenção era atingir concentração da droga no sítio operatório sem a interferência da distribuição vascular sistêmica. Já o uso tópico não foi considerado pela

necessidade de aplicações diárias e dificuldade de dispersar a droga de modo uniforme na ferida operatória (ALMEIDA *et al.*, 2004)..

A técnica operatória de descolamento do retalho com manobras delicadas evitando formações de hematoma e edema, o uso de agulha de calibre fino e a distribuição espaçada da droga ao longo do tecido operatório foram realizados para evitar o comprometimento isquêmico adicional àquele inerente à própria confecção do retalho. O procedimento em tecido superficial, sem abertura de cavidades e sem a manipulação de vísceras, pode ser realizado de modo seguro e sem sofrimento para os animais com uso de medicações anestésicas seguras. A confecção do retalho no dorso dos animais, e tendo ficado eles em gaiolas isoladas, evitou qualquer tipo de contato que pudesse escarificar ou prejudicar a evolução do processo cicatricial, mesmo com a realização de curativos abertos (OKAMOTO, 2001).

Dentre as substâncias consideradas como varredoras de radicais livres de oxigênio, o DMSO mostrou-se promissor pela sua reconhecida capacidade antioxidante em estudos de retalhos cutâneos isquêmicos. A literatura ainda descreve que a aplicação em concentrações com efeito medicamentoso pode ser realizada por via oral, tópica, intravenosa, intrarterial, transcutânea, intraperitoneal, intradérmica, retal e intramuscular. A concentração bioativa varia de acordo com a via de administração. A administração por via enteral ou parenteral é descrita em torno de 1,5 a 2 mg/kg. O uso tópico sugere concentrações que variam de 5 a 60. O uso intradérmico utiliza concentrações desde 0,5 a 12%. Na via transcutânea, em que o DMSO é usado como veículos de vacina, a concentração varia de 1 a 12%. No delineamento da pesquisa optou-se então pela concentração de 5% de DMSO e um volume total de 0,8 ml, obtendo-se uma dose total de 4 mg, dose esta próxima e recomendada pela literatura para uso intradérmico e transcutâneo (DUARTE; FERREIRA, 1997, RAND-LUBY *et al.*, 1996, ALI, 2002).

Na literatura consultada, apenas Almeida *et al.*, (2004) relataram o uso de DMSO, via subcutânea, em uma única aplicação em retalhos randômicos de ratos. Os resultados deste estudo estimularam a presente pesquisa que ainda optou pela associação da administração do DMSO com a OHB.

A OHB é um método de terapia empregado há mais de seis décadas no tratamento de tecidos isquêmicos (WONG *et al.*, 1996).

A opção pela OHB se fez também pelo fato de ser um método de proteção tecidual contra agentes oxidantes o que poderia ter efeito sinérgico àqueles esperados para a administração do DMSO. Por se obter efeito sistêmico por via inalatória e por ser passível de aplicação até a neovascularização completa do retalho e durante a definição do pedículo secundário, (aproximadamente nono dia após a confecção do retalho e por permitir a realização de 10 sessões consecutivas que são preconizadas por protocolos clínicos nas lesões isquêmicas agudas de difícil cicatrização). Corrobora a hipótese desta pesquisa o estudo de Arturson e Khanna (1970) que demonstraram a eficiência da OHB associada à administração de DMSO via enteral (ROCHA *et al.*, 2012).

A utilização de câmara hiperbárica experimental tem sido utilizada em animais de pequeno e médio porte em diversos trabalhos experimentais porém encontramos poucos trabalhos na literatura que utilizaram uma câmara multiplace, adaptando um sistema de campânula com a entrada e saída de oxigênio a 100% com fluxo intermitente por sessenta minutos, em trabalhos experimentais com coelhos e ratos, sem contudo avaliar, em tempo real, a saturação de oxigênio no interior da caixa. (FAGUNDES *et al.* 2008, ROCHA *et al.*, 2012, LYRA *et al.*; 2001, OLIVEIRA 2008 e LIMA, 2006).

Neste trabalho de forma inédita, foi construída por uma empresa especializada (TOTALMAT-SP/BR) uma caixa de experimento para este fim, onde foi adaptada uma conexão de saída da caixa de experimento para o analisador da concentração de oxigênio no painel de controle da câmara multiplace, conseguindo-se aferir a concentração exata do oxigênio em seu interior (Figuras 7, 8 A,B e C).

Em relação aos dados biométricos dos animais, pode-se verificar que todos os grupos apresentaram um ganho de peso corporal de forma não significativa. Esses dados sugerem que a administração de DMSO ou a OHB não causou efeitos tóxicos visto que todos os animais passaram pelo mesmo procedimento cirúrgico.

Em relação à avaliação da área de necrose pode-se perceber que todos os grupos que receberam a administração de alguma solução (AD ou DMSO) apresentaram um discreto aumento da área de necrose. Esse fato permite não nos permite inferir que a injeção do volume possa ter funcionado como uma barreira para a vascularização, pois não foi estatisticamente significativa.

agindo da mesma forma que o edema, embora o volume aplicado tenha sido escolhido de modo a minimizar este efeito visto que o edema e a formação de hematoma, ou seja, a barreiras físicas, mostraram ser prejudiciais à vitalidade de retalhos cutâneos randômicos. Essa assertiva é também corroborada por Almeida *et al.*, (2008) que utilizaram solução salina (NaCl 0,9%) com um volume total maior (0,1 ml/cm²). Esses mesmos autores ainda relatam que o trauma causado pela agulha de insulina utilizada para aplicação da droga em teste ou seu veículo possa ser um importante fator causal para o aumento da área de necrose. Na pesquisa, o grupo de DMSO apresentou uma área de necrose de 51,72%, maior do que observado no grupo AD e CT, demonstrando uma ausência de proteção, porém Almeida *et al.*, (2008) observaram que a aplicação de DMSO na concentração de 5% com um volume maior, levou a uma redução da área de necrose dos retalhos cutâneos randômicos. Esses autores demonstraram que enquanto o grupo CT possuía uma área de necrose de 47,99%, com a aplicação do DMSO o valor percentual decaiu para 41,57%, fatos que vão de encontro dos observados neste estudo. Podemos inferir que o volume utilizado com a redução da sua concentração pode ter influenciado a diferença do resultado encontrado entre os estudos. Quando associado o DMSO com a OHB, uma vez ao dia por 10 dias consecutivos, duas horas após o experimento observou-se uma discreta redução de 46,79% para 45,94% em relação ao grupo AD e uma redução de 47,19% para 45,94% em relação ao grupo CT, demonstrando uma ausência significativa de proteção quando comparado à extensão de área de necrose. No entanto, estudos em retalhos randômicos de Arturson e Khanna (1970), utilizando o DMSO, via intraperitoneal, após 25 minutos do procedimento cirúrgico, associando a OHB em pressões atmosféricas diferentes de 2 e 3 ATA, por 4 e 2 horas respectivamente, por dois dias, foram capazes de diminuir significativamente a área de necrose. Essa diferença de resultados pode ser compreendida se considerando que a barreira física criada pela aplicação do DMSO ou qualquer outro líquido que simule a formação de um edema possa interferir na proteção da OHB sobre os tecidos, e que pode ser potencializado com o aumento da pressão e ao tempo de exposição ao oxigênio, que aumenta a eficiência do processo de proteção, visto que ocorreria maior perfusão em menor tempo com redução da isquemia e necrose tecidual (ACEVEDO-BOGADO *et al.*, 2002).

O grupo submetido à OHB foi o que apresentou melhores resultados e, portanto, a menor área de necrose, 38,30%. No entanto, essa redução não foi estatisticamente significativa. A redução da área de necrose pela OHB já foi demonstrada por Arturson e Khanna, (1970). Esses autores demonstraram que o aumento da pressão de 2 para 3 ATA, mesmo com a diminuição de horas de exposição ao oxigênio a 100%, melhora a resposta à isquemia tecidual. Logo, esses autores inferem que o aumento da pressão atmosférica é mais importante que o número de sessões e que tempo de exposição e a precocidade do tratamento têm papel determinante nas lesões ou necrose resultantes dos fenômenos isquêmicos. Os mesmos inferem também que, mesmo interpondo uma barreira física entre o retalho e o leito, a neoangiogênese dos bordos da lesão pode ainda facilitar o processo de redução da área de necrose, nas condições estudadas, o que pode servir de modelo para novos trabalhos.

O fenômeno de isquemia reperusão é mediado pelas ERTOS, moléculas altamente instáveis e extremamente tóxicas para a maioria dos fenômenos biológicos. As ERTOS causam peroxidação lipídica das membranas celulares, gerando a formação de mais radicais livres; estes metabólitos altamente reativos de oxigênio são gerados constantemente em todas as células e, por serem potencialmente prejudiciais, são constantemente removidos por sistema protetores cuja integridade depende de suprimento adequado de nutrientes e oxigênio, em um ciclo que se auto propaga, levando a célula à morte celular por necrose ou apoptose. Atualmente, existe o interesse na identificação de substâncias presentes no meio que possuem atividade protetora contra mutações, a fim de resguardar as gerações futuras (WERKER *et al.*, 1995)

Nos testes de genotoxicidade onde foi empregado o ensaio do cometa, a média de frequência de células lesionadas, distribuídas entre as classes de danos, aumentou discretamente, porém não de modo significativo, entre o grupo CT, AD e DMSO, onde o grupo DMSO apresentou um valor maior de células lesionadas, logo com aumento da genotoxicidade, porém quando associado ao tratamento hiperbárico, este efeito caiu drasticamente com um escore de 29.00 do grupo DMSO para 12.00 na associação com OHB e para 7.60 quando utilizado a OHB isoladamente com valor de $p < 0,0001$, indicando diferença estatisticamente significativa com redução do dano de 2,59 e 3,17 do grupo DMSO+OHB e OHB respectivamente, demonstrando

que efetivamente o tratamento com a OHB reduziu a freqüência de células com danos no DNA, mesmo quando da sua associação (DMSO+OHB). Estes mecanismos ainda permanecem obscuros, porém sinalizam a grande redução do dano celular quando da utilização do tratamento com OHB em retalhos cutâneos de fluxo randomizados.

No teste de viabilidade celular (necrose e apoptose celular), onde foi empregada a coloração diferencial com alaranjado de acridina e brometo de etídio para a determinação de células viáveis e não viáveis, verificou-se a freqüência de micronúcleos, frente a dois agentes supostamente protetores. O menor índice de apoptose encontrado coincide com a diminuição do dano encontrado no teste do cometa, com um aumento maior no uso do DMSO isoladamente e uma redução significativa quando associado a OHB, com valor de $p < 0,0001$ entre os grupos; segundo Fenech *et al.*, (1999), os eventos de apoptose atuam na eliminação de células micronucleadas, reduzindo, portanto, a freqüência de células com danos clastogênicos, Vukicevic *et al.*, (2004), por sua vez, apresentam duas considerações distintas entre si a este respeito: na primeira delas, os autores dizem que uma alta freqüência de células em apoptose pode relacionar-se a outros danos genéticos que não resultariam na formação de micronúcleos e assim não elevariam a sua freqüência; por outro lado, um aumento na freqüência de micronúcleos e nos índices de apoptose normais poderia ser explicado pela indução de supressão apoptótica nas células micronucleadas, tornado-se estas necróticas antes mesmo de passarem pela mitose. Estudos corroboram o que foi observado: que o oxigênio funcione como um sinalizador de uma série de eventos que promovam a viabilidade celular. Zambioni *et al.* (1992) demonstram em seus estudos com OHB a redução do fator indutor de hipóxia (HIF- α , do inglês, *hypoxia-inducible factor*), um importante regulador da expressão gênica envolvida na regulação da oxigenação tecidual e que aumenta na presença da hipóxia. Os mecanismos moleculares de proteção proporcionados pela OHB na cicatrização de feridas isquêmicas são decorrentes da modulação do fator que induz hipóxia (HIF-1 α). Feridas tratadas com OHB apresentam diminuição do HIF-1 α e sua consequente gene expressão, com diminuição da apoptose e redução do processo inflamatório. Segundo Kranke *et al.* (2004), a proteína BNip3 (uma proteína pró-apoptótica localizada na mitocôndria) está extremamente elevada a partir do 10^o dia em tecidos isquêmicos. Altos níveis

de oxigênio induzidos pela OHB reduzem e atenuam a expressão da proteína BNip3, modulando a apoptose a despeito do persistente elevado nível de ácido láctico; dessa forma, a OHB aumenta a ação antiapoptótica e reduz a ação pró-apoptótica, resultando na diminuição da liberação de moléculas pró-apoptóticas pela mitocôndria e atenuando a apoptose. Em estudo imuno-histoquímico da apoptose celular em retalhos cutâneos randômicos, Rocha *et al.*, (2013) referiram que, ao avaliar a expressão da apoptose nos vários extratos, perceberam os efeitos protetores da OHB nas porções médias e distal do retalho, apresentando um efeito redutor na expressão da caspase 3 na pele externa do rato, demonstrando que a hiperoxigenação em tecidos sadios é semelhante àqueles que receberam o estímulo cirúrgico, fatos que colaboram com os nossos achados onde o tratamento com a OHB teve eficácia na redução na porcentagem de danos do DNA e com a redução da frequência de células em apoptose, que pode ser atribuída ao aumento de oxigenação hiperbárica dos tecidos na fase inicial da isquemia.

7 CONCLUSÕES

1. O tratamento com OHB, DMSO ou sua combinação não foi capaz de diminuir a área de necrose no retalho cutâneo.

2. Ao avaliar o provável efeito celular do DMSO e da OHB sobre os tecidos constatamos:

2.1- A terapia hiperbárica e a sua combinação com o DMSO levou a uma redução no percentual de células e no escore de dano no DNA.

2.2- Apenas o tratamento com OHB e não sua combinação com o DMSO foi capaz de aumentar a viabilidade celular e reduzir a apoptose das células do retalho cutâneo.

REFERÊNCIAS

Acevedo-Bogado CE, Bins EJ, D'Campora AJ, Neves RE. Efeito da hialuronidase na sobrevida de retalhos cutâneos em ratos. *Acta Cir Bras* 2002;17:14-16.

ALI BH. Dimethylsulfoxide: Recent pharmacological and toxicological research. *Vet Hum Toxicol* 2002;43:228-31.

Almeida KG, Fagundes DJ, Manna MCB, Monteiro EFS. Ação do dimetil-sulfóxido na isquemia de retalhos randômicos de pele em ratos. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2004; 19(6):649-57.

Anderson D, Plewa MJ. The international comet assay workshop. *Mutagenesis*, v.13, p. 67-73, 1998.

Arturson G, Khanna NN. The effects of hyperbaric oxygen, dimethyl sulfoxide and complamin on the surgical on experimental skin flaps. *Scand Plas Reconstr Surg*. 1970; 4:8-10

Bakar B, Kose EA, Sonals S, Alhan A, Kilinck, Keskill S. Evaluation of the neurotoxicity of DMSO infused into the carotid artery of rat. *Injury* 2012; 43(3): 315-22.

Baynosa RC, Zamboni WA. O efeito protetor da oxigenoterapia hiperbárica em enxertos e retalhos comprometidos. *Submarino Hyperb Med* 2012; 38(4):857-65.

Bertoletto PR, Fagundes DJ, Simoes MJ, Oshima CT, Montero EFS, Simoes RS. Effects of hyperbaric oxygen therapy on the rat intestinal mucosa apoptosis caused by ischemia-reperfusion injury. *Microsurgery* 2007; 27(4):224-7.

Champion WM, McSherry CK, Goulian D. Effect of hyperbaric oxygen on survival of pedicled skin flaps. *J Surg Res* 1967; 7: 583-586

Chem RC, Perin EC, Maracaja PF. Estudo da revascularização de retalhos em ratos. *AMRIGS* 1982; 26:22-6

Collins T. Lesão e morte celular. Lesão de isquemia e reperfusão. In Robbins *Patologia Estrutural e Funcional*. 6ªed. Guanabara – Koogan Rio de Janeiro. 2000; 1-26

Costa RI. Aumento do tempo de sobrevida dos retalhos pediculados com manitol. Estudo experimental. *Ver Soc Bras Cir Plast* 1996; 11(1):135-39.

Cotran RS, Kuma V, Collins T. Lesão e morte celular: Lesão de isquemia e reperfusão. In: Robbins. *Patologia estrutural e funcional*. 8ªed. Rio de Janeiro: Guanabara-koogan; 2010 p.1-26

Referências formatadas conforme metodologia proposta por Zárata P, Andrade SMO, Aydos, RD. Diretrizes para elaboração de Teses e Dissertações. 2ªed. Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento.

Duarte I, Ferreira L. Experimental study of the action of dimethyl sulfoxido on skin flaps. *Acta Orto Bras* 1997; 5(2):65-8.

Erdmann D, Roth AC, Hussmann J, Lyons SF, Mody NJ, Kucan JO, Russell RC. Skin allograft rejection and hyperbaric oxygen treatment in immune-histoincompatible mice. *Undersea Hyperbaric Medicine* 1995;22: 395-399.

Fedel-Miyasato LE, Kassuya C, Cândida AL, Auharek A, Sarah A, , Anelise SN, Oliveira RJ. Evaluation of anti-inflammatory, immunomodulatory, chemo preventive and wound healing potentials from *Schinust erebinthifolius* methanolic extract. *Revista Brasileira de Farmacognosia JVR* 2014;24: 565-575.

Fagundes DJ, Rech FV, Hermanson R. A proposal of multiplace hyperbaric chamber for animal experimentation and veterinary. *Acta Cir Bras* 2008; 23(4): 384-390.

Fenech M, Crott J, Tuner J, Brown S. Necrosis, apoptosis, cytostasis and DNA damage in human lymphocytes measured simultaneously within the cytokinesis-block micronucleus assay: description of method and results for hydrogen peroxide. *Mutagenesis* 1999; 14: 605-612.

Frederick F, Michael G. Prevention of skin flap necrosis by a course of treatment with vasodilatador drugs. *Plast Reconstr Surg* 1978; 61(5):733-42.

Galla TJ, Saetler RK, Hammersen F, Messmer K. Increase in skin-flap survival by the vasoactive drug buflomedil. *Plast Reconstr Surg* 1991; 87(1): 130-6.

Gallego-Villar D, Garcia-Fadrique G, Povo M, Salvador-Marin M, Gallego-Gomez J. Maintenance of the responset to dimethyl-sulfoxide treatment using hyperbaric oxygen in interstitial cystites, painful bladder syndrome: a prospective, randomized comparative. *Urolool* 2013; 90(4):4111-6

Gampper TJ, Zhang F, Mofakhmi NF. Beneficial effect hyperbaric oxygen on island flaps subjected to secondary venous ischemia. *Microsurgery* 2002; 22(2):49-52.

Greenwood TW, Gilchrist AG. The effect of HBO on wound healing following ionizing radiation. *Proceedings of the fifth international congress on hyperbaric medicine*. Barnaby Canada: Simon Frazier University 1973; 1: 253-263.

Grivicich I, Regner A, Rocha AB. Apopyosis: Programad cell death. *Revista Brasileira de Cancerologia* 2007; 53(3): 335-343

Grossman JA, McGonagle BA, Dowden RV, Jantar ML. O efeito da hialuronodase e dimetilsulfoxido (DMSO) na sobrevivencia de retalhos. *Ann Plast Surg* 1993;11(3): 223-6.

Gruber RP, Heitkamp DH, Lawrence JB. Skin permeability to oxygen and hyperbaric oxygen. *Arch Surg* 1970; 101: 69-70.

Hon BD, Goding G. Fisiologia dos retalhos cutâneos. In: Baker SR. *Retalhos locais em reconstrução facial*. 2° ed. São Paulo: Di Livros 2009; p 15-30.

Hsu OK, Gabre, Stewar E, Chen HI, Kobayashi M, Colvent JW, Sundine MJ, Kotchounian T, Dhar S. Utilização de drogas na proteção de retalhos cutâneos de ratos. *Plast Surg Reconst* 2002;113(7): 2048-54.

Jacob S, Bischel M, Herscheler RJ. Dimethyl sulfoxide: A new concept in pharmacotherapy. *Curr Ther Res* 1964; 6:134-5.

Jeffrey H, Ronald T, Charles WC. Effect of dimethyl sulfoxide on island flap perfusion and surgical in rats. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1987; 113:859-63.

Jerome EA, Charles EH, Hughh G, Willian T. Study n the action of dimethyl sulfoxide on the experimental pedicle flap. *Plast Reconstr Surg* 1967; 39(2): 142-6

Jewell JL, Russell RC, Guan KL. Amino acid signaling upstream of motor. *Nat Rev Mol cell Biol* 2013, 14(3): 133-9.

Jurell G, Kaijser L. The influence of varying pressure and duration of treatment with hyperbaric oxygen on the survival of skin flaps: an experimental study. *Scand J Plast Reconstr Surg* 1973; 7:25-28.

Kim N, Khalili M, Henary MM, Streckows kL, Michniak BB. Percutaneous penetration enhancement activity of aromatic dimethyliminosulforanes. *Int J Pharmacol* 1999;187:219-29.

Kivisari J, Ninikoski J. Effects of hyperbaric oxygen and prolonged hypoxia on the healing of open wounds. *Acta Chir Scand* 1975; 141:14-19.

Kligman AM. Topical pharmacology and toxicology of dimethylsulfoxide – Part 1. *J Am Med Assoc* 1993;193:140-6.

Kobayashi H, Sugiyama C, Morikawa Y, Hayashi M, Sofuni T. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. *MMS Communications* 1995: (2): 103-115.

KoehnleinL G. Experimental studies on the effect of dimethyl sulfoxide on pedicle flaps. *Surgery* 1970; 67(4): 672-7.

Komarowska TE, Chem SG, Zhang F, Dogan T, Lineaweaver WC, Unck HI. Prolonged perivascular use of verapamil or lidocaine decreases skin flap necrosis. *Ann Plast Surg* 1999: 43(3): 283-8.

Kranke P, Bennett M, Roeckl-Wiedmann I, Debus S. Hyperbaric oxygen therapy for chronic wounds (Cochrane Review). *Cochrane* 2004.

Kryger Z, Zhang F, Dogan T, Cheng C, Lineaweaver WC, Buncke HJ. The effects of VRGF on survival of random flap in the rat: examination of various routes of administration. *Br J Plast Surg* 2000: (53): 234-9.

Larson JV, Steensma GA, Flikkema RM, Norman EM. A aplicação da oxigenoterapia hiperbarica no tratamento de retalhos comprometidos. *Submarino Hyper* 2013; 40(6): 499-504.

Leite MT, Gomes HC, Percário S, Russo RC, Ferreira LM. Dimethylsulfoxide a Bloch to the deleterious effect of nicotine in a random skin flaps in the rat. *Plast Reconstr Surg* 2007; 120(7): 1819-22.

Leslie R, Rodney F, Shauna T, Willians EA, Karen A, Willian SF. Improved outcome of surgical flaps treated with topical dimethyl sulfoxide. *Ann Surg* 1996; 224(4):583-90.

Lima CX. Efeitos do pré-condicionamento por oxigenoterapia hiperbárica na lesão de isquemia e reperfusão hepática em ratos. [Dissertação de Mestrado]. Belo Horizonte Universidade Federal de Minas Gerais,2006.

Lozano DD, Stephenson LL, Zamboni WA. Effect of hyperbaric oxygen and medicinal leeching on survival of axial skin flaps subjected to total venous occlusion. *Plast Reconstr Surg* 1999; 104(4): 1029-32.

Lyra Perreira ML. Teles AP, Pereira Neto J. Câmara hiperbárica de acrílico para animais de pequeno porte. *Acta Cir Bras.* 2001; 16(4): 658-663.

Manson PN, Myers RA, Hoopes JE. Improved capillaries by hyperbaric oxygen in skin flaps. *Surg Forum*1980; 31:564-566.

McFarlane RM, Wennuth RE. The use of hyperbaric oxygen to prevent necrosis in experimental pedicle flaps and composite skin grafts. *Plast Reconstr Surg* 1966; 37:422-430.

McGahon AJ, Martin SJ, Bissonnette RP, Mahboudi A, Shi Y, Mogi IR.J.; Nishioka WK, Green DR. The end of the (cell)line: Methods for the study of apoptosis in vitro. In: Schurartz, LM, Osbourne BA eds. *Methods in cell biology.* Academic Press1995; 46: 153-184.

Mitriev YV, Minasian SM, Demchenko EA, Galagudza MM. Cardioprotetive of dimethylsulfoxide during global ischemia- reperfusion of isolated rat. *Heart.Bulll Exp.Biol. Med* 2012; 54 (1):47-50.

Moura GM, Santos RM. Radicais livres. *Jovem médico* 1998; 248-53.

Nemiroff PM, Lungu AL. The influence of hyperbaric oxygen and irradiation on vascularity in skin flaps: a controlled study. *Surg Forum* 1987; 38:565-567.

Nemiroff PM, Merwin GE, Brant T, CassisiNJ. HBO and irradiation on experimental skin flaps in rats. *Surg Forum*1984; 35:549-550.

Nemiroff PM. Synergistic effects of pentoxifylline and hyperbaric oxygen on skin flaps. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1988; 114:977-981

Nimikoski J. Viability of ischemic skin in hyperbaric oxygen. *Acta Chir Scand* 1970; 136:567-568.

Okamoto RH. Estresse oxidativo local e sistêmico na fase aguda, em ratos submetidos a retalhos cutâneos isquêmicos [Tese -Doutorado]. Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina, 2001.

Olive PL, Wlode kD, Durand RE, Banath P. Factors influencing DNA Migration from Individual Cells subject in Gel Electrophoresis. *Exper. Cell Res*1992; 198: 259-267.

Oliveira JM, Jordão BQ, Ribeiro LR, Eira AF, Mantovani MS. Anti-genotoxic effect of aqueous extracts of sun mushroom (*Agaricus blazei* Murill lineage 99/26) in mammalian cells in vitro. *Food and Chemical Toxicology*2007; 4: 1775-1780,

Oliveira MCSL. Efeito da oxigenoterapia hiperbárica após isquemia hepática segmentar normotérmica e reperfusão, em coelhos: avaliação bioquímica, morfológica e da microcirculação hepática pela ultra-sonografia contrastada. [tese de Doutorado] Universidade Federal de Minas Gerais–Faculdade de Medicina, 2008.

Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys Res. Commun*1984;123: 291-298.

Poersch A. Atividade protetora da DCTN (trans-desidrocrotonina) na frequência de micronúcleos e apoptose induzidos por diferentes agentes mutagênicos in vitro. Dissertação [Mestrado] – Instituto Agrônomo do Paraná, Londrina. Universidade Estadual de Londrina, 2005.

Rand-Luby L, Pommier RF, Williams ST, Woltering EA, Small KA, Etcher WS. Improve outcome of surgical flaps treated with topical dimethylsulfoxide. *Ann Surg* 1996; 224:583-9.

Raposio E, Caregnato P, Renzin M, Margarato A, Fenardo G, Borobina P, Capello C, Gualdi A, Molinari R, Santi PL. Experimental model for the evolution of topical application of a solution to help myocutaneous flap transposition. *Ann Plast Esthet* 2002; 43(3): 219-21.

Robert RJ, Anjo MF, Morgan RF. Dimethylsulfoxide increases the survival of primarily ischemic island skin flaps. *Otolaryngol Head Neck Surg*1994;10(2): 228-31.

Rocha FP; Fagundes DF, Pire JA, Rocha FS. Existe efeito protetor da oxigenação hiperbárica em retalhos cutâneos randômicos? Um estudo imuno-histoquímico da apoptose celular e fator de crescimento vascular endotelial. *Rev Bras Cir. Plást* 2013; 28(2):183-90.

Rocha FP, Fagundes DF, Pire JA, Rocha FS. Effects of hyperbaric oxygen and N-acetylcysteine on the survival of random pattern skin flaps in rats. *Indian J Plast Surg* 2012.45(3): 453-8.

Ross GD, Vetvicka V, Yan J, Xia Y; Vetvickova J. Therapeutic intervention with complement and b-glucan in cancer. *Immunopharmacology*, New York 1999; 42(1): 61-74.

Roth V, Herron MS, Bueno RA, Chambers CB, Neumeister MN. Stimulation angiogenesis by hyperbaric oxygen in an isolated tissue construct. *Undersea Hyperbaric Med* 2011;38(6)509-14.

Rydberg B, Johanson KJ. Estimation of single strand breaks in single mammalian cells. In Hanawalt PC, Friedberg EC and Fox CF (eds). *DNA Repair Mechanisms* Academic Press 1978, New York. NY .168-465.

Selçuk CT, Kuvatsv, Bozkurf M, Yasa Z, Gulsun N, Ilgezdi S, Ula M, Ozalp B. The effect of hyperbaric oxygen therapy on the survival of random pattern skin flaps in nicotine-treated rats. *Plast Reconstr Aesthet Surg* 2012; 65(4): 489-93.

Shigetoshi S, Simon R, Graham S. Dimethyl sulfoxide (DMSO) treatment reduces infarction volume after permanent focal cerebral ischemia in rats. *Neuroscience Letters* 1997; 239:125-7.

Shulman AG, Krohn HL. Influence of hyperbaric oxygen and multiple skin enxertos alogênicos on the healing of skin wounds. *Surgery* 1967; 62:1051-1058.

Silveira PC, Silava LA, Tromm PT, Cheffer DL, Souza CT, Pinho RA. Effects of therapeutic pulsed ultrasound and dimethylsulfoxidephonophoresis on oxidative stress parameters after injury induced by eccentric exercise. *Ultrasonics* 2012; 52(5): 650-4.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988, 175:184-191.

Speit G, Hartmann A. The Comet Assay (Single-Cell Gel Test), A Sensitive Genotoxicity Test for the Detection of DNA Damage and Repair. In: Henderson DS. *Methods in Molecular Biology: DNA Repair Protocols - Eukaryotic Systems*. Totowa: Humana Press 1996; 113: 203-211.

Stanley WJ, Herschler R. Pharmacology of DMSO. *Ann NY Acad Sci* 1985; 2-14.

Stevens DM, Weiss DD, Koller WA, Bianchi DA. Survival of normothermic microvascular flaps after prolonged secondary ischemia: Effects of hyperbaric oxygen. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1996; 115:360-364.

Suares, Neto C, Garcia S, Garcia B. A comparative study on the effect of various pharmacological agents on the surgical of skin flaps in the rat. *Br J Plast. Surg* 1999; 45:113-6.

Sumer BD, Gostmn BR, Gao F, Houghy BH, Paniello RC, Nuissenbaum B. Caspase inhibition in lances ischemic tolerance of fasciocutaneous flaps. *Laryngoscope* 2005; 115(8):1358-61.

Sumida K, Igarashi Y, Toritsuka N, Matsushita T, Abe-Tomizawa K, Aokim UT, Yamada H, Ohnoy. Effects of DMSO on gene expression in human and rat hepatocytes. *Hum Exp Toxicol* 2011; 30(10):1701-9

Tan CM, Myens RA, Hooper JE. Effects of hyperbáric oxygen and hiperbaric air on the survival of island skin flaps. *Plast Reconstr Surg* 1984;39:27-30.

Tice RR, Andrews PW, Hirai O, Singh NP. The single cell gel(SCG) assay: an electrophoretic technique for the detection of DNA damage in individual cells. *Adv Exp Med Boil* 1995; 283; 157-164.

Ulkur E, Yukse IF, Acike IC, Celikoz B. Effect of hyperbaric oxygen on pedicle flaps with compromised circulation. *Microsurgery* 2002; 22(1):16-20.

Vukicevic V, Kampfinger K, Stopper H. Influence of altered apoptosis in human lymphoblastoid cell lines on micronucleus frequency, *Toxicology Letters* 2004; 147: 187-95.

Werker PM, Kon M, Green CJ, Ambrose I, Hidalgo A. Oxidative processes and free radical scavengers in ischemia-reperfusion injury in adipocutaneous flaps: in vitro lipid peroxidation assessment. *Br J Plast Surg* 1995; 48:590-6.

Wong HP, Zamboni WA, Stephenson LL. Effect of hyperbaric oxygen on skeletal muscle necrosis following primary and secondary ischemia in a rat model. *Surg Forum* 1996; 7:705- 707.

Yuce IA, Bayramicli M. Effects of hyperbaric oxygen treatment and heparin on the survival of unipedicled venous flaps: an experimental study in rats. *Ann Plast Surg* 2000; 44(3):295-303.

Zamboni WA, Roth AC, Russell RC, Nemiroff PM, Smoot C. The effect of acute hyperbaric oxygen therapy on axial pattern skin flap survival when administered during and after total ischemia. *J. Reconstr Microsurg* 1989; 5:343-347.

Zamboni WA, Roth AC, Russell RC, Smoot EC. The effect of hyperbaric oxygen on reperfusion of ischemic axial skin flaps: A laser Doppler analysis. *Ann Plast Surg* 1992; 28: 339-341.

Zamboni WA. Applications of hyperbaric oxygen therapy in plastic surgery. In: Oriani G, Marroni A, Wattel F, eds. *Handbook on hyperbaric oxygen therapy*. New York: Springer- Verlag, 1996.

Zhang T, Gong W, Li, Yang S, Zhang K, Yang D, Xu P, Jia T. Efficacy of hyperbaric oxygen on survival of random pattern skin flap in diabetic rats. *Submarino Hyperb Med* 2007; 34(5): 335-9.

9 APÊNDICES

APENDICE A: Peso dos animais (g).

Grupo CT	PRÉ	PÓS
1	316	299
2	370	350
3		
4	310	279
5	419	384
6	455	418
7	440	449
8	459	440
9	321	315
10	389	405
Grupo AD	PRÉ	PÓS
1	392	372
2	299	263
3	420	400
4	389	368
5	340	336
6	365	358
7	310	306
8		
9	340	335
10	379	369
Grupo DMSO	PRÉ	PÓS
1	377	356
2	385	348
3	389	380
4	334	320
5	404	398
6	292	283
7	389	307
8	455	426
9	466	395
10	379	379
Grupo OHB	PRÉ	PÓS
1	489	446
2	470	428
3	447	425
4	450	422
5	438	418
6	432	413
7	438	402
8		
9	484	454
10	402	364
Grupo DMSO+OHB	PRÉ	PÓS
1	406	374
2	399	368
3	407	378
4	367	379
5	376	355
6	405	330
7	337	318
8		
9	395	385
10		

APÊNDICE B: Resultados da variação de área e percentual de necrose dos grupos.

Grupo CT	Percentual de área de necrose
1	35,61
2	67,10
3	
4	48,43
5	74,01
6	46,57
7	46,10
8	51,87
9	27,91
10	41,59
Grupo AD	
1	52,54
2	34,46
3	56,69
4	53,70
5	43,62
6	58,12
7	62,88
8	
9	62,86
10	54,73
Grupo DMSO	
1	23,39
2	67,60
3	40,45
4	53,17
5	49,51
6	55,41
7	58,18
8	76,43
9	48,27
10	44,80
Grupo OHB	
1	24,91
2	27,80
3	53,37
4	31,24
5	61,07
6	52,20
7	43,09
8	
9	39,00
10	47,41
Grupo DMSO+OHB	
1	63,43
2	
3	41,98
4	66,29
5	36,23
6	46,92
7	58,88
8	66,09
9	
10	45,27

APÊNDICE C: Resultado da análise da viabilidade celular e contagem diferencial de apoptose e necrose.

LAM.	VIA	APOP 1	APOP 2	NEC	Total	TT APOP	TT NEC	Prova	IND Viab	IND Apop	IND Nec
CT											
G 1.1	87	8	5	0	100	13	0	100	87	13	0
G 1.2	87	9	4	0	100	13	0	100	87	13	0
G 1.3	89	6	5	0	100	11	0	100	89	11	0
G 1.4	87	8	5	0	100	13	0	100	87	13	0
G 1.5	87	9	4	0	100	13	0	100	87	13	0
AD											
G 2.1	84	11	3	2	100	14	2	100	84	14	2
G 2.2	88	10	1	1	100	11	1	100	88	11	1
G 2.3	87	9	3	1	100	12	1	100	87	12	1
G 2.4	85	10	1	4	100	11	4	100	85	11	4
G 2.5	87	9	3	1	100	12	1	100	87	12	1
DMSO											
G 3.1	86	10	4	0	100	14	0	100	86	14	0
G 3.2	84	9	7	0	100	16	0	100	84	16	0
G 3.3	86	10	4	0	100	14	0	100	86	14	0
G 3.4	81	11	8	0	100	19	0	100	81	19	0
G 3.5	86	9	5	0	100	14	0	100	86	14	0
OHB											
G 4.1	90	7	3	0	100	10	0	100	90	10	0
G 4.2	92	7	1	0	100	8	0	100	92	8	0
G 4.3	89	8	3	0	100	11	0	100	89	11	0
G 4.4	92	6	2	0	100	8	0	100	92	8	0
G 4.5	92	6	2	0	100	8	0	100	92	8	0
DMSO+OHB											
G 5.1	85	7	6	2	100	13	2	100	85	13	2
G 5.2	87	8	4	1	100	12	1	100	87	12	1
G 5.3	85	7	6	2	100	13	2	100	85	13	2
G 5.4	89	6	4	1	100	10	1	100	89	10	1
G 5.5	87	8	4	1	100	12	1	100	87	12	1

ONDE:	
G1	CT
G2	AD
G3	DMSO
G4	OHB
G5	DMSO+OHD

APÊNDICE D: Resultados do ensaio do cometa.

Lâmina	Classe 0	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Total de danos	Escore
CT						
G 1.1	76	14	9	1	24	35
G 1.2	76	14	9	1	24	35
G 1.3	82	15	5	0	20	25
G 1.4	78	22	0	0	22	22
G 1.5	76	17	6	1	24	32
AD						
G 2.1	72	19	5	4	28	41
G 2.2	85	11	4	0	15	19
G 2.3	84	16	0	0	16	16
G 2.4	71	19	3	7	29	46
G 2.5	75	18	6	1	25	33
DMSO						
G 3.1	73	23	4	0	27	31
G 3.2	76	23	1	0	24	25
G 3.3	75	22	3	0	25	28
G 3.4	69	26	5	0	31	36
G 3.5	77	21	2	0	23	25
OHB						
G 4.1	94	6	0	0	6	6
G 4.2	91	9	0	0	9	9
G 4.3	93	6	1	0	7	8
G 4.4	91	8	1	0	9	10
G 4.5	95	5	0	0	5	5
DMSO+OHB						
G 5.1	87	9	3	1	13	18
G 5.2	95	3	2	0	5	7
G 5.3	92	6	2	0	8	10
G 5.4	87	9	3	1	13	18
G 5.5	95	3	2	0	5	7

ONDE:	
G1	CT
G2	AD
G3	DMSO
G4	OHB
G5	DMSO+OHD

ANEXO

ANEXO A – Certificado CEUA.

**C E R T I F I C A D O**

Certificamos que o Protocolo nº 309 do Pesquisador Albert Schiavetto de Souza referente ao projeto de pesquisa, “Estudo morfológico do retalho cutâneo sob a ação do dimetilsulfóxido, via subcutânea, associada a oxigenioterapia hiperbárica, em ratos”, está de acordo com os princípios éticos adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), com a legislação vigente e demais disposições da ética em investigação que envolvem diretamente os animais e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA/UFMS, em reunião de 20 de junho de 2011.

Campo Grande (MS), 21 de junho de 2011.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Joice Stein', is written over the printed name.

Dr^a Joice Stein
Coordenadora da CEUA

ANEXO B - Normas Adotadas.

Conselho Nacional de Saúde – Resolução n. 01/88: Normas de pesquisa em saúde Bioética 199;3:137-54.

DeCS – Descritores em Ciências da Saúde. 3ºed. São Paulo, Bireme, 1996, 1146p.

International Committee on Veterinary Anatomical Nomenclature – Nomina Anatomica Veterinária. 3 ºed. New York, Ithaca, 1983. 216p.

Uniform Requiriments for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals.
International Committee of Medical Journal Editors. Ann Intern Med997;126:36-47.