

Isquemia e reperfusão por circulação retrógrada: estudo comparativo experimental

Ischemia and reperfusion by retrograde flow: experimental comparative study

Cesar Roberto Busato¹, Carlos Alberto Lima Utrabo¹, Leandro Cavalcante Lipinski¹, Keizi Dayane de Lima¹, Márcio Dias Guilherme Filho¹, Nicolas Brandalize Medeiros¹, Samela Basi Fagundes¹, Willman Josviak¹

Resumo

Contexto: Isquemia crítica de membro inferior sem leito distal tem opções restritas para tratamento. Desviar o fluxo de maneira retrógrada através da circulação venosa é alternativa amparada em evidências de inúmeros trabalhos publicados. **Objetivos:** Comparar o comportamento de variáveis clínicas e laboratoriais em extremidades de suínos submetidas a isquemia e a isquemia com reperfusão por circulação retrógrada entre si e em relação a um grupo controle. **Métodos:** Dez suínos foram separados em dois grupos. No grupo 1 (n=5), controle, avaliaram-se padrões fisiológicos de variáveis como fluxo ao Doppler, temperatura, gasometria, lactato, creatinoquinase (CK) e pressão arterial. No grupo 2 (n=5), após um período médio de isquemia de 27 minutos e 30 segundos, consequente à interrupção do fluxo nas artérias femorais, os animais foram submetidos a arterialização venosa no membro posterior esquerdo e a manutenção da isquemia no direito. As variáveis foram analisadas separadamente durante momentos 0, 2, 3, 4 e 6 horas após a reperfusão para efeito de comparação entre si e com o grupo controle. **Resultados:** A análise das variáveis mostrou, em ambos os procedimentos, queda de BE e pO₂, com elevação significativa de lactato e CK em relação ao grupo controle. Nos membros isquêmicos arterializados, encontramos fluxo ao Doppler e maiores pressões arteriais e temperaturas quando comparadas ao membro em isquemia. **Conclusões:** A análise comparativa das extremidades em isquemia e isquemia arterializada mostrou, em relação ao grupo controle, um quadro de acidose metabólica, com significativo aumento de lactato e CK, que sugerem dano celular e sinais de reperfusão retrógrada nas extremidades arterializadas.

Palavras-chave: arterialização venosa; isquemia; reperfusão.

Abstract

Background: There are few options for treating critical ischemia in limbs with no distal patency. Diverting flow through the venous circulation is an option supported by evidence from numerous published studies. **Objectives:** To compare the behavior of clinical and laboratory variables between the hind limbs of pigs subjected to ischemia and to ischemia with reperfusion by retrograde circulation and between these intervention groups and a control group. **Methods:** Ten pigs were divided into 2 groups. In group 1 (n=5), controls, patterns of physiological variables such as flow according to Doppler ultrasound, temperature, blood gas analysis results, lactate, creatine kinase, and blood pressure were evaluated. In group 2 (n=5), after an initial ischemia period with mean duration of 27 minutes and 30 seconds, provoked by interrupting flow through the femoral arteries, the animals were subjected to venous arterialization of the left hind limb while the right hind limb was maintained in ischemia. Variables were analyzed separately for each hind leg at 0, 2, 3, 4, and 6 hours after reperfusion and compared against each other and the control group. **Results:** Analysis of variables from both procedures showed decreases in BE and PO₂ and significant increases in lactate and creatine kinase, in relation to the control group. In arterialized ischemic limbs, we observed flow on Doppler ultrasound, and arterial pressures and temperatures were higher than in the ischemic limbs. **Conclusions:** Comparative analysis of the extremities in ischemia and arterialized ischemia showed, in relation to the control group, metabolic acidosis with significant increases in lactate and creatine kinase, suggesting cellular damage, and there were signs of retrograde reperfusion in arterialized extremities.

Keywords: venous arterialization; ischemia; reperfusion.

¹Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPC, Departamento de Medicina, Ponta Grossa, PR, Brasil.

Fonte de financiamento: Nenhuma.

Conflito de interesse: Os autores declaram não haver conflitos de interesse que precisam ser informados.

Submetido em: Novembro 07, 2016. Aceito em: Maio 11, 2017.

O estudo foi realizado no Laboratório de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental, Faculdade de Medicina, Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), Ponta Grossa, PR, Brasil.

■ INTRODUÇÃO

Em isquemia crítica sem leito arterial distal, não é possível derivar o sangue para uma extremidade arterial pérvia distal à obstrução. Desviar o fluxo de maneira retrógrada através da circulação venosa é uma alternativa viável amparada em evidências de inúmeros trabalhos publicados¹⁻¹³. Esse conceito baseia-se na teoria de que, na ausência de pressão arterial primária nas arteríolas, o sangue fornecido utilizando o sistema venoso distal por meio da arterialização é capaz de suprir os tecidos periféricos e fornecer oxigenação adequada^{3-5,13}.

Diversas variáveis têm sido utilizadas para a avaliação de hipóxia tecidual em modelos animais, como avaliação do fluxo arterial através de aparelho Doppler^{14,15}, aferição da temperatura¹⁶, gasometria¹⁷, dosagem de lactato¹⁸, creatinoquinase (CK)¹⁹ e medidas de pressão arterial de extremidade²⁰. O objetivo deste trabalho é comparar, o comportamento dessas variáveis clínicas e laboratoriais em extremidades de suínos, submetidas a isquemia e, a reperfusão por circulação retrógrada entre si e em relação a um grupo controle.

■ MÉTODOS

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEUA 009/2013) e realizado no Laboratório de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental, Faculdade de Medicina, Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). Foram utilizados 10 suínos cruzados Large White-Landrace, divididos em dois grupos. No grupo 1 (n=5), controle, foi realizada avaliação dos padrões fisiológicos de qualidade de fluxo arterial pelo aparelho Doppler, temperatura, gasometria arterial (pH, excesso de base, bicarbonato, pressão parcial de oxigênio e pressão parcial de dióxido de carbono), lactato, CK e pressão arterial em extremidades posteriores, através de dissecação arterial femoral. As determinações foram realizadas em animais destinados à aula prática de Técnica Operatória antes dos procedimentos cirúrgicos.

No grupo 2 (n=5), com intervenção, as variáveis pesquisadas no grupo 1 foram determinadas em membro posterior esquerdo isquêmico arterializado e em membro isquêmico no direito.

Os animais de ambos os grupos receberam medicação pré-anestésica com ketamina (14 mg/kg), xilazina (0,2 mg/kg) e acepromazina (0,4 mg/kg). Foram induzidos à anestesia com propofol (5 mg/kg) e mantidos em anestesia inalatória com isoflurano em concentração alveolar mínima de 1,2 a 1,7%.

Em todos os membros posteriores estudados, foram realizadas disseções de artérias e veias femorais

comuns. Os vasos dos membros controle (grupo 1) foram utilizados somente como fonte de coleta. Nos membros dos animais do grupo 2, as veias foram utilizadas para coleta de sangue por punção direta e, através de arteriotomias, as extremidades distais e proximais das artérias femorais comuns foram canalizadas com cateter intravascular nº 14, (cateter intravenoso ESCALPE sem ponta de entrada, com parede de Teflon Esterilizado por Óxido de Etileno; SOLIDOR®), ligadas e ocluídas, iniciando-se a medida do tempo de isquemia.

Nos membros isquêmicos arterializados, a veia safena externa (parva) foi dissecada. Após anticoagulação sistêmica com 5.000 UI de heparina, realizou-se ligadura proximal, venotomia e rotura das válvulas a jusante com auxílio de valvulótomo de Lengua. Dilatação distal com soro heparinizado através de sonda nº 4. Canalização e fixação com cateter intravascular nº 14 (SOLIDOR®). Procedeu-se à conexão das extremidades proximais das artérias femorais comum com as veias safenas utilizando-se um cateter de silicone (EXTENSOR para Cateter Reversível Luer Lock 20 cm, 2 conectores macho – 10F; HARTMANN®), iniciando-se a contagem do tempo de arterialização T0.

Após o término dos procedimentos cirúrgicos e durante os tempos 0, 2, 4 e 6 horas de reperfusão, respectivamente momentos T0, T1, T3 e T4 (Figura 1), ao longo da investigação, realizou-se pesquisa da presença de fluxo sanguíneo nas extremidades com auxílio de um aparelho Doppler portátil (Doppler Vascular DV 600; Martec®) e aferição da temperatura com termômetro infravermelho (termômetro infravermelho Sem Contato FR1DZ1; G-TECH®). O fluxo sanguíneo foi avaliado na artéria safena, em cada membro. As aferições de temperatura foram realizadas, em três tempos, em um ponto fixo no espaço interdigital na região plantar e, na região dorsal, em três pontos distantes um do outro cerca de 3 cm ao longo da extremidade de cada membro. A distância entre o termômetro e a pele foi de aproximadamente 3 a 5 cm.

Nos tempos 0, 3 e 6 horas de reperfusão, respectivamente momentos T0, T2 e T4 (Figura 1), colheram-se, com seringas heparinizadas de 3 mL, amostras de sangue para gasometria, através dos cateteres das extremidades distais das arteriotomias (femoral superficial); por punção direta das femorais, colheu-se sangue venoso para dosagem de lactato e CK; e, utilizando-se régua e equipo em coluna de soro fisiológico, determinaram-se as pressões nas extremidades arteriais distais (femoral superficial) e proximais (femoral comum).

Procedeu-se à administração de 5.000 UI de heparina a cada 3 horas durante o transcorrer da pesquisa.

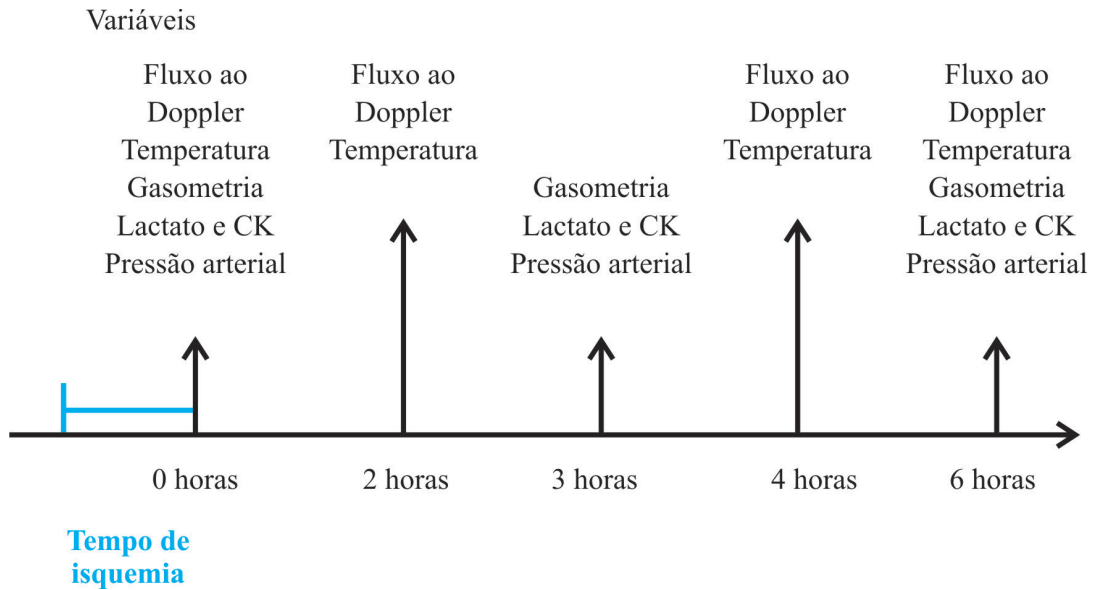


Figura 1. Determinação das variáveis estudadas nos membros isquêmicos e isquêmicos arterializados ao longo do tempo da pesquisa.

Ao final dos procedimentos, os animais do grupo 2 foram submetidos a eutanásia conforme resolução 1000/2012 do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV).

Análise estatística

Os resultados foram submetidos a análise quanto à distribuição de normalidade de acordo com o teste de Anderson Darling. O teste qui-quadrado com correção de Yates foi utilizado para variáveis qualitativas, e o teste *t* de Student para variáveis quantitativas, sendo estatisticamente significativo $p < 0,05$.

RESULTADOS

As variáveis pesquisadas em membros isquêmicos arterializados, com tempo médio de isquemia de 27 minutos e 30 segundos, foram comparadas às determinadas em membros isquêmicos e do grupo controle.

Fluxo arterial

A pesquisa de fluxo arterial ao Doppler nos membros isquêmicos arterializados mostrou, em T0, ausência de fluxo em um membro, padrão venoso pulsátil em três e pulsátil arterial em um; em T1, os quatro membros com fluxo apresentavam padrão venoso pulsátil; em T3, observou-se padrão pulsátil arterial em um e venoso pulsátil em três; em T4, três membros apresentavam padrão pulsátil venoso

e dois, ausência de fluxo. Os membros isquêmicos apresentaram ausência de fluxo ao longo da pesquisa.

Foram considerados para estudo apenas os dados referentes aos membros isquêmicos arterializados dos animais que apresentavam fluxo ao Doppler no momento da coleta ou da determinação: quatro animais até o momento T3 e três animais no momento T4.

Temperatura

Embora não tenha havido controle ambiental, as médias de variação da temperatura, nas extremidades estudadas, apresentaram curvas semelhantes, com médias significativamente inferiores às obtidas no grupo controle ao longo do tempo (Tabela 1). Quando comparadas entre si, as médias das temperaturas dos membros isquêmicos arterializados apresentavam uma diferença não significativa ($p=0,55$) de 2,25 °C a mais que as dos os membros isquêmicos no momento T4 (Tabela 2).

Gasometria

O pH dos membros isquêmicos arterializados e em isquemia partiu de níveis levemente superiores aos do grupo controle e apresentou curvas semelhantes, com queda não significativa em T2, um pouco mais acentuada do que em T4 (Tabelas 3, 4 e 5). Quando comparados entre si, não apresentaram significância (Tabelas 6, 7 e 8).

Tabela 1. Comparação da temperatura de membros arterializados e em isquemia em relação ao grupo controle nos diferentes momentos.

Temperatura (momentos)	Arterialização	Controle	P	Isquemia	Controle	P
	Média (desvio padrão)	Média (desvio padrão)		Média (desvio padrão)	Média (desvio padrão)	
T0	29,81 (3,77)	35,65 (0,55)	0,01	30,37 (3,97)	35,65 (0,55)	0,02
T1	26,34 (4,46)	35,65 (0,55)	0,002	26,32 (3,45)	35,65 (0,55)	0,0005
T3	24,77 (2,62)	35,65 (0,55)	0,0001	24,70 (2,35)	35,65 (0,55)	0,0001
T4	26,74 (5,67)	35,65 (0,55)	0,010	24,49 (2,20)	35,65 (0,55)	0,0001

Teste t de Student.

Tabela 2. Comparação da temperatura de membros isquêmicos arterializados e em isquemia nos diferentes momentos.

Temperatura (momentos)	Arterialização	Isquemia	p
	Média (desvio padrão)	Média (desvio padrão)	
T0	29,81 (3,77)	30,37 (3,97)	0,84
T1	26,34 (4,46)	26,32 (3,45)	0,99
T3	24,77 (2,62)	24,70 (2,35)	0,97
T4	26,74 (5,67)	24,49 (2,20)	0,55

Teste t de Student.

Tabela 3. Comparação das variáveis bioquímicas e de pressão arterial em membros arterializados e em isquemia em relação ao grupo controle no momento T0.

Variáveis	Arterialização	Controle	P	Isquemia	Controle	P
	Média (desvio padrão)	Média (desvio padrão)		Média (desvio padrão)	Média (desvio padrão)	
pH	7,32 (0,11)	7,30 (0,15)	0,83	7,31 (0,12)	7,30 (0,15)	0,92
BE	2,68 (1,02)	2,38 (2,47)	0,83	2,18 (1,38)	2,38 (2,47)	0,89
HCO ₃ ⁻	29,45 (1,77)	30,62 (4,17)	0,62	29,15 (2,29)	30,62 (4,17)	0,55
pO ₂	166,33 (61,91)	298,10 (128,32)	0,10	158,93 (58,34)	298,10 (128,32)	0,09
pCO ₂	60,75 (16,19)	68,82 (34,49)	0,68	60,60 (17,63)	68,82 (34,49)	0,68
Lactato	18,55 (2,99)	17,14 (6,96)	0,72	21,20 (10,28)	17,14 (6,96)	0,50
CK	1.647,50 (590,89)	940,00 (364,18)	0,06	1.612,50 (563,68)	940,00 (364,18)	0,07
Pressão arterial	55,75 (15,76)	35,86 (22,86)	0,18	47,50 (22,49)	35,86 (22,86)	0,47

Tabela 4. Comparação das variáveis bioquímicas e de pressão arterial em membros arterializados e em isquemia em relação ao grupo controle no momento T2.

Variáveis	Arterialização	Controle	P	Isquemia	Controle	P
	Média (desvio padrão)	Média (desvio padrão)		Média (desvio padrão)	Média (desvio padrão)	
pH	7,26 (0,08)	7,30 (0,15)	0,65	7,25 (0,06)	7,30 (0,15)	0,55
BE	1,13 (1,97)	2,38 (2,47)	0,44	0,68 (1,41)	2,38 (2,47)	0,26
HCO ₃ ⁻	29,30 (1,47)	30,62 (4,17)	0,57	29,08 (1,28)	30,62 (4,17)	0,50
pO ₂	143,65 (89,98)	298,10 (128,32)	0,08	167,53 (143,26)	298,10 (128,32)	0,19
pCO ₂	57,80 (23,85)	68,82 (34,49)	0,61	68,40 (11,02)	68,82 (34,49)	0,98
Lactato	40,30 (19,38)	17,14 (6,96)	0,04	36,10 (21,17)	17,14 (6,96)	0,10
CK	1.747,00 (556,34)	940,00 (364,18)	0,03	1.704,25 (554,79)	940,00 (364,18)	0,04
Pressão arterial	42,63 (19,61)	35,86 (22,86)	0,65	37,75 (15,76)	35,86 (22,86)	0,89

Teste t de Student.

Tabela 5. Comparação das variáveis bioquímicas e de pressão arterial em membros arterializados e em isquemia em relação ao grupo controle no momento T4.

Variáveis	Arterialização	Controle	P	Isquemia	Controle	P
	Média (desvio padrão)	Média (desvio padrão)		Média (desvio padrão)	Média (desvio padrão)	
pH	7,21 (0,12)	7,30 (0,15)	0,41	7,20 (0,09)	7,30 (0,15)	0,34
BE	-0,50 (3,58)	2,38 (2,47)	0,41	1,07 (2,72)	2,38 (2,47)	0,11
HCO ₃ ⁻	29,07 (1,61)	30,62 (4,17)	0,57	27,87 (2,48)	30,62 (4,17)	0,35
pO ₂	95,83 (13,82)	298,10 (128,32)	0,04	94,67 (3,89)	298,10 (128,32)	0,04
pCO ₂	76,23 (21,75)	68,82 (34,49)	0,75	71,87 (15,09)	68,82 (34,49)	0,89
Lactato	61,93 (19,70)	17,14 (6,96)	0,003	55,33 (19,15)	17,14 (6,96)	0,006
CK	2.020,67 (621,81)	940,00 (364,18)	0,02	1.879,33 (425,96)	940,00 (364,18)	0,02
Pressão arterial	33,17 (19,20)	35,86 (22,86)	0,87	36,67 (13,58)	35,86 (22,86)	0,96

Teste t de Student.

Tabela 6. Comparação das variáveis bioquímicas e de pressão arterial de membros isquêmicos arterializados e em isquemia no momento T0.

Variáveis	Arterialização	Isquemia	P
	Média (desvio padrão)	Média (desvio padrão)	
pH	7,32 (0,11)	7,31 (0,12)	0,91
BE	2,68 (1,02)	2,18 (1,38)	0,58
HCO ₃ ⁻	29,45 (1,77)	29,15 (2,29)	0,84
pO ₂	166,33 (61,91)	158,93 (58,34)	0,87
pCO ₂	60,75 (16,19)	60,60 (17,63)	0,99
Lactato	18,55 (2,99)	21,20 (10,28)	0,64
CK	1.647,50 (590,89)	1.612,50 (563,68)	0,93
Pressão arterial	55,75 (15,76)	47,50 (22,49)	0,57

Teste t de Student.

Tabela 7. Comparação das variáveis bioquímicas e de pressão arterial de membros isquêmicos arterializados e em isquemia no momento T2.

Variáveis	Arterialização	Isquemia	P
	Média (desvio padrão)	Média (desvio padrão)	
pH	7,26 (0,08)	7,25 (0,06)	0,85
BE	1,13 (1,97)	0,68 (1,41)	0,72
HCO ₃ ⁻	29,30 (1,47)	29,08 (1,28)	0,83
pO ₂	143,65 (89,98)	167,53 (143,26)	0,79
pCO ₂	57,80 (23,85)	68,40 (11,02)	0,45
Lactato	40,30 (19,38)	36,10 (21,17)	0,78
CK	1.747,00 (556,34)	1.704,25 (554,79)	0,92
Pressão arterial	42,63 (19,61)	37,75 (15,76)	0,71

Teste t de Student.

Tabela 8. Comparação das variáveis bioquímicas e de pressão arterial de membros isquêmicos arterializados e em isquemia no momento T4.

Variáveis	Arterialização	Isquemia	P
	Média (desvio padrão)	Média (desvio padrão)	
pH	7,21 (0,12)	7,20 (0,09)	0,91
BE	0,50 (3,58)	1,07 (2,72)	0,58
HCO ₃ ⁻	29,07 (1,61)	27,87 (2,48)	0,52
pO ₂	95,83 (13,82)	94,67 (3,89)	0,89
pCO ₂	76,23 (21,75)	71,87 (15,09)	0,79
Lactato	61,93 (19,70)	55,33 (19,15)	0,70
CK	2.020,67 (621,81)	1.879,33 (425,96)	0,76
Pressão arterial	33,17 (19,20)	36,67 (13,58)	0,81

Teste t de Student.

Excesso de base

Tanto os membros isquêmicos arterializados quanto aqueles em isquemia apresentaram uma queda progressiva do excesso de base (BE) em relação ao grupo controle, mais acentuada naqueles em isquemia (Tabelas 3, 4 e 5). Quando comparados entre si apresentavam uma diferença não significativa ($p=0,58$) de 1,57 em T4 (Tabelas 6, 7 e 8).

Concentração de bicarbonato

Tanto os membros isquêmicos arterializados quanto aqueles em isquemia apresentaram uma queda progressiva da concentração de bicarbonato (HCO_3^-), mais acentuada em isquemia, especialmente no momento T4 (Tabelas 3, 4 e 5), mas sem significância tanto em relação ao grupo controle quanto entre si (Tabelas 6, 7 e 8).

Pressão parcial de oxigênio

As pressões parciais de oxigênio (pO_2) nos membros isquêmicos arterializados e em isquemia partiram de níveis menores que os do grupo controle e apresentaram curvas semelhantes, com quedas significativas em T4 (Tabelas 3, 4 e 5). Comparadas entre si, não apresentaram significância (Tabelas 6, 7 e 8).

Pressão parcial de dióxido de carbono

As pressões parciais de dióxido de carbono (pCO_2) mostraram valores semelhantes e inferiores ao grupo controle no momento T0 com aumento progressivo da média dos membros em isquemia e leve queda na média daqueles em isquemia com arterialização em T2. Embora as médias de ambos os grupos tenham mostrado aumento em T4, esse aumento foi maior no grupo isquemia com arterialização (Tabelas 3, 4 e 5). Comparadas entre si, as médias não apresentaram significância (Tabelas 6, 7 e 8).

Lactato

As médias dos valores de lactato partiram de nível próximo ao do grupo controle e apresentaram curvas semelhantes, com aumento progressivo em T2, significativo para membros isquêmicos arterializados, e mais acentuado e significativo tanto para arterialização quanto para isquemia no momento T4 (Tabelas 3, 4 e 5). Comparadas entre si, as médias não apresentaram significância (Tabelas 6, 7 e 8).

Creatinoquinase

As médias dos valores de CK partiram de níveis superiores aos do grupo controle, mostrando aumento significativo tanto para membros isquêmicos arterializados

quanto para isquemia em T2 e T4 (Tabelas 3, 4 e 5). No entanto, as médias não apresentaram significância entre si (Tabelas 6, 7 e 8).

Pressão arterial

Para efeito de cálculo, foram consideradas as razões de pressões arteriais distais pelas proximais. Nos membros isquêmicos arterializados, a média dessas razões partiu de nível superior ao do grupo controle e ao dos membros em isquemia. As médias de ambos os grupos com intervenção apresentaram queda em T2, embora os membros isquêmicos arterializados tenham permanecido em nível mais elevado. Em T4, as médias se aproximaram às do grupo controle (Tabelas 3, 4 e 5) e não apresentaram diferença significativa entre si (Tabelas 6, 7 e 8).

As curvas de valor absoluto das pressões distais apresentaram padrão semelhante às razões, igualmente sem significância.

DISCUSSÃO

Não existem trabalhos experimentais de isquemia e reperfusão (I/R) por arterialização venosa que tenham testado as variáveis estudadas em animais. Nosso modelo produz uma isquemia aguda diferente da crônica, em que o tempo em isquemia sem necrose pode levar à produção de estímulos para arteriogênese.

Embora os procedimentos tenham sido realizados no mesmo animal, em ambos os membros posteriores, as variáveis estudadas foram determinadas separadamente. A utilização do membro contralateral é frequente em estudos de isquemia unilateral^{21,22}, pois permite que as medidas sejam realizadas sobre o mesmo substrato, embora não se possa afastar totalmente a interferência de um membro sobre o contralateral. O modelo experimental utilizado no presente estudo reproduz situações de isquemia e reperfusão por arterialização venosa com passagem retrógrada do fluxo venoso arterializado com maior pressão (arterial proximal) para o leito arterial de menor pressão (artéria distal)¹³.

Foram desprezados os valores determinados no membro isquêmico arterializado quando não havia fluxo ao Doppler na extremidade.

A presença de fluxo ao Doppler mostrou padrão pulsátil arterial e venoso pulsátil, este também encontrado em fistulas arteriovenosas²³.

Sasajima et al., em estudo de arterialização venosa profunda em camundongos, mostraram que a rotura das válvulas ao nível de veia femoral era acompanhada de aumento de temperatura cutânea em região coxofemoral e articulação do joelho. Mostraram ainda que a hipertermia em extremidade distal só ocorria quando as válvulas de veia poplítea eram rompidas¹⁰.

O aumento da temperatura média dos membros isquêmicos arterializados, observado a partir do momento T3, sugere perviedade do sistema e corrobora a utilidade da valvulotomia na veia arterializada.

Durante a reperfusão, o edema tecidual acaba se instalando com potencial agravante da injúria tecidual e da resposta sistêmica. No contexto da I/R, alterações locais e sistêmicas se desenvolvem em diversos sistemas: endotelial, sanguíneo, metabólico, ácido-base, etc.²⁰.

Szokoly et al. demonstraram, em ratos submetidos a I/R de membros posteriores, uma queda contínua e significativa do pH venoso comparado ao basal na primeira hora. Essa mudança foi acompanhada de alterações na $p\text{CO}_2$ e na $p\text{O}_2$, que apresentaram sinais moderados de compensação respiratória²⁰.

Mondek et al. mostraram um estudo piloto em que o grau máximo de acidose ocorreu 2 horas após o início da reperfusão em membro isquêmico devido a clameamento vascular. A amostra de sangue foi colhida na veia femoral ipsilateral²⁴.

Achados deste estudo mostram um quadro de acidose metabólica, com queda no valor de BE e pouca alteração em HCO_3^- . A queda de BE sugere tamponamento, o que permite certa estabilidade nos valores do pH. As variações na $p\text{CO}_2$ e $p\text{O}_2$ foram inespecíficas, apresentando queda significativa da $p\text{O}_2$ em ambos os membros acompanhada de aumento da $p\text{CO}_2$ ao final do experimento. Esses achados são compatíveis com outros estudos sobre I/R^{20,25}.

Os trabalhos de Szokoly et al. e Mondek et al. avaliaram o pH na veia coletora do membro, visto que a reperfusão se deu por via arterial^{20,24}. Em nossa pesquisa, determinamos a gasometria na extremidade distal da artéria femoral, uma vez que a reperfusão se deu por via venosa, e nossa intenção foi avaliar o fluxo retrógrado.

Sako et al., durante cirurgia de aneurisma de aorta abdominal que envolve I/R de extremidades, evidenciaram aumento transitório de lactato e redução de pH em veias ilíacas pós-reperfusão²⁶.

Theodoraki et al., em estudo sobre gradiente trans-hepático de lactato durante I/R em hepatectomias, encontraram aumento na produção de lactato hepático, observado 50 minutos após a reperfusão. Mostraram ainda correlação positiva entre os níveis de lactato intraoperatório sistêmico e o gradiente trans-hepático de lactato, sugerindo uma significativa contribuição da reperfusão hepática ao estado de hiperlactatemia sistêmica²⁷.

As médias de valores de lactato encontradas neste estudo partiram de nível semelhante ao do grupo controle e apresentaram curvas semelhantes, com aumento progressivo significativo e mais acentuado nos membros isquêmicos arterializados, nos quais

ocorreu reperfusão por via retrógrada (fluxo presente ao Doppler).

Woodruff et al., em estudo para avaliar a capacidade de um fármaco contra a injúria provocada pela isquemia e subsequente reperfusão (I/R), demonstraram a elevação de CK no grupo submetido a I/R, o que não foi observado no grupo submetido somente a isquemia²⁸. Isso pode sugerir que a base patogênica para a elevação do marcador de injúria muscular seria a reperfusão após isquemia.

Nesta pesquisa, os valores de CK apresentaram comportamento semelhante ao do lactato, mostrando aumentos significativos em T2 e ainda mais acentuados em T4, especialmente nos membros isquêmicos arterializados.

Szokoly et al., ao estudar I/R em membros posteriores de camundongos, encontrou queda da pressão arterial média em torno de 20% após a reperfusão. Possíveis eventos compensatórios paralelos ao procedimento ou, até mesmo, à vasodilatação devido à reperfusão do membro podem explicar a queda dos valores de pressão²⁰.

A média das razões de pressões arteriais dos membros isquêmicos arterializados partiu de nível superior ao do grupo controle e dos membros em isquemia. As médias de ambos os grupos com intervenção apresentaram queda em T2, embora os isquêmicos arterializados tenham permanecido em nível mais elevado. Em T4, as médias se aproximaram às do grupo controle. A curva de queda da pressão arterial distal foi semelhante à curva das razões entre a pressão arterial distal e proximal, o que não sugere a interferência da pressão arterial proximal nos valores encontrados.

CONCLUSÃO

Os achados desta pesquisa são compatíveis com quadros de acidose metabólica, com significativo aumento de CK e lactato, sugerindo dano celular em ambas as extremidades e sinais de reperfusão retrógrada, devido à manutenção da presença do fluxo ao Doppler nos membros isquêmicos arterializados.

REFERÊNCIAS

- Alexandrescu V, Ngongang C, Vincent G, Ledent G, Hubermont G. Deep calf veins arterialization for inferior limb preservation in diabetic patients with extended ischaemic wounds, unfit for direct arterial reconstruction: preliminary results according to an angiosome model of perfusion. *Cardiovasc Revasc Med.* 2011;12(1):10-9. PMID:21241966. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carrev.2009.12.002>.
- Djoric P. Early individual experience with distal venous arterialization as a lower limb salvage procedure. *Am Surg.* 2011;77(6):726-30. PMID:21679641.

3. Busato CR, Utrabo CA, Gomes RZ, et al. Utilização da safena magna in situ para arterialização do arco venoso do pé. *J Vasc Bras.* 2010;9(3):119-23. <http://dx.doi.org/10.1590/S1677-54492010000300004>.
4. Taylor RS, Belli AM, Jacob S. Distal venous arterialization for salvage of critically ischaemic inoperable limbs. *Lancet.* 1999;354(9194):1962-5. PMID:10622299. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(99\)03164-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(99)03164-5).
5. Mutirangura P, Ruangsetakit C, Wongwanit C, Sermsathanasawadi N, Chinsakchai K. Pedal bypass with deep venous arterialization: the therapeutic option in critical limb ischemia and unreconstructable distal arteries. *Vascular.* 2011;19(6):313-9. PMID:22008976. <http://dx.doi.org/10.1258/vasc.2010.0a0278>.
6. Lengua F, Madrid A, Acosta C, Vargas J. Arterialización venosa temporal del pie diabético. *J Vasc Bras.* 2010;9(1):14-20. <http://dx.doi.org/10.1590/S1677-544920100005000007>.
7. Lu XW, Idu MM, Ubbink DT, Legemate DA. Meta-analysis of the clinical effectiveness of venous arterialization for salvage of critically ischaemic limbs. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2006;31(5):493-9. PMID:16488164. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejvs.2005.12.017>.
8. Özbek C, Kestelli M, Emrecan B, et al. A novel approach: ascending venous arterialization for atherosclerosis obliterans. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2005;29(1):47-51. PMID:15570271. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejvs.2004.09.027>.
9. Schreve MA, Minnee RC, Bosma J, Leijdekkers VJ, Idu MM, Vahl AC. Comparative study of venous arterialization and pedal bypass in a patient cohort with critical limb ischemia. *Ann Vasc Surg.* 2014;28(5):1123-7. PMID:24189192. <http://dx.doi.org/10.1016/j.avsg.2013.08.010>.
10. Sasajima T, Kikuchi S, Ishikawa N, Koyama T. Skin temperature in lower hind limb subjected to distal vein arterialization in rats. *Adv Exp Med Biol.* 2014;812:361-8. PMID:24729255. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-0620-8_48.
11. Houliind K, Christensen J, Hallenberg C, Jepsen JM. Early results from an angiome-directed open surgical technique for venous arterialization in patients with critical lower limb ischemia. *Diabet Foot Ankle.* 2013;4(1):22713. PMID:24358432. <http://dx.doi.org/10.3402/dfa.v4i0.22713>.
12. Ozbek C, Kestelli M, Bozok S, et al. Surgical stimulation of angiogenesis. *Asian Cardiovasc Thorac Ann.* 2014;22(1):36-9. PMID:24585641. <http://dx.doi.org/10.1177/0218492312468285>.
13. Busato CR, Utrabo CA, Lipinski LC, et al. Experimental model for the study of retrograde flow. *J Vasc Bras.* 2016;15(2):93-8. <http://dx.doi.org/10.1590/S1677-5449.008915>.
14. Bordinhão A. Comparação entre a Dopplermetria e o fluxo livre da artéria torácica interna de cães com e sem o uso de noradrenalina. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 2013;28:224-30. PMID:23939319.
15. Poerschke RA, Silveira DA, Lodi P, Tilton W, Marx G, Lampert AS. Temporary vascularization on ischemic limbs through arterial-medullary shunt: an experimental work. *J Vasc Bras.* 2012;11:29-33. <http://dx.doi.org/10.1590/S1677-54492012000100006>.
16. Brioschi ML, Mehl A, Oliveira AG, et al. Exame de termometria cutânea infravermelha na avaliação do pé diabético. *Rev Méd Paraná.* 2007;65:33-41.
17. Hurtado Rojas P, Alves Tannous L, Von Bahten LC, Castro Villegas F, Gasparetto J. Análise da gasometria e dos níveis de lactato na hipertensão intra-abdominal associada à sepse abdominal: Modelo experimental em ratos. *Panamerican J Trauma.* 2013;2:49-51. <http://dx.doi.org/10.5005/jp-journals-10030-1057>.
18. Nagy O, Seidel H, Paulíková I, Mudron P, Kováč G. Use of blood gases and lactic acid analyses in diagnosis and prognosis of respiratory diseases in calves. *Bull Vet Inst Pulawy.* 2006;50:149-52.
19. Currie IS, Wakelin SJ, Lee AJ, Chalmers RT. Plasma creatine kinase indicates major amputation or limb preservation in acute lower limb ischemia. *J Vasc Surg.* 2007;45(4):733-9. PMID:17398384. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jvs.2006.12.050>.
20. Szokoly M, Nemeth N, Hamar J, Furka I, Miko I. Early systemic effects of hind limb ischemia-reperfusion on hemodynamics and acid-base balance in the rat. *Microsurgery.* 2006;26(8):585-9. PMID:17066412. <http://dx.doi.org/10.1002/micr.20291>.
21. Thaveau F, Zoll J, Bouitbir J, et al. Contralateral leg as a control during skeletal muscle ischemia-reperfusion. *J Surg Res.* 2009;155(1):65-9. PMID:19159910. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jss.2008.08.001>.
22. Mansour Z, Bouitbir J, Charles AL, et al. Remote and local ischemic preconditioning equivalently protects rat skeletal muscle mitochondrial function during experimental aortic cross-clamping. *J Vasc Surg.* 2012;55(2):497-505.e1. PMID:22056287. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jvs.2011.07.084>.
23. Barros FS, Pontes SM, Silva WP, Prezotti BB, Sandri JL. Identificação pelo Doppler colorido de fístula arteriovenosa na trombose venosa profunda. *J Vasc Bras.* 2006;5:224-8. <http://dx.doi.org/10.1590/S1677-54492006000300012>.
24. Mondek P, Sefranek V, Tomka J, et al. Regional biochemical and hematologic changes in patients after revascularization of the lower extremities in ischemia of the extremities. *Rozhl Chir.* 2002;81(5):265-70. PMID:12046433.
25. Tejchman K, Domanski L, Sienko J, et al. Early acid-base balance disorders during kidney transplantation. *Trans Proc.* 2006;38(1):123-6. PMID:16504681. <http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2006.01.024>.
26. Sako H, Hadama T, Miyamoto S, et al. Limb ischemia and reperfusion during abdominal aortic aneurysm surgery. *Surg Today.* 2004;34(10):832-6. PMID:15449152. <http://dx.doi.org/10.1007/s00595-004-2829-y>.
27. Theodoraki K, Arkadopoulos N, Fragulidis G, et al. Transhepatic lactate gradient in relation to liver ischemia/reperfusion injury during major hepatectomies. *Liver Transpl.* 2006;12(12):1825-31. PMID:17031827. <http://dx.doi.org/10.1002/lt.20911>.
28. Woodruff TM, Arumugam TV, Shiels IA, Reid RC, Fairlie DP, Taylor SM. Protective effects of potent C5a receptor antagonist on experimental acute limb ischemia-reperfusion in rats. *J Surg Res.* 2004;116(1):81-90. PMID:14732352. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jss.2003.04.001>.

Correspondência

Cesar Roberto Busato
 Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG, Departamento de
 Medicina
 Rua Saldanha da Gama, 425 - Orfãs
 CEP 84015-130 - Ponta Grossa (PR) - Brasil
 Tel.: (42) 9902-3534 / (42) 3028-4245
 E-mail: crbusato@gmail.com

Informações sobre os autores

CRB - PhD em Princípios da Cirurgia pela Universidade Federal do
 Paraná (UFPR).
 CALU - Mestre em Princípios da Cirurgia pela Faculdade Evangélica
 do Paraná (FEPAR).
 LCL - PhD em Cirurgia Veterinária pela Universidade Federal de São
 Paulo (UNIFESP).
 KDL, MDGF, NBM, SBF e WJ - Estudantes de Medicina, Universidade
 Estadual de Ponta Grossa (UEPG).

Contribuições dos autores

Concepção e desenho do estudo: CRB, LCL
 Análise e interpretação dos dados: CRB, MDGF
 Coleta de dados: CRB, CALU, LCL, KDL, MDGF, NBM, SBF, WJ
 Redação do artigo: CRB, MDGF
 Revisão crítica do texto: CRB
 Aprovação final do artigo*: CRB, CALU, LCL, KDL, MDGF, NBM, SBF,
 WJ
 Análise estatística: MDGF
 Responsabilidade geral do estudo: CRB, CALU

*Todos os autores leram e aprovaram a versão final submetida ao
 J Vasc Bras.

Ischemia and reperfusion by retrograde flow: experimental comparative study

Isquemia e reperfusão por circulação retrógrada: estudo comparativo experimental

Cesar Roberto Busato¹, Carlos Alberto Lima Utrabo¹, Leandro Cavalcante Lipinski¹, Keizi Dayane de Lima¹, Márcio Dias Guilherme Filho¹, Nicolas Brandalize Medeiros¹, Samela Basi Fagundes¹, Willman Josviak¹

Abstract

Background: There are few options for treating critical ischemia in limbs with no distal patency. Diverting flow through the venous circulation is an option supported by evidence from numerous published studies. **Objectives:** To compare the behavior of clinical and laboratory variables between the hind limbs of pigs subjected to ischemia and to ischemia with reperfusion by retrograde circulation and between these intervention groups and a control group. **Methods:** Ten pigs were divided into 2 groups. In group 1 (n=5), controls, patterns of physiological variables such as flow according to Doppler ultrasound, temperature, blood gas analysis results, lactate, creatine kinase, and blood pressure were evaluated. In group 2 (n=5), after an initial ischemia period with mean duration of 27 minutes and 30 seconds, provoked by interrupting flow through the femoral arteries, the animals were subjected to venous arterialization of the left hind limb while the right hind limb was maintained in ischemia. Variables were analyzed separately for each hind leg at 0, 2, 3, 4, and 6 hours after reperfusion and compared against each other and the control group. **Results:** Analysis of variables from both procedures showed decreases in BE and PO₂ and significant increases in lactate and creatine kinase, in relation to the control group. In arterialized ischemic limbs, we observed flow on Doppler ultrasound, and arterial pressures and temperatures were higher than in the ischemic limbs. **Conclusions:** Comparative analysis of the extremities in ischemia and arterialized ischemia showed, in relation to the control group, metabolic acidosis with significant increases in lactate and creatine kinase, suggesting cellular damage, and there were signs of retrograde reperfusion in arterialized extremities.

Keywords: venous arterialization; ischemia; reperfusion.

Resumo

Contexto: Isquemia crítica de membro inferior sem leito distal tem opções restritas para tratamento. Desviar o fluxo de maneira retrógrada através da circulação venosa é alternativa amparada em evidências de inúmeros trabalhos publicados. **Objetivos:** Comparar o comportamento de variáveis clínicas e laboratoriais em extremidades de suínos submetidas a isquemia e a isquemia com reperfusão por circulação retrógrada entre si e em relação e a um grupo controle. **Métodos:** Dez suínos foram separados em dois grupos. No grupo 1 (n=5), controle, avaliaram-se padrões fisiológicos de variáveis como fluxo ao Doppler, temperatura, gasometria, lactato, creatinoquinase (CK) e pressão arterial. No grupo 2 (n=5), após um período médio de isquemia de 27 minutos e 30 segundos, conseqüente à interrupção do fluxo nas artérias femorais, os animais foram submetidos a arterialização venosa no membro posterior esquerdo e a manutenção da isquemia no direito. As variáveis foram analisadas separadamente durante momentos 0, 2, 3, 4 e 6 horas após a reperfusão para efeito de comparação entre si e com o grupo controle. **Resultados:** A análise das variáveis mostrou, em ambos os procedimentos, queda de BE e pO₂, com elevação significativa de lactato e CK em relação ao grupo controle. Nos membros isquêmicos arterializados, encontramos fluxo ao Doppler e maiores pressões arteriais e temperaturas quando comparadas ao membro em isquemia. **Conclusões:** A análise comparativa das extremidades em isquemia e isquemia arterializada mostrou, em relação ao grupo controle, um quadro de acidose metabólica, com significativo aumento de lactato e CK, que sugerem dano celular e sinais de reperfusão retrógrada nas extremidades arterializadas.

Palavras-chave: arterialização venosa; isquemia; reperfusão.

¹Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPC, Departamento de Medicina, Ponta Grossa, PR, Brazil.

Financial support: None.

Conflicts of interest: No conflicts of interest declared concerning the publication of this article.

Submitted: November 07, 2016. Accepted: May 11, 2017.

The study was carried out at Laboratório de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental, Faculdade de Medicina, Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), Ponta Grossa, PR, Brazil.

■ INTRODUCTION

In cases of critical ischemia in which distal arterial bed patency is lacking, it is not possible to shunt blood to an arterial extremity distal of the obstruction. Diverting flow in a retrograde direction through the venous circulation is a feasible alternative that is supported by evidence from countless published studies.¹⁻¹³ The concept is based on the theory that in the absence of primary arterial blood pressure in arterioles, blood supplied by arterialization of the distal venous system is capable of supplying the peripheral tissues and providing adequate oxygenation.^{3-5,13}

Many different variables have been used to evaluate tissue hypoxia in animal models, such as assessment of arterial flow using Doppler ultrasound (US),^{14,15} temperature measurements,¹⁶ blood gas analysis,¹⁷ lactate¹⁸ and creatine phosphokinase (CP) assays,¹⁹ and measurements of arterial blood pressure at extremities.²⁰ The objective of this study is to compare the behavior of these clinical and laboratory variables in pigs' hind limbs after induction of ischemia, with and without reperfusion via retrograde circulation, against each other and in relation to a control group.

■ METHODS

This project was approved by the Animal Research Ethics Committee (CEUA 009/2013) and conducted in the Operating Techniques and Experimental Surgery Laboratory at the Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) Medical Faculty, Brazil. Ten Large White-Landrace cross pigs were acquired and divided into two groups. In group 1 (n=5), the control group, analyses were conducted of physiological indicators of the quality of arterial flow using Doppler US, temperature, arterial blood gas analysis (pH, base excess, bicarbonate, partial oxygen pressure and partial carbon dioxide pressure), lactate, CP, and arterial blood pressure in the hind limbs, by femoral artery dissection. These analyses were all performed on animals that had been selected for use in practical Operating Technique classes before surgical procedures were conducted.

In group 2 (n=5), the intervention group, the same variables measured in group 1 were determined for the right hind limb after induction of ischemia and the left hind limb after induction of ischemia and arterialization.

The animals in both groups were premedicated with ketamine (14 mg/kg), xylazine (0.2 mg/kg), and acepromazine (0.4 mg/kg). Anesthesia was induced with propofol (5 mg/kg) and maintained with inhaled

isoflurane at a minimum alveolar concentration of 1.2 to 1.7%.

In all hind limbs studied, common femoral arteries and veins were dissected. In limbs in the control group (group 1) these vessels were only used for data collection. In the hind limbs of animals in group 2, veins were used to draw blood samples by direct puncture, while arteriotomies were performed at the distal and proximal extremities of the common femoral arteries and cannulated with number 14 intravascular catheters, (ESCALPE intravenous catheter without entry tip, with Teflon wall sterilized by ethylene oxide; SOLIDOR®), ligated, and occluded, when ischemia time measurement was initiated.

In limbs designated for arterialization after ischemia, the external (small) saphenous vein was dissected. Systemic anticoagulation was administered with 5,000 UI of heparin, followed by proximal ligation, venotomy, and rupture of downstream valves using a Lengua valvulotome, and then distal dilatation with heparinized saline via the n° 4 probe, before cannulation and fixation with the number 14 intravascular catheter (SOLIDOR®). The proximal extremities of the common femoral arteries were connected to the saphenous veins using a silicone catheter (EXTENSOR for 20 cm Luer Lock Reversible Catheter, 2 10F male connectors-; HARTMANN®), which was defined as the start of arterialization, T0.

Once the surgical procedures had been completed, at 0, 2, 4, and 6 hours of reperfusion, respectively times T0, T1, T3 and T4 (Figure 1), tests were performed to detect blood flow at the extremities with a portable Doppler US unit (DV 600 Vascular Doppler; Martec®), temperature was measured with an infrared thermometer (FR1DZ1 non-contact infrared thermometer; G-TECH®). Blood flow was tested at the saphenous artery in each limb. Temperature measurements were performed at three different times, at a fixed point in the interdigital space of the plantar region and, on the dorsal surface at three points around 3 cm apart from each other along the extremity of each limb. The distance between the thermometer and the skin was approximately 3 to 5 cm.

At 0, 3, and 6 hours of reperfusion, times T0, T2 and T4 respectively (Figure 1), heparinized syringes were used to collect 3 mL blood samples for blood gas analysis, via the catheters at the distal extremities of the arteriotomies (superficial femoral artery); and venous blood was drawn by direct puncture of the femoral vein for lactate and CP assays; and, a ruler and a saline column were used to determine blood pressure at distal (superficial femoral) and proximal (common femoral) arterial extremities.

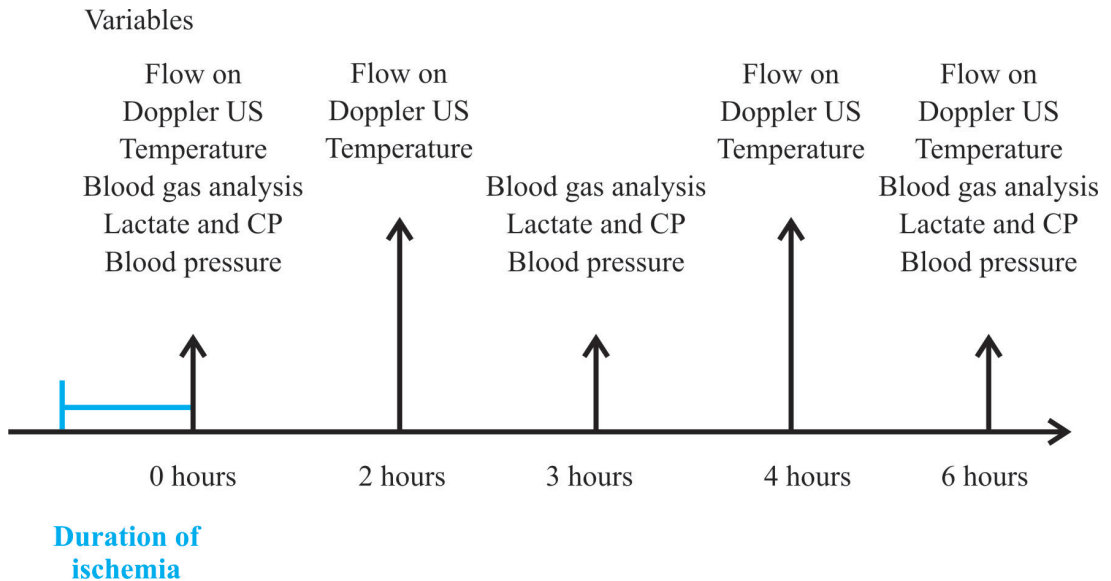


Figure 1. Determination of variables studied in ischemic limbs and arterialized ischemic limbs over duration of study.

Throughout the study, 5,000 UI of heparin were administered every 3 hours.

After all procedures had been completed, animals in group 2 were euthanized as directed by Federal Veterinary Medical Council resolution 1000/2012 (Conselho Federal de Medicina Veterinária).

Statistical analysis

The results were subjected to analysis of normality of distribution using the Anderson Darling test. The chi-square test with Yates' correction was used to compare qualitative variables, and Student's *t* test was used for quantitative variables, with statistical significance set at $p < 0.05$.

RESULTS

The variables measured in limbs arterialized after a mean ischemia time of 27 minutes and 30 seconds were compared with variables measured in the ischemic limbs and control limbs.

Arterial flow

Doppler examination of arterial flow in the arterialized ischemic limbs at T0 showed absence of flow in one limb, pulsating venous pattern in three, and pulsating arterial pattern in one; at T1 four limbs with blood flow had pulsating venous flow patterns; at T3, pulsating arterial flow was observed in one and pulsating venous flow in three; at T4, three limbs exhibited pulsating venous flow and two limbs had

no blood flow. All ischemic limbs exhibited absence of flow throughout the study.

For the purposes of analysis, only data from arterialized ischemic limbs that had flow detected by Doppler US were considered: four animals up to T3 and three animals at T4.

Temperature

Although there was no environmental control, the mean variations in temperature, at the extremities in the study group, exhibited similar curves, with means significantly lower to those measured for the control group over time (Table 1). When compared against each other, the mean temperatures for the arterialized ischemic limbs exhibited a non-significant ($p=0.55$) difference; temperatures were 2.25 °C higher than the ischemic limbs at T4 (Table 2).

Blood gas analysis

The pH of arterialized ischemic limbs and ischemic limbs began at slightly higher levels than the pH of the control group and followed similar curves, with a non-significant fall at T2, a little more accentuated than at T4 (Tables 3, 4, and 5). When compared against each other, they did not exhibit significance differences (Tables 6, 7, and 8).

Base excess

Both arterialized ischemic limbs and limbs maintained in ischemia exhibited a progressive fall in base excess (BE) in relation to the control group,

Table 1. Comparison of temperatures in arterIALIZED limbs and limbs in ischemia in relation to the control group, at four measurement times.

Temperature (measurement times)	ArterIALIZATION	Control	P	Ischemia	Control	P
	Mean (standard deviation)	Mean (standard deviation)		Mean (standard deviation)	Mean (standard deviation)	
T0	29.81 (3.77)	35.65 (0.55)	0.01	30.37 (3.97)	35.65 (0.55)	0.02
T1	26.34 (4.46)	35.65 (0.55)	0.002	26.32 (3.45)	35.65 (0.55)	0.0005
T3	24.77 (2.62)	35.65 (0.55)	0.0001	24.70 (2.35)	35.65 (0.55)	0.0001
T4	26.74 (5.67)	35.65 (0.55)	0.010	24.49 (2.20)	35.65 (0.55)	0.0001

Student's t test.

Table 2. Comparison of temperatures in arterIALIZED ischemic limbs and limbs in ischemia at different measurement times.

Temperature (measurement times)	ArterIALIZATION	Ischemia	P
	Mean (standard deviation)	Mean (standard deviation)	
T0	29.81 (3.77)	30.37 (3.97)	0.84
T1	26.34 (4.46)	26.32 (3.45)	0.99
T3	24.77 (2.62)	24.70 (2.35)	0.97
T4	26.74 (5.67)	24.49 (2.20)	0.55

Student's t test.

Table 3. Comparison of biochemical variables and arterial blood pressure levels in arterIALIZED limbs and limbs in ischemia in relation to the control group at measurement time T0.

Variables	ArterIALIZATION	Control	P	Ischemia	Control	P
	Mean (standard deviation)	Mean (standard deviation)		Mean (standard deviation)	Mean (standard deviation)	
pH	7.32 (0.11)	7.30 (0.15)	0.83	7.31 (0.12)	7.30 (0.15)	0.92
BE	2.68 (1.02)	2.38 (2.47)	0.83	2.18 (1.38)	2.38 (2.47)	0.89
HCO ₃ ⁻	29.45 (1.77)	30.62 (4.17)	0.62	29.15 (2.29)	30.62 (4.17)	0.55
pO ₂	166.33 (61.91)	298.10 (128.32)	0.10	158.93 (58.34)	298.10 (128.32)	0.09
pCO ₂	60.75 (16.19)	68.82 (34.49)	0.68	60.60 (17.63)	68.82 (34.49)	0.68
Lactate	18.55 (2.99)	17.14 (6.96)	0.72	21.20 (10.28)	17.14 (6.96)	0.50
CP	1,647.50 (590.89)	940.00 (364.18)	0.06	1,612.50 (563.68)	940.00 (364.18)	0.07
Arterial blood pressure	55.75 (15.76)	35.86 (22.86)	0.18	47.50 (22.49)	35.86 (22.86)	0.47

Table 4. Comparison of biochemical variables and arterial blood pressure levels in arterIALIZED limbs and limbs in ischemia in relation to the control group at measurement time T2.

Variables	ArterIALIZATION	Control	P	Ischemia	Control	P
	Mean (standard deviation)	Mean (standard deviation)		Mean (standard deviation)	Mean (standard deviation)	
pH	7.26 (0.08)	7.30 (0.15)	0.65	7.25 (0.06)	7.30 (0.15)	0.55
BE	1.13 (1.97)	2.38 (2.47)	0.44	0.68 (1.41)	2.38 (2.47)	0.26
HCO ₃ ⁻	29.30 (1.47)	30.62 (4.17)	0.57	29.08 (1.28)	30.62 (4.17)	0.50
pO ₂	143.65 (89.98)	298.10 (128.32)	0.08	167.53 (143.26)	298.10 (128.32)	0.19
pCO ₂	57.80 (23.85)	68.82 (34.49)	0.61	68.40 (11.02)	68.82 (34.49)	0.98
Lactate	40.30 (19.38)	17.14 (6.96)	0.04	36.10 (21.17)	17.14 (6.96)	0.10
CP	1,747.00 (556.34)	940.00 (364.18)	0.03	1,704.25 (554.79)	940.00 (364.18)	0.04
Arterial blood pressure	42.63 (19.61)	35.86 (22.86)	0.65	37.75 (15.76)	35.86 (22.86)	0.89

Student's t test.

Table 5. Comparison of biochemical variables and arterial blood pressure levels in arterialized limbs and limbs in ischemia in relation to the control group at measurement time T4.

Variables	Arterialization	Control	P	Ischemia	Control	P
	Mean (standard deviation)	Mean (standard deviation)		Mean (standard deviation)	Mean (standard deviation)	
pH	7.21 (0.12)	7.30 (0.15)	0.41	7.20 (0.09)	7.30 (0.15)	0.34
BE	-0.50 (3.58)	2.38 (2.47)	0.41	1.07 (2.72)	2.38 (2.47)	0.11
HCO ₃ ⁻	29.07 (1.61)	30.62 (4.17)	0.57	27.87 (2.48)	30.62 (4.17)	0.35
pO ₂	95.83 (13.82)	298.10 (128.32)	0.04	94.67 (3.89)	298.10 (128.32)	0.04
pCO ₂	76.23 (21.75)	68.82 (34.49)	0.75	71.87 (15.09)	68.82 (34.49)	0.89
Lactate	61.93 (19.70)	17.14 (6.96)	0.003	55.33 (19.15)	17.14 (6.96)	0.006
CP	2,020.67 (621.81)	940.00 (364.18)	0.02	1,879.33 (425.96)	940.00 (364.18)	0.02
Arterial blood pressure	33.17 (19.20)	35.86 (22.86)	0.87	36.67 (13.58)	35.86 (22.86)	0.96

Student's t test.

Table 6. Comparison of biochemical variables and arterial blood pressure levels in arterialized limbs and limbs in ischemia at measurement time T0.

Variables	Arterialization	Ischemia	P
	Mean (standard deviation)	Mean (standard deviation)	
pH	7.32 (0.11)	7.31 (0.12)	0.91
BE	2.68 (1.02)	2.18 (1.38)	0.58
HCO ₃ ⁻	29.45 (1.77)	29.15 (2.29)	0.84
pO ₂	166.33 (61.91)	158.93 (58.34)	0.87
pCO ₂	60.75 (16.19)	60.60 (17.63)	0.99
Lactate	18.55 (2.99)	21.20 (10.28)	0.64
CP	1,647.50 (590.89)	1,612.50 (563.68)	0.93
Arterial blood pressure	55.75 (15.76)	47.50 (22.49)	0.57

Student's t test.

Table 7. Comparison of biochemical variables and arterial blood pressure levels in arterialized limbs and limbs in ischemia at measurement time T2.

Variables	Arterialization	Ischemia	P
	Mean (standard deviation)	Mean (standard deviation)	
pH	7.26 (0.08)	7.25 (0.06)	0.85
BE	1.13 (1.97)	0.68 (1.41)	0.72
HCO ₃ ⁻	29.30 (1.47)	29.08 (1.28)	0.83
pO ₂	143.65 (89.98)	167.53 (143.26)	0.79
pCO ₂	57.80 (23.85)	68.40 (11.02)	0.45
Lactate	40.30 (19.38)	36.10 (21.17)	0.78
CP	1,747.00 (556.34)	1,704.25 (554.79)	0.92
Arterial blood pressure	42.63 (19.61)	37.75 (15.76)	0.71

Student's t test.

Table 8. Comparison of biochemical variables and arterial blood pressure levels in arterialized limbs and limbs in ischemia at measurement time T4.

Variables	Arterialization	Ischemia	P
	Mean (standard deviation)	Mean (standard deviation)	
pH	7.21 (0.12)	7.20 (0.09)	0.91
BE	0.50 (3.58)	1.07 (2.72)	0.58
HCO ₃ ⁻	29.07 (1.61)	27.87 (2.48)	0.52
pO ₂	95.83 (13.82)	94.67 (3.89)	0.89
pCO ₂	76.23 (21.75)	71.87 (15.09)	0.79
Lactate	61.93 (19.70)	55.33 (19.15)	0.70
CP	2,020.67 (621.81)	1,879.33 (425.96)	0.76
Arterial blood pressure	33.17 (19.20)	36.67 (13.58)	0.81

Student's t test.

which was more accentuated in limbs maintained in ischemia (Tables 3, 4, and 5). When arterialized limbs were compared with those maintained in ischemia, there was a non-significant ($p=0.58$) difference of 1.57 at T4 (Tables 6, 7, and 8).

Bicarbonate concentration

Both arterialized ischemic limbs and limbs maintained in ischemia exhibited a progressive fall in the concentration of bicarbonate (HCO_3^-), which was more accentuated in the ischemic limbs, especially at T4 (Tables 3, 4, and 5), but without significance either in relation to the control group or to the arterialized limbs (Tables 6, 7, and 8).

Partial oxygen pressure

Partial oxygen pressures (pO_2) in the arterialized ischemic limbs and the ischemic limbs started from lower levels than the control limbs and followed similar curves, with significant drops at T4 (Tables 3, 4, and 5). Comparisons between them did not reveal significance (Tables 6, 7, and 8).

Partial carbon dioxide pressure

Partial carbon dioxide pressure (pCO_2) values were similar and lower than in the control group at T0, followed by a progressive increase in mean pCO_2 in limbs maintained in ischemia and a mild fall in mean pCO_2 in the arterialized ischemic limbs at T2. The means for both groups exhibited increases at T4, although the increase was greater in the ischemia with arterialization group (Tables 3, 4, and 5). Comparisons between means were not significant (Tables 6, 7, and 8).

Lactate

Mean lactate values started from a baseline level similar to that in the control group and exhibited similar curves, with a progressive increase at T2, which was significant for arterialized ischemic limbs, and a more accentuated increase at T4 that was significant both for arterialization and ischemia (Tables 3, 4, and 5). Comparisons between means were not significant (Tables 6, 7, and 8).

Creatine phosphokinase

Mean CP values started from higher baseline levels than the control group, exhibiting significant increases both in arterialized ischemic limbs and in those in ischemia at T2 and T4 (Tables 3, 4, and 5). However, means did not exhibit significant differences (Tables 6, 7, and 8).

Arterial blood pressure

The ratios of distal arterial pressures to proximal arterial pressures were used for the purposes of calculations. In arterialized ischemic limbs, the mean of this ratio started from a higher baseline than in the control group and than in limbs in ischemia. The means in both intervention groups exhibited a drop at T2, although the ratio for arterialized ischemic limbs remained higher. At T4, the means approached those in the control group (Tables 3, 4, and 5) and were not significantly different from each other (Tables 6, 7, and 8).

The curves for absolute distal pressures exhibited similar patterns to the ratios, also without significance.

DISCUSSION

There are no experimental studies of ischemia and reperfusion (I/R) by arterialization of veins that have tested the variables of interest in animals. Our model induced acute ischemia, which is different from the chronic form, in which a period of ischemia without necrosis can lead to production of stimuli for arteriogenesis.

Although both procedures were conducted on the same animal, one on each hind limb, the variables studied were determined separately. Use of the contralateral limb is common in studies of unilateral ischemia,^{21,22} because it means that the measurements can be taken over the same substrate, although it is not possible to entirely rule out interference from one limb with the other. The experimental model used in this study reproduces the conditions of ischemia and reperfusion by venous arterialization, with retrograde transfer of the higher pressure arterialized venous flow (proximal arteries) to the lower pressure arterial bed (distal arteries).¹³

When Doppler US did not detect flow at the extremity, the data collected from the arterialized ischemic limb were disregarded.

Doppler examination showed pulsating arterial and pulsating venous flow patterns, as are seen in arteriovenous fistulas.²³

Sasajima et al. studied deep venous arterialization in mice, showing that rupture of the valves at the level of the femoral vein was accompanied by an increase in skin temperature in the region of the hip and thigh and at the knee joint. They also showed that hyperthermia of the distal extremity only occurred when the valves in the popliteal vein were ruptured.¹⁰

The increased mean temperature of arterialized ischemic limbs, observed from T3 onwards, suggests that the system is patent and confirms the utility of valvulotomy of the arterialized vein.

Tissue edema occurs during reperfusion, with potential exacerbation of tissue damage and the systemic response. In the context of I/R, local and systemic changes involve many different systems: endothelial, circulatory, metabolic, acid-base, etc.²⁰

Szokoly et al. demonstrated that in rats subjected to I/R in the hind limbs there was a continuous and significant drop in venous pH compared to baseline in the first hour. This was accompanied by changes in $p\text{CO}_2$ and $p\text{O}_2$, which exhibited moderate signs of respiratory compensation.²⁰

Mondek et al. reported a pilot study in which the maximum level of acidosis occurred 2 hours after the start of reperfusion to a limb that had been ischemic due to vascular clamping. The blood sample was drawn from the ipsilateral femoral vein.²⁴

Findings from this study showed metabolic acidosis, with a drop in the BE value and little change to HCO_3^- . The fall in BE suggests buffering, which allows a certain stability in pH levels. The variations in $p\text{CO}_2$ and $p\text{O}_2$ were nonspecific, with a significant drop in $p\text{O}_2$ in both limbs, combined with an increase in $p\text{CO}_2$ at the end of the experiment. These findings are compatible with other studies of I/R.^{20,25}

Szokoly et al. and Mondek et al. conducted studies in which pH was measured in the collector vein of the limb, because reperfusion was via arterial pathways.^{20,24} In our study, we conducted blood gas analysis of samples from the distal extremity of the femoral artery, since reperfusion was via venous vessels, and our intention was to evaluate retrograde flow.

During surgery for abdominal aortic aneurysms that involved I/R of extremities, Sako et al. observed transitory increases in lactate and a reduction in pH in iliac veins after reperfusion.²⁶

Theodoraki et al. studied the transhepatic lactate gradient during I/R in hepatectomies and observed increased hepatic lactate production 50 minutes after reperfusion. They also demonstrated a positive correlation between intraoperative systemic lactate levels and the transhepatic lactate gradient, suggesting that hepatic reperfusion made a significant contribution to the systemic hyperlactatemic state.²⁷

The mean lactate values observed in the intervention groups in this study started from a similar baseline level to the control group and exhibited similar curves, with a progressive and significant increase that was more accentuated in arterialized ischemic limbs, in which reperfusion was retrograde (flow present on Doppler US).

Woodruff et al. conducted a study to evaluate the capacity of a drug to counter injury provoked by ischemia and subsequent reperfusion (I/R), demonstrating increases in CP in the group subjected to I/R, which were not observed in a group that was

only subjected to ischemia.²⁸ This may suggest that the pathogenic basis of the increase in the marker of muscle injury could be reperfusion after ischemia.

In this study, CP values exhibited similar behavior to lactate levels, showing significant increases at T2 and even more accentuated increases at T4, especially in the arterialized ischemic limbs.

Szokoly et al. studied I/R in the hind legs of mice, observing a fall in mean arterial blood pressure of around 20% after reperfusion. Possible compensatory events parallel to the procedure or even vasodilation due to reperfusion of the limb could explain the drop in pressure.²⁰

The mean ratio of arterial pressures in arterialized ischemic limbs started from a higher level than the control group and than the limbs in ischemia. Means in both intervention groups exhibited a reduction at T2, although the arterialized ischemic limbs maintained a higher level. At T4, means approached the means for the control group. The curve for the fall in distal arterial blood pressure was similar to the curves for the ratio between distal and proximal arterial blood pressures, which is not suggestive of interference in the values from proximal arterial blood pressure.

CONCLUSIONS

The findings of this study are compatible with metabolic acidosis, with significant increases in CP and lactate, suggesting cellular damage in both limbs and signs of retrograde reperfusion due to maintenance of flow, as seen on Doppler US, in the arterialized ischemic limbs.

REFERENCES

- Alexandrescu V, Ngongang C, Vincent G, Ledent G, Hubermont G. Deep calf veins arterialization for inferior limb preservation in diabetic patients with extended ischaemic wounds, unfit for direct arterial reconstruction: preliminary results according to an angiosome model of perfusion. *Cardiovasc Revasc Med.* 2011;12(1):10-9. PMID:21241966. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carrev.2009.12.002>.
- Djoric P. Early individual experience with distal venous arterialization as a lower limb salvage procedure. *Am Surg.* 2011;77(6):726-30. PMID:21679641.
- Busato CR, Utrabo CA, Gomes RZ, et al. Utilização da safena magna in situ para arterialização do arco venoso do pé. *J Vasc Bras.* 2010;9(3):119-23. <http://dx.doi.org/10.1590/S1677-54492010000300004>.
- Taylor RS, Belli AM, Jacob S. Distal venous arterialization for salvage of critically ischaemic inoperable limbs. *Lancet.* 1999;354(9194):1962-5. PMID:10622299. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(99\)03164-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(99)03164-5).
- Mutirangura P, Ruangsetakit C, Wongwanit C, Sermsathanasawadi N, Chinsakchai K. Pedal bypass with deep venous arterialization: the therapeutic option in critical limb ischemia and unreconstructable distal arteries. *Vascular.* 2011;19(6):313-9. PMID:22008976. <http://dx.doi.org/10.1258/vasc.2010.0a0278>.

6. Lengua F, Madrid A, Acosta C, Vargas J. Arterializacao venosa temporal del pie diabético. *J Vasc Bras.* 2010;9(1):14-20. <http://dx.doi.org/10.1590/S1677-54492010005000007>.
7. Lu XW, Idu MM, Ubbink DT, Legemate DA. Meta-analysis of the clinical effectiveness of venous arterialization for salvage of critically ischaemic limbs. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2006;31(5):493-9. PMID:16488164. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejvs.2005.12.017>.
8. Özbek C, Kestelli M, Emrehan B, et al. A novel approach: ascending venous arterialization for atherosclerosis obliterans. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2005;29(1):47-51. PMID:15570271. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejvs.2004.09.027>.
9. Schreve MA, Minnee RC, Bosma J, Leijdekkers VJ, Idu MM, Vahl AC. Comparative study of venous arterialization and pedal bypass in a patient cohort with critical limb ischemia. *Ann Vasc Surg.* 2014;28(5):1123-7. PMID:24189192. <http://dx.doi.org/10.1016/j.avsg.2013.08.010>.
10. Sasajima T, Kikuchi S, Ishikawa N, Koyama T. Skin temperature in lower hind limb subjected to distal vein arterialization in rats. *Adv Exp Med Biol.* 2014;812:361-8. PMID:24729255. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-0620-8_48.
11. Houlind K, Christensen J, Hallenberg C, Jepsen JM. Early results from an angiosome-directed open surgical technique for venous arterialization in patients with critical lower limb ischemia. *Diabet Foot Ankle.* 2013;4(1):22713. PMID:24358432. <http://dx.doi.org/10.3402/dfa.v4i0.22713>.
12. Ozbek C, Kestelli M, Bozok S, et al. Surgical stimulation of angiogenesis. *Asian Cardiovasc Thorac Ann.* 2014;22(1):36-9. PMID:24585641. <http://dx.doi.org/10.1177/0218492312468285>.
13. Busato CR, Utrabo CA, Lipinski LC, et al. Experimental model for the study of retrograde flow. *J Vasc Bras.* 2016;15(2):93-8. <http://dx.doi.org/10.1590/1677-5449.008915>.
14. Bordinhão A. Comparação entre a Dopplermetria e o fluxo livre da artéria torácica interna de cães com e sem o uso de noradrenalina. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 2013;28:224-30. PMID:23939319.
15. Poerschke RA, Silveira DA, Lodi P, Tilton W, Marx G, Lampert AS. Temporary vascularization on ischemic limbs through arterial-medular shunt: an experimental work. *J Vasc Bras.* 2012;11:29-33. <http://dx.doi.org/10.1590/S1677-54492012000100006>.
16. Brioschi ML, Mehl A, Oliveira AG, et al. Exame de termometria cutânea infravermelha na avaliação do pé diabético. *Rev Méd Paraná.* 2007;65:33-41.
17. Hurtado Rojas P, Alves Tannous L, Von Bahten LC, Castro Villegas F, Gasparetto J. Análise da gasometria e dos níveis de lactato na hipertensão intra-abdominal associada à sepse abdominal: Modelo experimental em ratos. *Panamerican J Trauma.* 2013;2:49-51. <http://dx.doi.org/10.5005/jp-journals-10030-1057>.
18. Nagy O, Seidel H, Paulíková I, Mudron P, Kováč G. Use of blood gases and lactic acid analyses in diagnosis and prognosis of respiratory diseases in calves. *Bull Vet Inst Pulawy.* 2006;50:149-52.
19. Currie IS, Wakelin SJ, Lee AJ, Chalmers RT. Plasma creatine kinase indicates major amputation or limb preservation in acute lower limb ischemia. *J Vasc Surg.* 2007;45(4):733-9. PMID:17398384. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jvs.2006.12.050>.
20. Szokoly M, Nemeth N, Hamar J, Furka I, Miko I. Early systemic effects of hind limb ischemia-reperfusion on hemodynamics and acid-base balance in the rat. *Microsurgery.* 2006;26(8):585-9. PMID:17066412. <http://dx.doi.org/10.1002/micr.20291>.
21. Thaveau F, Zoll J, Bouitbir J, et al. Contralateral leg as a control during skeletal muscle ischemia-reperfusion. *J Surg Res.* 2009;155(1):65-9. PMID:19159910. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jss.2008.08.001>.
22. Mansour Z, Bouitbir J, Charles AL, et al. Remote and local ischemic preconditioning equivalently protects rat skeletal muscle mitochondrial function during experimental aortic cross-clamping. *J Vasc Surg.* 2012;55(2):497-505.e1. PMID:22056287. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jvs.2011.07.084>.
23. Barros FS, Pontes SM, Silva WP, Prezotti BB, Sandri JL. Identificação pelo Doppler colorido de fistula arteriovenosa na trombose venosa profunda. *J Vasc Bras.* 2006;5:224-8. <http://dx.doi.org/10.1590/S1677-54492006000300012>.
24. Mondek P, Sefranek V, Tomka J, et al. Regional biochemical and hematologic changes in patients after revascularization of the lower extremities in ischemia of the extremities. *Rozhl Chir.* 2002;81(5):265-70. PMID:12046433.
25. Tejchman K, Domanski L, Sienko J, et al. Early acid-base balance disorders during kidney transplantation. *Trans Proc.* 2006;38(1):123-6. PMID:16504681. <http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2006.01.024>.
26. Sako H, Hadama T, Miyamoto S, et al. Limb ischemia and reperfusion during abdominal aortic aneurysm surgery. *Surg Today.* 2004;34(10):832-6. PMID:15449152. <http://dx.doi.org/10.1007/s00595-004-2829-y>.
27. Theodoraki K, Arkadopoulos N, Fragulidis G, et al. Transhepatic lactate gradient in relation to liver ischemia/reperfusion injury during major hepatectomies. *Liver Transpl.* 2006;12(12):1825-31. PMID:17031827. <http://dx.doi.org/10.1002/lt.20911>.
28. Woodruff TM, Arumugam TV, Shiels IA, Reid RC, Fairlie DP, Taylor SM. Protective effects of potent C5a receptor antagonist on experimental acute limb ischemia-reperfusion in rats. *J Surg Res.* 2004;116(1):81-90. PMID:14732352. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jss.2003.04.001>.

Correspondence

Cesar Roberto Busato
 Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG, Departamento de
 Medicina
 Rua Saldanha da Gama, 425 - Orfãs
 CEP 84015-130 - Ponta Grossa (PR) - Brazil
 Tel.: (42) 9902-3534 / (42) 3028-4245
 E-mail: crbusato@gmail.com

Author information

CRB - PhD in Principles of Surgery from Universidade Federal do
 Paraná (UFPR).
 CALU - MSc in Principles of Surgery from Faculdade Evangélica do
 Paraná (FEPAR).
 LCL - PhD in Veterinary Surgery from Universidade Federal de São
 Paulo (UNIFESP).
 KDL, MDGF, NBM, SBF and WJ - Medical students at Universidade
 Estadual de Ponta Grossa (UEPG).

Author contributions

Conception and design: CRB, LCL
 Analysis and interpretation: CRB, MDGF
 Data collection: CRB, CALU, LCL, KDL, MDGF, NBM, SBF, WJ
 Writing the article: CRB, MDGF
 Critical revision of the article: CRB
 Final approval of the article*: CRB, CALU, LCL, KDL, MDGF, NBM,
 SBF, WJ
 Statistical analysis: MDGF
 Overall responsibility: CRB, CALU

*All authors have read and approved of the final version of the article submitted to *J Vasc Bras.*