Jairo Zacchê de Sá

EFEITOS DA NITROGLICERINA TÓPICA SOBRE A ÁREA VIÁVEL DE RETALHOS PRÉ-FABRICADOS POR IMPLANTE VASCULAR EM RATOS

RECIFE
2006

Jairo Zacchê de Sá

EFEITOS DA NITROGLICERINA TÓPICA SOBRE A ÁREA VIÁVEL DE RETALHOS PRÉ-FABRICADOS POR IMPLANTE VASCULAR EM RATOS

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Cirurgia.

ORIENTADOR

JOSÉ LAMARTINE DE ANDRADE AGUIAR
PROF. ASSOCIADO DA BASE DA TÉCNICA CIRÚRGICA DO DEPARTAMENTO DE CIRURGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

RECIFE
2006

Sá, Jairo Zacchê de

Efeitos da nitroglicerina tópica sobre a área viável de retalhos pré-fabricados por implante vascular em ratos / Jairo Zacchê de Sá. – Recife : O Autor, 2006.

xiii, 90 folhas : il., fig., tab.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Cirurgia, 2006.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Cirurgia plástica – Retalhos pré-fabricados – Implante vascular – Ratos . 2. Autonomização de retalhos – Área de viabilidade. 3. Utilização da nitroglicerina tópica – Área viável do retalho – Efeito da medicação. I. Título.

616-089.844	**CDU (2.ed.)**	**UFPE**
617.95	**CDD (22.ed.)**	**BC2007-011**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR
Prof. Amaro Henrique Pessoa Lins

VICE-REITOR
Prof. Gilson Edmar Gonçalves e Silva

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Prof. Celso Pinto de Melo

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DIRETOR
Prof. José Thadeu Pinheiro

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DIRETORA SUPERINTENDENTE
Prof. Heloísa Mendonça de Morais

DEPARTAMENTO DE CIRURGIA
Prof. Sílvio Romero Marques

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA
NÍVEL MESTRADO E DOUTORADO
COORDENADOR
Prof. José Lamartine de Andrade Aguiar

VICE-COORDENADOR
Prof. Carlos Teixeira Brandt

CORPO DOCENTE
Prof. Álvaro Antônio Bandeira Ferraz
Prof. Carlos Teixeira Brandt
Prof. Cláudio Moura Lacerda de Melo
Prof. Edmundo Machado Ferraz
Prof. Frederico Teixeira Brandt
Prof. José Lamartine de Andrade Aguiar
Prof. Salvador Vilar Correia Lima
Prof. Sílvio Caldas Neto

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA
NÍVEL DE MESTRADO E DOUTORADO

Relatório da Defesa de Tese do Dr. Jairo Zacchê de Sá Aluno do Programa de Pós-graduação em Cirurgia, Área de Concentração: Cirurgia: Clínica e Experimental. Turma iniciada em 2001.

Às treze horas do dia vinte de Dezembro de dois mil e seis no auditório Murilo La Greca do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, tiveram inicio os trabalhos de defesa de tese do Dr. Jairo Zacchê de Sá, para obtenção do grau de Doutor em Cirurgia. A comissão Julgadora – eleita pelo Colegiado do Programa e homologada pela Câmara de Pesquisa e Pós-graduação – foi integrada pelos professores: Dr. Carlos Teixeira Brandt, Doutor do Departamento de Cirurgia do CCS/UFPE (Presidente da Banca Examinadora); Dr. Frederico Teixeira Brandt, Doutor do Departamento de Cirurgia do CCS/UFPE; Dr. Salvador Vilar Correia Lima, Doutor do Departamento de Cirurgia do CCS/UFPE; Dr. Jairo de Andrade, Doutor do Departamento de Cirurgia do CCS/UFPE; e, Dr Saulo Monteiro dos Santos, Doutor do Departamento de Cirurgia do CCS/UFPE; e, para suplentes: interno: Dr. Silvio da Silva Caldas Neto, Doutor do Departamento de Cirurgia do CCS/UFPE e, finalmente, externo, Dr. Marcelo Valença, , tendo, como orientador interno, o Dr. José Lamartine de Andrade Aguiar , Doutor do Departamento de Cirurgia do CCS/UFPE. A tese apresentada pelo doutorando Jairo Zacchê de Sá versou sobre: "Efeitos da Nitroglicerina Tópica sobre a Área Viável de Retalhos pré-fabricados por Implante Vascular em ratos". Após, a explanação de 30(trinta) minutos, pelo candidato, justificando a escolha, o objetivo da pesquisa, a metodologia empregada e os resultados obtidos, baseados na análise estatística, ilustrados com datashow, foram realizadas as argüições na seguinte ordem: Prof. Dr. Carlos Teixeira Brandt (Presidente da Banca Examinadora), Prof. Dr.Frederico Teixeira Brandt, Prof. Dr. Salvador Vilar Correia Lima, Prof. Dr. Jairo de Andrade, e Prof. Dr. Saulo Monteiro dos Santos; todas as argüições foram feitas no tempo regulamentar, e respondidas pelo candidato. Ao término das mesmas, a Comissão Julgadora proferiu o seguinte resultado: Prof. Dr. Carlos Teixeira Brandt (Presidente da Banca Examinadora), menção "APROVADA", Prof. Dr. Frederico Teixeira Brandt, menção "Aprovado", Prof. Dr. Salvador Vilar Correia Lima, menção "Aprovada", Prof. Dr. Jairo de Andrade, menção "Aprovado", e Prof. Dr. Saulo Monteiro dos Santos, menção "Aprovado". Conclusão, o candidato, foi aprovado com menção "Aprovado". Nada mais havendo a registrar foram encerrados os trabalhos do que, para constar, elaborei o presente relatório que vai por mim, Niége Maria de Paiva Melo, Secretária, assinados depois do Senhor Presidente, e demais integrantes da Comissão Examinadora. Recife, 20 de Dezembro de 2006.

Prof. Carlos Teixeira Brandt (Presidente)
Prof. Frederico Teixeira Brandt
Prof. Salvador Vilar Correia Lima
Prof. Jairo de Andrade
Prof. Saulo Monteiro dos Santos
Niége Maria de Paiva Melo (secretária) Niége Paiva

DEDICATÓRIA

Esta tese é dedicada a meus pais, ***Jairo*** e ***Maria Anaide***; a minha esposa, ***Míria***; a meus filhos, ***Clarisse*** e ***Pedro***; presentes de ***Deus*** e alicerces da minha Vida.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. José Lamartine de Andrade Aguiar**, pela orientação calcada no estímulo à criação de idéias, alicerce imprescindível à elaboração desta tese.

Ao **Prof. Júlio Morais,** pela orientação, pelo espírito acadêmico e por ter-me revelado que a Cirurgia Plástica é encantadora e inesgotável.

Aos **colegas** do Curso de Mestrado, pelo convívio amigo, estímulo e discussões proveitosas, que me ajudaram a atingir o objetivo.

À **Profª Olga Martins Marques**, pela atenção, orientação e empenho no trabalho de preparação das amostras de sangue dos animais utilizados nesta pesquisa.

Ao **Prof. Alexandre Ricardo Pereira Schuler,** pela fundamental aplicação de métodos de cromatografia utilizados neste trabalho.

Ao patologista **José Ricardo Alves de Lima,** pela atenção e empenho no trabalho de interpretação histopatológica do material.

Ao **Engenheiro Maurício Castelo Branco**, pela importante contribuição na utilização do *Software* de avaliação de área utilizado neste trabalho.

Ao **Serviço de Cirurgia Plástica** do Hospital do Servidor Público Estadual de São Paulo – Francisco Morato, representado pelos Doutores **Leão Faiwichow** e **Luiz Kamakura**, a quem devo minha formação de Cirurgião Plástico.

Ao **Dr. Antônio Carlos Braga**, pelo estímulo, respeito e companheirismo sempre presentes, em todos os momentos da elaboração da tese.

Ao **Prof. José Natal Figueroa,** pela orientação na metodologia e análise estatística.

A **Márcia** e **Mércia Araújo**, assessoras de produção dos Anais da Faculdade de Medicina, CCS – UFPE, pelo valioso apoio na confecção deste trabalho.

À **Veterinária Adriana Ferreira Cruz,** e aos funcionários do biotério pela inesgotável colaboração.

E, finalmente, ao **Núcleo de Cirurgia Experimental da Universidade Federal de Pernambuco-UFPE**, sempre de portas abertas à investigação experimental, que vem incentivando a elaboração de teses de Mestrado e Doutorado em Cirurgia.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS..... viii
LISTA DE FIGURAS..... ix
RESUMO..... xii
ABSTRACT..... xiii

1. INTRODUÇÃO..... 01
1.1 Retalhos pré-fabricados..... 02
1.2 Autonomização..... 08
1.3 Tratamento de retalhos cutâneos isquêmicos com agentes farmacológicos..... 12
1.4 Nitroglicerina tópica..... 26
1.5 Objetivos..... 28

2. MÉTODOS..... 29
2.1 implante do pedículo – primeiro tempo cirúrgico..... 30
2.2 Elevação do retalho – segundo tempo cirúrgico..... 35
2.3 Distribuição dos animais em grupos..... 38
2.4 Avaliação de área..... 39
2.5 Estudo histológico..... 40
2.6 Análise da nitroglicerina e seus metabólitos no plasma..... 41
2.7 Análise estatística..... 45

3.RESULTADOS..... 46
3.1 Avaliação qualitativa dos retalhos..... 46
3.2 Avaliação quantitativa das áreas..... 47
3.3 Histologia..... 51

4. DISCUSSÃO..... 54
4.1 Escolha do modelo experimental..... 54
4.2 Período entre o implante vascular e a elevação do retalho..... 56
4.3 Escolha do agente farmacológico..... 58
4.4 Análise dos grupos..... 62
4.6 Autonomização de retalhos..... 64
4.7 Considerações Finais..... 72

5. CONCLUSÕES..... 74

6. REFERÊNCIAS..... 75

ANEXOS..... 86

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Af	= área final
Ai	= área inicial
ATP	= adenosina trifosfato
CEEA	= Comissão de Ética em Experimentação Animal
DP	= desvio padrão
EGB	= extrato de ginkgo biloba
EMLA	= lidocaína e prilocaína
FCEV	= fator de crescimento endotelial vascular
GMP	= guanosina monofosfato cíclico
HPLC	= cromatografia líquida de alta eficiência
L-NAME	= L-nitro arginina metil ester
PCA 70	= proteínas de choque aquecidas 70
PCr	= fosfocreatina
SOD	= superóxido dismutase
STT	= sistema terapêutico transdérmico
TCS	= tecido celular subcutâneo
UFPE	= Universidade Federal de Pernambuco

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Disposição do animal anestesiado durante a cirurgia..... 30

Figura 2 Implante do pedículo femoral na pele do abdome: (**A**) visualização do pedículo; (**B**) pedículo dissecado com uma camada de músculo; (**C**) colocação de um porta-agulhas através de um túnel para rebater o pedículo; (**D**) pedículo rebatido para o abdome após ligadura e secção distal; (**E**) pedículo fixado com ponto 0,5cm acima da incisão para formação do túnel (seta); (**F**) final do implante do pedículo com fechamento das incisões..... 33

Figura 3 Implante do pedículo no retalho autonomizado: (**A**) pedículo femoral dissecado; **(B)** pedículo seccionado distalmente e rebatido; (**C**) retalho autonomizado de pedículo superior: incisões laterais e inferior e retalho liberado do leito; (**D**) retalho suturado ao leito, mostrando a abertura do túnel por onde passava o pedículo; (**E**) pedículo fixado à pele do retalho; (**F**) final do implante do pedículo no retalho autonomizado..... 34

Figura 4 Retalho elevado após três semanas. Intra-operatório: (A) identificação do pedículo femoral implantado na parede abdominal do rato. (B) Observa-se como única fonte de nutrição o pedículo implantado..... 36

Figura 5 STT de nitroglicerina colocado sobre o retalho..... 36

Figura 6 Curativo sem tensão para Fixação do STT sobre o retalho na parede abdominal do rato..... 37

Figura 7 Delineamento das áreas calculadas pelo AutoCAD em rato do grupo B: (A) área inicial; (B) área final..... 40

Figura 8 Disposição e calibre dos vasos da pele da parede abdominal do rato três semanas após a autonomização..... 46

Figura 9 Áreas finais de retalhos cutâneos abdominais suturados "in situ", 7 dias após terem sido elevados: **(A)** retalho com implante vascular sem autonomização, grupo 1; **(B)** retalho com implante vascular e autonomização, no mesmo tempo cirúrgico, grupo 2; **(C)** retalho com implante vascular sem autonomização no qual foi colocado um STT de nitroglicerina, grupo 3; (D) retalho com implante vascular e autonomização no mesmo tempo cirúrgico, no qual foi colocado um STT de nitroglicerina, grupo 4..... 50

Figura 10 A: Pele preservada com anexos íntegros (40x); B: Epiderme necrótica (40x); C: Infiltrado neutrofílico subepidérmico (40x); D: Derme com infiltrado inflamatório (40x); E: Vaso arterial trombosado (100x)..... 52

Figura 11 Cromatograma líquido de alta performance ultra-violeta de uma amostra do plasma de rato, 7 dias após utilização contínua do STT5 de nitroglicerina. Fase móvel = 40% metanol, pico 1 = 2 – mononitroglicerina; pico 2 = 1,2 - dinitroglicerina..... 53

Figura 12 Mecanismo de isquemia-reperfusao adaptado do trabalho de Michael..... 67

Figura 13 Figura adaptada do livro Cirurgia Plástica Reparador e Estética[1] com a representação esquemática da microcirculação: 1. Arteríola; 2. Capilar; 3. Vênula; 4.Comunicação arteriovenosa; 5. Esfíncter; 6. Inervação simpática..... 69

RESUMO

O mecanismo que resulta na falência de retalhos cutâneos ainda não está completamente esclarecido. Ao contrário dos resultados conflitantes observados com o uso de medicação, a autonomização cirúrgica proporciona um aumento na área viável de retalhos cutâneos de forma efetiva e confiável. Se o fenômeno da autonomização fosse completamente entendido, talvez esta informação seria usada para criar uma autonomização com base química, promovendo uma imediata proteção ao retalho ameaçado. O objetivo deste trabalho foi: estudar o efeito da nitroglicerina tópica sobre a área viável de um modelo de retalho pré-fabricado por implante vascular em ratos e analisar o mecanismo de autonomização cirúrgica aplicada a retalhos pré-fabricados sob efeito da nitroglicerina tópica**.** Foram utilizados 40 ratos Wistar submetidos a implante do pedículo femoral na região subdérmica da parede abdominal e divididos em quatro grupos de dez animais: grupo 1, sem autonomização e sem nitroglicerina tópica; grupo 2, com autonomização simultânea e sem nitroglicerina tópica; grupo 3, sem autonomização e com nitroglicerina tópica; grupo 4, com autonomização simultânea e com nitroglicerina tópica. A nitroglicerina era liberada por via transdérrmica através de uma membrana semipermeável de um dispositivo de liberação constante por sete dias. A extensão das áreas viáveis nos grupos foi delimitada, e o percentual da área viável, em relação à área total do retalho, foi calculado por meio do AutoCAD R 14. O valor médio do percentual de área viável alcançou 8,9 % no grupo submetido unicamente a implante vascular; 49,4 % no grupo submetido a implante vascular com autonomização simultânea; 8,4 % no grupo submetido a implante vascular e nitroglicerina tópica; e 1,1 % no grupo submetido a implante vascular com autonomização simultânea e nitroglicerina tópica. Houve diferenças significantes entre os quatro grupos experimentais no que diz respeito à distribuição dos valores do percentual de área viável, $p < 0,001$ (Kruskal-Wallis). Esta diferença ocorreu entre os pares de grupos: 1 e 2 ($p = 0,005$); 1 e 4 ($p = 0,024$); 2 e 3 ($p = 0,003$); 2 e 4 ($p = 0,001$). Os resultados fortaleceram a hipótese de que o fechamento dos canais arteriovenosos é o responsável pelo fenômeno da autonomização cirúrgica, e permitiram concluir que a nitroglicerina tópica não induziu ao aumento da área viável de retalhos pré-fabricados por implante vascular, e que a nitroglicerina tópica diminuiu a área viável dos retalhos submetidos à autonomização cirúrgica.

DESCRITORES: Autonomização; Retalho pré-fabricado; Nitroglicerina.

ABSTRACT

The mecanism that results in skin flap failure is yet not completely known. Contrary to the conflicting results observed with the use of drugs, the delay phenomenon provides an increase in the skin flap viables areas, which are effective and trusted. If the delay phenomenon were fully understood, perhaps this information could be used to create an immediate chemical delay in the threatened flap. The purpose of this study was: to study the effect of local nitroglycerin over the viable area of a prefabricated flap model for vascular implant in rats, and to analyze the mechanism of delay phenomenon applied to these models under local nitroglycerin. Forty Wistar rats underwent implant of femoral pedicle in the under skin region of the abdominal wall. The animals were divided in four groups of ten rats that: group 1 –without surgical delay procedure and local nitroglycerin; group 2 – with simultaneously surgical delay procedure, but without local nitroglycerin; group 3 – without surgical delay procedure, but with local nitroglycerin; and group 4 – with simultaneously surgical delay procedure and local nitroglycerin. Nitroglycerin was released via dermis under skin, through a semi permeable membrane of a device for drug constant releasing for seven days. The extensions of the viable areas among the groups were demarked, and the percentages of the viable areas, in relation to the total flap, were calculated using the AutoCAD R 14. The mean percentage value of the viable area reached 8.9% in the group that underwent solely vascular implantation; this value was 49.4% in the group that underwent vascular implantation with simultaneously surgical delay procedure; it was 8.4% in the group that underwent vascular implantation and received local nitroglycerin; and it was 1.1% in the group that underwent vascular implantation with simultaneous surgical delay procedure and local nitroglycerin. There were significant differences among the four experimental groups as regard to the distribution of viable areas percentages values, $p < 0.001$ (Kruskal-Wallis). These differences occur between groups 1 and 2 ($p = 0.005$); 1 and 4 ($p = 0.024$); 2 and 3 ($p = 0.003$; and 2 and 4 ($p = 0.001$). These results give support to the hypothesis that the closure of the arterial venous channels is responsible for the phenomenon of surgical delay procedure, and allow the conclusion that local nitroglycerin did not induce an increase of the prefabricated viable flap areas by vascular implantation; and that the local nitroglycerin decrease the viable flap areas that underwent delay surgical procedures.

KEYWORDS: Delay procedure; Prefabricated flap; Nitroglycerin.

INTRODUÇÃO

Os retalhos encontram-se presentes em todos os ramos da cirurgia plástica e constitui um procedimento freqüentemente utilizado pelo cirurgião na realização de intervenções reconstrutoras ou estéticas. A sua utilização remonta a séculos, e em todos estes anos uma preocupação afligiu aqueles que os utilizam: a obtenção de modelos que assegurem total segurança na confecção dos retalhos. Esta obstinada tentativa de confeccionar retalhos cutâneos com absoluta segurança levou inúmeros cirurgiões a pesquisarem os mecanismos de sobrevivência e possíveis coadjuvantes que auxiliassem na sobrevida dos retalhos[1].

Com a implantação da cirurgia plástica como especialidade, verificada entre as duas grandes guerras mundiais (1914-1918 e 1939-1945), os retalhos cutâneos foram objeto de muito interesse. Estudos experimentais em animais de laboratório possibilitaram a evolução baseada em dados científicos[2].

Entre 1950 e 1960, as pesquisas relacionadas com os retalhos cutâneos foram direcionadas no sentido de encontrar uma explicação para o fenômeno de autonomização. Com a evolução e aumento da sofisticação de abordagem dos retalhos, o procedimento de autonomização é raramente utilizado, exceto indiretamente na expansão tecidual. Todavia, um número significativo de retalhos cutâneos agudos (ou seja, não autonomizados) mostra sinais de isquemia e falência iminente. Se o fenômeno de autonomização fosse completamente entendido, talvez essa informação pudesse ser usada para criar uma autonomização com base química, promovendo uma imediata proteção ao retalho ameaçado. Portanto, estudos farmacológicos têm sido utilizados não só com o objetivo de salvar o retalho fracassado por causas intrínsecas, como também para testar hipóteses à cerca do

fenômeno de autonomização, e melhorar o entendimento da fisiopatologia da falência intrínseca dos retalhos cutâneos[3].

1.1 Retalhos pré-fabricados

Habitualmente, o pedículo vascular de um retalho penetra pelo seu segmento profundo, onde é necessário incluir gordura ou músculo, ou os dois componentes. Essa condição torna o retalho espesso e é tecnicamente proibitivo tentar modelá-lo primariamente, dado o risco de diminuir a vascularização e levar à isquemia e necrose. Em suma, seria inadequado para regiões que requerem pele fina[4].

Orticochea[5], foi o primeiro autor a descrever a aplicação clínica do conceito de implante vascular através da transferência de vasos temporais superficiais sob a pele retroauricular da concha. Nesse trabalho, a pele foi elevada com sucesso, como retalho composto, nutrido pelos vasos implantados e transferido, como um retalho temporofrontal pediculado, para reconstrução nasal.

Erol[6], estudou, em cães, o processo de vascularização de um enxerto de pele colocado diretamente sobre os vasos femorais e mantido por um período de 14, 21 e 31 dias. Os resultados indicaram que, por esse método, enxertos livres de pele poderiam ser transformados em retalhos ilhados. Com esse registro, este autor foi o primeiro a desenvolver um estudo experimental, no sentido de criar um retalho pré-fabricado com pedículo vascular e pele bastante fina. Com base nesses estudos experimentais, esse mesmo autor utilizou 10 retalhos pré-fabricados com enxertos de pele aplicados sobre os vasos temporais, em oito pacientes, para pré-fabricar retalhos pediculados de pele fina, da região temporal e frontal, a fim de cobrir áreas

mal vascularizadas, quando o tecido local era inviável. Nos casos clínicos, o período entre o implante vascular e a utilização do retalho foi, pelo menos, de 21 dias.

Erol e Spira[7], com o objetivo de criar um novo leito capilar para um tecido receptor, demonstraram que era possível obter a vascularização de um enxerto de pele, após deixá-lo sobre uma fístula arteriovenosa por um período de 15 dias. Estudo realizado em 24 ratos.

Yao[8], através do implante de um pedículo vascular em retalhos cutâneos tubulizados, com vascularização ao acaso, transformou esses retalhos cutâneos randomizados em retalhos axiais. Além disso, estudou o processo de vascularização, desencadeado a partir do implante vascular, em um modelo com coelhos. Posteriormente, em 1984, Yao[9] observou que a viabilidade de um segmento de tecido composto (osso, músculo e subcutâneo) é mais bem preservada, quando implantado um pedículo vascular juntamente com tal segmento no subcutâneo, e que o pedículo assim implantado, ademais, funciona como suporte vascular para posterior transferência.

Yao[10], implantou o ramo descendente da artéria circunflexa femoral superficial sob um retalho de pele da porção medial da coxa. Seis semanas mais tarde, ele transferiu a unidade composta pré-fabricada, como um retalho livre de 26 x 16cm de pele e subcutâneo, para reparação de uma retração cicatricial no pescoço. O procedimento consagrou esse autor como o primeiro cirurgião a apresentar um caso clínico de transferência microcirúrgica de tecido composto pré-fabricado[10].

As técnicas de implante vascular foram estudadas por Hirase et al.[11], em ratos e coelhos. Os pesquisadores descreveram a criação de retalhos livres revascularizados por pedículo vascular implantado e sugeriram suas possíveis aplicações clínicas. Em 1988, os mesmos autores implantaram um pedículo vascular

no subcutâneo de um retalho randômico de espessura total, em orelha de coelho. Após três semanas, os retalhos vascularizados unicamente pelo pedículo implantado foram transferidos como retalhos livres, com o fluxo sangüíneo restabelecido através de anastomose microcirúrgica com os vasos receptores da orelha contralateral. Ao exame histológico, constatou-se que o pericôndrio estava bem vascularizado com área de formação ativa de cartilagem, ao redor dos vasos implantados[12]. Hirase et al.[13] observaram que a vascularização de um retalho específico era conseguida com um pedículo composto por uma fístula arteriovenosa, obtida por um enxerto de veia. Após algumas semanas, o retalho poderia ser transferido como retalho livre, nutrido unicamente pelo pedículo criado.

Morrison et al.[14], criaram, em coelhos, um retalho cutâneo fino de padrão axial, através de um implante da artéria e veia femorais na região subdérmica. Como resultado do estudo, os autores relataram que o implante vascular provocava um crescimento extenso de neovasos, provenientes da artéria e veia implantada, e que o processo de neovascularização começava poucos dias após o implante, progredindo rapidamente por oito a doze semanas.

Khouri et al.[15], investigaram a possibilidade de vascularizar uma parte selecionada de um tecido-alvo, de forma seqüenciada, através de implante de um pedículo arteriovenoso e a fáscia que o envolvia, como suporte vascular, em um modelo em ratos. Observaram que, independentemente da anatomia vascular própria, uma quantidade ilimitada de retalhos livres compostos podia ser construída e transferida, tendo um grande pedículo implantado como suporte vascular. O suporte vascular era induzido a perfundir um bloco selecionado de tecido, o qual, no primeiro estágio, ainda mantinha a maior parte de sua nutrição proveniente da vascularização sangüínea original. Tardiamente, o retalho pré-fabricado era

facilmente dissecado e transferido para o sítio receptor, onde a revascularização era promovida por meio de anastomose entre um grande suporte vascular induzido e o pedículo receptor.

Falco et al.[16], estudando a viabilidade, o fluxo sangüíneo e o padrão de vascularização de retalhos cutâneos pré-fabricados, através do implante de um pedículo arteriovenoso em ratos, observaram a média de área viável dos retalhos, o padrão de vascularização entre os vasos implantados e os vasos do retalho e o brotamento de novos vasos, a partir do implante vascular.

Takato et al.[17], utilizando retalhos venosos pré-fabricados em coelhos, investigaram a viabilidade de grandes retalhos nutridos unicamente com pedículo venoso e o tempo necessário entre o implante vascular e a elevação do retalho. O resultado desse estudo mostrou que a extensão de área viável, reproduzível em retalhos pré-fabricados com fluxo inteiramente venoso, foi obtida quando o retalho era elevado três semanas após implantação do pedículo.

Duffy et al.[18], utilizaram um modelo experimental em coelhos, para investigar o conceito de retalho fino pré-fabricado por exteriorização de um pedículo vascular em um retalho tubulizado de pele. Observaram uma sobrevida melhor da porção distal desse retalho, quando se aumentava o período entre o implante vascular e a elevação do retalho.

Stepán et al.[19], determinaram, segundo modelo em ratos, que o tempo mínimo entre o implante vascular e a elevação de um retalho com sucesso é de 14 dias. Utilizando injeção de contraste intravascular, descreveram a dinâmica e a morfologia do processo de neovascularização.

Pribaz et al.[20], inicialmente em estudo experimental e, posteriormente, em aplicação clínica, demonstraram que era possível usar, repetidas vezes, o mesmo pedículo, para pré-fabricar retalhos diferentes. Observaram, porém, que ocorre uma diminuição da área viável do retalho, a partir da segunda transferência.

Maitz et al.[21], desenvolveram um modelo de pré-fabricação de retalho, em que utilizaram um pedículo arteriovenoso exteriorizado e tubulizado, proveniente de orelha de coelho. Nesse estudo, os autores examinaram a viabilidade longitudinal (ou seja, apenas em relação ao comprimento) e as alterações existentes no padrão vascular dos retalhos. Para tanto, variaram o tempo de implante do pedículo com as incisões de autonomização.

Kostakoglu et al.[22] relataram, em ratos, que a reinervação em retalhos vasculares livres pré-fabricados não contribuiu significativamente para a formação de novos vasos.

Com o objetivo de avaliar a contribuição do tecido perivascular na neovascularização de enxertos de pele (retalhos pré-fabricados) em ratos, Yap-Legaspi et al.[23], concluíram que a quantidade de tecido perivascular ao redor do pedículo, não afetou, estatisticamente, o grau de neovascularização de enxertos de pele.

Tark et al.[24], desenvolveram um modelo em ratos, utilizando um pedículo musculovascular. Comparando a eficácia desse tipo de pedículo, no que diz respeito à revascularização de retalhos compostos, em relação ao arteriovenoso esqueletizado e ao fasciovascular, observaram que o musculovascular superou os outros tipos, no que diz respeito à revascularização de novos tecidos.

Morrison et al.[25], apresentaram três casos clínicos em que foram confeccionados retalhos pré-fabricados finos por implante vascular e transferidos, por microcirurgia, para cobertura de áreas em joelho e face.

Examinando a taxa e o padrão de crescimento vascular de um pedículo vascular implantado no subcutâneo em coelhos, Hickey M et al[26] estudaram como os vasos neoformados se conectavam aos vasos cutâneos preexistentes, e se a aplicação de fator de crescimento de fibroblastos poderia acelerar o processo de angiogênese. Eles concluíram que o fator de crescimento de fibroblastos colocado adjacente ao pedículo aumentava a sobrevida para aqueles retalhos elevados há uma semana, mas não alteram a sobrevida para aqueles elevados há 2 e 4 semanas.

Na prática, implantando um pedículo vascular no subcutâneo e mantendo-o nesse local por um determinado período de tempo, consegue-se que a região se torne área doadora de retalhos finos. Esse tipo de pré-fabricação é chamado de indução vascular[16,17,19]. Observou-se, ainda, que, através desse procedimento, era possível a obtenção de retalhos livres pré-fabricados, utilizando-se uma área doadora que possua característica semelhante às da região a ser reparada, independentemente da existência natural de um pedículo vascular no próprio local[11.]

1.2 Autonomização

A autonomização, como uma ferramenta na pré-fabricação de retalho, permite a conversão de tecidos para um retalho de padrão axial e, ainda, a transferência de uma quantidade de tecido superior à que seria possível em um retalho

randomizado[27-28]. McFarlane et al.[29], estudaram o mecanismo pelo qual a autonomização exercia efeito favorável sobre um retalho pediculado, no dorso de ratos, o qual sabidamente dependia de uma autonomização prévia, sob pena de tornar-se necrótico. Os autores observaram as alterações na vascularização do retalho, durante a autonomização e posterior elevação, o fluxo sangüíneo e a atividade metabólica nos tecidos do retalho.

Myers e Cherry[30], definiram, em coelhos, que, para produzir um aumento na vascularização de retalhos, a autonomização deveria reduzir o fluxo sangüíneo ao retalho, durante o primeiro estágio. Segundo os autores, o estímulo ao aumento da vascularização devia-se à isquemia.

Reinisch[31], estudando o fenômeno em porcos demonstrou que existia um fluxo sangüíneo substancial na porção distal, aparentemente mal vascularizada, de um retalho. Tal circulação ocorria através de canais arteriovenosos normalmente presentes, de paredes grossas e não-nutridores, em geral controlados por inervação simpática. Elevando-se o retalho, ocorria sua denervação, causando abertura dos canais. Concluiu, então, que o fenômeno de autonomização era resultado do fechamento espontâneo dos canais arteriovenosos.

Com a utilização do “Doppler” em estudo experimental e clínico, Callegari et al.[32] mostraram que a autonomização cirúrgica resulta em dilatação dos vasos existentes, com maior efeito no nível do plexo capilar, e não em processo de neovascularização do retalho.

A obtenção clínica bem sucedida de retalhos pré-fabricados finos, pela inserção, no subcutâneo, de uma lâmina de silicone adjacente a um retalho convencional pediculado, nos vasos epigástricos profundos inferiores, foi relatada por Itoh e Arai[33].

Byun et al.[34] observaram, em orelhas de coelho, que a autonomização prévia de retalhos venosos arterializados aumentou significativamente a área de sobrevida, em relação aos retalhos não autonomizados. Com esses resultados, concluíram que a autonomização provocou um aumento da comunicação arteriovenosa nos retalhos.

O papel da angiogênese e do crescimento de capilares e vênulas no mecanismo de autonomizacão cirúrgica de retalhos cutâneos em um modelo em coelho, estudados a partir de marcadores utilizando-se método mais especifico de imunohistoquímica para identificação de células endoteliais, foi realizado por López et al[35]. Os resultados indicaram que um processo angiogênico pode estar implicado na fisiologia do fenômeno da autonomizacão.

Cederna et al.[28], avaliando o efeito da autonomização na vascularização de retalhos cutâneos em ilha da parede abdominal de coelhos, concluíram que o período de autonomização de 21 e 27 dias era capaz de promover um aumento estatisticamente significativo na vascularização do retalho, em decorrência da dilatação das anastomoses, e de obter retalhos maiores pela captura de áreas teciduais adjacentes.

A análise intracelular não invasiva das alterações dos fosfometabólitos, ATP e fosfocreatina (PCr), os quais são fontes básicas de energia para a sobrevida celular, foi realizada por Park et al[36] utilizando a espectroscopia do fósforo radioativo por ressonância magnética e superfície espiral em 1997. Foi utilizado um modelo de retalho cutâneo em ratos. Os autores observaram que o pH e a relação ATP/(pH+ fosfato inorgânico) mostraram forte correlação com a viabilidade de retalhos cutâneos autonomizados e os não autonomizados, e que podem ser índices prognóstico para predizer a falência de retalhos cutâneos. A razão para a sobrevida da porção distal de retalhos autonomizados mantido o seu nível de ATP, a despeito

do baixo nível intracelular de PCr, poderia ser o acúmulo da creatino quinase aumentando o então chamado “transporte de energia,” função do sistema creatinoquinase/fosfocreatina.

Com o objetivo principal de estudar qual estratégia de autonomizacão cirúrgica deveria ser adotada para render retalhos com maior viabilidade,Yang et al[37] compararam dois diferentes procedimentos de autonomizacão cirúrgica em um modelo de retalho cutâneo em ratos. Os autores concluíram que o procedimento mais efetivo era ligar vasos de território conhecido de maneira anterógrada ao longo do comprimento do retalho.

O desenvolvimento de um modelo animal para mensuração direta de algumas das alterações microcirculatórias induzidas pela autonomizacão cirúrgica foi o objetivo do trabalho de Barker et al[38]. Os autores observaram que a orelha de ratos homozigotos para ausência de pêlos prestou-se como sendo um modelo efetivo para visualização direta e mensuração das alterações induzidas pela autonomizacão cirúrgica na microcirculação.

Taylor et al[39], mostraram que a autonomizacão cirúrgica de um retalho produz dilatação da arquitetura vascular existente, particularmente nos vasos capilares que ligam territórios adjacentes. O evento é permanente e irreversível com efeito máximo observado entre 48 e 72 horas após elevação do retalho e está associada tanto com um aumento do tamanho como do número de células em todas as camadas das paredes dos vasos capilares de ligação, especialmente a camada muscular. O tempo da seqüência da autonomizacão parece ser similar em diferentes espécies e em diferentes tecidos, sugerindo a possibilidade de um processo universal para autonomizacão.

O papel do óxido nítrico na microcirculacão de retalhos cutâneos autonomizados, uma vez observado o aumento na viabilidade destes retalhos, foi estudado por McDonald et al[40], utilizando um modelo de retalho cutâneo arterial em ratos. Os resultados dos trabalhos demonstraram que o óxido nítrico é um importante indutor de vasodilatacão, promovendo o aumento do fluxo nos vasos que ligam territórios cutâneos adjacentes (vasos de choque) e aumentando a sobrevida dos retalhos autonomizados.

1.3 Tratamento de retalhos cutâneos isquêmicos com agentes farmacológicos

O mecanismo que resulta na falência de retalhos cutâneos, apesar de incessantes pesquisas, ainda não está completamente esclarecido[41]. O grande número de agentes farmacológicos que tem sido investigado com o propósito de reduzir a área de necrose dos retalhos reflete a variedade de mecanismos propostos para agir na falência de retalhos cutâneos críticos.

A liberação de norepinefrina durante as primeiras 30 horas após o retalho ser elevado é tida como responsável pela isquemia e posterior necrose de retalhos em ratos[42]. Kennedy et al[42], avaliaram os efeitos de doses farmacológicas de reserpina (5mg / Kg), droga que atua promovendo depleção dos estoques de norepinefrina, e concluíram que não houve aumento na área viável de retalhos cutâneos randomizados. Em 1983, Hendel et al[43] observaram justamente o contrário, ou seja, que a depleção de terminais nervosos simpáticos aumentou o fluxo sangüíneo e a área viável de retalhos cutâneos em ratos.

Acreditando que os vasodilatadores pudessem desempenhar um papel no que se refere à área viável de retalho cutâneo, Rohrich et al[44], utilizaram nitroglicerina e relataram que tanto em ratos como em porcos a droga aumentou significativamente a área viável de retalhos cutâneos.

A zona de transição localizada entre a porção proximal, adequadamente perfundida, e a porção distal, isquêmica, de um retalho cutâneo agudo, é uma área, segundo Im et al[45], capaz de sofrer a ação de radicais livres de oxigênio, gerados pelo mecanismo de isquemia-reperfusão, responsáveis pela necrose distal do retalho. Neste trabalho, os autores observaram um aumento significativo na área viável deste tipo de retalho com o uso do alopurinol e superóxido dismutase.

Nichter et al[41] utilizaram a nitroglicerina em um modelo de retalho cutâneo randomizado em ratos, e observaram que não houve aumento na área viável do retalho. Esse resultado é contrário ao que tinha sido publicado por Rohrich[44].

Analisando os casos de necrose de pele que ocorrem em retalhos cutâneos com hematoma subjacente, mesmo quando parece haver uma perfusão tecidual adequada, Angel et al[46], comprovaram o envolvimento dos radicais livres derivados do hematoma no mecanismo que culminava com necrose tecidual.

A possibilidade de que a necrose de pele seja o resultado final de um mecanismo que envolva diminuição do fluxo sangüíneo na porção distal de um retalho cutâneo, com conseqüente lentidão deste fluxo, acúmulo de hemácias e hemoconcentração, levou Monteiro at al[47] a estudarem a influência da pentoxifilina na área viável de retalhos cutâneos. Os autores observaram que a droga alterou as propriedades reológicas da microcirculação e aumentou a área viável de retalhos cutâneos em ratos.

Para Galla et al[48] a fisiopatologia da isquemia e necrose de um retalho cutâneo passa por uma diminuição do fluxo sangüíneo na microcirculação. Em estudo realizado em ratos, esses autores obtiveram um aumento na área viável de retalho cutâneo randomizado com a utilização do buflomedil. Segundo os autores, foi de fundamental importância a capacidade da droga de proporcionar melhoria da capacidade de deformidade da hemácia e a redução da agregação plaquetária.

A preservação da circulação vascular periférica pode ser responsável pelo aumento da viabilidade dos retalhos cutâneos randomizados[49]. Williams et al[49], demonstraram que a pentoxifilina aumentou a sobrevida de retalho cutâneo randomizado em aproximadamente 50% quando administrada 14 dias antes da cirurgia. A ação da pentoxifilina em aumentar a capacidade de flexibilização das hemácias, diminuir a agregação plaquetária e diminuir os níveis plasmáticos do fibrinogênio, segundo os autores, seriam responsáveis pelo resultado obtido.

A ação de impedir a agregação plaquetária é creditada como sendo a principal responsável pelo aumento da viabilidade de retalho cutâneo proporcionada pela administração tópica da capsaicina, segundo trabalho realizado por Linuma e Swada[50] em ratos.

A ação dos radicais livres de oxigênio, como produto final da exposição dos retalhos cutâneos a íons cobalto, foram responsáveis pela diminuição da viabilidade deste retalho, de acordo com o trabalho de Atabey et al[51], em ratos.

Um et al[52], observaram que a inibição da porção constitutiva endotelial do óxido nítrico provocou uma diminuição do fluxo sangüíneo na porção proximal de um retalho cutâneo, com conseqüente redução significativa na viabilidade do retalho em ratos.

A eficácia da vitamina E em salvar retalhos cutâneos isquêmicos, como agente varredor de radicais livres, foi estudada por Khazanchi[53] em um modelo em ratos. Não foi observada diferença significativa entre o grupo controle e o grupo teste. Nesse estudo a vitamina E era começada uma semana após a cirurgia[53].

A ação vasodilatadora e de antiagregante plaquetário de um análogo da prostaglandina I_2, "Beraprost sodium", foi avaliada por Alexandrou et al[54] em um modelo em ratos. Os autores observaram um aumento significativo na área de sobrevida dos retalhos cutâneos no grupo onde a medicação foi ministrada.

A relação do óxido nítrico com a fisiopatologia da falência dos retalhos cutâneos foi estudada por Gribbe et al[55]. Os achados mostraram que a isquemia causada ao realizar um retalho cutâneo levou a um dano endotelial e a uma diminuição da atividade da enzima óxido nítrico sintetase dependente do cálcio. Adicionalmente, uma indução da atividade da enzima óxido nítrico sintetase independente do cálcio, em retalho cutâneo, era notada tanto na porção viável como na porção destinada à necrose do retalho.

Cordeiro et al[56], em estudos utilizando a L-arginina antes da reperfusão concluíram que sua administração reduziu significativamente a extensão de necrose de retalho cutâneo em ratos. Os dados também demonstraram que a droga reduziu o número de neutrófilos dentro do retalho reperfundido. Como a injúria tecidual após isquemia-reperfusão era mediada por neutrófilo, os autores hipotetisaram que a L-arginina era convertida a óxido nítrico, o qual previne a seqüestração de leucócitos pós-isquemia para o interior dos retalhos, evitando a injúria da isquemia-reperfusão.

O óxido nítrico é extremamente lipofílico o que lhe permite uma rápida difusão através das membranas. O seu potente efeito vasodilatador, sua ação de prevenir a aderência e agregação plaquetária, prevenir a aderência do neutrófilo ao endotélio,

assim como agir na permeabilidade endotelial, são características ressaltadas por Zamboni[57] como capazes de prevenir a injúria tecidual observada no mecanismo de isquemia-reperfusão.

Os neutrófilos têm sido implicados como uma fonte de radicais livres de oxigênio, mediadores da injúria tecidual na reperfusão. Os estudos de Ueda et al[58], indicaram que "Sulfatide" tem um efeito protetor significativo contra a injuria da isquemia-reperfusão em retalhos cutâneos arteriais em ratos. Tal efeito do "Sulfatide" contra a injúria de isquemia-reperfusão foi relatado ser mediado pela forte ligação do mesmo com a selectina-L, importante na interação dos leucócitos ao endotélio.

A aplicação local de uma droga vasoativa, o "Buflomedil", ligado ao lipossomo, foi estudada por Uhl et al[59] em um modelo em ratos. O estudo concluiu que a droga reduziu a necrose de retalho cutâneo pela melhoria da perfusão microvascular. De acordo com os autores, os efeitos de ação vasodilatadora, de melhorar a deformabilidade da hemácia e reduzir a agregação plaquetária do "Buflomedil" foram responsáveis pelo resultado obtido.

Raposio e Santi[60] em seus estudos utilizando dimetil sulfóxido com peróxido de hidrogênio tópico, em retalhos cutâneos randomizados em coelhos, concluíram que houve um aumento significativo tanto na viabilidade como na tensão transcutânea de oxigênio destes retalhos. Para os autores, o resultado foi decorrente da capacidade de depuração de radicais livres do dimetil sulfóxido.

A interação do neutrófilo ao endotélio nas vênulas pós-capilares e a subseqüente vasoconstricção microarteriolar são importantes eventos microcirculatórios levando à diminuição do fluxo sangüíneo funcional e à injúria tecidual do mecanismo de isquemia-reperfusão. A difusão de substâncias vasoativas

que são responsáveis por esta vasoconstricção patológica permanece desconhecida. Mazolewski et al[61] utilizaram um bloqueador do receptor do tromboxano A_2 em ratos, e observaram que embora houvesse uma diminuição significativa, o mesmo não era capaz de eliminar totalmente a vasoconstricção, nem de evitar a aderência endotelial dos polimorfonucleares.

Observando que cada vez mais os radicais livres de oxigênio eram implicados como mediadores da injúria dos retalhos cutâneos ilhados, Schanaider et al[62], demonstraram que o manitol foi capaz de proteger 75% dos retalhos das lesões que ocorrem após isquemia-reperfusão em um modelo em ratos. Para os autores, o resultado obtido ocorreu graças à ação do manitol como varredor de radicais livres de oxigênio.

Com o objetivo de estudar o efeito da droga vasoativa, buflomedil, na prevenção de isquemia de retalhos cutâneos em ratos, Biondo-Simões et al[63] considerando as ações de vasodilatador, antiagregante plaquetário e eritrocitário, concluíram que o buflomedil não foi capaz de diminuir a necrose em retalhos cutâneos isquêmicos.

Em decorrência da forte ligação do “sulfatide” à P-selectina, importante agente mediador da agregação leucocitária, foi observada uma menor invasão de leucócito na camada dérmica do retalho no grupo tratado com a medicação. Para Akamatsu et al[64] a ligação do “sulfatide” à P-selectina, impedindo a ação da mesma na agregação leucocitaria, levou ao aumento do fluxo sangüíneo na porção distal dos retalhos cutâneos randomizados em ratos. Os autores observaram ainda um aumento significativo na área viável dos retalhos cutâneos com a utilização desta medicação.

Tellioglu et al[65], estudaram a ação da “carnitine” na viabilidade de retalhos cutâneos ao acaso em ratos, e observaram um aumento na área viável destes retalhos. Para os autores, a “carnitine” era capaz de otimizar o diminuído aporte de oxigênio através do baixo fluxo sangüíneo após elevação dos retalhos. Através da ação da “carnitine”, há uma redução da toxidade dos ácidos graxos livres a nível celular decorrente do acúmulo de acil-CoA e acetil-CoA que ocorre durante a isquemia.

Para Cordeiro et al[66], os retalhos isquêmicos apresentavam claramente um elevado número de neutrófilos, como também uma elevação de mastócito após a reperfusão. Com o objetivo de avaliar a ação desta célula no mecanismo de isquemia-reperfusão, os autores utilizaram o cromolim sódico, droga reconhecidamente inibidora da degranulação do mastócito, a difenidramina (H1-bloqueador) e a cimetidina (H2-bloqueador), bloqueadoras da histamina em retalhos cutâneos epigástricos em ratos. Os autores concluíram: (1) que a administração da difenidramina e cimetidina antes da reperfusão aumentou a viabilidade no modelo estudado, (2) os bloqueadores H1 e H2 também reduziram o número de neutrófilos e mastócitos dos retalhos, (3) a utilização do cromolim sódico não proporcionou o mesmo efeito dos bloqueadores de histamina, (4) o mecanismo através do qual os bloqueadores da histamina diminuíram a injúria da isquemia-reperfusão era incerto,porém, poderia ser relatada a conhecida capacidade da histamina de induzir o recrutamento de leucócitos nos pequenos vasos.

O efeito do Extrato de Ginkgo Biloba (EGB) sobre a área viável de retalho cutâneo randomizado foi estudado por Souza Filho et al [67], em um modelo em ratos. Foi observado um aumento significativo na área viável dos retalhos. Para os autores, o resultado obtido foi conseqüência do mecanismo de ação da droga em atuar

como: (1) depurador de radicais livres, (2) ser antagonista do fator ativador de plaquetas e (3) ter provável papel na inibição da formação do óxido nítrico.

Para demonstrar que as plaquetas poderiam desempenhar um papel importante na patogênese da injúria tecidual do mecanismo de isquemia-reperfusão, Yur-Ren et al[68], estudando em um modelo de retalho cutâneo arterial epigástrio inferior em ratos, notaram um aumento na viabilidade dos retalhos, após a utilização de um antagonista da glicoproteína IIb/IIIa ("abciximab"). O aumento da sobrevida dos retalhos promovida pela medicação foi decorrente de sua ação como potente inibidor da ativação/agregação plaquetária e da diminuição da deposição da plaqueta ativada no endotélio vascular.

A utilização de uma fonte externa de óxido nítrico mostrou-se eficaz no que diz respeito ao aumento da área viável de retalhos cutâneos e miocutâneos em porcos, submetidos a um período de isquemia seguido de reperfusão, segundo Khiabani et al[69]. Os autores observaram que os resultados estavam relacionados com a diminuição do acúmulo de neutrófilos no endotélio vascular do retalho.

Acevedo-Bogado et al [70], estudando o efeito do edema em retalhos cutâneos em ratas, observaram que a hialuronidase demonstrou melhora efetiva na sobrevida destes retalhos, quando o fator edema estava envolvido no processo. Os autores sugerem um processo de dissolução do edema como provável mecanismo de melhora dos retalhos.

O dimetil sulfóxido, segundo Carpenter et al[71], atuando como depurador de radicais livres, foi capaz de aumentar a viabilidade de retalho cutâneo arterial em ratos submetidos ao mecanismo de isquemia reperfusão.

A importância da ativação plaquetária levando à isquemia tecidual observada no mecanismo de isquemia-reperfusao foi destacada por Yur-Ren et al[72]. Os autores estudaram os efeitos da “Nitrosoglutathion”, um doador de óxido nítrico, em um modelo de retalho cutâneo arterial em ratos. Como conclusão, observaram que a medicação doou apropriadamente óxido nítrico a ponto de suprimir a ativação plaquetária e a indução da óxido nítrico sintetase independente do cálcio (i ONS), resultando em menor ativação plaquetária, melhor perfusão sangüínea e maior viabilidade dos retalhos após a injúria da isquemia-reperfusão.

O papel de citocinas pró-inflamatórias como a interleucina-1 e fatores de crescimento (fator de crescimento transformante beta e fator de crescimento básico de fibroblasto) foram avaliadas através da administração do fator de crescimento endotelial vascular (FCEV) por Pang et al[73]. Em um modelo de retalho isquêmico dorsal em ratos, os autores concluíram que o FCEV exógeno pode proteger o retalho da injúria do mecanismo de isquemia-reperfusão através da regulação das citocinas pró-inflamatórias e inibição da produção do oxido nítrico citotóxico.

Klein et al[74] lograram sucesso ao desenvolver um modelo animal transgênico, capaz de produzir superóxido dismutase três a quatro vezes acima do que era produzido pelo controle, em um modelo de retalho cutâneo arterial em ratos. O estudo confirmou o efeito protetor da medicação contra a injúria do mecanismo de isquemia-reperfusão.

A análise do nível endógeno do Fator de Crescimento Endotelial Vascular (FCEV) em um modelo de retalho cutâneo ao acaso em ratos, delineando as relações entre a produção do FCEV endógeno com a lipoperoxidacão, e o efeito do FCEV endógeno com a área viável do retalho foi realizada por Zhang et al [75]. Os autores concluíram que a produção do FCEV endógeno foi significativamente

aumentada nos retalhos com isquemia moderada, porém diminuiu nos retalhos com isquemia grave. A administração de FCEV exógeno aumentou significativamente a área viável de retalhos isquêmicos.

A ação de um potente vasodilatador, o sildenafil, foi avaliada quanto à sua capacidade de aumentar a área viável de retalhos cutâneos ao acaso em um modelo em ratos por Sarifakioglu et al[76]. O Sildenafil age como inibidor seletivo da fosfodiesterase V. Os autores concluíram que a medicação teve um efeito dose-dependente para aumentar a viabilidade deste tipo de retalho.

Baseado na capacidade do fator de crescimento endotelial vascular (FCEV) e do óxido nítrico em produzir vasodilatacão, induzir a angiogênese e aumentar a área viável de retalhos, Komorowska-Timek et al[77] estudaram o efeito da aplicação de uma única dose intra-arterial do FCEV ou L-arginina, um substrato para produção do óxido nítrico, em retalho cutâneo arterial de ratos. Os autores concluíram que a administração do FCEV ou L-arginina diminuíram a necrose dos retalhos, porém, também aumentou a contração do retalho nas áreas de maior grau de necrose. Os dados de perfusão sugerem que os efeitos benéficos do FCEV e L-arginina, na viabilidade de retalhos, poderiam ser baseados em mecanismos diversos.

Enfatizando a importância da adesão dos neutrófilos ao endotélio vascular como fator importante na injúria tecidual que ocorre no mecanismo de isquemia-reperfusão, Gabriel et al[78], estudaram os efeitos da L-arginina na adesão endotelial dos neutrófilos na microcirculação, em um modelo de injúria da isquemia-reperfusão, em retalho muscular em ratos. Os autores observaram que a L-arginina parece diminuir os efeitos deletérios da adesão endotelial dos neutrófilos associada à injúria da isquemia-reperfusão, e que os efeitos da L-arginina foram revertidos por um inibidor da síntese de óxido nítrico, “L-NAME”, indicando que a L-arginina agiria via o

mecanismo de síntese do óxido nítrico. Estes resultados sugeriram um importante papel do óxido nítrico em diminuir a interação endotelial dos neutrófilos que ocorre no mecanismo de isquemia-reperfusão.

Explorando o potencial angiogênico de certos fatores de crescimento capazes de estimular a angiogênese localizada e melhorar a perfusão sangüínea, Huemer et al[79], utilizaram a terapia gênica para avaliar o efeito do fator de crescimento transformante beta, sendo expresso através de adenovírus injetados no espaço subdérmico, em um modelo de retalho cutâneo arterial em ratos. Os autores concluíram que houve um aumento significativo na área viável destes retalhos.

Fundamentando-se nos recentes achados de que o precondicionamento induz a expressão de proteínas de choque aquecidas (PCA), as quais podem ajudar na sobrevida celular em episódios agudos de stress, Harder et al[80], observaram se um aquecimento localizado precondicionante e a indução da PCA 70 aumentariam a viabilidade de um grande retalho randomizado em um modelo em porcos. Os autores concluíram que o aquecimento local precondicionante aumentou significativamente a área viável dos retalhos pela indução da PCA 70 e que desta forma obtém-se um método mais simples, mais barato e menos invasivo de precondicionamento.

A coadministração tópica de um facilitador de penetração, o ácido oléico, e do dimetil sulfóxido, para estudar a sobrevida de retalho cutâneo em um modelo em ratos foi instituído por Hsu et al[81]. O estudo determinou que um aumento estatisticamente significativo na sobrevida do retalho foi observado no grupo tratado unicamente com ácido oléico, e que este mesmo resultado não foi observado quando as drogas foram ministradas simultaneamente.

Fundamentando sua pesquisa na capacidade dos anestésicos locais como a lidocaína de promover relaxamento na musculatura lisa vascular e vasodilatacão periférica, Karaçal et al[82] estudaram a efetividade do EMLA, uma mistura de lidocaína e prilocaína, em prevenir a necrose de retalho cutâneo ao acaso em um modelo em ratos. Como conclusão, os autores observaram que o EMLA levou a um aumento significativo na viabilidade dos retalhos. Devido à viabilidade clínica, fácil administração, alto índice terapêutico e baixo custo, os autores consideraram o agente terapêutico como um candidato ideal para o propósito de uso clínico quando se tem como objetivo aumentar a viabilidade de retalhos.

Leal et al [83], verificaram a influência da pentoxifilina, droga que melhora a viscosidade sanguínea uma vez que aumenta a capacidade de deformação dos eritrócitos e granulócitos, e do cloridrato de buflomedil, droga que age através do bloqueio da passagem do cálcio para a musculatura lisa vascular promovendo vasodilatacão, na sobrevida de retalhos randomizados em ratos expostos à nicotina em doses que produzem níveis comparáveis a de fumantes humanos. Como conclusão, observaram que o buflomedil e a pentoxifilina, apesar da melhora observada na vascularização dos retalhos, não apresentaram resultados estatisticamente significantes.

Sá et al [84] estudando a extensão da área viável em retalhos pré-fabricados por implante vascular em ratos, concluíram que apesar dos retalhos submetidos à autonomização e, simultaneamente, implante do pedículo vascular apresentarem área viável significativamente maior, os mesmos não demonstraram um aumento significativo da densidade vascular em torno do pedículo implantado. Os autores explicaram seus resultados baseados na teoria de que ocorre um fechamento dos “shunts” pré-capilares devido à hipersensibilidade a catecolaminas circulantes no

final do período de autonomizacão. Esse resultado ia de encontro ao que foi observado por alguns autores[31,32,34,39,40], os quais relataram que o aumento da viabilidade dos retalhos autonomizados está associado à dilatação da arquitetura vascular preexistente, principalmente nos vasos capilares que ligam territórios adjacentes. Por outro lado, outros pesquisadores[28,30,35], apresentaram resultados frontalmente contrários, enaltecendo a importância do aumento na vascularização dos retalhos autonomizados como fator primordial para o ganho de área viável destes retalhos. Estes relatos deixam clara a necessidade de mais estudos nesta área para melhor entendimento da fisiopatologia da falência de retalhos cutâneos.

Diferentemente dos resultados conflitantes observados com o uso de medicação a fim de aumentar a viabilidade dos retalhos, a autonomização cirúrgica proporciona um aumento na área viável de retalhos cutâneos de forma efetiva e confiável. No entanto, a autonomização cirúrgica implica em uma seqüência de procedimentos, estendendo a permanência hospitalar dos pacientes. Situações como nos retalhos traumáticos e naqueles em que a estratégia cirúrgica necessita ser modificada na sala de cirurgia, os mesmos não podem ser beneficiados com o procedimento de autonomização prévia. Além disso, mesmo os retalhos autonomizados ocasionalmente apresentam perdas parciais ou totais. Portanto, um agente farmacológico capaz de aumentar a sobrevida de retalhos cutâneos isquêmicos é uma adição necessária ao arsenal cirúrgico atual[41].

1.4 Nitroglicerina tópica

A nitroglicerina tópica (gliceril trinitrato) é um agente atrativo para aumentar a área de sobrevida dos retalhos por várias razões. A nitroglicerina é um vasodilatador direto (arterial e, principalmente, venoso) com relato de uso em seres humanos desde de 1879, quando William iniciou a administração sublingual para alívio da angina aguda. O composto é prontamente hidrolizado no fígado pela enzima redutase de nitratos orgânicos dependente de glutationa a um dinitrato menos ativo. O pico de concentração plasmática é alcançado, em humanos, cerca de 5 minutos após administração sublingual, e o tempo estimado de meia-vida é de 7 ½ minutos. Os efeitos da droga são dose-dependente [41,85]. Os efeitos colaterais da nitroglicerina, em seres humanos, decorrem principalmente de sua ação cardiovascular: cefaléia, tonturas, sincope, enrubescimento e palpitações[85].

Quando usado pela via transdérmica, a nitroglicerina mostra um rápido início de ação e mais longa duração de eficácia terapêutica, por ser facilmente absorvida e evitar a primeira passagem ao nível do fígado[85].

Após a aplicação da nitroglicerina tópica as concentrações plasmáticas de nitroglicerina atingem um platô em 2 horas, o qual é mantido durante o período recomendado de aplicação. A altura deste platô é diretamente proporcional ao tamanho da área do sistema de liberação[41]. Após a remoção do NITRODERM TTS 5, o nível plasmático da nitroglicerina cai rapidamente[85].

Após alcançar a camada média muscular da parede dos vasos, a nitroglicerina é convertida em óxido nítrico, que por sua vez estimula a guanilato ciclase para produzir guanosina monofosfato cíclico (GMP cíclico). Esta substância produz

vasodilatacão pela queda do cálcio celular, seja pela inibição da entrada do íon cálcio, ou por facilitação do seu fluxo do citoplasma para o meio extracelular, induzindo o relaxamento da musculatura lisa. A sua principal ação sistêmica decorre de uma diminuição do tônus venoso[85].

Em detalhado estudo com agentes vasodilatadores e antiadrenérgicos, Hendel et al. [43] descreveram um aumento no fluxo sangüíneo em retalho cutâneo de pedículo axial, na parede abdominal de ratos, após aplicação tópica de nitroglicerina creme. Rohrich et al[44], posteriormente, demonstraram um aumento na viabilidade de retalhos cutâneos utilizando nitroglicerina em retalhos axiais de pedículo axial em ratos e porcos. Até hoje, não há relatos sobre o efeito desta medicação em retalhos pré-fabricados por indução vascular.

Um produto que contém nitroglicerina tópica, de liberação contínua e controlada, renovado a cada 24 horas, denominado NITRODERM TTS® (Novartis Pharma Ag, Suíça) foi utilizado no presente estudo em retalhos cutâneos pré-fabricados por indução vascular, com e sem autonomização simultânea, em um modelo em ratos.

O sistema utilizado tem a seguinte disposição:

	NITRODERM TTS 5
Quantidade de nitroglicerina liberada por hora	0,2 mg
Conteúdo total de nitroglicerina	25 mg
Área de liberação do fármaco	10 cm²

A nitroglicerina restante em cada sistema serve como reserva e não é liberada em uso normal. Por exemplo, após 12 horas cada sistema libera 10% do seu conteúdo original de nitroglicerina. Uma vez que a nitroglicerina é liberada por NITRODERM TTS 5 a uma velocidade constante por cm², a dose administrada depende do tamanho da área do sistema de liberação e das condições da pele, principalmente do estado de hidratação, o que pode causar variações no nível plasmático. A dose nominal de liberação de nitroglicerina *in vivo* é de aproximadamente 20 a 25 mcg/cm² x hora[41].

1.5 Objetivos

Os principais objetivos deste estudo foram:

- Estudar o efeito da nitroglicerina tópica sobre a área viável de um modelo de retalho pré-fabricado por implante vascular em ratos;
- Analisar o mecanismo da autonomização cirúrgica aplicada a retalhos pré-fabricados sob efeito da nitroglicerina tópica.

MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE (anexo 1). Os procedimentos descritos para manejo e cuidado dos animais em experimentação encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais.

Os animais eram alojados individualmente após cirurgia, fornecidas água e ração para ratos (Labina®) *ad libitum*, e mantidos no Biotério do Núcleo de Cirurgia Experimental.

O sistema terapêutico transdérmico, Nitroderm TTS®, é projetado para assegurar liberação controlada de nitroglicerina, através de uma membrana semipermeável, de forma contínua, por um mínimo de 24 horas, após aplicação sobre uma pele intacta. O sistema consiste em uma folha metálica na parte de trás, e um reservatório de droga, entre a folha metálica e a membrana semipermeável de difusão limitada. O reservatório contém nitroglicerina com lactose em um fluido de silicone para uso médico, adicionado ao dióxido de silicone coloidal para aumentar a viscosidade. A membrana semipermeável é um copolímero de acetato de etileno-vinil com um lado adesivo em contato com a pele, projetado para prover liberação uniforme de nitroglicerina.

Foi utilizada anestesia intraperitoneal com hidrato de cloral a 10%, na dose de 0,4mL/100g de peso corporal[55]. Durante o procedimento, era colocada um cateter para o fornecimento de oxigênio (0,2-0,5 l/min) direcionado para a narina do animal.

A anestesia foi igual para todos os grupos e a dose era suplementada, quando havia necessidade (figura 1).

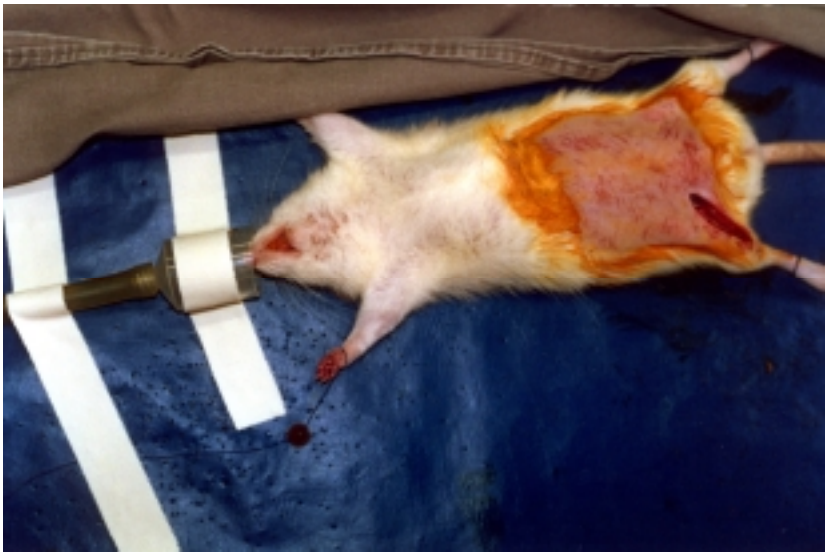


Figura 1. Disposição do animal anestesiado durante a cirurgia.

2.1 Implante do pedículo – primeiro tempo cirúrgico

Sob efeito da anestesia, o animal era fixado à mesa cirúrgica com presilhas, em decúbito dorsal. Realizava-se tricotomia na face anterior do abdome, região inguinal e face interna da coxa direita até o joelho. Procedia-se à anti-sepsia com solução de álcool iodado e assepsia com campo operatório. Uma incisão no sentido crânio-caudal era realizada da prega inguinal até próximo ao joelho. Por este acesso, dissecavam-se e isolavam-se os vasos femorais comuns e superficiais, com o auxílio de um microscópio cirúrgico dfv®, e os seus principais ramos eram ligados com fio de mononylon 9-0. O nervo femoral também era incluído no pedículo. Preservava-se uma camada de músculo de 1,0 a 1,5mm e estendia-se a dissecção até próximo ao joelho. Em seguida, era ligado distalmente o pedículo

vasculonervoso com fio de nylon 9-0 e seccionado. Na pele da parede abdominal do rato, distante cerca de 2,0cm da prega inguinal, no sentido cranial e em direção à linha média do abdome, fazia-se um orifício de 0,5cm, por onde era colocado um porta-agulhas microcirúrgico, que passava através de um túnel no subcutâneo da parede abdominal para tracionar o segmento proximal do pedículo. Desta forma, o pedículo era rebatido cranialmente, em direção à linha média do abdome, e exteriorizado na pele. A partir desse orifício, cerca de 0,5cm em direção cranial e à linha média, passava-se um ponto com fio de nylon 6-0 na pele, de fora para dentro, transfixava-se a camada de músculo do pedículo e exteriorizando-se de volta na pele onde o ponto era fixado. Fez-se um esforço para que, sepultando-se o pedículo no subcutâneo, ele ocupasse o local mais central possível, em relação à parede abdominal do rato. Todo o cuidado era dispensado no sentido de evitar-se a torção do pedículo, durante a sua transferência, e também de fazer com que os vasos ficassem em contato com a porção subdérmica na extensão maior possível. Durante a preparação do túnel, irrigava-se o pedículo com uma solução de lidocaína a 2%, sem vasoconstrictor, protegendo-o por uma compressa de gaze úmida, embebida em solução salina. Fechava-se a incisão para dissecção do pedículo, através de sutura simples com fio de nylon 5-0, e o orifício por onde o pedículo havia sido exteriorizado, com fio de nylon 6-0 (figura 2).

Nos retalhos submetidos à autonomizacão cirúrgica, Procedia-se a dissecção do pedículo de forma idêntica à anterior. Contudo, era desenhado um grande retalho cutâneo de base cranial, com a marcação começando no ponto médio do púbis e seguindo paralelo ao ligamento inguinal em direção à espinha ilíaca ântero-superior, donde se traçava uma linha vertical até a reborda costal do mesmo lado e do lado contralateral. A autonomização era obtida, descolando-se o retalho do seu leito até a

margem cranial e realizando-se as incisões sobre a marcação prévia, de modo que mantinha contato com o leito apenas por sua porção cranial. O pedículo, já dissecado, era então implantado no retalho, por meio de um túnel no subcutâneo, e fixado à pele do retalho, como descrito previamente. Após a fixação do pedículo, suturava-se o retalho ao leito com fio de nylon 5-0 (figura 3).

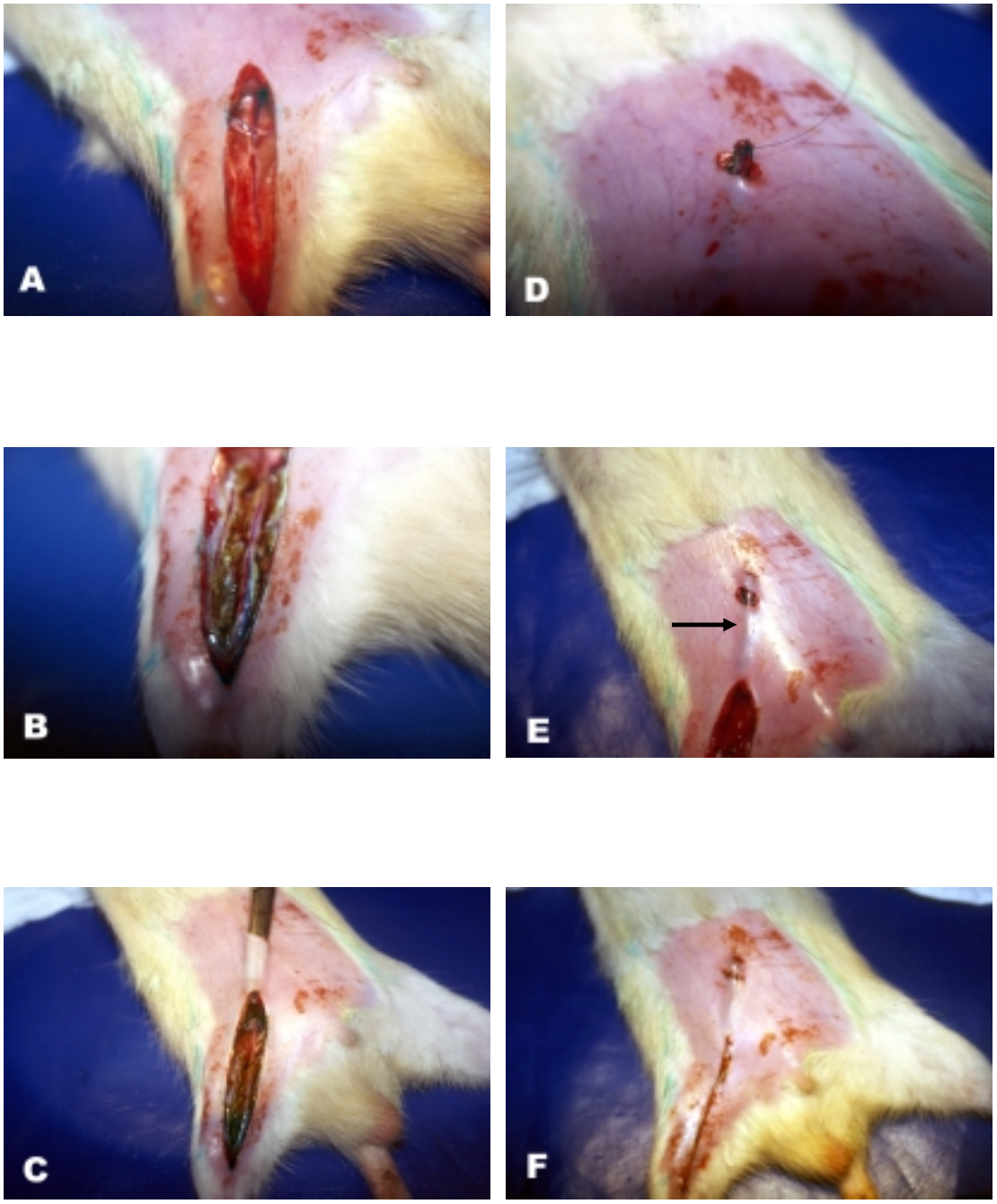


Figura 2. Implante do pedículo femoral na pele do abdome: (**A**) visualização do pedículo; (**B**) pedículo dissecado com uma camada de músculo; (**C**) colocação de um porta-agulhas através de um túnel para rebater o pedículo; (**D**) pedículo rebatido para o abdome após ligadura e secção distal; (**E**) pedículo fixado com ponto 0,5cm acima da incisão para formação do túnel (seta); (**F**) final do implante do pedículo com fechamento das incisões.

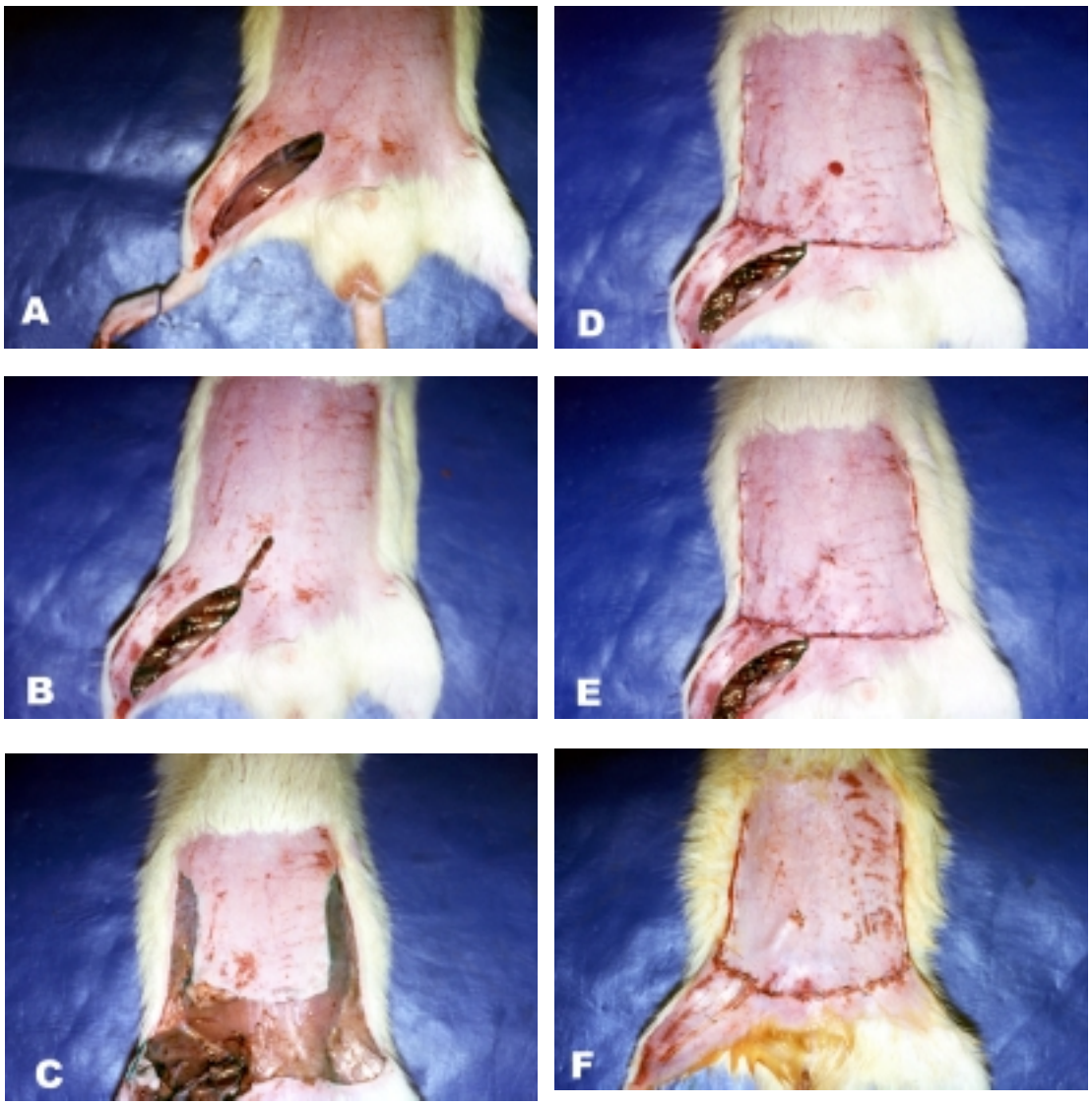


Figura 3. Implante do pedículo no retalho autonomizado: (**A**) pedículo femoral dissecado; **(B)** pedículo seccionado distalmente e rebatido; (**C**) retalho autonomizado de pedículo cranial: incisões laterais e inferior e retalho liberado do leito; (**D**) retalho suturado ao leito, mostrando a abertura do túnel por onde passava o pedículo; (**E**) pedículo fixado à pele do retalho; (**F**) final do implante do pedículo no retalho autonomizado.

2.2 Elevação do retalho – segundo tempo cirúrgico

Após três semanas, elevava-se um retalho desenhado em ilha, seguindo os mesmos pontos de referência dos retalhos autonomizados, no primeiro tempo cirúrgico. Nesse tempo, o retalho demarcado era fotografado e a área obtida denominada área inicial (Ai). Complementando aquelas incisões, a partir da reborda costal de cada lado, eram feitas incisões oblíquas em direção ao apêndice xifóide. O retalho assim elevado tinha como única fonte de nutrição o pedículo implantado (figura 4). Realizava-se a dissecção no local dos vasos, com microscópio cirúrgico, como se fora um retalho livre. Após a elevação do retalho, suturava-se “in situ” com fio de nylon 5-0.

Para o grupo submetido à autonomizacão, o retalho previamente mantido com base superior, neste tempo (após três semanas) era totalmente liberado do leito, exceto pelo pedículo implantado (figura 4). A dissecção no local dos vasos também era realizada com o microscópio cirúrgico e a área obtida pela demarcação do retalho era denominada área inicial (Ai). Após a elevação, o retalho era suturado “in situ”, por sutura simples, com fio de nylon 5-0.

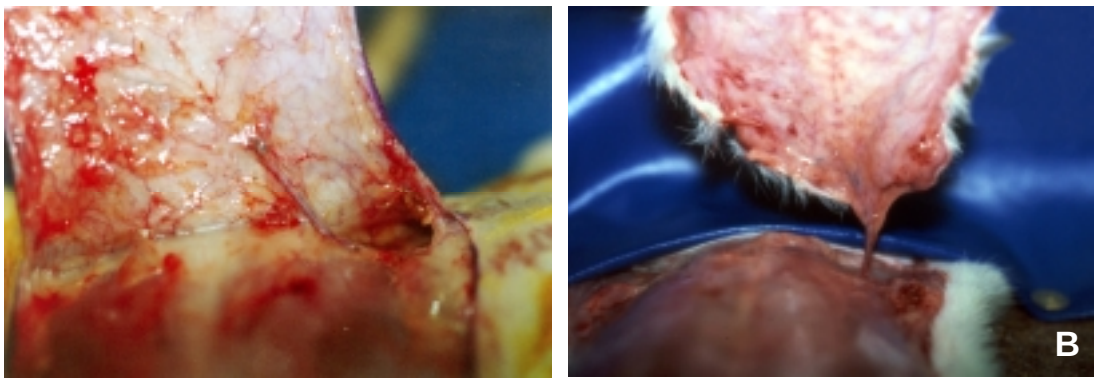


Figura 4. Retalho elevado após três semanas. Intra-operatório: (A) identificação do pedículo femoral implantado na parede abdominal do rato. (B) Observa-se como única fonte de nutrição o pedículo implantado

Os ratos que receberam nitroglicerina tinham um sistema terapêutico transdérmico (STT) aplicado no meio do retalho por 7 dias após a cirurgia. Este sistema continha 25 mg de nitroglicerina sobre uma membrana de 10 cm² com uma taxa de liberação *in vivo* de 5 mg por 24 horas[85] (figura 5).

Figura 5. STT de nitroglicerina colocado sobre o retalho

O STT de nitroglicerina era colocado logo após o segundo tempo cirúrgico, era trocado diariamente, e a medicação mantida por sete dias. Durante este período o retalho era nutrido exclusivamente pelo pedículo implantado.

O STT era mantido no local por uma fita adesiva (esparadrapo), de 5 cm de largura, aplicada sem tensão, conhecida como aparato de Montgomery. Este último era construído colocando-se uma fita adesiva ao redor da região dorsal, com extremidades ântero-laterais livres, dobradas sobre si, para permitir que a armação pudesse ser apertada. Em cada fita adesiva, uma fenda era feita nas duas extremidades, permitindo a passagem, de dentro para fora, de uma compressa de gaze dobrada. Ao amarrar sem tensão a gaze, as extremidades eram aproximadas por sobre o STT, fixando-a ao mesmo e mantendo-o no local (Fig 6).

Figura 6. Curativo sem tensão para Fixação do STT sobre o retalho na parede abdominal do rato.

2.3 Distribuição dos animais em grupos

Foram utilizados 40 ratos machos, da raça Wistar, pesando entre 300 e 350g, provenientes do Biotério do Departamento de Nutrição do Centro de Ciências da Saúde - UFPE. Os animais foram divididos em quatro grupos:

Grupo 1 (Controle do grupo 3). Este grupo era formado pelos animais que **não** receberam o STT de nitroglicerina após a elaboração do retalho pré-fabricado por implante vascular **não** autonomizado.

Grupo 2 (Controle do grupo 4). Este grupo era formado pelos animais que **não** receberam o STT de nitroglicerina após a elaboração do retalho pré-fabricado por implante vascular **autonomizado**.

Grupo 3. Este grupo recebeu um STT de nitroglicerina imediatamente após a elaboração do retalho pré-fabricado por implante vascular **não** autonomizado. O dispositivo era trocado diariamente durante sete dias consecutivos.

Grupo 4. Este grupo recebeu um STT de nitroglicerina imediatamente após a elaboração do retalho pré-fabricado por implante vascular **autonomizado**. O dispositivo era trocado diariamente durante sete dias consecutivos.

2.4 Avaliação de área

Sete dias após terem sido deixados os retalhos pediculados unicamente pelos vasos implantados, os grupos eram novamente fotografados para avaliação das áreas viáveis.

As áreas obtidas, nesse tempo, eram chamadas áreas finais (Af). As fotografias foram obtidas por um único pesquisador com a câmara Cânon®, modelo EOS ELAN, com lentes Macro EF 50 mm 1: 2,5 fixa e mantida a uma distância de 10cm do objeto.

Transferiam-se as fotografias para um microcomputador, através de um Scaner Agfa®, modelo SnapScan 1236. As áreas Ai e Af eram mensuradas pelo programa "AutoCAD R14"[79]. Para tanto, colocava-se um molde de $1cm^2$ em todas as fotos e, antes da medição, empregava-se um fator de escala para que os resultados fossem obtidos de maneira uniforme em centímetros quadrados (figura 7).

O valor representativo da área viável para cada animal era obtido pela divisão do valor da Af pelo da Ai. Os dados para análise eram valores relativos, expressos como percentual de área viável em relação à área original do retalho. Em cada animal, as áreas Af e Ai eram medidas três vezes, pelo mesmo pesquisador. Portanto, o resultado final para áreas era obtido por média aritmética.

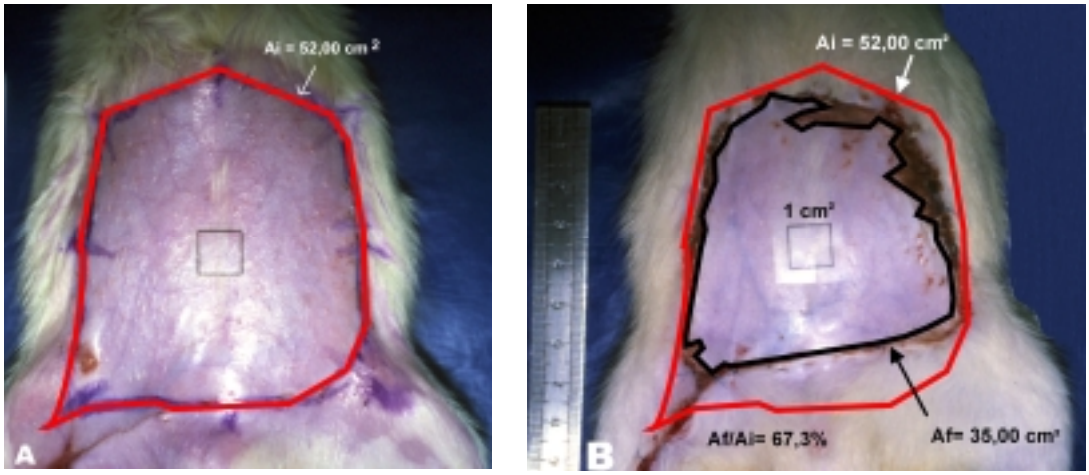


Figura 7. Delineamento das áreas calculadas pelo AutoCAD em rato do grupo 2: (A) área inicial; (B) área final

2.5 Estudo histológico

Após a fotografia das áreas finais, os retalhos eram retirados e submetidos a estudo histológico.

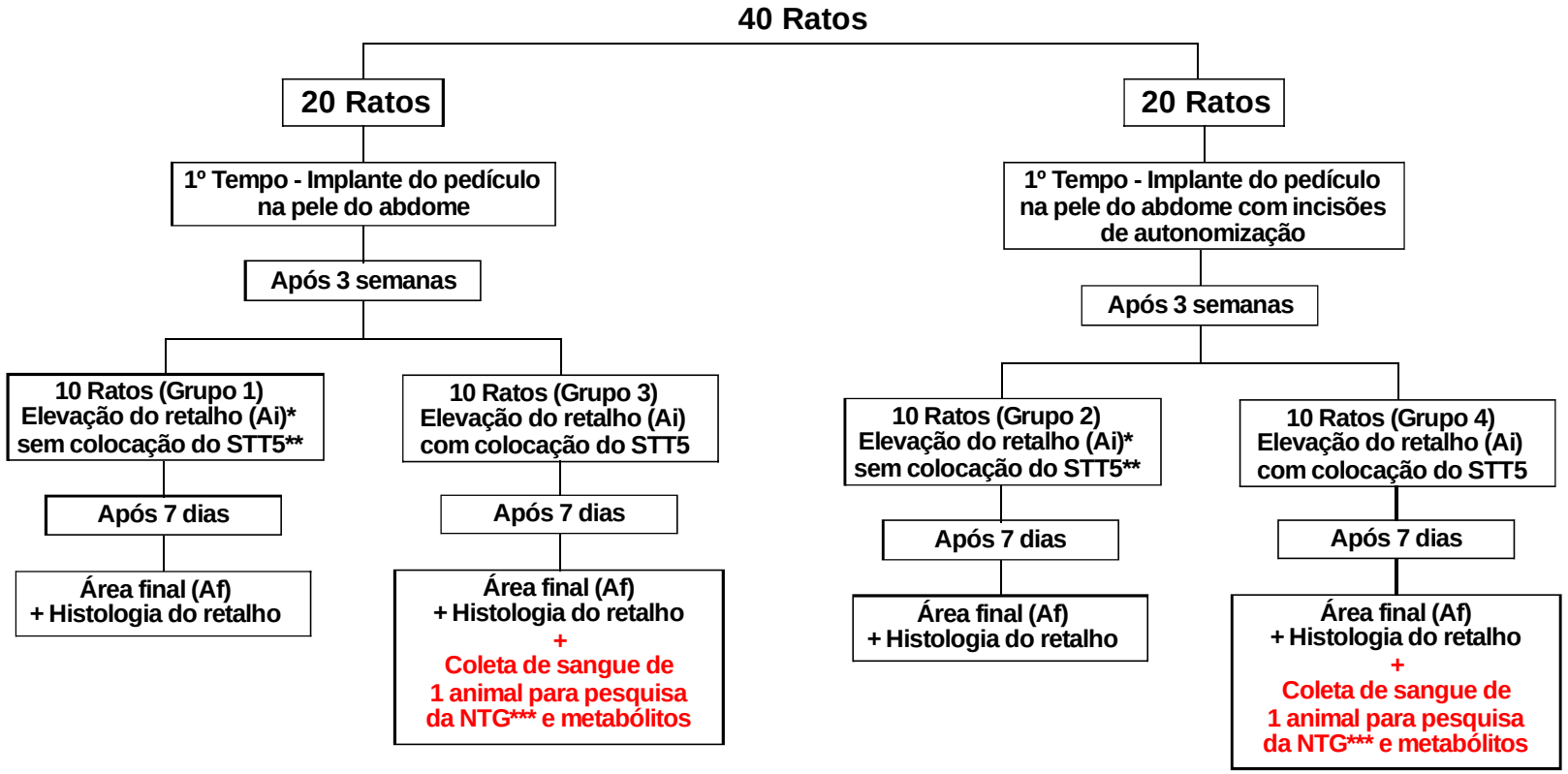
Os seguimentos cutâneos eram fixados em solução aqüosa de formaldeído a 10%, por 24h, desidratados em escala ascendente de álcool etílico, diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Cortes com espessura de 5μm foram corados com hematoxilina-eosina. Os cortes histológicos assim obtidos eram constituídos de pele, tecido celular subcutâneo (TCS) e músculo estriado.

Todo o retalho, incluindo áreas com viabilidade e com necrose, era estudado microscopicamente. Os fragmentos foram retirados de uma área macroscopiamente viável, de transição e necrótica.

As imagens foram fotografadas no microscópio trinocular Olympus® CX 31 com câmara digital Samsung® SDC-415 adaptada e um programa de captura de imagens ATI multimídia center.

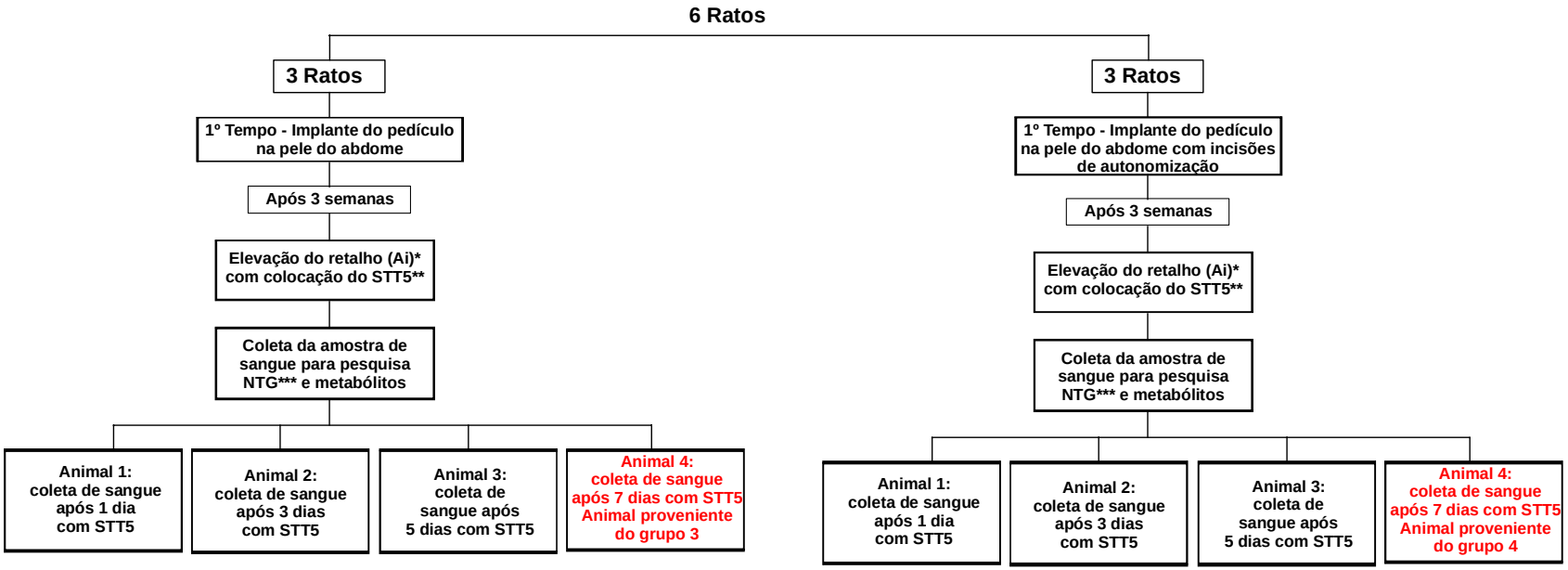
2.6 Análise da nitroglicerina e seus metabólitos no plasma

Com o intuito de se certificar que a nitroglicerina estava sendo absorvida através da pele e alcançando a corrente sangüínea dos animais tratados com o STT, decidiu-se retirar uma amostra de sangue de animais em uso do STT no primeiro, terceiro, quinto e sétimo dias de tratamento com a medicação. Desta forma, um animal do grupo 3 e um do grupo 4, ao final do sétimo dia de utilização do STT, tinham uma amostra de sangue retirada para detecção da nitroglicerina sérica. Para detecção da medicação no primeiro, terceiro e quinto dias foi realizado um estudo em separado. Neste estudo em separado havia dois grupos cada um com 3 animais. Foram repetidos os mesmos procedimentos realizados nos grupos 3 e 4. As amostras de sangue dos animais foram colhidas no primeiro, terceiro e quinto dias de uso do STT. Cada animal fornecia uma única amostra de sangue. Portanto, o estudo correspondia à detecção da nitroglicerina sérica, liberada pelo STT no primeiro, terceiro, quinto e sétimo dias de pós-operatório (organograma).



*Ai=área inicial
**STT5=Sistema terapêutico transdérmico
***NTG=Nitroglicerina

Estudo em separado para pesquisa da NTG e Metabolitos



*Ai=área inicial
**STT5=Sistema terapêutico transdérmico
***NTG=Nitroglicerina

O preparo da amostra era realizado como se segue: para 0,5 ml de plasma do animal, era adicionado 0,1 ml de 1 Molar de nitrato de prata, e extraia-se três vezes com 2 ml de metanol. A camada orgânica era coletada e condensada até cerca de 1 ml. Após centrifugação (1000 g, 10 min), 100 – 300 µl da solução era submetida a análise[87].

Os níveis séricos de nitroglicerina e seus metabólitos eram analisados utilizando *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC), no departamento de química industrial da UFPE. O sistema era composto de:

- HPLC com bomba, modelo CG 480 – E
- Detector ultravioleta, modelo CG – 437 B, a 220 nm.
- Sistema isocrático
- Fase móvel: Água/metanol (6:4), a 1 ml/min.
- Volume injetado: 20 µl
- Integrador – Processador modelo CG – 300
- Coluna 250 mm x 4,6 mm

O padrão analítico para a nitroglicerina foi obtido no laboratório de Química Industrial da UFPE a partir da nitroglicerina contida no STT. Os metabólitos 2-mononitroglicerina (referência M078) e 1,2- dinitroglicerina (referência D010) foram comprados do laboratório Radiam (Austin, Texas, Estados Unidos) e usados como recebidos[87].

2.7 Análise estatística

Na análise estatística dos dados, a variável resposta foi a relação entre a área final e a inicial. Os valores obtidos foram transformados em percentagem. O cotejo das distribuições dessa relação entre os grupos foi realizado através do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, tendo em vista que os pressupostos para a utilização do teste paramétrico ANOVA (Análise de Variância) não foram considerados satisfatórios. As comparações das distribuições da relação entre área final e área inicial entre pares de grupos, após realização do teste de Kruskal-Wallis, foram realizadas através do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. Em todos os testes adotou-se o nível de significância de 5%.

Resultados

3.1 Avaliação qualitativa dos retalhos

Não se observou qualquer área de necrose dos retalhos submetidos ao primeiro tempo da autonomização cirúrgica, grupos 2 e 4. Estes retalhos tinham como fontes de nutrição sua base cranial e o pedículo recém-implantado. Um aumento no calibre dos vasos dispostos longitudinalmente no retalho, sentido crânio-caudal, vistos por transparência através da pele, foi observado sistematicamente, por ocasião do segundo tempo cirúrgico, nos grupos submetidos à autonomização (figura 8) .

Figura 8. Disposição e calibre dos vasos da pele da parede abdominal do rato três semanas após a autonomização.

Sete dias após o segundo tempo, a necrose já estava bem definida e o tecido viável foi delimitado para quantificação da área. A evolução das áreas viáveis e não-viáveis revelou-se uniforme nos quatro grupos. Durante a elevação dos retalhos, as áreas viáveis apresentavam, rotineiramente, sangramento das bordas. Com dois dias, apresentavam-se congestas e edemaciadas. Por volta do quinto dia, o edema havia desaparecido, a coloração dessas áreas era rosa e elas apresentavam enchimento capilar conservado. As áreas necrosadas eram pálidas, imediatamente após a elevação, tornavam-se escuras posteriormente e, por volta do sétimo dia, estavam secas, retraídas e com coloração preta.

3.2 Avaliação quantitativa das áreas

No grupo 1, houve, em média, uma viabilidade de 8,9% do retalho, três semanas após o implante do pedículo. No grupo 2, observou-se, em média, uma viabilidade de 49,4% do retalho. No grupo 3, a viabilidade média alcançou 8,4%, após três semanas do implante do pedículo.No grupo 4, a viabilidade média alcançou 1,1%, após três semanas do implante do pedículo (anexo 2).

A tabela 1 apresenta as principais estatísticas descritivas da área inicial (Ai), área final (Af) e da relação entre área final e área inicial (Af/Ai), de acordo com os grupos experimentais.

Tabela 1. Principais estatísticas descritivas da área inicial, área final e da relação entre área inicial e área final, de acordo com os grupos experimentais.

		Estatísticas descritivas					
Grupo	**Variável**	**n**	**Média**	**DP**	**Mínimo**	**Mediana**	**Máximo**
1	Ai	10	47,1	5,2	38,6	47,8	55,8
	Af	10	4,1	5,1	0,4	2,2	16,5
	Af/Ai (%)	10	8,9	10,9	0,8	4,6	35,3
2	Ai	10	46,0	4,4	38,0	47,8	50,6
	Af	10	22,5	10,8	4,4	23,4	36,0
	Af/Ai (%)	10	49,4	23,2	8,8	51,4	79,6
3	Ai	10	37,6	7,6	27,1	37,3	47,0
	Af	10	3,0	2,5	0,0	3,6	7,0
	Af/Ai (%)	10	8,4	8,0	0,0	7,9	25,7
4	Ai	10	35,7	9,6	28,3	32,7	58,5
	Af	10	0,4	0,8	0,0	0,0	2,4
	Af/Ai (%)	10	1,1	2,5	0,0	0,0	8,1

O gráfico 1 mostra geometricamente as distribuições dos valores da relação Ai/Af, expressos em percentagem, segundo os grupos experimentais.

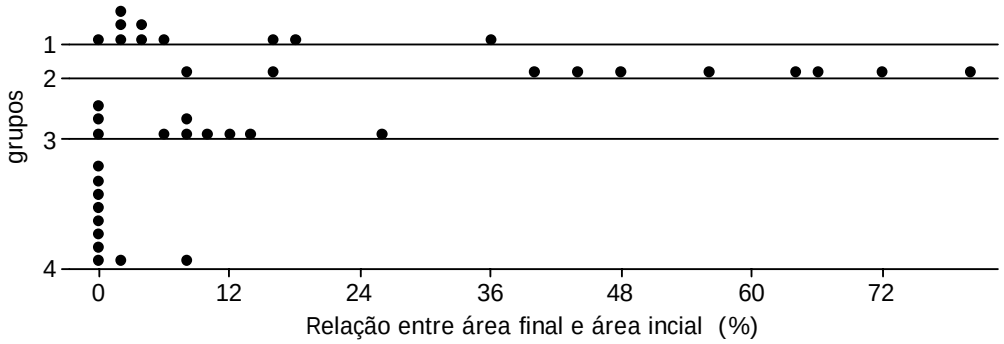


Gráfico 1. Representação geométrica das distribuições dos valores da relação Af/Ai (%), segundo os grupos experimentais.

O quadro 1 mostra o ordenamento dos grupos experimentais de acordo com a ordem crescente de seus postos médios. Quanto maior for o posto médio de um grupo, maiores foram os valores da relação Af/Ai daquele grupo em comparação com os grupos anteriores na ordenação.

Quadro 1. Ordenamento dos grupos experimentais, segundo a ordem crescente de seus postos médios**.**

Grupo	**4**	**3**	**1**	**2**
Posto médio	8,3	19,2	20,0	34,5

O resultado do teste Kruskal-Wallis indica que houve diferenças signficantes entre os quatro grupos experimentais no que diz respeito à distribuição dos valores da relação Af/Ai ($p < 0,001$; gráfico 1). O teste de comparação múltiplas de Bonferroni revela que os seguintes pares de grupos apresentaram diferença significante quanto à distribuição da relação Af/Ai:

Grupo 1 e Grupo 2 ($p = 0,005$)

Grupo 1 e Grupo 4 ($p = 0,024$)

Grupo 2 e Grupo 3 ($p = 0,003$)

Grupo 2 e Grupo 4 ($p < 0,001$)

As demais comparações realizadas, grupo 1 com grupo 3 e grupo 3 com grupo 4, não apresentou diferença estatisticamente significante quanto à distribuição da relação Af/Ai.

A figura 9 mostra a Af de uma amostra de cada um dos quatro grupos.

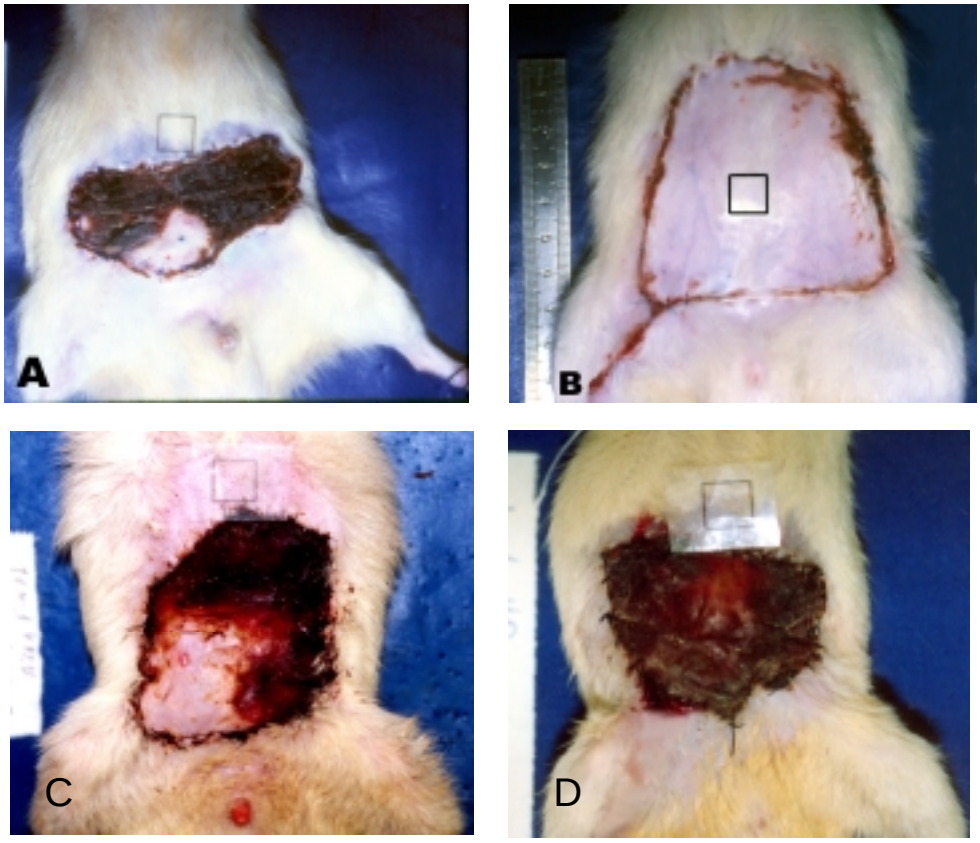


Figura 9. Áreas finais de retalhos cutâneos abdominais suturados “in situ”, 7 dias após terem sido elevados: **(A)** retalho com implante vascular sem autonomização, grupo 1; **(B)** retalho com implante vascular e autonomização, no mesmo tempo cirúrgico, grupo 2; **(C)** retalho com implante vascular sem autonomização no qual foi colocado um STT de nitroglicerina, grupo 3; (D) retalho com implante vascular e autonomização no mesmo tempo cirúrgico, no qual foi colocado um STT de nitroglicerina, grupo 4.

3.3 Histologia

Os cortes histológicos foram realizados na área viável, na área de necrose e na área de transição entre tecido necrótico e tecido viável do retalho. No estudo histológico a pele está representada por epiderme e derme com numerosos folículos pilosos e glândulas sebáceas de permeio. No tecido celular subcutâneo, além de tecido conjuntivo e adiposo, observam-se vasos arteriais e venosos, filetes nervosos e feixe de músculo estriado esquelético em corte transversal.

Na área de transição entre pele preservada e isquêmica a epiderme encontra-se com necrose coagulativa e por vezes revela erosão. Há presença de infiltrado neutrofílico subepidérmico que se estende à derme em alguns pontos, com vasos arteriais obstruídos. A derme revela ainda proliferação fibroblástica com áreas de colágeno espesso. Há ausência de anexos cutâneos e músculo estriado esquelético na área correspondente à necrose epidérmica. Na base do segmento frequentemente observa-se tecido de granulação.

Tais achados foram identificados em todos os grupos. Figura 10.

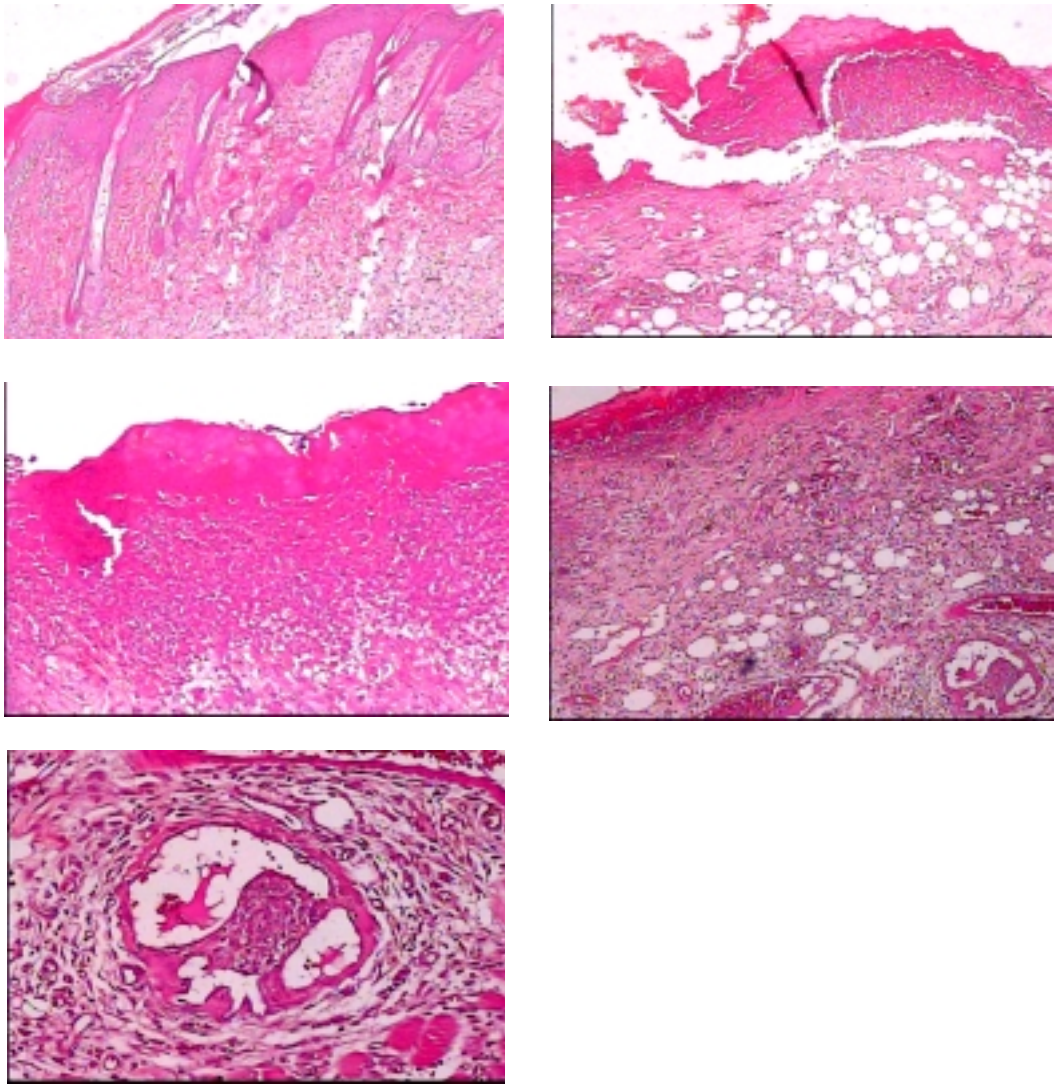


Figura 10. A: Pele preservada com anexos íntegros (40x); B: Epiderme necrótica (40x); C: Infiltrado neutrofílico subepidérmico (40x); D: Derme com infiltrado inflamatório (40x); E: Vaso arterial trombosado (100x)

3.4 Análise da nitroglicerina e seus metabólitos no plasma

Os resultados dos estudos sobre a eficiência do sistema de liberação da medicação (STT 5) e o efeito sistêmico da dose liberada indicaram que a nitroglicerina foi transportada através da pele dos retalhos para dentro dos mesmos. Através do HPLC os metabólitos da nitroglicerina foram identificados no plasma de todos os animais submetidos ao método. Figura 11.

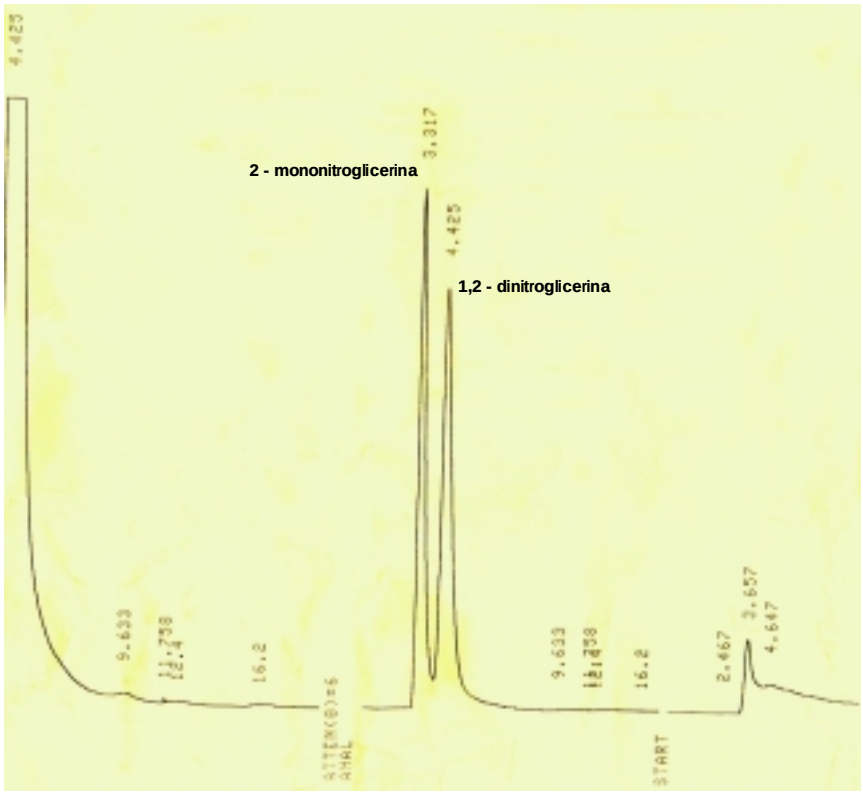


Figura 11. Cromatograma líquido de alta performance ultra-violeta de uma amostra do plasma de rato, 7 dias após utilização contínua do STT5 de nitroglicerina. Fase móvel = 40% metanol, pico 1 = 2 – mononitroglicerina; pico 2 = 1,2 - dinitroglicerina.

Discussão

4.1 Escolha do modelo experimental

Para a autonomização cirúrgica de um retalho faz-se necessário diminuir o aporte sangüíneo para o mesmo, antes de sua transferência definitiva. Esta diminuição do aporte sangüíneo poderá ser realizada em tempo único ou gradativo, através de incisões realizadas na periferia do retalho. Por isso, é importante o estudo prévio dos pedículos vasculares responsáveis por uma determinada região, de forma que, ao realizar as incisões de autonomização, o aporte sangüíneo não seja comprometido, a ponto de provocar o surgimento de áreas de necrose durante o processo de autonomizacão. No presente estudo, buscou-se criar um modelo de retalho cutâneo pré-fabricado, no qual a área viável era passível de mensuração, permitisse a realização da autonomizacão cirúrgica e utilização tópica da medicação, e ainda, pudesse ser empregado clinicamente. O pedículo femoral e a pele da parede abdominal de ratos apresentam alguns atributos, que os predispõem a servir de modelo adequado a um grande retalho autonomizado e pré-fabricado. Dentre os principais atributos podem citar-se: (1) a anatomia vascular constante da região femoral; (2) a quantidade de pele disponível, na parede abdominal, a ser incluída no retalho; (3) a localização periférica, permitindo fácil acesso e monitorização; (4) a baixa morbidade observada em decorrência da manipulação dessas regiões.

Em nenhum caso se observou necrose ou paralisia do membro inferior direito dos ratos em decorrência da utilização do pedículo femoral vasculonervoso. Incluiu-

se no retalho, uma quantidade grande de pele, porquanto, se uma área pequena fosse utilizada e houvesse uma viabilidade de 100%, nos quatro grupos, não se poderia avaliar que extensão de pele viável cada procedimento seria capaz de proporcionar. Dessa forma, a ocorrência de necrose era fundamental, pois refletia a quantidade máxima de área viável, obtida em decorrência do procedimento cirúrgico empregado em cada grupo.

No presente estudo, o modelo experimental utilizado permitiu estudar a autonomizacão sem que ocorresse necrose na porção distal do retalho no primeiro tempo cirúrgico. Isto ocorreu graças à vascularização própria da parede abdominal dos ratos, o que permitiu deixar o retalho pediculado com base cranial, sem que houvesse necrose, durante a autonomização. Isso pode ter influenciado na extensão final da área viável. Com efeito, Khouri et al[15], em 1991, circundando com um pedículo fasciovascular a articulação interfalangiana proximal do segundo artelho direito, parcialmente desvascularizada pela dissecção, relataram que o grau de isquemia do bloco de tecido dissecado, no momento do implante de um pedículo que o iria prover com uma fonte alternativa de perfusão, era um importante fator na pré-fabricação. Enquanto a isquemia moderada se tem mostrado um fator benéfico, a isquemia total leva à morte tissular. Nos grupos 2 e 4, acreditou-se que, ao diminuir a vascularização dos retalhos com as incisões de autonomização, a isquemia parcial poderia criar condições para que o pedículo ofertasse nutrição mais eficaz.

A inclusão de uma pequena camada muscular de 1,0 a 1,5mm, como também do nervo, ao redor do pedículo dissecado, tinha como única função diminuir os traumas da manipulação direta sobre o pedículo, durante a dissecção, e não influenciar na sobrevida dos retalhos. Este relato está em concordância com o

trabalho de Kostakoglu et al[22], 1995, onde concluíram que os retalhos musculares pré-fabricados, denervados ou reinervados, não apresentaram diferença significativa com relação à sobrevida dos retalhos. E concorda também com Falco et al[16], 1992 e Yap-Legaspi et al[23], 1995, cujos estudos concluíram que a quantidade de tecido perivascular ao redor do pedículo não afetou, estatisticamente, o grau de neovascularização dos enxertos de pele em retalhos pré-fabricados.

4.2 Período entre o implante vascular e a elevação do retalho

No presente estudo, o tempo entre o implante do pedículo e a elevação do retalho foi de três semanas. A questão era saber quanto tempo o pedículo deveria permanecer implantado até que fosse capaz de garantir uma nutrição adequada ao retalho. Há um consenso entre os autores de que existem dois padrões principais de vascularização de um seguimento de pele a partir de um pedículo implantado, são eles: conexão entre os vasos doadores (vasos do pedículo implantado) e receptores (vasos existentes no seguimento de pele), e brotamento e arborização de novos vasos provenientes do pedículo implantado[7,8,14,16]. No entanto, o tempo em que o pedículo deve permanecer, até que o retalho possa ser elevado com segurança, ainda não está definido em humanos. Embora experimentalmente existam vários estudos com esse propósito, na prática, eles têm servido tanto para esclarecer, quanto para confundir essa questão [6-9,14,18,25].

Morrison et al[14] foram os primeiros a investigar a pré-fabricação de retalhos finos de pele, de padrão axial, e a discutir as prováveis aplicações clínicas. Concluíram que deve haver um intervalo de pelo menos oito semanas, entre o

implante do pedículo e a elevação, com sucesso, de um retalho fino de pele, baseado no pedículo implantado.

Duffy et al[18] relataram que pequena quantidade de tecido colado diretamente sobre um pedículo implantado tornava-se neovascularizado com relativa rapidez. Entretanto, retalhos maiores e potencialmente mais úteis, necessitavam de um período de seis semanas.

Maitz et al[21] demonstraram sobrevida de quase 100% em retalhos com tamanho de 1 x 6cm (área de 6cm^2), elevados após seis semanas do implante do pedículo em coelhos.

No grupo 2 do presente trabalho, ao contrário do que foi relatado pelos trabalhos mencionados acima, três grandes retalhos (área média de 47,7cm^2) autonomizados e pré-fabricados por implante vascular, no mesmo tempo cirúrgico, evoluíram com área viável de aproximadamente 100%, três semanas após o implante do pedículo. Na prática clínica, é uma vantagem considerável conseguir-se não só diminuir o tempo entre o implante do pedículo e a elevação do retalho, como também se maximizar a quantidade de tecido a ser transferida. Esses resultados estavam de acordo com os relatados por Yao[8], Hirasé et al[12], Takato et al[17] e Stepan et al[19], os quais demonstraram não haver mais proliferação dos vasos neoformados, em ratos, após 21 dias.

Ainda não se sabe, com total segurança, qual o verdadeiro tamanho do retalho que pode ser utilizado, livre ou pediculado, após o implante vascular. A injeção de contraste no pedículo é uma forma de delimitação de área. Entretanto, além de pouco prática, não é totalmente confiável.

Ao autonomizar um retalho pré-fabricado, busca-se um efeito somatório, no sentido de otimizar sua viabilidade e, com isso, aumentar o aporte sangüíneo através do leito capilar. Isso permite que uma parte maior do retalho receba nutrição suficiente para sua sobrevivência, no momento em que se deixa o pedículo implantado como a única fonte de alimentação do retalho. Esse é o período crítico de isquemia[20,21,34].

4.3 Escolha do agente farmacológico

No presente estudo utilizou-se o sistema adesivo terapêutico transdérmico de NITRODERM STT 5 disponível no comércio, formado por várias camadas, com a capacidade de liberar nitroglicerina de forma contínua após aplicação na pele. Nos casos onde a permeabilidade da pele é excessiva, a liberação do fármaco é limitada pela própria membrana de controle. A substância ativa penetra na pele e torna-se biodisponível diretamente na circulação sistêmica em concentração relativamente constante durante o período de aplicação recomendado.

Algumas vantagens observadas no uso tópico da nitroglicerina podem ser destacadas:

- A droga é facilmente encontrada no comércio, já na forma de ser utilizada clinicamente (NITRODERM TTS), dispensando qualquer preparo;
- O uso tópico da nitroglicerina, ao contrário do parenteral, permite um nível terapêutico efetivo tecidual, sem que haja uma distribuição significativa sistêmica da droga, e com alto índice terapêutico em seres humanos;

- A medicação pode ser facilmente administrada no pós-operatório, mesmo nos casos de acompanhamento clínico em caráter ambulatorial.

Todavia, um agente farmacológico ideal capaz de prevenir ou reverter à isquemia em retalhos cutâneos permanece elusivo. Segundo Rohrich et al[44], tal agente deveria apresentar as seguintes características:

1. Viabilidade clínica;
2. Fácil administração;
3. Alto índice terapêutico (segurança);
4. Resultados reproduzíveis;
5. Uso exclusivo no pós-operatório;
6. Custo efetivo;
7. Mecanismo de ação conhecido;
8. Bioviabilidade estabelecida;
9. Capacidade de prevenir totalmente a necrose de retalho.

No presente estudo houve uma preocupação de detectar a nitroglicerina plasmática, uma vez que a base do experimento estava condicionada à ação da medicação. Era importante saber se a medicação havia passado para corrente sangüínea do animal durante o tempo em que o mesmo permaneceu com o STT aderido a sua pele. Para tanto, um estudo em separado foi realizado, repetindo os mesmos tempos cirúrgicos dos grupos 3 e 4. Ao final, eram analisadas amostras no primeiro, terceiro, quinto e sétimo dias, escolhidos aleatoriamente, após utilização do STT 5 transdérmico. Desta forma, caso a medicação fosse detectada na corrente sangüínea destes animais, havia segurança de afirmar que os resultados

observados estavam condicionados à ação da medicação. A detecção era realizada por HPLC no departamento de química industrial da Universidade Federal de Pernambuco. Como resultado desta análise, em todos os casos foi confirmada a presença dos principais metabólitos (2-mononitroglicerina e o 1,2- dinitroglicerina) da nitroglicerina no plasma destes animais em comparação a um padrão. A confirmação da nitroglicerina no sangue dos animais, onde a amostra de sangue foi colhida aleatoriamente, deu segurança para afirmar que os resultados obtidos nos grupos 3 e 4 eram realmente decorrentes da ação da nitroglicerina.

A dosagem dos metabólitos se faz necessária e está de acordo com o que é relatado nos trabalhos que tem por objetivo a dosagem plasmática da nitroglicerina e seus metabólitos. Há uma unanimidade em afirmar que as concentrações dos metabólitos são notoriamente maiores que a da nitroglicerina, uma vez que os tempos de meia-vida destes metabólitos são consideravelmente mais longos do que o da nitroglicerina (30-60 minutos para dinitroglicerinas, 5-6 horas para mononitroglicerinas)[87].

Em estudo prévio, Sá et al. [84] observaram que nos retalhos submetidos à autonomização cirúrgica com implante de um pedículo vascular simultâneo, o percentual de área viável era significativamente maior que aqueles submetidos ao mesmo tipo de implante vascular, porém sem autonomização . Além disso, os autores demonstraram que a densidade vascular em torno do pedículo implantado não mostrou diferença do ponto de vista estatístico ao comparar estes dois grupos. Ou seja, a autonomização cirúrgica apesar de aumentar a área viável dos retalhos, não contribuiu para aumentar a vascularização dos mesmos, a partir do pedículo implantado. Portanto, o objetivo da utilização da nitroglicerina, no presente estudo, atendia a dois propósitos: 1- observar se a droga era capaz de proporcionar um

aumento da área viável dos retalhos, semelhante ao obtido com a execução da autonomização cirúrgica no modelo em estudo; 2- procurar entender como a autonomização cirúrgica era capaz de aumentar a área viável dos retalhos cutâneos, a partir do mecanismo de ação de vasodilatação principalmente venosa da nitroglicerina[85] . Para atender ao segundo propósito, a nitroglicerina foi utilizada no grupo onde os retalhos eram submetidos à autonomização cirúrgica.

4.4 Análise dos grupos

As comparações entre as áreas foram possíveis graças à transformação dos valores absolutos do tamanho de cada área para valores relativos, Af/Ai. Esta conduta impediu a análise tendenciosa de que a área viável de um determinado grupo foi diferente dos demais. Desta forma, o tamanho da área final (área viável) por si só não tinha grande valor para comparação, mas sim, o valor proporcional desta área em relação ao tamanho original do retalho, ou seja Af/Ai.

Chama a atenção o fato de que foi considerada área viável a porção viável do retalho original no sétimo dia de pós-operatório, excluídos aqueles segmentos cicatrizados por segunda intenção. Áreas com epidermólise parcial, que no sétimo dia de pós-operatório encontravam-se totalmente reparadas por meio de epitelização eram incluídas como área viável. Contudo, áreas de viabilidade duvidosa *(borderline*) ou aquelas cicatrizadas por granulação ou contratura de ferida não foram consideradas como áreas viáveis.

A comparação entre o grupo 3, que utilizou a nitroglicerina tópica, e o grupo 1 onde foi realizado o mesmo procedimento com exceção do uso da nitroglicerina,

mostrou que não houve diferença estatisticamente significante com relação ao percentual de área viável. A expectativa de se obter aumento na área de viabilidade dos retalhos do grupo 3 se justificaria pela ação vasodilatadora da nitroglicerina.

Ao se comparar o grupo 2, submetido à autonomizacão cirúrgica e o grupo 1, que não foi submetido à autonomizacão cirúrgica, ambos sem a ação da nitroglicerina, observou-se que a autonomização foi capaz de aumentar significativamente a área de viabilidade dos retalhos do grupo 2 em relação ao 1(p = 0,005).

Ao se utilizar a nitroglicerina nos retalhos submetidos à autonomizacão cirúrgica, grupo 4, quando então comparado ao grupo 1 (sem autonomizacão e sem nitroglicerina), observou-se que o percentual de área viável do grupo 1 foi estatisticamente maior (p=0,04), ainda que o grupo 4 tenha sido submetido à autonomizacão cirúrgica.

Observou-se que a diferença estatisticamente significante que havia entre o grupo 2 quando comparado ao grupo 1(p= 0,005) também existiu quando o grupo 2 foi comparado ao grupo 3 (p= 0,003). Poderia se esperar que a utilização da nitroglicerina pudesse aumentar a área de viabilidade dos retalhos do grupo 3, fazendo com que desaparecesse esta diferença.

Ao analisar os grupos 3 e 4, onde a nitroglicerina tópica foi utilizada em ambos, observou-se que não houve diferença estatisticamente significativa, apesar da autonomização cirúrgica realizada no grupo 4. Diferentemente do que foi observada na comparação entre os grupos 1 e 2 que não utilizaram a nitroglicerina. Mais uma vez foi ratificada a observação de que a utilização da nitroglicerina tópica diminuiu a extensão de área viável conseguida só com o procedimento da autonomização cirúrgica.

Apesar da queda do valor percentual médio da área viável dos grupos submetidos a implante do pedículo sem autonomização (de 8,9% do grupo 1 para 8,4% do grupo 3) em virtude da utilização da nitroglicerina tópica, foi sensível a queda observada nos grupos onde os retalhos foram submetidos à autonomização cirúrgica (de 49,4% do grupo 2 para 1,1% do grupo 4).

O relato de que a área de sobrevida dos retalhos não foi aumentada uma vez tratada com nitroglicerina tópica no pós-operatório, está em concordância com o que foi relatado por Nichter et al[41], porém diverge frontalmente com os achados de Hendel et al[43], e Rohrich et al[44]. Enquanto que Nichter et al[41] , em 1985, trabalharam com retalhos cutâneos com padrão de vascularização randomizado (ao acaso), Hendel et al[43] e Rohrich et al[44] trabalharam com retalhos cutâneos com padrão de vascularização axial. No presente estudo foi utilizado um retalho com padrão de vascularização axial pré-fabricado por implante vascular. O fato dos retalhos axiais pré-fabricados por implante vascular e os randomizados responderem de forma diferente à utilização da nitroglicerina tópica em relação aos retalhos axiais simplesmente (não pré-fabricados), reforça a noção de que retalhos axiais e retalhos randomizados são fundamentalmente diferentes e não respondem a agentes farmacológicos de forma análoga.

4.5 Autonomização de retalhos

Os resultados apresentados no presente trabalho demonstraram que o vasodilatador venoso tópico utilizado (a nitroglicerina) anulou completamente o efeito proporcionado pela autonomização cirúrgica ao modelo de retalho pré-fabricado em

estudo. A fisiopatologia relacionada ao fracasso de retalhos cutâneos permanece controversa.

Alguns autores atribuem à diminuição do fluxo sangüíneo que ocorre na porção distal do retalho como responsável pela isquemia e necrose destes retalhos[35,42,43,50,63,65,77,79,82,83]. Nesse grupo, ainda existem aqueles que consideram que a oclusão venosa é mais deletéria à sobrevida dos retalhos que a arterial[41,44,70] e aqueles que confiam que a diminuição do aporte sangüíneo ao retalho seja mediada pela ação do óxido nítrico [40,52,55,76].

Outros autores defendem que a necrose é mediada pelos radicais livres de oxigênio decorrente do mecanismo de isquemia-reperfusão[45,46,51,60-62,66-68,71,73-75]. Há, nesse grupo, os que afirmam que a injúria tecidual decorrente da isquemia-reperfusão pode ser regulada pela ação do óxido nítrico ou pelo sulfatídeo[66,57,58,64,68, 69,78].

Ainda há outra corrente de pesquisadores que acreditam que a lentidão do fluxo sangüíneo que ocorre ao nível da microcirculação, e a conseqüente hemoconcentração, contribui de forma decisiva para falência dos retalhos cutâneos segundo outros autores[47-49,59,83].

Em decorrência de tais controversas, as teorias que tentam explicar as modificações intrínsecas que passam a vigorar nos retalhos submetido à autonomização cirúrgica, tornando-os capazes de suportar um surto isquêmico de forma menos traumática, permanece da mesma forma desconhecida.

Utilizando o mesmo modelo experimental empregado no corrente estudo, Sá et al[84] demonstraram que em torno do pedículo implantado, a densidade vascular não diferia, quer no grupo submetido à autonomização cirúrgica, quer no grupo não autonomizado. De acordo com este resultado estão os trabalhos que demonstram que

a autonomização cirúrgica provoca uma dilatação da arquitetura vascular existente e não uma neovascularização, particularmente nos vasos capilares que ligam territórios adjacentes[28,32,38,39]. Daí então, o que acontece nos retalhos submetidos à autonomização cirúrgica, a ponto de aumentar a área viável dos mesmos, é a questão em aberto que se procura até hoje a resposta. De certo, parece ser o fato de que não ocorre uma neovascularização, ou pelo menos, sua influência parece não ser decisiva neste processo.

Para interpretação dos resultados apresentados neste trabalho, se faz necessária à descrição de mecanismos aceitos como principais responsáveis pela necrose dos retalhos cutâneos. Dentre estes mecanismos, a injúria tecidual que ocorre no mecanismo de isquemia-reperfusão ocupa papel de destaque. De acordo, com tal mecanismo, um estado hiperadrenérgico ocorreria durante a realização dos retalhos cutâneos em virtude da transecção dos nervos simpáticos que correm junto aos vasos, com liberação abrupta de norepinefrina. Como resultado, ocorreria uma vasoconstricção capaz de induzir uma temporária, porém completa oclusão capilar. Neste período isquêmico, a lise da adenosina trifosfato (ATP) levaria ao acúmulo da hipoxantina. Simultaneamente, a atividade da xantina oxidase aumenta em tecidos isquêmicos. Então, a enzima e um substrato para reação de produção de radicais livres estão presentes em excesso, porém esta reação (hipoxantina → xantina → ácido úrico) não pode ser processada sem o outro substrato, o oxigênio. Com a depuração pelo organismo da norepinefrina, inicia-se a vasodilatação, ocorre reperfusão, e o oxigênio é ofertado em excesso onde antes havia isquemia, e a reação acima ocorre rapidamente para a direita. A grande quantidade de radicais superóxido produzida como um subproduto ultrapassa os níveis normalmente baixos da enzima superóxido dismutase (SOD) endógena, o excedente de radicais livres leva à injúria tecidual através da

peroxidação lipídica, que destroem as camadas lipídicas das paredes celulares e das organelas intracelulares, culminando com a necrose tecidual[45]. O mecanismo de produção de radicais livres de oxigênio é mostrado na figura (figura 12).

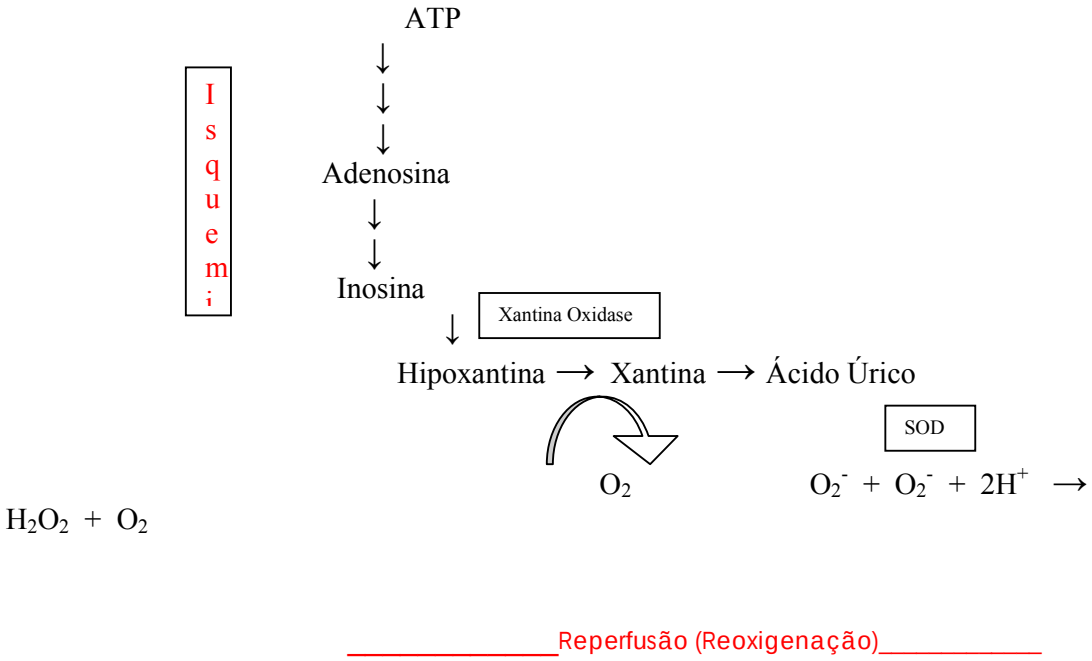


Figura 12. Mecanismo de isquemia-reperfusao adaptado do trabalho de Im et al[45]

Outra fonte de radicais livres advém da adesão dos polimorfonucleares neutrófilos ao endotélio poscapilar do retalho, através da molécula de adesão CD 18, localizadas na superfície dos neutrófilos, atraídos por citocinas. Um complexo enzimático NADPH-oxidase, ligado à membrana do neutrófilo, tem a capacidade de liberar grande quantidade de radicais livres de oxigênio[78].

Para explicar como a autonomização cirúrgica ocorreria, uma vez aplicada aos retalhos, levando-se em consideração o mecanismo de falência tecidual descrito acima, admite-se que ocorreria uma diminuição parcial do fluxo sangüíneo, durante a execução da autonomização cirúrgica. Tal diminuição proporcionaria um ambiente

isquêmico capaz de levar à formação de radicais livres, estimulando a produção endógena de um varredor de radicais livres, a enzima SOD. Por se tratar de diminuição parcial do fluxo, o mesmo ainda seria suficientemente capaz de manter o retalho, impedindo a necrose tecidual. No segundo tempo cirúrgico, quando os retalhos seriam novamente incisados, desta vez a ponto de serem transferidos (com diminuição mais intensa do fluxo), haveria no organismo uma quantidade de SOD já formada por ocasião do primeiro procedimento e capaz de impedir a ação deletéria de grande parte dos radicais livres. A autonomizacão cirúrgica agiria, portanto, aumentando os níveis da enzima superóxido dismutase na porção distal dos retalhos cutâneos[3].

Outro mecanismo que procura explicar a fisiopatologia da falência dos retalhos cutâneos é focado na nutrição da pele, que ocorre em nível de microcirculação por uma rede anastomótica denominada de plexo dermo-subdérmico. A microcirculação tem grande importância funcional: (a) nas trocas metabólicas e nutrição tecidual; (b) na regulação do fluxo sangüíneo por mecanismo de vasoconstricção; (c) na termorregulação. Ocorre que na pele, tal plexo é rico em canais que se assemelham a capilares que conectam a circulação arterial à venosa, canais arteriovenosos (*shunts*). Contudo, os canais arteriovenosos são canais com diâmetro grande e paredes grossas que não permitem trocas metabólicas. Na pele, estes canais são predominantemente inervados pelos nervos simpáticos. A estimulação nervosa causaria vasoconstricção, enquanto que uma denervação produziria imediata dilatação. Durante o ato cirúrgico para confecção de um retalho, haveria uma secção dos nervos simpáticos que caminham junto aos vasos sangüíneos e, às vezes, na própria parede dos vasos, levando à denervação simpática e abertura dos canais arteriovenosos. Nas áreas de fluxo sangüíneo enfraquecido (como na porção distal

dos retalhos cutâneos), o fluxo sangüíneo seria desviado através de canais arteriovenosos precapilares de baixa resistência, levando à isquemia e necrose dos tecidos circunjacentes, uma vez que o sangue não atingiria os capilares responsáveis pelas trocas metabólicas, vasos nutrientes.[31] O trajeto do fluxo sanguineo na microcirculacão é representado na figura 13.

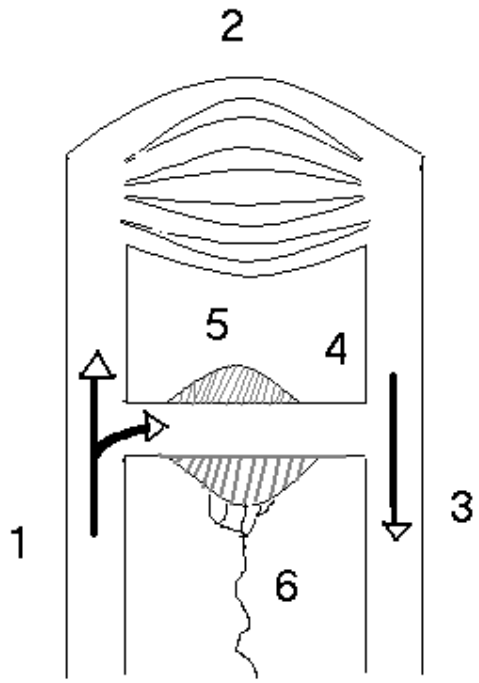


Figura 13. Figura adaptada do livro Cirurgia Plástica Reparador e Estética[1] com a representação esquemática da microcirculação: 1. Arteríola; 2. Capilar; 3. Vênula; 4.Comunicação arteriovenosa; 5. Esfíncter; 6. Inervação simpática.

Levando em consideração que este mecanismo de falência tecidual é o correto, há outra corrente de autores que procuram explicar o fenômeno da autonomização cirúrgica. Para estes autores a diminuição parcial do aporte sangüíneo ao retalho, durante a execução do procedimento de autonomização, provocaria também uma simpatectomia, por ocasião da lise das fibras nervosas do sistema nervoso

simpático, que correm junto e na parede dos vasos. Como conseqüência, haveria um relaxamento do tônus dos canais arteriovenosos, aumentando o fluxo sangüíneo através dos mesmos. Por se tratar de uma diminuição parcial do fluxo, ainda haveria pressão capaz de assegurar que o sangue chegasse até os vasos nutridores para atender a demanda metabólica tecidual, ainda que parte do aporte sangüíneo destinado à pele era desviado através dos canais arteriovenosos por apresentarem menor resistência. Isto explicaria o fato de não haver necrose nos retalhos dos grupos 2 e 4 submetidos à diminuição parcial do fluxo durante o primeiro tempo do procedimento de autonomização cirúrgica. Após alguns dias, em decorrência da denervação, o organismo passaria a um estágio de hipersensibilidade às aminas vasoativas que circulam normalmente no organismo, o que levaria ao fechamento desses canais arteriovenosos. No segundo tempo cirúrgico, após três semanas, o retalho seria novamente incisado a ponto de ser transferido. Em decorrência deste novo procedimento ocorreria novamente a secção das fibras nervosas, porém já não levaria à abertura dos canais arteriovenosos, uma vez que os mesmos encontrar-se-iam fechados em virtude da hipersensibilidade às aminas vasoativas circulantes. O fato dos canais arteriovenosos encontrarem-se fechados, obrigaria um maior aporte sangüíneo a circular através dos vasos nutridores, promovendo as trocas metabólicas, aumentando, assim, a área de viabilidade dos retalhos. Segundo esta teoria, portanto, a autonomização cirúrgica agiria promovendo um fechamento dos canais arteriovenosos[31,32,34].

No presente estudo, com o objetivo de estudar como a autonomização foi capaz de aumentar a área de viabilidade dos retalhos, foi utilizada uma medicação com mecanismo de ação conhecido, a nitroglicerina, nos retalhos submetidos à autonomização cirúrgica, grupo 4. A utilização da nitroglicerina em retalhos

autonomizados levaria a uma melhor compreensão de sua fisiopatologia, permitindo saber que seqüências de modificações ocorreram nos tecidos submetidos à autonomização cirúrgica de acordo com as duas hipóteses apresentadas: aumento dos níveis de varredores de radicais livres de oxigênio *versus* fechamento dos canais artériovenosos. Por se tratar de um agente vasodilatador potencialmente venoso, segundo a hipótese de que a autonomização cirúrgica agiria através do fechamento dos canais arteriovenosos, era de se esperar, com a utilização da nitroglicerina, que houvesse uma diminuição considerável da área viável dos retalhos submetidos à autonomizacão cirúrgica. A expectativa justifica-se uma vez que, ao submeter os retalhos autonomizados à ação de um vasodilatador venoso, deixaria de ocorrer o fechamento dos canais arteriovenosos, decorrente da autonomização cirúrgica, pela ação vasodilatadora da nitroglicerina, favorecendo o desvio do fluxo sangüíneo através dos vasos de menor resistência, diminuindo consideravelmente o aporte sangüíneo aos vasos nutridores, impedindo as trocas metabólicas em nível da microcirculacão e, conseqüentemente, sobreviria a necrose tecidual.

Por outro lado, se a autonomização cirúrgica agisse através do aumento dos níveis da enzima SOD na porção distal dos retalhos, era de se esperar, no grupo 4, um aumento da área viável ainda maior que o observado no grupo 2, onde os retalhos foram submetidos à autonomização sem a nitroglicerina. Tal expectativa se justifica uma vez que, por se tratar de agente vasodilatador, a nitroglicerina seria capaz de diminuir a vasoconstricção decorrente da descarga adrenérgica, diminuindo a produção de radicais livres de oxigênio e aumentando a área viável dos retalhos.

De acordo com os resultados observados no presente estudo, a extensão da área viável dos retalhos submetidos apenas à autonomização cirúrgica, grupo 2, cai consideravelmente ao submeter este grupo à ação da nitroglicerina, grupo 4. Portanto, no modelo experimental utilizado no corrente estudo, retalhos cutâneos pré-fabricados por implante vascular em ratos, fortalece ainda mais a hipótese de que os canais arteriovenosos estão implicados na fisiologia do fenômeno de autonomização cirúrgica, uma vez que o fechamento dos mesmos, com o fluxo sangüíneo ocorrendo, obrigatoriamente, através dos vasos nutrientes, seria responsável pelo aumento da área viável observado nos retalhos submetidos à autonomização cirúrgica.

4.5 Considerações Finais

Apesar da autonomização cirúrgica proporcionar resultados efetivos e confiáveis, no que diz respeito ao aumento da área viável de retalhos cutâneos, tal procedimento implica em, pelo menos, mais de um tempo cirúrgico e aumento da permanência hospitalar. Ainda vale a pena ressaltar que nos retalhos traumáticos e naqueles que devem ser modificados durante o ato cirúrgico, os mesmos não têm como se beneficiarem de uma autonomização prévia e algumas vezes necrosam.

A descoberta de um agente farmacológico capaz de reverter ou prevenir a necrose de retalhos cutâneos é fator limitante às pretensões futuras da cirurgia plástica. Os resultados apresentados neste trabalho de que o fechamento dos canais arteriovenosos, existentes predominantemente no plexo subdérmico, desempenha papel fundamental na sobrevida de retalhos cutâneos fornecem

subsídio importante para a compreensão de mecanismos envolvidos tanto com a falência, quanto com sobrevida dos retalhos cutâneos. Pesquisas adicionais no sentido de testar novas drogas que atuem seletivamente fechando os canais arteriovenosos serão necessárias para comprovação dos resultados encontrados neste trabalho e iniciar o estudo clínico destas medicações.

Conclusões

Dos resultados obtidos, no presente estudo, de acordo com a metodologia empregada, nas condições em que foram realizados os experimentos e com o grau de confiabilidade superior a 95% ($p < 0,05$), pode-se concluir que:

1. A nitroglicerina tópica (NITRODERM TTS 5) não induziu ao aumento da área viável de retalhos pré-fabricados por implante vascular;

2. A nitroglicerina tópica (NITRODERM TTS 5) diminuiu a área viável dos retalhos submetidos à autonomizacão cirúrgica.

REFERÊNCIAS

1. Silva ER. Fisiologia dos retalhos cutâneos. In: Mileja JM, Zanini AS, Psillakis JM, editores. Cirurgia Plástica Reparadora e Estética. Rio de Janeiro: Medsi; 1992. p.77-80.
2. Oliveira MC. Evolução e perspectivas dos retalhos. In: Hochberg J, Bozola A, Esfon J, Oliveira M, Vieira R, Zanini S et al, editores. Retalhos. Rio de Janeiro: Medsi; 1990. p.3-5.
3. Daniel RK, Kerringa CL. Principles and phydiology of skin flap surgery. In: McCarthy, editor. Plastic Surgery Pensylvainia: W.B. Saunders Company; 1990. p.275-328.
4. Morrison WA, Dvir E, Doi K, Hurley JV, Hickey MJ, McC O'Brien B. Prefabrication of thin transferable axial-pattern skin flaps: na experimental study in rabbits. Br J Plast Surg. 1990; 43: 645-54.
5. Orticochea M. A new method for total reconstruction of the nose: the ears as donor areas. Br J Plast Surg. 1971; 24: 225-32.
6. Erol OÖ. The transformation of a free skin graft into a vascularized pedicled flap. Plast Reconstr Surg. 1976; 58: 460-7.
7. Erol OÖ, Spira M. New capillary bed formation with a surgically constructed arteriovenous fistula. Plast Reconstr Surg. 1980; 66: 109-15.
8. Yao ST. Vascular implantation into skin flap: experimental study and clinical application: a preliminary report. Plast Reconstr Surg. 1981; 68: 404-10.
9. Yao ST. Experimental study of tissue graft vascularization by means of vascular implantation and subcutaneous burying. Plast Reconstr Surg. 1984; 73: 403-10.

10. Yao ST. Microvascular transplantation of prefabricated free thigh flap. Plast Reconstr Surg. 1982; 69: 568-8.
11. Hirasé Y, Valouri FA, Buncke HJ, Newlin LY. Customized prefabricated neovascularized free flaps. Micrsurgery. 1987; 8: 218-24.
12. Hirasé Y, Valauri FA, Buncke HJ. Neovascularized free cutaneous cartilage flap transfer with microsurgical anastomosis: An experimental model in the rabbit. Ann Plast Surg. 1988; 21: 342-47.
13. Hirasé Y, Valauri FA, Buncke HJ. Creaton of neovascularised free flaps using vein grafts as pedicles: a preliminary report on experimental models. Br J Plast Surg. 1989; 42: 216-22.
14. Morrison WA, Dvir E, Doi K, Hurley JV, Hickey MJ, McC O'Brien B. Prefabrication of thin transferable axial-pattern skin flaps: an experimental study in rabbits. Br J Plast Surg. 1990; 43: 645-54.
15. Khouri RK, Upton J, Shaw WW. Prefabrication of composite free flaps through staged microvascular transfer: An experimental and clinical study. Plast Reconstr Surg. 1991; 87: 108-15.
16. Falco NA, Pribaz JJ, Erikson E. Vascularization of skin following implantation of na arteriovenous pedicle: implications in flap prefabrication. Microsurgery. 1992; 13: 249-54.
17. Takato T, Komuro Y, Yonehara H, Zuker RM. Prefabricated venous flaps: an experimental study in rabbits. Br J Plast Surg. 1993; 46: 122-6.
18. Duffy FJ, Pribaz JJ, Hergrueter CA, Maitz PKM. Flap prefabrication using an exteriorised vascular pedicle in a rabbit ear model. Br J Plast Surg. 1993; 46: 279-84.

19. Stepán D, Válka J, Samohýl J, Meyer VE, Smahel J. Prefabrication of a skin axial flap in experiment. Acta Chir Plast. 1993; 35: 28-35.
20. Pribraz JJ, Maitz PKM, Fine NA. Flap prefabrication using th “vascular crane” principle: an experimental study and clinical application. Br J Plast Surg. 1994; 47: 250-56.
21. Maitz PKM, Pribaz JJ, Duffy FJ, Hergrueter CA. The value of the delay phenomenon in flap prefabrication: an experimental study in rabbits. Br J Plast Surg. 1994; 47: 149-54.
22. Kostakoglu N, Terenghi G, Manek S, Batchelor AG, Polak JM, Green CJ. Reinnervation and neovascularisation in prefabricated free muscle flaps. Microsurgery. 1995; 16: 388-95.
23. Yap-Legaspi EC, Nozaki M, Takeuchi M. The contribution of perivascular tissue to the neovascularization of full thickness skin grafts (prefabricated flaps): an experimental study. Br J Plast Surg. 1995; 48: 89-92.
24. Tark KC, Tuchler RE, Shaw WW. Flap prefabrication: effectiveness of different vascular carriers. Ann Plast Surg. 1996; 37: 298-04.
25. Morrison AW, Penington AJ, Kumta SK, Callan P. Clinical applications and technical limitations of prefabricated flaps. Plast Reconstr Surg. 1997; 99: 378-85.
26. Hickey M, Wilson Y, Hurley J. Mode of vascularization of control and basic fibroblast growth factor stimulated prefabricated skin flaps. Plast Reconst Surg. 1998; 101: 1296-98.
27. Abbase EA, Shenaq SM, Spira M, El-Falaky MH. Prefabricated flaps: experimental and clinical review. Plast Reconstr Surg 1995; 96: 1218-25.

28. Cederna PS, Chang P, Pitted-Cuenod BM, Razaboni RM, Cram AE. The effect of the delay phenomenon on the vascularity of rabbit abdominal cutaneous island flaps. Plast Reconstr Surg. 1997; 99: 183-93.

29. McFarlane RM, Heagy FC, Radin S, Aust JC, Wermuth RE. A study of the delay phenomenon in experimental pedicle flaps. Plast Reconstr Surg. 1965; 35: 245-62.

30. Myers MB, Cherry G. Mechanism of the delay phenomenon. Plast Reconstr Surg. 1965; 35: 245-62.

31. Reinisch JF. The pathophysiology of skin flap circulation – the delay phenomenon. Plast Reconstr Surg. 1974; 54: 585-98.

32. Callegari PR, Ian Taylor G, Caddy CM, Minabe T. An anatomic review of the delay phenomenon: I. Experimental studies. Plast Reconstr Surg. 1992; 89: 397-07.

33. Iton Y, Arai K. A deep inferior epigastric flap with a prefabricated thin portion obtained from the insertion of a silicone sheet. Br J Plast Surg. 1992; 45: 204-07.

34. Byun J, Constantinescu MA, Lee A, May Jr JW. Effects of delay procedures on vasculature and survival of arterialized venous flaps: an experimental study in rabbits. Plast Reconstr Surg. 1995; 96: 1650-59.

35. López JLA, Suárez Nieto C, Garcia PB, Ortoega MR. Evaluation of angiogenesis in delayed skin flaps using a monoclonal antibody for the vascular endothelium. Br J Plast Surg. 1995; 48: 479-86.

36. Ha B, Park CG, Minn KW. Analysis of high-energy phosphometabolites in delayed experimental skin flaps using ^{31}P nuclear magnetic resonance spectroscopy. Br J Plast Surg. 1997; 50: 272-79.

37. Yang D, Morris SF. Comparison of two different delay procedures in a rat skin flap model. Plast Reconstr Surg. 1998; 102(5): 1591-97.

38. Barker JH, Frank J, Bidiwala SB, Stengel CK, Carroll SM, Carrol CM, et al. An animal model to study microcirculatory changes associated with vascular delay. Br J Plast Surg. 1999; 52: 133-42.

39. Dhar SC, Taylor GI. The delay phenomenon: the story unfolds. Br J Plast Surg. 1999; 104(7): 2079-91.

40. Scott McDW, Lo Jr. TP, Thurmond MBS, Jones C, Cohen R, Miller A, et al. Role of nitric oxide in skin flap delay. Rol Nitric Oxide Skin Flap Delay. 2004; 113(3): 927-31.

41. Nichter LS, Sobieski MW, Edgerton MT. Efficacy of topical nitroglycerin for random-pattern skin-flap salvage. Plast Reconstr Surg. 1985; 75(6): 847-52.

42. Kennedy TJ, Pistone G, Miller SH. The effects of reserpine on microcirculatory flow in rat flaps. Plast Reconstr Surg. 1979; 63(1): 101-9.

43. Hendel PM, Lilien DL, Buncke HJ. A study of the pharmacologic control of blood flow to acute skin flaps using xenon washout. Part I. Plast Reconstr Surg. 1983; 71(3): 387-98.

44. Rohrich RJ, Cherry GW, Spira M. Enhancement of skin-flap survival using nitroglycerin Ointment. Plast Reconstr Surg. 1984; 73(6): 943-48.

45. Im MJ, Manson PN, Bulkley GB, Hoopes JE. Effects of superoxide dismutase and allopurinol on the survival of acute island skin flaps. Ann Surg. 1985; 201(3): 357-9.

46. Angel MF, Narayanan K, Swartz WM, Ramasastry SS, Basford RE, Kuhns DB, et al. The etiologic role of free radicals in hematoma-induced flap necrosis. Plast Reconstr Surg. 1986; 77(5): 795-01.

47. Monteiro DT, Santamore WP, Nemir Jr. P. The influence of pentoxifylline on skin-flap survival. Plast Reconstr Surg. 1986; 77(2): 277-81.

48. Galla TJ, Saetzler RKE, Hammersen F, Messmer K. Increase in skin-flap survival by the vasoactive drug buflomedil. Plast Reconstr Surg. 1991; 87(1): 130-8.

49. Williams PB, Hankins DB, Layton CT, Pratt MF. Long-term pretreatment with pentoxifylline increase random skin flap survival. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 1994; 120(1): 65-71.

50. Sawada TL. Topical application of capsaicin and flap survival. Br J Plast Surg. 1996; 49: 319-20.

51. Atabey A, Im MJ, Akgur FM, Vander Kolk CA, Manson PN. The effect of cobalt chloride on skin flap survival. Br J Plast Surg. 1996; 49: 321-24.

52. Um SC, Suzuki S, Toyokuni S, Kim BM, Tanaka T, Hiai H, et al. Involvement of nitric oxide in survival of random skin flap. Plast Reconstr Surg. 1998; 101(3): 785-92.

53. Khazanchi RK. Role of vitamin E in ischemic skin flap survival in rats. Indian J Plast Surg 1997; 28: 80-2.

54. Alexandrou K, Hata Y, Matsuka K. Effect of beraprost sodium (Procyclin^{tm}), a stable prostaglandin I_2 analogue, on a dorsal skin flap model in rats. J Oral Maxillofac Surg. 1997; 55: 311.

55. Gribbe Ö, Lundeberg T, Samuelson UE, Wiklund NP. Nitric oxide synthase activity and endothelial ultrastructure in ischaemic skin-flaps. Br J Plast Surg. 1997; 50: 483-90.

56. Cordeiro PG, Mastorakos DP, Hu QY, Kirschner RE. The protective effect ofl-arginine on ischemia-reperfusion injury in rat skin flaps. Plast Reconstr Surg. 1997; 100(5): 1227-33.

57. Zamboni WA. Use of a nitric oxide precursor to protect pig myocutaneous flaps from ischemia-reperfusion injury. Plast Reconstr Surg. 1998; 102(6): 2049-51.

58. Ueda K, Nozawa M, Masayuki M, Jun A, Sadao T. Sulfatide protects rat skin flaps against ischemia-reperfusion injury. J Surg Res. 1998; 80: 200-04.

59. Uhl E, Rösken F, Curri SB, Menger M, Messmer K. Reduction of skin flap necrosis by transdermal application of buflomedil bound to liposomes. Plast Reconst Surg. 1998; 102(5): 1598-1604.

60. Raposio E, Santi PL. Pharmacological enhancement of cutaneous flap survival with topical dimetryl sulphoxide and hydrogen peroxide. Br J Plast Surg. 1998; 60: 551-54.

61. Mazolewski PJ, Roth AC, Suchy HMA, Stephenson LLBS, Zamboni WA. Role of the thromboxane A2 receptor in the vasoactive response to ischemia-reperfusion injury. Plast Reconst Surg. 1999; 104(5): 1393-96.

62. Schanaider A, Oliveira Neto AA, Costa IR, Leite GLS, Considera DP, Lopes AKP, et al. Mannitol in reperfusion skin island flaps injury. Acta Cir Bras. [citado em periódico da internet]. 1999 Sept [acesso em 2003 Jan 16]; 13(3): [aproximadamente 7p.]. Disponível em: http://scielo.br/scielo.php?script=sci.

63. Biondo-Simiões MLP, Greca FH, Paula JB, Chin EWK, Santo EAA, Stalhschmidt FL. Influência do buflomedil em retalhos cutâneos isquêmicos – estudo experimental. Acta Cir Bras. [citado em periódico da internet]. 2000 [acesso em 2003 Jan 16]; 15 (supl 3): [aproximadamente 8p.]. Disponível em: http://scielo.br/scielo.php?script=sci.

64. Akamatsu J, Ueda K, Tajima S, Nozawa M. Sulfatide elongates dorsal skin flap survival in rats. J Surg Res. 2000; 92: 36-39.

65. Tellioglu AT, Uras KA, Yilmaz T, Alagözlü H, Tekdemir I, Karabag O. The effect of carnitine on random-pattern flap survival in rats. Plast Reconst Surg. 2001; 108(4): 959-62.

66. Cordeiro PG, James L, Mastorakos D, Hu QY, Pinto JT, Santamaria E. Plast Reconst Surg. 2000; 105(2): 654-59.

67. Souza Filho MVP, Leal PRA, Sbalchiero JC, Marque MJM. Effect of ginkgo biloba extract on skin flap survival in rats. Rev Soc Bras Cir Plast 2002; 17(2): 45-56.

68. Yur-Ren K, Seng-Feng J, Feng-Sheng W, Hui-Chen HBS, Fu-Chan W, Kuender D, et al. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonist (abciximab) inhibited platelet activation and promoted skin flap survival after ischemia/reperfusion injury. J Surg Res. 2002; 107: 50-55.

69. Khiabani KT, Kerrigan CL. The effect of the nitric oxide donor SIN-1 on ischemia-reperfused cutaneous and myocutaneous flaps. Plast Reconst Surg. 2002; 110(1): 169-76.

70. Acevedo-Bogado CE, Bins-Ely J, d'Acampora AJ, Neves RE. Efeito da hialuronidase de retalhos cutâneos em ratas. Acta Cir Bras 2001; 17(supl. 1): 14-16.

71. Carpenter RJ, Angel MF, Mogan RF. Dimethyl sulfoxide increase the survival of primarily ischemic island skin flaps. DMSO. [citado em periódico da internet]. 2003 [acesso em 2003 Jan 13]; [aproximadamente 6p.]. Disponível em: http://www.dmso.org/articles/skin/ischem.htm.

72. Yur-Ren K, Feng-Sheng W, Seng-Feng J, Hui-Chen HBS, Fu-Chan W, Kuender D, et al. Nitrosoglutathione modulation of platelet activation and nitric oxide synthase expression in promotion of flap survival after ischemia/reperfusion injury. J Surg Res. 2004; 119: 92-99.

73. Pang Y, Lincaweaver WC, Lei MP, Oswald T, Shamburger S, Cai Z, Zhang F. Evaluation of the mechanism of vascular endothelial growth factor improvement of ischemic flap survival in rats. Plast Reconst Surg. 2003; 112(2): 556-64.
74. Klein MB, Chan PH, Chang J. Protective effects of superoxide dismutase against ischemia-reperfusion injury: development and application of a transgenic animal model. Plast Reconst Surg. 2003; 111(1): 251-55.
75. Zhang F, Oswald T, Lin S, Cai Z, Lei M, Jones M, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and the effect of exogenous VEGF on survival of a random flap in the rat. Bri J Platic Surg. 2003; 56: 653-59.
76. Sarifakioglu N, Gokrem S, Ates L, Akbuga UB, Aslan G. The influence of sildenafil on random skin flap survival in rats: an experimental study. Bri J Platic Surg. 2004; 57: 769-72.
77. Komorowska-Timek E, Timek TA, Brevetti LS, Zhang F, Lineaweaver WC, Buncke HJ. The effect of single administration of vascular endothelial growth factor or L-arginine on necrosis and vasculature of the epigastric flap in the rat model. Bri J Platic Surg. 2004; 57: 317-25.
78. Gabriel A, Porrino ML, Stephenson LLBS, Zamboni WA. Effect of L-arginine on leukocyte adhesion in ischemia-reperfusion injury. Platic Reconst Surg. 2004; 113(6): 1698-1702.
79. Huemer GM, Shafighi M, Meirer R, Debagge P, Piza-Katzer H, Gurunlouglu R. Adenovirus-mediated transforming growth factor-β ameliorates ischemic necrosis of epigastric skin flaps in a rat model. J Surg Res. 2004; 121: 101-7.
80. Harder Y, Contaldo C, Klenk J, Banic A, Jakob SM, Erni D. Improved skin flap survival after local heat preconditioning in pigs. J Surg Res. 2004; 119: 100-5

81. Hsu OK, Gabr E, Steward E, Chen H, Kobayashi MR, Calvert JW, et al. Pharmacologic enhancement of rat skin flap survival with topical oleic acid. Platic Reconst Surg. 2004; 113(7): 2048-54.

82. Karaçal N, Ambarcioglu Ö, Topal U, Mamedov T, Kutlu N. Enhancement of dorsal random-pattern skin flap survival in rats with topical lidocaine and prilocaine (EMLA): Enhancement of flap survival by EMLA. J Surg Res. 2005; 2(1): 1-5.

83. Leal PR, Cammarota MC, Sbalchiero J, Marques MM, Moreira M. Efeitos da pentoxifilina e o cloridrato de buflomedil em retalhos randomizados em ratos sob influência da nicotina. Rev Soc Bras Cir Plást 2004; 19(3) 37-42.

84. Sá JZ, Aguiar JLA, Morais J, Coelho ARB, Lopes SML, Melo CB. Área viável e vascularização, pós automização cirúrgica de retalho pré-fabricado por implante vascular em ratas. Acta Cir Bras. 2001; 17(supl. 1): 39-42.

85. Silva PR, Guimarães ICB, Guimarães AC. Farmacologia da angina do peito. In: Silva P, editor. Farmacologia, 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002. p.672-684.

86. Baba S, Shinohara Y. Application of high-performance liquid chromatography with synchronized accumulating radioisotope detector to analysis of glyceryl trinitrate and its metabolites in rat plasma. J Chromatography. 1984; 305: 119-126.

87. Han C, Gumbleton M, Lau DTW, Benet LZ. Improved gas chromatographic assay for the simultaneous determination of nitroglycerin and its mono-and dinitrate metabolites. J Chromatography. 1992; 579: 237-45.

ANEXOS

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Recife, 24 de outubro de 2003

Ofício nº 200/2003
Da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE
Ao Ilmo Jairo Zacche de Sá
Departamento de Cirurgia Experimental, CCS/UFPE

Após o recebimento de sua carta de encaminhamento solicitando a análise do procedimento com animais do Projeto de pesquisa intitulado **"Efeitos da nitroglicerina sobre a área viável de retalhos pré-fabricados por implante vascular em ratos",** processo Nº 23076.006699/2003-94, os membros da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEA-UFPE) analisaram os aspectos relativos aos protocolos experimentais adotados.

Concluímos que, na versão atual, os procedimentos descritos para manejo e cuidado dos animais em experimentação encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals, as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEEA-UFPE.

De acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 9.605 – art. 32 e Decreto 3.179-art 17, de 21/09/1999, que trata da questão do uso de animais para fins científicos, ressaltamos ainda que o sacrifício dos animais experimentais, realizado no presente trabalho, justifica-se pelo fato de não existirem recursos alternativos para a realização do procedimento científico. Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais descritos no projeto analisado.

Atenciosamente,

Profa. Miriam Camargo Guarnieri
Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal

Profa. Belmira Lara da S. Andrade da Costa
Vice-Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal

Resultados da mensuração das áreas (Ai, Af, Af/Ai) dos retalhos **não** autonomizados e **não** tratados com o STT (grupo 1)

Ratos	**Ai**	**Af**	**Af/Ai(%)**	**Média + DP (%)**
	41,94	1,78	4,24	
	42,54	1,75	4,11	
01	41,87	1,80	4,30	4,2 ± 0,1
	55,25	0,92	1,67	
	55,96	0,86	1,54	
02	56,05	0,91	1,62	1,6 ± 0,1
	52,99	2,66	5,02	
	53,72	2,55	4,75	
03	53,11	2,76	5,20	5,0 ± 0,2
	47,56	8,14	17,12	
	47,51	7,76	16,33	
12	48,32	8,54	17,67	17 ± 0,4
	48,04	0,40	0,83	
	47,60	0,33	0,69	
15	47,91	0,37	0,77	0,8 ± 0,0
	48,95	1,02	2,08	
	48,47	1,06	2,19	
16	48,42	1,02	2,11	2,1 ± 0,0
	47,51	0,70	1,47	
	47,90	0,73	1,52	
07	47,72	0,68	1,43	1,5 ± 0,0
	41,93	6,36	15,17	
	41,75	6,50	15,57	
17	42,58	6,24	14,65	15,1 ± 0,4
	46,48	16,65	35,82	
	46,79	16,94	36,20	
09	47,23	16,03	33,94	35,3 ± 1,3
	38,62	2,56	6,63	
	38,76	2,53	6,53	
10	38,39	2,45	6,38	6,5 ± 0,2
(Média±DP)	47,1 ± 5,2	4,1 ± 5,1	**8,9 ± 10,9**	**8,9 ± 10,9**

DP = Desvio-Padrão

Resultados da mensuração das áreas (Ai, Af, Af/Ai) dos retalhos autonomizados e **não** tratados com o STT (grupo 2)

Ratos	**Ai**	**Af**	**Af/Ai(%)**	**Média + DP (%)**
01	48,83	7,60	15,56	15,9 ± 0,3
	48,12	7,82	16,25	
	48,55	7,76	15,98	
02	49,58	35,91	72,43	72,5 ± 1,7
	49,37	36,42	73,77	
	49,96	35,66	71,38	
11	44,18	28,27	63,99	64,3 ± 0,2
	44,52	28,83	64,76	
	44,39	28,53	64,27	
13	39,88	17,88	44,83	44,9 ± 0,0
	39,97	17,96	44,93	
	39,94	17,93	44,89	
05	49,62	4,14	8,34	8,8 ± 5,4
	49,65	4,61	9,29	
	49,81	4,40	8,83	
14	47,00	30,60	65,11	65,5 ± 0,6
	47,28	30,87	65,29	
	47,24	31,17	65,98	
07	47,97	26,69	55,64	55,5 ± 0,0
	48,39	26,73	55,24	
	48,85	27,20	55,68	
18	43,05	34,34	79,77	79,6 ± 0,7
	42,91	34,40	80,17	
	43,36	34,16	78,78	
19	50,42	20,13	39,92	39,5 ± 0,2
	50,84	19,79	38,93	
	50,63	20,08	39,66	
10	38,04	17,51	46,03	47,4 ± 0,7
	38,13	18,69	49,02	
	37,93	17,85	47,06	
(Média±DP)	**46 ± 4,4**	**22,5 ± 10,8**	**49,4 ± 23,2**	**49,4 ± 23,2**

DP = Desvio -Padrão

Resultados da mensuração das áreas (Ai, Af, Af/Ai) dos retalhos **não** autonomizados e tratados com o STT (grupo 3)

Ratos	**Ai**	**Af**	**Af/Ai(%)**	**Média + DP (%)**
06	45,50	4,77	10,48	10,6 ± 0,1
	46,47	4,98	10,72	
	46,76	4,94	10,56	
07	42,47	4,97	11,70	12,4 ± 0,8
	42,16	5,43	12,88	
	42,48	5,43	12,78	
08	46,64	3,85	8,25	8,5 ± 0,3
	46,86	4,04	8,62	
	47,42	4,12	8,69	
09	45,53	3,22	7,07	7,2 ± 0,1
	45,65	3,35	7,34	
	45,33	3,26	7,19	
12	33,83	0,10	0,30	0,3 ± 0,0
	34,03	0,13	0,38	
	34,37	0,11	0,32	
13	40,04	0	0,00	0,0 ± 0,0
	40,25	0	0,00	
	40,46	0	0,00	
18	34,02	0	0,00	0,0 ± 0,0
	34,37	0	0,00	
	34,71	0	0,00	
19	28,67	1,58	5,51	5,4 ± 0,0
	29,19	1,53	5,24	
	28,93	1,59	5,50	
20	26,89	6,86	25,51	25,7 ± 0,4
	27,25	7,23	26,53	
	27,12	6,77	24,96	
22	30,57	4,30	14,07	14,2 + 0,2
	30,35	4,29	14,14	
	30,45	4,36	14,32	
(Média±DP)	37,6 ± 7,6	3,0 ± 2,5	8,4 ± 8,0	8,4 ± 8,0

DP = Desvio-Padrão

Resultados da mensuração das áreas (Ai, Af, Af/Ai) dos retalhos autonomizados e tratados com o STT (grupo 4).

Ratos	**Ai**	**Af**	**(af/aig4)%**	**Média + DP (%)**
01	58,68	0	0,00	0,0 ± 0,0
	58,40	0	0,00	
	58,55	0	0,00	
02	35,00	0	0,00	0,0 ± 0,0
	33,00	0	0,00	
	32,80	0	0,00	
04	46,33	0,97	2,09	2,1 ± 0,0
	47,20	0,96	2,03	
	45,99	0,99	2,15	
09	29,23	0	0,00	0,0 ± 0,0
	29,71	0	0,00	
	30,03	0	0,00	
11	28,41	0	0,00	0,0 ± 0,0
	28,38	0	0,00	
	28,22	0	0,00	
14	32,17	0	0,00	0,0 ± 0,0
	32,15	0	0,00	
	31,04	0	0,00	
16	33,80	0,19	0,56	0,5 ± 0,0
	34,55	0,18	0,52	
	34,33	0,18	0,52	
17	35,76	0	0,00	0,0 ± 0,0
	35,68	0	0,00	
	35,52	0	0,00	
18	28,87	0	0,00	0,0 ± 0,0
	28,74	0	0,00	
	29,00	0	0,00	
19	29,84	2,35	7,88	8,1 ± 0,2
	29,58	2,41	8,15	
	29,74	2,44	8,20	
(Média±DP)	**35,7 ± 9,6**	**0,4 ± 0,8**	**1,1 ± 2,5**	**1,1 ± 2,5**

DP = Desvio-Padrão