

STEPHANIE LUZIA DA COSTA PEDRETTI

**AÇÃO DA PENTOXIFILINA NA VITALIDADE E NO REPARO TECIDUAL DOS
RETALHOS CUTÂNEOS EM RATOS, ADMINISTRADA VIA SUBCUTÂNEA**

Belo Horizonte - MG

2019

STEPHANIE LUZIA DA COSTA PEDRETTI

**AÇÃO DA PENTOXIFILINA NA VITALIDADE E NO REPARO TECIDUAL DOS
RETALHOS CUTÂNEOS EM RATOS, ADMINISTRADA VIA SUBCUTÂNEA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação de Ciências Aplicadas à Cirurgia e Oftalmologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Aplicadas à Cirurgia.

Orientador: Professor Doutor Tarcizo Afonso Nunes.

Coorientador: Professor Doutor Cícero de Lima Rena.

Faculdade de Medicina - UFMG

Belo Horizonte – MG

JULHO – 2019

P371a Pedretti, Stephanie Luzia da Costa.
Ação da Pentoxifilina na vitalidade e no reparo tecidual dos retalhos cutâneos em ratos, administrada via subcutânea [manuscrito]. / Stephanie Luzia da Costa Pedretti. -- Belo Horizonte: 2019. 100f.: il.
Orientador (a): Tarcizo Afonso Nunes.
Coorientador (a): Cícero de Lima Rena.
Área de concentração: Cicatrização.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Cicatrização. 2. Retalhos Cirúrgicos. 3. Pentoxifilina. 4. Sobrevivência de Tecidos. 5. Ratos. 6. Dissertação Acadêmica. I. Nunes, Tarcizo Afonso. II. Rena, Cícero de Lima. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WO 185



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À
OFTALMOLOGIA

UFMG

FOLHA DE APROVAÇÃO

**AÇÃO DA PENTOXIFILINA NA VITALIDADE E NO REPARO TECIDUAL DOS
RETALHOS CUTÂNEOS EM RATOS, ADMINISTRADA VIA SUBCUTÂNEA**

STEPHANIE LUZIA DA COSTA PEDRETTI

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA, como requisito para obtenção do grau de Doutor em CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA, área de concentração CICATRIZAÇÃO, linha de pesquisa Fatores Intervenientes na Cicatrização Tecidual.

Aprovada em 01 de julho de 2019, pela banca constituída pelos membros:


Prof(a). Tarcizo Afonso Nunes - Orientador
UFMG


Prof(a). Cícero de Lima Rena
UFJF


Prof(a). Armando Chiari Junior
UFMG


Prof(a). José Carlos Ribeiro Resende Alves
FMUIT


Prof(a). Vera Maria Peters
UFJF


Prof(a). Rui Lopes Filho
IML-BH

Belo Horizonte, 1 de julho de 2019.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E
À OFTALMOLOGIA**

Reitora: Professora Sandra Regina Goulart Almeida

Vice-Reitor: Professor Alessandro Fernandes Moreira

Pró-Reitor de Pós-Graduação: Professor Fábio Alves da Silva Júnior

Pró-Reitor de Pesquisa: Professor Mário Fernando Montenegro Campos

Diretor da Faculdade de Medicina: Professor Humberto José Alves

Vice-Diretora da Faculdade de Medicina: Professora Alamanda Kfoury Pereira

Coordenador do Centro de Pós-Graduação: Professor Tarcizo Afonso Nunes

Subcoordenadora do Centro de Pós-Graduação: Professora Eli Lola Gurgel
Andrade

Chefe do Departamento de Cirurgia: Professor Marco Antônio Gonçalves
Rodrigues

Chefe do Departamento de Oftalmologia e Otorrinolaringologia: Professora
Helena Maria Gonçalves Becker

**Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e
à Oftalmologia:**

Professora Vivian Resende (coordenadora)

Professor Túlio Pinho Navarro (subcoordenador)

Professor Marco Antônio Percoppe

Professor Sebastião Cronemberger Sobrinho

Professor Márcio Bittar Nehemy

Representante Discente: Artur Caldeira Abreu Veloso

Aos meus pais, Newton e Verônica,
exemplos de coragem e persistência,
amor e saudade eterna.

Aos meus filhos, Raphael, Gabriel e
Laura, alegrias da minha vida, certeza
de amor.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Tarcizo Afonso Nunes, coordenador do Centro de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina da UFMG, pela disponibilidade, pelos valiosos conhecimentos compartilhados, acolhimento, paciência, confiança e incentivo à pesquisa.

Ao Professor Doutor Cícero de Lima Rena, pelos valiosos conhecimentos compartilhados e enriquecedora experiência, pela disponibilidade, paciência, confiança e incentivo à pesquisa.

À Professora Doutora Paula Peixoto Campos, do Departamento de Patologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais, pelos valiosos conhecimentos compartilhados, compromisso, acolhimento e contribuição à pesquisa.

A todos os funcionários da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais.

À Professora Doutora Vera Maria Peters, pela organização do Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora - MG, local da realização do experimento. Ao Sr. Luiz Carlos Franco, funcionário designado pelo CBR-UFJF, para me acompanhar e auxiliar no experimento, pela preciosa contribuição, compromisso, pontualidade e amizade. A todos os funcionários do CBR-UFJF, pelas contribuições na realização do experimento desta pesquisa.

À Doutora Laura Alejandra Orellano, Pós-Doutoranda do Departamento de Patologia Geral da Universidade Federal de Minas Gerais, pelo apoio e amizade, pelas contribuições nos procedimentos no Laboratório de Morfologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB-UFMG). À doutoranda do Laboratório de Apoptose e Angiogênese do ICB- UFMG, Marcela Guimarães Takahashi de Lazari, pela amizade, apoio e compromisso.

A todos os funcionários e professores do Departamento de Patologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Ao Professor Fernando Henrique Pereira, do Núcleo de Bioestatística da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, pelos ensinamentos e orientação na análise estatística.

Ao Professor Aloísio Goreske, administrador do Hospital da Santa Casa de Misericórdia de Juiz de Fora Minas Gerais, pelo apoio à realização do experimento.

Ao funcionário Cícero Moreira, chefe da Farmácia do Hospital da Santa Casa de Misericórdia de Juiz de Fora, Minas Gerais, pelo compromisso e contribuição à pesquisa.

Ao meu consorte, Eduardo, e meus filhos, Raphael, Gabriel e Laura, inesgotáveis fontes de amor, minha profunda gratidão pela maravilhosa estrutura familiar.

Aos meus amigos, pelo incentivo e reconhecimento.

A todas as pessoas que contribuíram, apoiaram e participaram de maneira direta e ou indireta na pesquisa.

Às pessoas que me incentivaram a buscar novos conhecimentos para contribuir com novos motivos para outras pesquisas.

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca se tem medo e nunca se arrepende”.

Leonardo da Vinci

RESUMO

Introdução: o retalho cutâneo é considerado importante recurso cirúrgico para a reconstrução de perdas teciduais, porém pode apresentar complicações como isquemia e necrose. **Objetivos:** verificar a ação da pentoxifilina na vitalidade e no reparo tecidual dos retalhos cutâneos em ratos, administrada via subcutânea, na dose de 100 mg/kg. Identificar elementos histológicos, como número de vasos, reepitelização, densidade do colágeno e as dosagens de *VEGF* e *TGF-β1*. **Método:** foram utilizados 32 ratos da linhagem *Wistar (Rattus Norvegicus albinus)*, distribuídos em quatro grupos, com oito animais cada, denominados CT, P1, P3, P5. Foi confeccionado retalho cutâneo de McFarlane modificado, pedículo caudal. O grupo CT recebeu gaze embebida com solução salina no leito do retalho. Foi administrada pentoxifilina nos grupos P1, P3 e P5, via subcutânea, no peroperatório até o 5º dia de pós-operatório. Foram aferidas as variáveis macroscópicas: dimensão total do retalho, tecido com necrose e viável. Realizou-se a exérese do retalho para análises histológicas e dosagens bioquímicas de *VEGF* e *TGF-β1*. Os animais foram submetidos à eutanásia no 10º dia do pós-operatório. Análises morfométricas quantificaram número de vasos, espessura do epitélio e densidade do colágeno. **Resultados:** A análise macroscópica do retalho cutâneo dos ratos mostrou que o valor da média da dimensão do tecido com necrose no grupo CT: 35,85mm (±1,95) e no grupo P5: 22,73mm (±0,87), $p < 0,0001$. A dimensão do tecido viável no grupo CT: 39,2mm (±1,62) e grupo P5: 45,85mm (±0,8074), $p = 0,0164$. O número de vasos/campo aumentou nos três segmentos do retalho cutâneo e, no segmento distal do retalho dos grupos, CT: 21 (±3,4) e P5: 40 (±5,0), $p = 0,0174$. A espessura do epitélio aumentou no segmento distal dos grupos, CT: 9µm (±0,5) e P5: 15µm (±1,1), $p < 0,0001$. A densidade do colágeno reduziu em todos os segmentos do retalho cutâneo dos grupos tratados. No segmento distal dos grupos CT: 138000µm² (±3330), P5: 34430µm² (±5321), $p < 0,0001$. Os níveis do *VEGF* nas amostras de pele do grupo CT: 246,8pg/mg (± 25,8), P5: 471,1pg/mg (±33,8), $p < 0,0001$, e no soro do grupo CT: 145,2pg/mg (± 5,1), P5: 223,9pg/mg (± 25,2), $p = 0,005$. Os níveis do *TGF-β1* nas amostras de pele do grupo CT: 162,1pg/mg (± 22,9), P5: 46,4pg/mg (± 17,20), $p = 0,018$, e no soro do grupo CT: 313,9pg/mg (± 28,5), P5: 191,3pg/mg (± 15,9), $p = 0,0063$. **Conclusões:** A pentoxifilina, administrada via subcutânea, aumentou a vitalidade e o reparo tecidual dos retalhos cutâneos nos grupos de ratos tratados por maior número de dias. Houve aumento do número de vasos, *VEGF* e espessura do epitélio. Evidente diminuição da densidade do colágeno e *TGF-β1*.

Palavras-chave: Cicatrização. Retalhos cirúrgicos. Pentoxifilina. Sobrevivência de tecido. Rato.

ABSTRACT

Introduction: the skin flaps play a very important role of the plastic surgery for the reconstruction of tissue loss, but may present complications such as ischemia and necrosis. **Objectives:** To verify the action of pentoxifylline, administered by subcutaneous route, at the dose of 100 mg / kg, in the vitality and tissue repair in cutaneous flaps of rats. To identify histological elements, such as number of vessels, epithelium thickness, density of collagen and dosages of VEGF and TGF- β -1. **Method:** 32 Wistar rats (*Rattus Norvegicus albinus*), distributed in four groups named CT, P1, P3, P5, with eight animals each, were used. The modified Mcfarlane skin flap, caudal pedicle was performed. In the CT group the flap received gauze soaked with saline on the flap bed. Pentoxifylline was administered, by subcutaneous route, in the P1, P3, P5 groups, in the perioperative until the 5th postoperative day. Macroscopic variables were measured: total flap size, tissue with necrosis and tissue viability. The excision of the flap was performed for histological analysis and biochemical measurements of VEGF and TGF- β 1. The animals were submitted to euthanasia on the 10th day. Morphometric analyzes quantified: number of vessels, epithelium thickness and collagen density. **Results:** The macroscopic analysis of the rat skin flap showed that the mean tissue size with necrosis in the CT group was 35.85 mm (\pm 1.95) and in the P5 group: 22.73 mm (\pm 0.87), $p < 0.0001$. The size of the viable tissue in the groups, CT: 39.2mm (\pm 1.62) and P5: 45.85mm (\pm 0.8074), $p = 0.0164$. The morphometric analysis showed that the number of vessels / field increased in the three segments of the skin flap with significant differences, in the distal segment of the flap in groups, CT : 21 (\pm 3.4) and P5: 40 (\pm 5.0), $p = 0.0174$. The epithelium thickness of the increased in the three segments of the skin. In the distal segment, CT group: 9 μ m (\pm 0.5), P5 group: 15 μ m (\pm 1.1), $p < 0.0001$. The collagen density decreased in all segments of the cutaneous flap in the treated groups. In the distal segment, CT group: 138000 μ m² (\pm 3330), P5 group: 34430 μ m² (\pm 5321), $p < 0,0001$. The levels of VEGF in the skin samples of the CT group: 246.8pg / mg (\pm 25.8), P5 group: 471.1pg / mg (\pm 33.8), $p < 0.0001$. In the sérum, CT group: 145.2pg / mg (\pm 5.1), P5 group: 223.9pg / mg (\pm 25.2), $p = 0.005$. The levels of TGF- β 1 in the skin samples of the CT group: 162.1 pg / mg (\pm 22.9), P5 group: 46.4 pg / mg (\pm 17.20), $p = 0.018$. In the sérum, group CT: 313.9 pg / mg (\pm 28.5), P5 group: 191.3 pg / mg (\pm 15.9), $p = 0.0063$. **Conclusion:** Pentoxifylline administered by subcutaneous route, increased vitality and repair of cutaneous flaps in the groups of rats treated for a greater number of days. There was an increase a number of vessels VEGF, and epithelial thickness. Evident decreased collagen density and TGF- β 1.

Key words: Wound healing. Surgical flaps. Pentoxifylline. Survival of tissue. Rat.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

| | |
|---|---|
| °C | Grau Celsius |
| µg | Micrograma |
| µL | Microlitro |
| µm | Micrômetro |
| A | Animal |
| a.C | Antes de Cristo |
| AMP _c | Adenosina Monofosfato cíclico |
| ANOVA | Análise de variância |
| ATP | adenosina trifosfato |
| C ₁₃ H ₁₈ N ₄ O ₃ | Molécula da pentoxifilina com 13 átomos de Carbono, 18 átomos de Hidrogênio, 04 átomos de Nitrogênio, 03 átomos de Oxigênio |
| CBR | Centro de Biologia da Reprodução |
| CEUA | Comissão Ética no Uso de Animais |
| CIOMS | Colégio Internacional em Experimentação Animal |
| cm | Centímetro |
| cm ² | Centímetro quadrado |
| CIOMS | <i>Council for International Organizations of Medical Sciences</i> |
| CONCEA | Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal |
| CO ₂ | Dióxido de carbono |
| CT | Grupo Controle |
| CTGF | <i>Connective tissue Growth Factor</i> (Fator de crescimento de tecido conjuntivo) |
| D | Distal |
| D1 | Dia da operação |
| D10 | Dia da eutanásia |
| DL50 | Dose letal mediana |
| DP | Desvio-padrão |
| EGF | <i>Epidermal Growth Factor</i> (Fator de crescimento epidérmico) |
| ELISA | <i>Enzyme-linked immunoabsorbent assay</i> |

| | |
|---------------|---|
| FGF | <i>Fibroblast Growth Factor</i> (Fator de crescimento de fibroblastos) |
| GAGs | Glicosaminoglicanos |
| HE | Hematoxilina eosina |
| HGF | <i>Hepatocyte Growth Factor</i> (Fator de crescimento de hepatócitos) |
| I | Intermediário |
| ICB | Instituto de Ciências Biológicas |
| IL | Interleucina |
| IFN- γ | Interferon -gama |
| iNOS | Isoforma do Óxido Nítrico sintase |
| iPDE | Inibidor da fosfodiesterase (<i>Phosphodiesterase</i>) |
| I/R | Isquemia/Reperusão |
| IUPAC | <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> |
| KGF | <i>Keratinocyte Growth Factor</i> (Fator de crescimento de ceratinócitos) |
| kg | Quilograma |
| LASER | <i>Light amplification by stimulated emission of radiation</i> |
| LILACS | Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde |
| Ltda. | Limitada |
| MEC | Matriz extracelular |
| MCTIC | Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação |
| MEDLINE | <i>Medical Literature Analysis and Retrieval System On-line</i> |
| Mg | Miligrama |
| min | Minuto |
| mL | Mililitro |
| mm | Milímetro |
| ms | Milissegundo |
| n | Número de animais (n=) |
| Ng | Nanograma |
| Nm | Nanômetro |
| Pr | Proximal |
| P | Pentoxifilina |
| pg | Picograma |
| P1 | Pentoxifilina - dose única - um dia, grupo 1 |

| | |
|-------------------|--|
| P3 | Pentoxifilina -dose única durante três dias, grupo 3 |
| P5 | Pentoxifilina - dose única durante cinco dias, grupo 5 |
| PDGF | <i>Platelet Derived Growth Factors</i> (Fator de crescimento derivado de plaquetas) |
| pH | Potencial hidrogeniônico |
| Prof | Professor |
| Prof ^a | Professora |
| PSR | <i>Picrosirius Red</i> |
| s | Segundo |
| S.A. | Sociedade Anônima |
| SBCAL | Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório |
| TGF-β1 | <i>Transforming Growth Factor beta - 1</i> (Fator de crescimento transformador beta-1) |
| TNF-α | <i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i> (Fator de necrose tumoral- alfa) |
| TRAM | <i>Transverse Rectus Abdominis Myocutaneous</i> (Retalho miocutâneo reto abdominal) |
| UFJF | Universidade Federal de Juiz de Fora |
| UFMG | Universidade Federal de Minas Gerais |
| USA | <i>United State of America</i> |
| VEGF | <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> (Fator de crescimento do endotélio vascular) |
| α | Alfa |
| β | beta |
| μ | Micra |
| p | Pico |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Fotografias do rato e aferição das medidas do retalho cutâneo no dorso, com paquímetro digital..... | 40 |
| Figura 2 - Fotografias da confecção do retalho cutâneo no dorso do rato.... | 41 |
| Figura 3 - Fotografia do animal do grupo Controle mostra retalho no dorso do rato com gaze embebida com solução salina 0,9%, acima da fáscia muscular..... | 42 |
| Figura 4 - Fotografia mostra esquema de desenho retangular do retalho cutâneo no dorso do rato, de 2,0 cm de largura por 8,0 cm de comprimento e as marcações de suas divisões nos segmentos: distal (D) distal, intermediário (I) e proximal (Pr)..... | 43 |
| Figura 5 - Desenho mostra esquema de administração da pentoxifilina nos segmentos - conteúdo de 1,0 mL dividido em cinco injeções de 0,2 mL, administração no segmento distal e na transição dos segmentos do retalho intermediário (I) e proximal (Pr)..... | 44 |
| Figura 6 - Fotografia de animal do grupo P1 mostra administração solução com pentoxifilina, via subcutânea, no segmento intermediário do retalho no dorso do rato, peroperatório (D1)..... | 44 |
| Figura 7 - Fotografias de animal do grupo P3 mostram administração da solução com pentoxifilina, via subcutânea, no segmento distal e intermediário do retalho no dorso do rato nos dias D1, D2 e D3..... | 45 |
| Figura 8 - Fotografias de animal do grupo P5 mostram administração da solução com pentoxifilina, via subcutânea, no segmento distal e intermediário do retalho no dorso do rato nos dias D1, D2, D3, D4 e D5..... | 45 |
| Figura 9 – Animal com necrose parcial no segmento distal do retalho cutâneo..... | 47 |
| Figura 10 - Fotografias do retalho, peça cutânea retangular, superfície dorsal (A) e ventral (B) de animal do grupo P3, com aferição da dimensão de necrose por meio do paquímetro digital..... | 48 |
| Figura 11 - Fotografia do animal em decúbito dorsal e coleta de sangue por punção cardíaca..... | 48 |

| | |
|---|----|
| Figura 12 - Imagem da captura de tela do programa de morfometria <i>Image Pró-Plus 4.5</i> | 51 |
| Figura 13 - Fotografias representativas da aferição das medidas das dimensões dos tecidos com necrose nos retalhos cutâneos, no 10 ^o dia de pós-operatório, com paquímetro digital, comparando-se as medidas nos animais dos quatro grupos: CT, P1, P3 e P5..... | 56 |
| Figura 14 - Fotografias de peça cutânea retangular, superfície dorsal e ventral, grupos P3 e P5 (A e B)..... | 58 |
| Figura 15 - Fotomicrografias representativas de cortes histológicos do segmento intermediário do tecido de granulação de amostras do retalho cutâneo dos grupos: CT, P1, P3, P5..... | 60 |
| Figura 16 - Fotomicrografias representativas de cortes histológicos do segmento intermediário do retalho cutâneo do grupo P5, mostra vasos do tecido de granulação..... | 61 |
| Figura 17 - Fotomicrografias representativas de cortes histológicos do segmento intermediário do tecido de granulação de amostras do retalho cutâneo dos grupos: CT, P1, P3, P5..... | 62 |
| Figura 18 - Fotomicrografias representativas de cortes histológicos do segmento intermediário, amostras do retalho cutâneo dos grupos: CT, P1, P3, P5..... | 64 |

LISTA DE GRÁFICOS

| | |
|--|-----|
| Gráfico 1 - Representação gráfica da macroscopia: dimensão total do retalho, do tecido com necrose, do tecido viável, comparação entre os grupos: CT, P1, P3, P5, (A-C)..... | 93 |
| Gráfico 2 - Representação gráfica da morfometria do número de vasos/campo nos segmentos: proximal, intermediário, distal do retalho cutâneo e comparação entre os grupos CT, P1, P3, P5 (A-C)..... | 94 |
| Gráfico 3 - Representação gráfica da morfometria da espessura do epitélio nos segmentos: proximal, intermediário, distal do retalho cutâneo e comparação entre os grupos CT, P1, P3, P5..... | 95 |
| Gráfico 4 - Representação gráfica da morfometria da densidade do colágeno nos segmentos: proximal, intermediário, distal do retalho cutâneo e comparação entre os grupos CT, P1, P3, P5..... | 96 |
| Gráfico 5 - Representação gráfica da dosagem de <i>VEGF</i> , comparação na pele (A) e no soro (B) nos grupos: CT, P1, P3, P5..... | 97 |
| Gráfico 6 - Representação gráfica da dosagem de <i>TGF-β1</i> , comparação na pele(A) no soro(B) nos grupos: CT, P1, P3, P5..... | 97 |
| Gráfico 7 - Diagrama de caixa (<i>box-plot</i>): peso no dia da operação..... | 98 |
| Gráfico 8 - Diagrama de caixa (<i>box-plot</i>): peso no dia da eutanásia..... | 98 |
| Gráfico 9 - Diagrama de caixa (<i>box-plot</i>): dimensão total do retalho..... | 99 |
| Gráfico 10 - Diagrama de caixa (<i>box-plot</i>): dimensão do tecido com necrose..... | 99 |
| Gráfico 11 - Diagrama de caixa (<i>box-plot</i>): dimensão do tecido viável..... | 99 |
| Gráfico 12 - Representação gráfica das dimensões total do retalho, do tecido com necrose, do tecido viável..... | 100 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|--|----|
| Quadro 1 - Classificação das fibras colágenas..... | 33 |
| Quadro 2 - Citocinas e fatores de crescimento, células produtoras e efeito biológico..... | 35 |
| Quadro 3 – Animal/grupo, variáveis: peso/operação; peso/eutanásia; dimensão total retalho; dimensão tecido necrose; dimensão tecido viável; observação..... | 91 |
| Quadro 4 - Variáveis peso, dimensão total do retalho, tecido com necrose, tecido viável variável, grupo, de normalidade, de teste Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk..... | 92 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Dimensão do retalho cutâneo: total, do tecido com necrose e do tecido viável (mm), média, desvio-padrão (\pm DP) e porcentagem (%), comparação entre os grupos CT, P1, P3 e P5, valor de p | 57 |
| Tabela 2 – Análise morfométrica do número de vasos/campo, segmentos: proximal, intermediário, distal dos grupos CT, P1, P3, P5; média, \pm desvio-padrão, comparação entre os grupos: CT, P1, P3 e P5, valor de p | 59 |
| Tabela 3 – Análises morfométricas da espessura do epitélio (μ m) nos segmentos: proximal, intermediário, distal dos retalhos nos grupos CT, P1, P3, P5; média, \pm desvio-padrão, valor de p | 61 |
| Tabela 4 – Análise morfométrica da densidade do colágeno (μ m ²) nos segmentos proximal, intermediário, distal dos retalhos nos grupos: CT, P1, P3 e P5, média, \pm desvio-padrão, valor de p | 63 |
| Tabela 5 - Fator de crescimento do endotélio vascular (<i>VEGF</i>) dos grupos CT, P1, P3, P5, na pele e no soro, média, desvio-padrão (\pm DP), pg/mg, valor de p | 65 |
| Tabela 6 - Fator de crescimento transformador beta-1 (<i>TGF-β1</i>) dos grupos CT, P1, P3, P5, na pele e no soro, média, desvio-padrão (\pm DP), pg/mg, valor de p | 65 |

SUMÁRIO¹

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 22 |
| 2 OBJETIVOS..... | 26 |
| 2.1 Objetivo geral..... | 27 |
| 2.2 Objetivos específicos..... | 27 |
| 3 REVISÃO DA LITERATURA..... | 28 |
| 3.1 Modelo animal..... | 29 |
| 3.2 Pentoxifilina..... | 29 |
| 3.2.1 <i>Via de administração subcutânea</i> | 31 |
| 3.3 Retalho cutâneo..... | 31 |
| 3.4 Reparo tecidual..... | 33 |
| 4 MÉTODO..... | 39 |
| 4.1 Animais e composição dos grupos..... | 40 |
| 4.1.1 <i>Preparação dos animais para o experimento e anestesia</i> | 41 |
| 4.1.2 <i>Procedimentos cirúrgicos</i> | 42 |
| 4.1.3 <i>Uso de medicamentos nos retalhos nos quatro grupos de animais</i> | 43 |
| 4.2 Pós-operatório..... | 47 |
| 4.2.1 <i>Exérese do retalho, coleta de sangue e eutanásia</i> | 48 |
| 4.3 Análise histológica e análises morfométricas..... | 50 |
| 4.3.1 <i>Dosagem de VEGF, TGF-β1</i> | 53 |
| 4.3.2 <i>Análise estatística e variáveis estudadas</i> | 54 |
| 5 RESULTADOS..... | 56 |
| 5.1 Análise macroscópica da vitalidade dos retalhos cutâneos..... | 57 |
| 5.2 Avaliação histológica das amostras do retalho cutâneo..... | 59 |
| 5.2.1 <i>Morfometria do número de vasos</i> | 59 |

¹ Este trabalho foi revisado com base nas novas regras ortográficas aprovadas pelo Acordo Ortográfico assinado entre os países que integram a Comunidade de Países de Língua Portuguesa (CPLP), em vigor no Brasil desde 2009. O texto foi formatado de acordo com a ABNT NBR 14724, atualizada de 17.04.2017 e as referências seguiram as normas de Vancouver.

| | |
|---|----|
| 5.2.2 Morfometria da espessura do epitélio..... | 62 |
| 5.2.3 Morfometria da densidade do colágeno..... | 63 |
| 5.3 Dosagem bioquímica do VEGF e TGF- β 1 na pele e no soro dos animais..... | 65 |
| 5.3.1 Fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) na pele e no soro dos animais..... | 65 |
| 5.3.2 Fator de crescimento transformador beta-1 (TGF- β 1) na pele e no soro dos animais..... | 66 |
| | |
| 6 DISCUSSÃO..... | 67 |
| | |
| 7 CONCLUSÕES..... | 79 |
| | |
| REFERÊNCIAS..... | 81 |
| | |
| ANEXOS E APÊNDICES..... | 89 |

1 INTRODUÇÃO

Retalho cutâneo, por definição, é a transferência de um segmento de pele de um local do organismo para outro, permanecendo o pedículo vascular¹. Considerado um importante recurso cirúrgico para a reconstrução de perdas teciduais decorrentes de traumas, excisão de lesões neoplásicas, defeitos congênitos ou de isquemia, pode apresentar complicações como edema, deiscência, hematoma, infecção e necrose, mesmo com o apropriado zelo e o uso da técnica adequada^{1,2}.

A confecção do retalho cutâneo envolve complexos processos da cicatrização e circulatórios, cujo início se faz imediatamente, na incisão, quando há interrupção da integridade da pele, com lesão de vasos e conseqüente ativação de vias da cascata da coagulação^{3,4}. Uma incerteza do procedimento cirúrgico é a imprevisibilidade da suficiência da vascularização do retalho²⁻⁵. Na dissecação do retalho o aporte vascular pode apresentar-se insuficiente, principalmente no segmento distal, levando ao comprometimento da vitalidade e a eventual necrose parcial ou total⁵⁻⁸.

Alterações fisiopatológicas ocorrem durante a confecção do retalho cutâneo e podem induzir uma série de eventos, como a interrupção parcial do suprimento vascular e conseqüente diminuição da perfusão, por período variável e transitório. O retorno venoso no plexo dérmico e subdérmico ficam prejudicados, sendo a oclusão venosa nocente para vitalidade do retalho. Os vasos linfáticos lesionados resultam em edema intersticial, colaborando para a diminuição do aporte sanguíneo nos capilares. Os nervos do sistema simpático seccionados causam a liberação de catecolaminas, gerando vasoconstricção e redução do aporte vascular local^{1,2}. Diante do restabelecimento da perfusão, lentamente, o tecido do retalho cutâneo, mal perfundido, deve reequilibrar o balanço endógeno e a formação de radicais livres, uma vez aumentada após o trauma cirúrgico⁵⁻¹¹.

O mecanismo da reperfusão, com o retorno do aporte de oxigênio no tecido isquêmico, gera espécies reativas de oxigênio. Produtos resultantes desse fenômeno influenciam e causam alterações inflamatórias e metabólicas mediadas por radicais livres, que provocam modificações celulares estruturais e funcionais, que podem contribuir para a necrose tecidual.

Concomitantemente ao trauma cirúrgico de confecção do retalho cutâneo, ocorre processo inflamatório mediado por grupo de cininas: serotonina, histamina e bradicinina. Estas agem promovendo aumento da permeabilidade da

microcirculação, que por vezes benéfica ocasiona edema intersticial. Esse edema, mesmo, transitório, pode durar de quatro a 24 horas, e contribui para a diminuição da perfusão do retalho^{1-9,12}.

O retalho cutâneo necessita sobreviver e superar todas as etapas que acarretam a diminuição de perfusão, alterações nas complexas e sequenciais fases da cicatrização e, por fim, atingir a vitalidade em toda a sua extensão, evitando-se, assim, a necrose.

A perda da vitalidade, principalmente no segmento distal, apresenta índice que varia de 9 a 65%, o que resulta em impacto na qualidade de vida do paciente e é um dos precedentes para o aumento dos custos assistenciais, requerendo providências para ser evitada^{4-6,8}. Quando presente, a necrose do retalho é um desafio para o cirurgião, pois provavelmente haverá a demanda de procedimentos cirúrgicos secundários.

Várias pesquisas experimentais empregaram fármacos e outras modalidades terapêuticas com o fito de atenuar o processo de formação de radicais livres, estimular o reparo tecidual e diminuir o edema tecidual. Entre os fármacos encontram-se o dimetilsulfóxido, ácido kaurenico, arginina, hialuronidase, sildenafil, minoxidil, estradiol, estreptoquinase e alopurinol, pentoxifilina, cloridrato de buflomedil, toxina botulínica tipo A, heparina, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina e calcitriol. Entre as modalidades terapêuticas encontram-se a oxigenação hiperbárica, fator de crescimento vascular endotelial, eletroporação e gene do fator de crescimento de hepatócito, células-tronco mesenquimais de tecido adiposo, plasma rico em plaquetas e LASER diodo. Todas essas pesquisas buscaram as diversas maneiras de interferir e modificar as condições da perfusão, principalmente no segmento intermediário e distal do retalho cutâneo. Assegurando, assim, a vitalidade do retalho, com a possibilidade de diminuir ou mesmo evitar a necrose,^{5,8-26}.

A partir das pesquisas anteriores e dos conhecimentos adquiridos observaram-se perspectivas e lacunas para realizar nova investigação. A pentoxifilina foi o fármaco de escolha do presente estudo, administrada via subcutânea para averiguar as alterações teciduais em retalhos cutâneos de rato^{1,7,15,17,20,27-36}.

A pentoxifilina possui propriedade hemorreológica, pois aumenta a deformabilidade de eritrócitos, cujo tamanho normal varia 7 a 8 micrômetros (μm), e

desse modo, facilita esses circularem por capilares de $3\ \mu\text{m}$ ²⁸. O fenômeno depende da geometria celular, da viscosidade interna e das propriedades viscoelásticas da membrana eritrocitária²⁸. O aumento do aporte de sangue, por carrear mais oxigênio, possibilita a circulação de adenosina 3',5' monofosfato cíclico, capacitando o metabolismo interferir na vitalidade tecidual. O fármaco atua na cascata da coagulação, inibindo a agregação plaquetária, aumentando a síntese de prostaciclina, sendo este último, um importante vasodilatador. Desempenha papel na imunomodulação morfológica, diminui a ação inflamatória e tem ação fibrinolítica, com diminuição da síntese de colágeno. Potente antioxidante age inibindo a síntese de ânion superóxido, podendo reduzir os metabólitos tóxicos da reperfusão, com redução dos responsáveis pelo dano tecidual e consequente restauração da vitalidade do retalho^{1,7,15,17,20,29-38}.

A pentoxifilina é sobejamente usada pela via oral e parenteral tanto nos distúrbios circulatórios, como nas doenças oclusivas arteriais periféricas⁴⁰. Na Cirurgia Plástica tem sido usada no pós-operatório de confecção de retalhos, pela via parenteral¹. Na Dermatologia, tem aplicabilidade no tratamento de algumas dermatoses, assim como tem uso em outras especialidades, como a Oftalmologia, Otorrinolaringologia, Gastroenterologia e Cardiologia⁴¹⁻⁴⁷.

Não foram encontradas, na literatura, publicações sobre o uso da pentoxifilina, administrada via subcutânea, com a dose de 100 mg/kg/dia, no retalho cutâneo do dorso de ratos.

O presente estudo tem a proposta de avaliar os efeitos da pentoxifilina, quando administrada via subcutânea. Verificar a ação do fármaco na vitalidade e no reparo tecidual dos retalhos cutâneos do dorso de ratos. Identificar os elementos histológicos que integram o reparo tecidual e a influência na vitalidade sob a ação do fármaco.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Verificar a ação da pentoxifilina na vitalidade e no reparo tecidual dos retalhos cutâneos de ratos, administrada via subcutânea, na dose de 100 mg/kg/dia, em períodos diferentes.

2.2 Objetivos específicos

Identificar a ação da pentoxifilina na vitalidade e no reparo tecidual dos retalhos cutâneos, por meio de quantificar:

- ✓ angiogênese: número de vasos/campo e dosagem de *VEGF*
- ✓ reepitelização: espessura do epitélio
- ✓ densidade do colágeno e dosagem de *TGF-β1*

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Modelo animal

O trabalho “Introdução ao Estudo de Medicina Experimental”, de *Claude Bernard*, 1865, com os estudos de fisiologia, difundiu os princípios de investigação em animais e transposição para a fisiologia humana e procurou estabelecer as diretrizes, regras e os princípios para o estudo experimental. O modelo animal é usado em todos os campos da pesquisa biológica. A exploração de outras espécies pelos humanos, atualmente, tem condições e regras éticas estabelecidas. Em cirurgia, observa-se a possibilidade de novas técnicas cirúrgicas, bem como uso de fármacos e tecnologias a serem testados em animais. Com a simulação do procedimento cirúrgico em animais tornou-se possível verificar a viabilidade da sua realização, eficácia terapêutica e consequências na homeostase do organismo submetido ao experimento⁴. A escolha do modelo foi criteriosa, embasada no uso tradicional e consagrado em estudos de retalho cutâneo da literatura com o modelo rato, sendo o animal mais usado, para esse tipo de estudo, em pesquisas nas quatro bases de dados da literatura^{4-23,25,26,29,33,34, 36-38}.

3.2 Pentoxifilina

De acordo com a nomenclatura internacional de química (*International Union of Pure and Applied Chemistry - IUPAC*) é designada como *3,7-dimethyl-1-(5-oxohexyl) purine-2,6-dione*. O fármaco é um derivado trimetilado das xantinas, cuja fórmula molecular é $C_{13}H_{18}N_4O_3$. A meia-vida do fármaco é de 0.4 a 0.8 horas, com excreção renal. A dose letal mediana (DL50), após administração intraperitoneal em camundongos é de 195 mg/kg de peso corpóreo; e após administração oral a dose é de 1385 mg/kg. A DL50 do fármaco após administração intraperitoneal em ratos é de 230 mg/kg de peso corpóreo e após administração oral, 1.770 mg/kg^{15,20,27,30}.

O fármaco desempenha papel na imunomodulação morfológica, com ação na fibrogênese, diminuição da síntese de colágeno e redução da ação inflamatória. Potente antioxidante atua inibindo a síntese de ânion superóxido, diminuindo o estresse oxidativo, podendo reduzir os metabólitos tóxicos da reperfusão responsáveis pelo dano tecidual e consequente aumento da vitalidade do retalho^{1,7,15,20,27,29,32,35,36}.

Inibidor da fosfodiesterase (iPDE), atua em nível do monofosfato de 3' 5'adenosina (AMP_c), mediador intracelular, um nucleotídeo sintetizado no núcleo da célula a partir da adenosina trifosfato (ATP), sob ação de uma enzima ligada à membrana, a adenilatociclase. O AMP_c é continuamente produzido e inativado por hidrólise da 5'-AMP, por meio da família de enzimas conhecidas como fosfodiesterases. O AMP_c regula vários aspectos da função celular, incluindo enzimas envolvidas no metabolismo energético, divisão e diferenciação celulares, transporte de íons, canais iônicos e proteínas contráteis, com envolvimento na energia e vitalidade celular^{7,10,20,35-46}.

Pesquisas mostraram os efeitos do fármaco na redução da inflamação sistêmica, podendo agir como mediador de fator de necrose tumoral alfa ($TNF-\alpha$), interleucina (IL) 1, 6 e 8; fator de crescimento endotelial vascular ($VEGF$) e fator de crescimento transformador-beta ($TGF-\beta 1$). Estes interferem em elementos celulares, como os neutrófilos, monócitos e macrófagos, inibindo a proliferação de fibroblastos com diminuição da produção e organização das fibras colágenas, glicosaminoglicanos e fibronectina. O fármaco reduz a adesividade dos leucócitos ao endotélio, diminuindo a ativação dos leucócitos e o consequente dano endotelial de neutrófilos resultante. Atua na diminuição do fibrinogênio sérico, minorando a agregação plaquetária e promovendo a desgranulação plaquetária, sem prolongar o tempo de sangramento^{15,20,27,28,30,34,35,37,41-47}.

O uso do fármaco em pacientes de diversas especialidades médicas tem eficácia comprovada, como na Cirurgia Vascular, pois promove a melhora da perfusão na microcirculação, pela melhora da fluidez sanguínea e dos efeitos antitrombóticos. Detém vasta aplicabilidade no tratamento das doenças vasculares, e é administrada pela via oral e parenteral⁴⁰.

A pentoxifilina é utilizada na Cirurgia Plástica para influenciar e atuar na microcirculação, com o intuito de prevenir a necrose de retalho, sendo administrada por via oral ou parenteral^{1,6,7,15,20,29,32-34,37,38}.

A Dermatologia tem utilizado a pentoxifilina como tratamento ou como adjuvante no tratamento de algumas doenças como a psoríase, hanseníase, leishmaniose, sarcoidose, vasculites idiopáticas, entre outras citadas em trabalhos da literatura, administrada pela via oral⁴¹.

O uso da pentoxifilina na Oftalmologia é citado com melhora do fluxo sanguíneo ocular em pacientes com retinopatia diabética, devido a inibição do cálcio intracelular

dos polimorfonucleares, porém os resultados ainda são controversos e são necessários novos estudos^{42,43}. Na Otorrinolaringologia, há estudo comparativo entre o uso da pentoxifilina, via parenteral, e a nitroglicerina tópica nas perfurações timpânicas^{44,45}.

Na Gastroenterologia, trabalho com o método de metanálise, base de dados Cochrane, ano de 2009, 336 pacientes com o distúrbio do fígado de hepatite alcoólica grave, receberam administração de pentoxifilina. O resultado da pesquisa mostrou significativa redução da mortalidade nos pacientes que receberam a administração pela via oral e parenteral de pentoxifilina⁴⁶.

Na Cardiologia, atenuou a remodelação cardíaca em pacientes expostos ao tabaco, reduzindo o estresse oxidativo e melhorando a bioenergética cardíaca. A resistência periférica pode ser reduzida se a pentoxifilina for administrada em altas doses ou por infusão parenteral rápida. O fármaco exerce efeito inotrópico positivo no coração⁴⁷.

3.2.1 Via de administração subcutânea

A via subcutânea é um método seguro e reconhecido internacionalmente. A administração de fármaco no tecido celular subcutâneo superficial, com a característica da pentoxifilina é alcançar nível adequado de concentração no local onde o efeito é esperado, ou seja, no sítio operatório. O esquema de administração da pentoxifilina pela via subcutânea pode ser de várias formas, em dose única, durante ou logo após o ato operatório ou com aplicações subsequentes, dependendo do objetivo da pesquisa. O fármaco tem a característica de ser hidrossolúvel (77.000 mg/L - 25º), sendo uma das condições para a administração pela via subcutânea²⁷. A complicação tardia possível é a lipodistrofia na região de aplicação, porém se acredita que outros estudos serão oportunos para avaliar tal possibilidade. O uso da via subcutânea, no entanto, reúne controvérsias e participa com pouca adesão para uso como via de acesso para tratamento^{5,20,22,25,48-50}.

3.3 Retalho cutâneo

Os retalhos são muito utilizados na cirurgia plástica devido à perda de substância tecidual que necessita de reconstrução por exérese de tumor, trauma ou

defeito congênito^{1,5-10,20,48,49}. Sushuruta (600 a.C) descreveu o retalho médio-frontal, primeiro retalho da história da Cirurgia Plástica, chamado de “retalho indiano”, usado na reconstrução de nariz. Gaspare Tagliacozzi, (1597), descreveu a confecção e transposição direta do retalho de membro superior para reconstrução nasal^{1,4}.

Na era da Revolução Científica, século XVII, houve grande avanço das técnicas cirúrgicas, consequência de conhecimentos de Anatomia e de Fisiologia. A Sociedade dos Cirurgiões foi criada no século XVIII, na França, e em seguida na Inglaterra. A Medicina moderna, no século XIX, impulsionou a Cirurgia com o desenvolvimento da anestesia, em 1846^{1,4}.

A partir desse período, muitas técnicas foram criadas, aprimoradas e descritas com os mais diferentes tipos de retalhos para cobertura de estruturas anatômicas nobres e importantes, com melhora significativa do tempo de cicatrização, do aspecto funcional e estético do paciente.

Os retalhos cutâneos, fasciocutâneos, musculares e musculocutâneos possuem em comum a manutenção do pedículo vascular, diferindo no tipo de suprimento vascular, se randomizado ou axial. Quando o suprimento é randomizado, não há um pedículo definido, o fluxo sanguíneo é recebido de artérias miocutâneas que vão enviar ramos e formar os plexos dérmicos e subdérmicos. Como exemplo de retalhos com suprimento vascular randomizado, citam-se os retalhos cutâneos, do tipo de avanço, de rotação e V-Y. Quando o suprimento vascular é axial, o pedículo tem suprimento vascular definido, o fluxo sanguíneo é recebido de artérias cutâneas e septocutâneas que vão enviar ramos para formar plexos dérmicos e subdérmicos. O comprimento do retalho depende do trajeto e tamanho da artéria que compõe o pedículo e forma um feixe neurovascular do retalho^{1,48,49}. Mcfarlane (1965) elaborou e descreveu um modelo de retalho cutâneo com pedículo cranial. Adamson (1967) reproduziu e modificou o retalho cutâneo de Mcfarlane, de pedículo cranial para um mesmo retalho, porém com pedículo caudal. Os estudos nos modelos, em ratos, de Mcfarlane e Adamson foram importantes e são usados, até os dias de hoje, na investigação da vitalidade tecidual e prevenção de isquemia, principalmente no segmento distal do retalho cutâneo^{48,49}.

3.4 Reparo tecidual

O processo de cura da lesão tecidual da pele pode ocorrer por regeneração e cicatrização. O tecido lesionado é preenchido por células do estroma conjuntivo ou glia. As células perdidas são substituídas por células semelhantes estrutural e funcionalmente e são dependentes dos mecanismos da origem do tecido².

A pele é o maior órgão do corpo humano, com importantes funções, e quando íntegra as principais funções são proteger os órgãos e evitar perda dos líquidos internos. É composta de duas camadas, a derme e a epiderme, originárias de folhetos embrionários distintos, mesoderma e ectoderma, respectivamente.

A epiderme é a camada mais superficial da pele, sendo a responsável pela proteção e preservação de órgãos. Células do tipo queratinócitos e melanócitos, assim como células de Langerhans e Merckel, fazem parte do tecido tegumentar. A junção dermoepidérmica tem como principal função promover trocas de líquidos e nutrientes do plexo vascular entre as duas camadas^{2,3,33,51-54}.

A derme tem espessura variada de acordo com a região. É constituída de tecido conjuntivo sobre o qual a epiderme se apoia, conferindo resistência mecânica. Dispõe de duas camadas distintas, com diferenças na densidade de colágeno e elastina, sendo estas: camada papilar (mais superficial) e camada reticular (mais espessa e profunda). As principais células dérmicas são fibroblastos e fibrócitos, porém basófilos, histiócitos e plasmócitos também são encontrados^{2,3,51-53}.

As fibras colágenas, constituídas por uma escleroproteína cuja função é a sustentação dérmica, são compostas de glicina, prolina e hidroxiprolina. O aminoácido glicina compõe a proporção de 33,5%; a prolina e hidroxiprolina aparecem na proporção de 12% e 10%, respectivamente. Colágeno e elastina são as proteínas que contêm hidroxiprolina em concentrações diferentes, logo, há condição de mensurá-las pela dosagem da concentração de hidroxiprolina em determinado tecido^{2,35,53,54}.

Aminoácidos sulfurados, tirosina e outros aminoácidos também participam da formação do colágeno, porém são pouco frequentes. O colágeno é a proteína mais abundante no corpo humano e é sintetizado por fibroblasto, osteoblasto, odontoblasto, condrócito e célula muscular lisa. À microscopia eletrônica, as fibras colágenas se apresentam dispostas em bandas ou estrias transversais, com intervalos de 700 angstroms, em arranjo de tríplice fita helicoidal, com diâmetro de 1

a 20 µm. Existem vários tipos de colágeno, divididos em quatro classes. O colágeno mais abundante no organismo é o do tipo I, com três cadeias peptídicas, duas delas (alfa-1) idênticas entre si e uma diferente (alfa -2). A diferença entre as cadeias alfa 1 e alfa 2 é a sequência dos aminoácidos. O colágeno tipo III é encontrado nos vasos sanguíneos, útero, nervos e também nos tecidos cicatriciais^{2,33,54} (QUADRO 1).

Quadro 1 - Classificação das fibras colágenas

| Classe | Característica | Tipo | Localização |
|--------|-----------------------|-----------------------|---|
| 1 | Fibrilar intersticial | I, II e III | Estrutura extracelular dos principais tecidos conectivos mais abundantes nos mamíferos |
| 2 | Membrana basal | IV | Disposição reticular Integridade da membrana basal Fibras de ancoragem |
| 3 | Pericelular | V e VI | Tipo V envolve os fibroblastos, as células do músculo liso e outras células mesenquimais Tipo VI é encontrado em muitos tecidos conectivos |
| 4 | Recém-descobertos | VII, VIII, IX, X e XI | Tipo VII tem como principal função estabilizar a junção dermoepidérmica e a derme subjacente Tipo X participa da ossificação endocondral Tipo XI é um produto específico dos tecidos cartilagosos |

Fonte Isaac (2007)³⁵.

A **regeneração** é uma restauração perfeita e completa da arquitetura do tecido que sofreu ruptura de sua (s) camada (s). Embora seja a forma esperada e ideal no conjunto da cicatrização, apenas é observada em organismos inferiores, em determinados tecidos como o fígado e no desenvolvimento embrionário⁵¹.

A **cicatrização** é um processo complexo, orquestrado, que envolve uma sequência organizada, simultânea de eventos celulares e moleculares. No momento de lesão da pele, por exemplo, na situação de uma ferida traumática, superficial (epiderme) ou profunda (derme), os mecanismos da cicatrização são imediatamente acionados e ocorre a resposta do organismo ao trauma^{2,3,51-53}.

O **reparo tecidual** inicia-se com o rompimento da barreira da membrana e dos tecidos adjacentes. Acontecem o sangramento, a lesão do endotélio vascular e o extravasamento de proteínas intra e extravascular. O sangramento da ferida é o estímulo para hemostasia, com a ativação das plaquetas e da cascata da coagulação. As plaquetas são fragmentos citoplasmáticos, os primeiros da resposta à lesão e é estímulo à cicatrização de feridas. Vasoconstrição reflexa é a contração

do músculo liso e do endotélio vascular, dura poucos minutos, sendo a primeira resposta à lesão dos vasos. Executa importante papel na cicatrização, dispõe do processo de adesão, agregação e desgranulação. A agregação plaquetária forma coágulo e este origina um trombo que impede o sangramento e constitui uma barreira protetora.

A desgranulação plaquetária ocasiona a liberação de citocinas, fatores de crescimento e matriz extracelular armazenada dentro dos grânulos alfa das plaquetas. Contém substâncias que promovem mecanismos celulares e extracelulares importantes para hemostasia, bem como para várias outras fases da cura das feridas, como a deposição de matriz extracelular, mecanismo de quimiotaxia de leucócitos, proliferação celular, angiogênese e remodelamento^{2,3,35,51-54}. O processo de cicatrização é dividido didaticamente em três fases, são elas: inflamatória, proliferativa e de remodelagem. As fases da cicatrização se sobrepõem e acontecem de forma contínua e temporal.

Fase inflamatória: inicia-se imediatamente com a dissolução da continuidade da pele e perdura por 48 horas a 72 horas. A partir da ferida, com o sangramento, há o extravasamento de plaquetas, plasma e elementos celulares. A agregação plaquetária e elementos ativados da cascata de coagulação possibilitam o contato das plaquetas com o colágeno subendotelial, formando um tampão rico em fibrina que limita o sangramento e efetiva a hemostasia. O recrutamento de leucócitos para a ferida na área de inflamação, como neutrófilos e monócitos, simultaneamente, realiza atividades essenciais no local da ferida. O afluxo de monócitos e sua conversão em macrófagos com a liberação de citocinas e fatores de crescimento são importantes para o reparo tecidual.

Os neutrófilos, assim como os macrófagos, desbridam, limpam partículas de proteínas e propiciam a descontaminação. Os macrófagos ativados são as principais células efetoras do reparo tecidual. Desempenham a função de verdadeiros maestros do mecanismo de cicatrização ao produzirem diversas citocinas e fatores de crescimento que possibilitam a angiogênese, a reepitelização, a migração e a multiplicação de fibroblastos, degradação e remoção de componentes do tecido conjuntivo danificado, bem como a manutenção do processo inflamatório local. Além da fagocitose dos fragmentos celulares, secretam fatores quimiotáticos, capazes de atrair outras células inflamatórias para o local da ferida. Produzem prostanglandinas, que funcionam como potentes vasodilatadores e afetam a

permeabilidade microvascular. O macrófago tem papel relevante na produção das citocinas e fatores de crescimento que se destacam como necessários na formação do tecido de granulação, tais como o fator de crescimento derivado de plaquetas (*PDGF*), fator de crescimento transformador beta (*TGF- β 1*), o fator de crescimento de fibroblasto (*FGF*) e o fator de crescimento endotelial vascular (*VEGF*). Representa componentes fundamentais na transição da fase inflamatória para a fase proliferativa da cicatrização^{2,3,28,33,51-54}.

As citocinas e os fatores de crescimento, assim como, as células produtoras e o efeito biológico correspondente, envolvidos na fase inflamatória da cicatrização, encontram-se didaticamente citadas abaixo (QUADRO 2).

Quadro 2 - Citocinas e fatores de crescimento, células produtoras e efeito biológico

| Citocinas, Fatores de Crescimento | Células produtoras | Efeito biológico |
|---|---|---|
| <i>VEGF</i> (fator de crescimento vascular endotelial) | Macrófagos, ceratinócitos | Potente fator angiogênico |
| <i>TGF-β</i> (fator transformador de crescimento beta) | Plaquetas, macrófagos, endotélio, queratinócitos, fibroblasto | Quimiotaxia de polimorfonucleares, síntese de Isoforma do óxido nítrico sintase (iNOS, proliferação de fibroblastos e diferenciação para miofibroblasto, degradação do colágeno III e síntese do I, fator angiogênico |
| <i>TNF-α</i> (fator de necrose tumoral alfa) | Macrófagos, endotélio | Superexpressão de selectinas no endotélio, aumento da síntese de iNOS e suprarregulação de integrinas |
| <i>KGF</i> (fator de crescimento de ceratinócitos) | Fibroblastos | Quimiotaxia e proliferação de ceratinócitos |
| <i>HGF</i> (fator de crescimento de hepatócitos) | Células mesenquimais | Quimiotaxia e proliferação de ceratinócitos |
| <i>PDGF</i> (fator de crescimento derivado de plaquetas) | Plaquetas, macrófagos, endotélio, ceratinócitos | Quimiotaxia de polimorfonucleares, proliferação de fibroblastos e diferenciação para miofibroblasto, degradação do colágeno I e síntese do III |
| <i>IL-1</i> (interleucina-1) | Macrófagos, endotélio, ceratinócitos | Superexpressão de selectinas no endotélio e aumento da síntese de iNOS |
| <i>IL-8</i> (interleucina-8) | Macrófagos, fibroblastos | Quimioatraente para polimorfonucleares e macrófagos |
| <i>IFN-γ</i> (interferon gama) | Macrófagos | Diferenciação de monócitos em macrófagos e ativação destes; aumento da síntese de iNOS |
| <i>EGF</i> (fator de crescimento epidérmico) | Plaquetas, macrófagos | Quimiotaxia e proliferação de fibroblastos, proliferação e quimioatração de ceratinócitos |
| <i>FGF</i> (fator de crescimento de fibroblastos) | Macrófago, endotélio, fibroblastos | Quimiotaxia e proliferação de fibroblastos e ceratinócitos; potente fator angiogênico |

Fonte: adaptado de Duque (2016)⁵⁴

Fase **proliferativa**: também chamada transicional ou de fibroplasia, com duração de aproximadamente dois a quatro dias. Essa fase envolve a migração e proliferação de fibroblastos, a produção da matriz extracelular, a contração da ferida e a angiogênese. A seguir, cada etapa dessa fase foi sumarizada.

A migração e proliferação de fibroblastos maduros dos tecidos adjacentes e a diferenciação de células mesenquimais locais originam os fibroblastos presentes na ferida. As citosinas e fatores de crescimento liberados pelos macrófagos, sobretudo o *PDGF*, o *TGF- β* , o *FGF* e o fator de crescimento do tecido conjuntivo (*CTGF*), estimulam tanto a migração quanto a proliferação de fibroblastos.

A produção de matriz extracelular tem como elementos estruturais: colágeno, glicosaminoglicanos e proteoglicanos, sendo sintetizada pelo fibroblasto. A elastina não é produzida no processo de cicatrização, não promovendo, nesse momento, a elasticidade da cicatriz.

O fibroblasto produz o procolágeno, que sofre hidroxilação no retículo endoplasmático dos resíduos de lisina e prolina, podendo ser transferido para a matriz extracelular (MEC), com a forma de tríplice hélice. Os cofatores da enzima prolina-hidroxilase são o ácido ascórbico, o ferro, o oxigênio e o alfa cetoglutarato, portanto, a ausência de algum desses impossibilitará a síntese de colágeno, acarretando cicatrização deficiente. A fibroplasia, com alta produção de fibroblastos, pode ser observada com hipertrofia transitória da cicatriz^{2,3,32,36,48,50-52}.

A contração da ferida tem início quatro a cinco dias após o ferimento e perdura por até três semanas. Nas feridas crônicas, o período de contração pode prolongar-se indefinidamente. Há alteração fenotípica de fibroblastos em miofibroblastos, mediada por *PDGF* e *TGF- β* , que se ligam a elementos da matriz extracelular por meio de integrinas. A velocidade de contração é de aproximadamente 0,6 a 0,75 mm por dia, em uma ferida com fechamento por segunda intenção^{2,3,30,35}.

A angiogênese é desencadeada a partir da lesão vascular da ferida, começa um a dois dias após o trauma, tornando-se evidente nos próximos quatro dias. A migração de células endoteliais de vênulas intactas da periferia para a borda da ferida forma novos capilares. A regulação da angiogênese se faz por meio de fatores de crescimento como o *VEGF* e *TGF- β* , entre outras citocinas, derivados de plaquetas, macrófagos e restos proteicos de células endoteliais. A ferida possui ambiente metabólico rico em ácido láctico, hipóxico e acidótico e esse estimula a

angiogênese. A matriz extracelular e o tecido inflamatório, formado pela proliferação vascular, são denominados de tecido de granulação, importante no reparo tecidual, por ser jovem, muito vascularizado e de aspecto avermelhado^{2,3,30,36-38,51-53}.

Fase de **remodelação**: o principal acontecimento nessa fase é a remodelação da matriz extracelular, no denominado tecido de granulação, quando o colágeno produzido de forma desorganizada na fase proliferativa começa a sofrer o processo de degradação. O acúmulo de colágeno na ferida atinge o ápice em torno de 21 dias e então há o predomínio da colagenólise e não da síntese. O colágeno passa a ser degradado pela enzima colagenase^{2,3,51-54}.

4 MÉTODO

O projeto experimental foi aprovado pelas Comissões de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais, protocolo número 097/2016, e pela CEUA da Universidade Federal de Juiz de Fora - MG., protocolo número 036/2016.

Os princípios éticos em experimentação animal foram obedecidos de acordo com as orientações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL).

Todos os protocolos e procedimentos encontram-se de acordo com a Lei nº 11.734 de 08/10/2008 e do CONCEA- MCTIC^{4,55-57}.

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados no Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), sendo os animais provenientes desse Laboratório.

A pesquisa das amostras biológicas de pele e sangue foram realizadas no Laboratório de Apoptose e Angiogênese do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais, e os demais gastos financeiros foram complementados com recursos próprios.

Não há conflito de interesse.

Os animais foram mantidos em estante climatizada, sob condições controladas de iluminação (ciclo claro/escuro de 12 horas), temperatura média de 22°, umidade relativa do ar entre 40 e 70%, água filtrada e ração *ad libitum* (ração Nuvilab-Quimtia S.A). Cada animal foi alojado em gaiola individual de polipropileno, com medida de 49 cm x 34 cm x 16 cm, tampa de aço inoxidável e piso forrado com maravalhas^{4,55-58}.

4.1 Animais e composição dos grupos

Foram utilizados 32 ratos (*Ratus Norvegicus albinus*, *Rodentia Mammalia*, linhagem *Wistar*), machos, com peso médio de 310 gramas, média de idade de três meses, distribuídos, aleatoriamente, em quatro grupos de oito animais, assim denominados:

Grupo CT (n=8)

Grupo P1 (n=8)

Grupo P3 (n=8)

Grupo P5 (n=8)

Os animais do grupo Controle (CT) foram submetidos à confecção do retalho cutâneo e receberam solução salina 0,9% embebida em gaze no leito do retalho.

Os animais dos outros três grupos, foram submetidos à confecção do retalho cutâneo, receberam a administração de pentoxifilina e foram identificados com a letra P, acompanhada de um número, que se refere ao número de dias que receberam a administração do fármaco (P1, P3, P5).

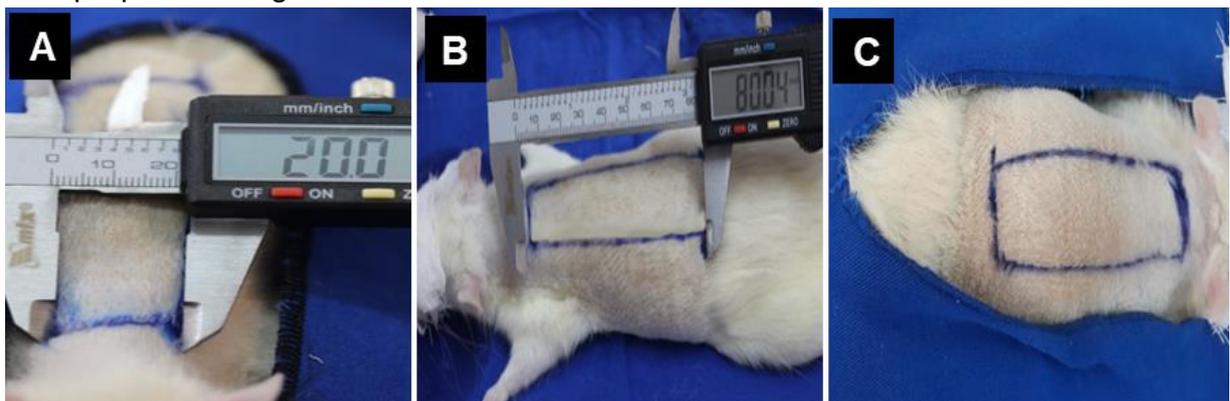
4.1.1 Preparação dos animais para o experimento e anestesia

O peso de cada animal foi aferido antes dos procedimentos cirúrgicos, no dia da operação (D1) e no dia da eutanásia (D10), antes da indução anestésica, em balança de precisão (Filizola MF - Indústria S.A. - Campo Grande-MS, (peso máximo 3 kg e peso mínimo 10 g e = 0,5 g).

Os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina 10%, dose de 90 mg/kg e xilazina 2%, dose de 10 mg/kg, via intraperitoneal (Syntec do Brasil Ltda. - Santana do Parnaíba-SP). Quando os animais se encontravam em plano anestésico, foram posicionados em decúbito ventral e realizada tricotomia do dorso do animal com área de 10,0cm de comprimento por 4,0cm de largura, aproximadamente (máquina de tricotomia *home*, Carrefour Comércio e Indústria Ltda)⁵⁷.

Realizou-se a marcação no dorso do animal, de retalho cutâneo de dimensão de 2,0 cm de largura por 8,0 cm de comprimento, com desenho retangular, pedículo do suprimento vascular de base caudal, (marcador permanente Pilot), (FIG. 1).

Figura 1 - Fotografias do rato e aferição das medidas do retalho cutâneo no dorso, com paquímetro digital



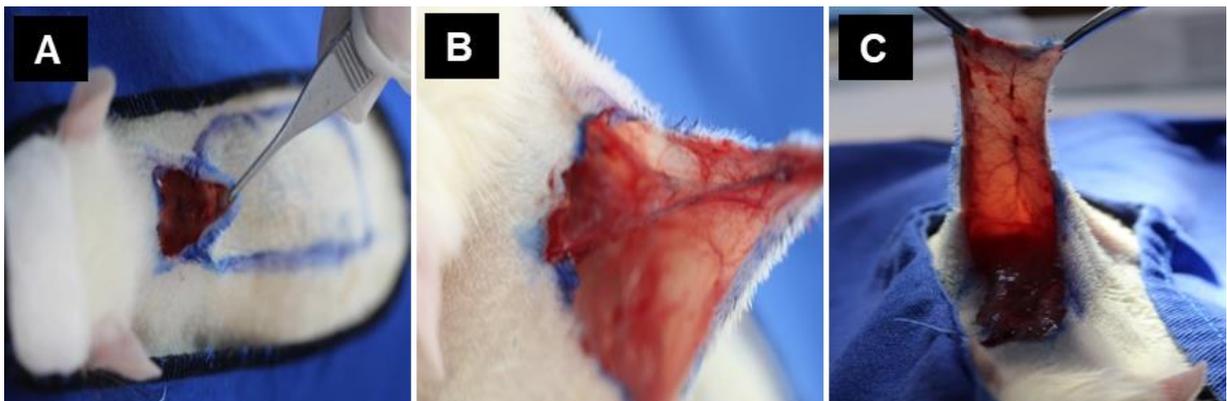
(A) Largura de 2,0 cm (B) comprimento de 8,0 cm (C) desenho do retalho
Fonte: da autora

4.1.2 Procedimentos cirúrgicos

Os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico proposto, pela manhã, em dias úteis e no mesmo horário, sendo operados três animais por dia. Uma planilha foi elaborada, com o planejamento dos procedimentos para os quatro grupos de animais. A equipe cirúrgica usou máscara, gorro e luvas e avental estéreis. O material cirúrgico e campos foram esterilizados em autoclave.

A técnica operatória de confecção de retalho foi realizada de acordo com a proposição de McFarlane modificado, sendo realizada nos animais dos quatro grupos do experimento, conforme as etapas seguintes: antissepsia com digliconato de clorexidine 2% degermante (digliconato de clorexidine 2% Riohex - São José do Rio Preto- SP); incisão da área previamente desenhada no dorso do animal^{48,49}; descolamento em bloco da pele, do tecido celular subcutâneo até o plano superior da fáscia muscular superficial; elevação do retalho e hemostasia com compressão suave (FIG. 2).

Figura 2 - Fotografias da confecção do retalho cutâneo no dorso do rato



(A) Desenho e início da incisão cirúrgica do retalho cutâneo no dorso do rato; (B e C) elevação do retalho

Fonte: da autora

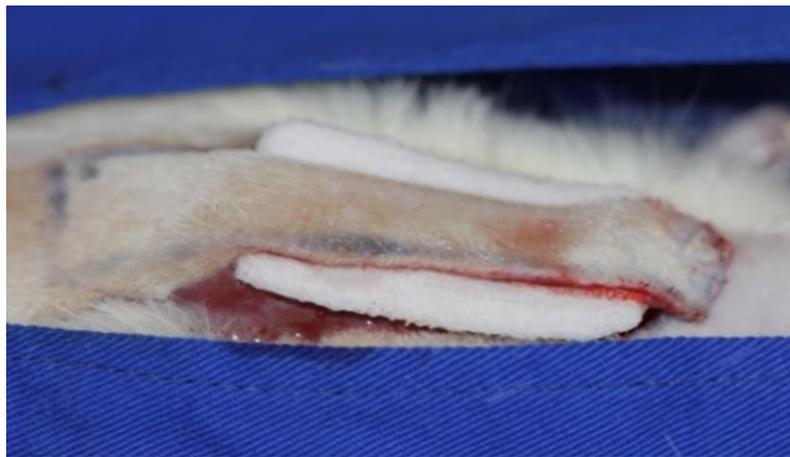
A síntese dos retalhos foi realizada com fio *nylon* 4.0, pontos separados e distância de 0,5cm entre cada ponto (fio *mononylon*, cuticular - Curvelo-MG) nos quatro grupos.

A limpeza das feridas foi realizada com solução salina 0,9% (frasco de 100 mL, Fresenius Kabi Unidade Aquirraz – Ceará; gaze IV (Medhouse, São Paulo - São Paulo).

4.1.3 Uso de medicamentos nos retalhos nos quatro grupos de animais

Nos animais do grupo Controle (CT) foi colocada gaze umedecida com solução salina 0,9% no plano de dissecção do retalho, por 30 segundos. Em seguida, retirada a gaze e realizada síntese do retalho (FIG. 3).

Figura 3 - Fotografia do animal do grupo Controle mostra retalho no dorso do rato com gaze embebida com solução salina 0,9%, acima da fáscia muscular

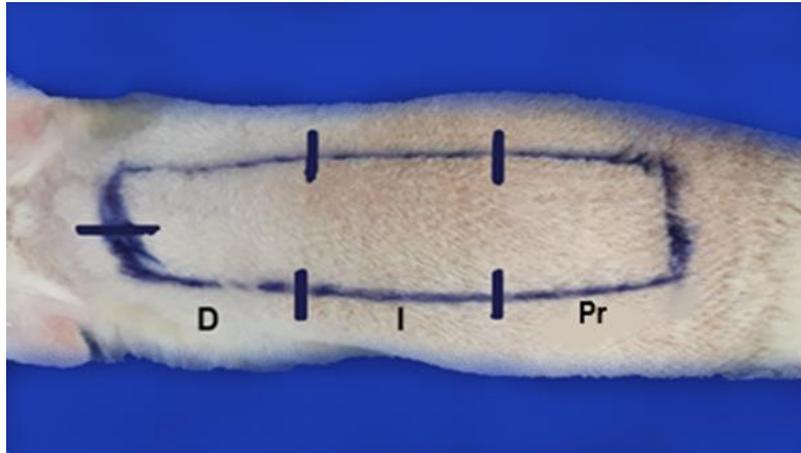


Fonte: da autora

Nos animais dos outros três grupos (P1, P2 e P3) foi administrada pentoxifilina no retalho nos segmentos previamente padronizados.

No retalho com dimensão de 2,0 cm de largura foi feita a marcação, no segmento distal, para dividi-lo à metade (1,0 cm) e o comprimento de 8,0 cm foi dividido em três segmentos com 2,6 cm de distância entre eles. Considerou-se que o segmento proximal seria aquele mais próximo do pedículo vascular (FIG. 4)

Figura 4 - Fotografia mostra esquema de desenho retangular do retalho cutâneo no dorso do rato, de 2,0 cm de largura por 8,0 cm de comprimento e as marcações de suas divisões nos segmentos: distal (D), intermediário (I) e proximal (Pr)

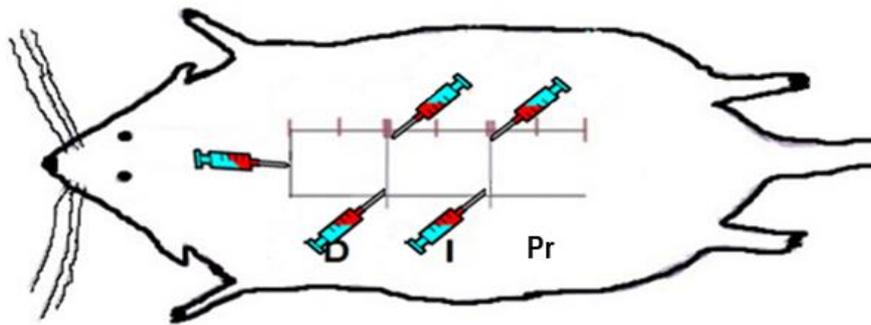


Fonte: da autora

Os animais dos grupos :P1, P3 e P5 receberam o analgésico petidina na dose de 10mg/kg, pela via subcutânea, do lado esquerdo, a 3,0 cm da cauda do retalho, no peroperatório, e depois com prescrição de 08/08 horas, até por 03 dias, conforme a necessidade, alternando o lado do local da aplicação. Os grupos P3 e P5, sem a sobreposição de dose, receberam o analgésico, 30 minutos antes da administração da pentoxifilina, nos dias D1, D2, D3, D4 e D5, de acordo com o grupo do animal⁵⁷. Posteriormente, à administração do analgésico, os animais dos grupos P3e P5 foram conduzidos suavemente ao contensor, para administração de pentoxifilina nos dias estabelecidos no pós-operatório para esses grupos (D2 e D3 no grupo P3; D2, D3, D4 e D5 no grupo P5).

A dose de pentoxifilina empregada foi de 100 mg/kg/dia adicionados à água bidestilada para completar o conteúdo de 1,0 mL (água bidestilada, SaMtec, Ribeirão Preto-SP; pentoxifilina, União Química, Pouso Alegre-MG). O conteúdo de 1,0 mL, solução de pentoxifilina e água bidestilada, foi dividido em cinco injeções de 0,2 mL, administradas no tecido subcutâneo superficial (tecido adiposo superficial) na borda do retalho, na metade superior do segmento distal, na transição do segmento distal para o intermediário e na transição do segmento intermediário para o proximal do lado direito e esquerdo (FIG. 5).

Figura 5 - Desenho mostra esquema de administração da pentoxifilina nos segmentos - conteúdo de 1,0 mL dividido em cinco injeções de 0,2 mL, administração no segmento distal (D) e na transição dos segmentos do retalho intermediário (I) e proximal (Pr)

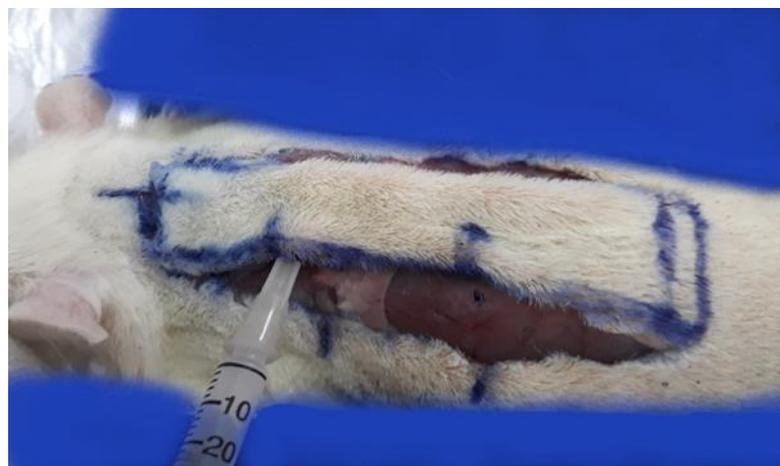


D - distal; I - intermediário; Pr - proximal

Fonte: da autora

Os animais do grupo P1 (n=8) receberam administração do conteúdo de 1,0 mL da solução com pentoxifilina no peroperatório (D1), via subcutânea, após a confecção do retalho e antes da síntese do mesmo, (FIG. 6).

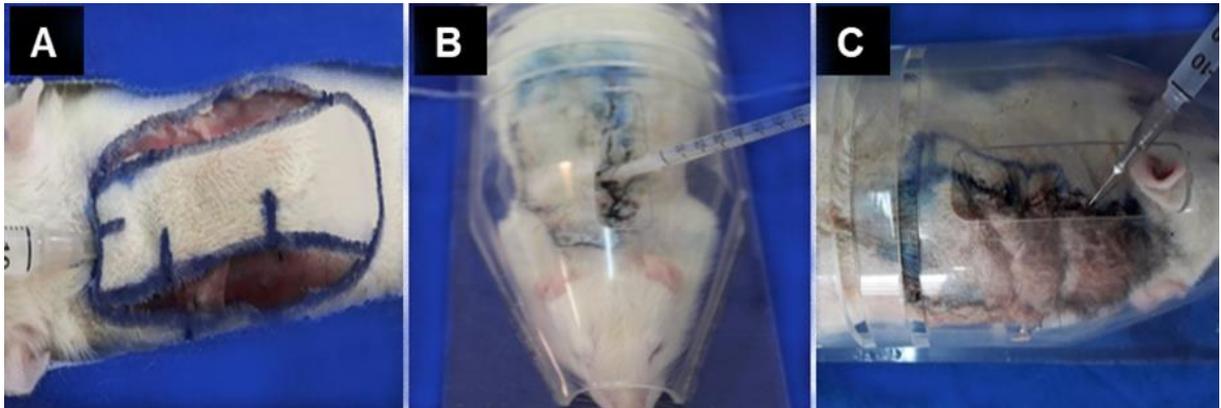
Figura 6 - Fotografia de animal do grupo P1 mostra administração solução com pentoxifilina, via subcutânea, no segmento intermediário do retalho no dorso do rato, peroperatório (D1)



Fonte: da autora

Os animais do grupo P3 (n=8) receberam administração do conteúdo de 1,0mL da solução da pentoxifilina nos dias D1, D2 e D3, correspondente ao peroperatório, 24h e 48h após a operação, respectivamente (FIG. 7).

Figura 7 - Fotografias de animal do grupo P3 mostram administração da solução com pentoxifilina, via subcutânea, no segmento distal e intermediário do retalho no dorso do rato nos dias D1, D2 e D3

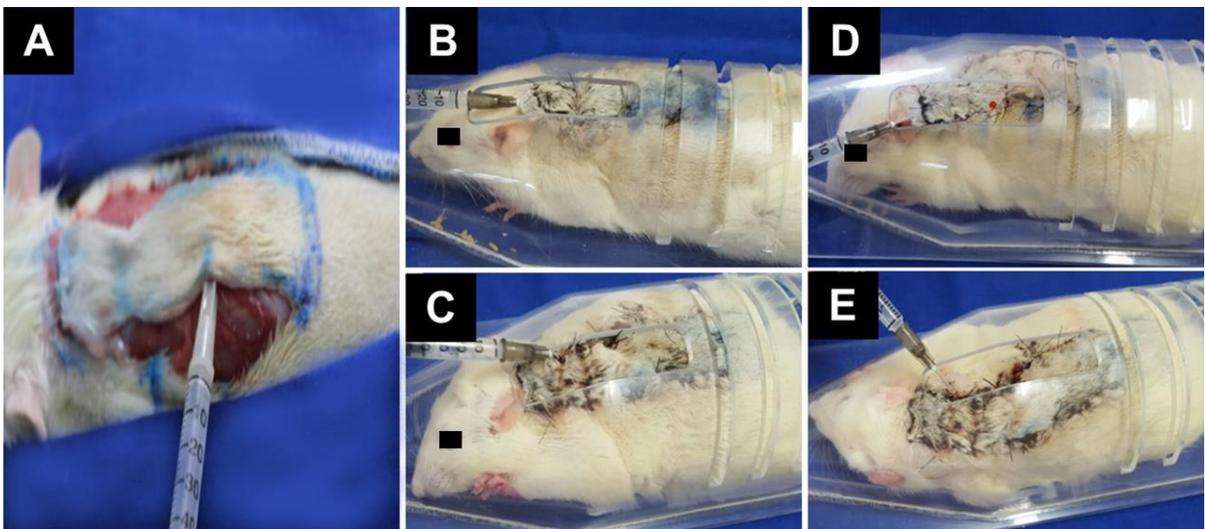


(A) Administração da pentoxifilina no segmento distal do retalho no dorso do animal, no peroperatório (B e C) administração da pentoxifilina no segmento intermediário do retalho, animal no contensor, pós-operatório

Fonte: da autora

Os animais do grupo P5 (n=8) receberam a administração do conteúdo de 1,0 mL da solução com pentoxifilina nos dias D1, D2, D3, D4 e D5, correspondente ao peroperatório, 24h, 48h, 72h e 96h após a operação, respectivamente (FIG. 8)

Figura 8 - Fotografias de animal do grupo P5 mostram administração da solução com pentoxifilina, via subcutânea, no segmento distal e intermediário do retalho no dorso do rato nos dias D1, D2, D3, D4 e D5



(A) Administração da pentoxifilina no segmento intermediário do retalho no dorso do animal, no peroperatório; (B, C, D e E) administração da pentoxifilina, nos segmentos do retalho, animal no contensor, pós-operatório

Fonte: da autora

4.2. Pós-operatório

Os animais foram mantidos em observação na sala de recuperação e, quando ativos, foram conduzidos à estante climatizada do Centro de Experimentação Animal, com anotações na ficha de identificação, como prescrição de analgésico, orientações para manter a ingestão de ração e água e notificação de diarreia, pelos eriçados, secreção ocular (cromodacriorreia) e mudanças nas atividades habituais.

Não foi realizado curativo na ferida operatória e não foi administrado antimicrobiano. A observação dos animais foi mantida durante os 10 dias do experimento, para avaliar o reparo tecidual, pois o período de formação completa do pedículo vascular secundário é em torno do nono dia^{4,5}.

Todos os animais receberam 10 mg/kg de cloridrato de petidina no peroperatório (D1), pela via subcutânea, do lado esquerdo a 3,0cm do retalho. No decorrer do experimento, o analgésico foi administrado 30 minutos antes da administração da solução com pentoxifilina e conforme a necessidade, com base na observação clínica de sinais de dor como o eriçamento de pelo, mudança no comportamento de rotina, como a diminuição de ingestão de ração ou água. (Dolosal^R, cloridrato de petidina 50 mg/mL, Cristália - Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda - Butantã-SP)⁵⁵⁻⁵⁸.

Os animais foram acompanhados e avaliados durante 10 dias quanto ao comportamento, alteração da rotina de ingestão de água e ração, aparência, postura, sinais de sofrimento como pelos eriçados e secreção nasal ou ocular e diarreia^{56,58}. Todas as observações foram anotadas na ficha de identificação de cada animal (FIG. 9).

O peso dos animais de cada grupo foi aferido no dia da operação (D1) e no dia da eutanásia (D10), sendo a avaliação ponderal, componente do estado de higidez de cada animal operado⁵.

O aspecto macroscópico do retalho cutâneo de cada animal foi observado, sendo considerado como tecido viável aquele com poucas ou sem alterações da camada superficial da pele do rato, ou seja, semelhante ao tecido normal. Tecido com necrose foi considerado quando a pele do rato se apresentava com a textura endurecida, cor escura variando desde o marrom até o preto e presença de crostas (FIG. 9)⁵⁹.

Figura 9 - Animal com necrose parcial no segmento distal do retalho cutâneo



Fonte: da autora

As medidas da dimensão total do retalho, do tecido com necrose e do tecido viável foram aferidas com paquímetro digital e anotadas nas fichas individuais. O desenho da necrose foi realizado com caneta azul em molde de folha de acetato transparente, para representação gráfica dessas medidas.

A documentação fotográfica foi realizada nos seguintes dias D1, D3, D5, D7 e D10, juntamente com a observação clínica do animal e do retalho, em todos os animais da pesquisa, pelo mesmo pesquisador, durante as etapas do experimento, com câmera digital *Cannon EF 100 mm, USM* - Tóquio- Japão.

4.2.1 Exérese do retalho, coleta de sangue e eutanásia

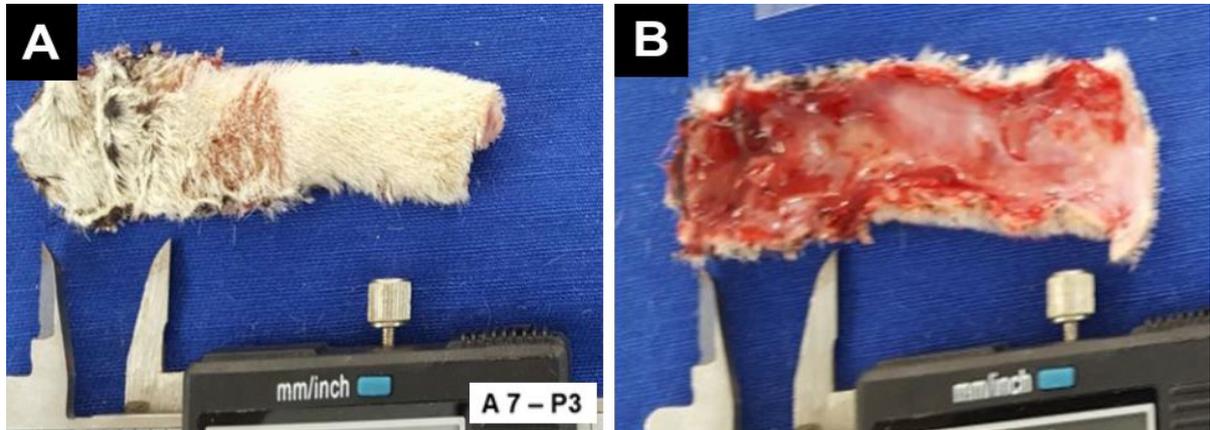
No 10º dia do pós-operatório, o peso do animal foi aferido e, logo após, o animal foi anestesiado com cetamina 10% dose de 90 mg/kg e xilazina 2% na dose de 10 mg/kg, pela via intraperitoneal^{56,57}.

A aferição das medidas da dimensão total do retalho, dimensão de tecido com necrose, dimensão do tecido viável foi efetuada com paquímetro digital e as características macroscópicas do retalho no 10º dia do pós-operatório (D10) foram anotadas e reportadas ao banco de dados para análise estatística^{20,59}.

Quando o animal se encontrava em plano anestésico, foi realizada a tricotomia dos pelos crescidos na área do retalho do dorso do rato. A dissecação e elevação do retalho de seu leito foram realizadas e observou-se a reorganização tecidual antes da coleta do retalho^{1-5,20,59}.

Após a exérese, as superfícies dorsal e ventral dos retalhos cutâneos foram fotografadas, (FIG. 10).

Figura 10 - Fotografias do retalho, peça cutânea retangular, superfície dorsal (A) e ventral (B) de animal do grupo P3, com aferição da dimensão de necrose por meio do paquímetro digital



Fonte: da autora

Após a exérese do retalho para análise histológica, três animais de cada grupo, escolhidos aleatoriamente, e foi realizada coleta, por punção cardíaca, de aproximadamente 2mL de sangue (animais sob anestesia geral) para análise bioquímica, correspondente a 6 a 8% do peso corporal do animal⁵⁶ (FIG. 11).

Figura 11 - Fotografia do animal em decúbito dorsal e coleta de sangue por punção cardíaca



Fonte: da autora

O sangue coletado foi centrifugado (Centrífuga Excelsa II Modelo 206 BL-Fanem - São Paulo, Brasil, *Freezer Harris* - 80 ULT, Canadá) para coleta de plasma fresco, para quantificar VEGF e TGF- β 1 no soro. O material biológico retirado do animal foi congelado em *freezer* a menos 80°C e, em seguida, levado para análise no Laboratório do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG.

A peça cirúrgica foi aderida em molde de papel filtro e, em seguida, colocada em frasco de solução de formaldeído tamponado a 10%, neutro (potencial hidrogeniônico – pH: 7,4) por 48 horas e identificada (formaldeído tamponado a 10%, frasco com 100 mL- Vetec P.A. - Rio de Janeiro -RJ).

A eutanásia do animal foi realizada mediante aprofundamento da anestesia, e aumento da dose de cetamina para 180 mg/kg (90 + 180=270 mg/kg) e xilazina 20 mg/kg (10 + 20=30mg/kg), via intraperitoneal.

As peças cutâneas retangulares dos animais dos quatro grupos foram devidamente identificadas e enviadas para análise histológica do retalho. Assim como, o fragmento de pele do segmento proximal de retalho e plasma sanguíneo para as dosagens bioquímicas, de VEGF e TGF- β 1, em três animais de cada grupo, escolhidos aleatoriamente.

4.3 Análise histológica e análises morfométricas

As amostras do retalho retangular retiradas dos animais foram submetidas às etapas de processamento histológico de desidratação em concentrações crescentes de álcool, diafanização em xilol, impregnação em parafina e em seguida a inclusão em blocos de parafina. Foram obtidos cortes com 5 μ m de espessura, que foram corados pela hematoxilina-eosina (HE) e *Picrosirius red*, para evidenciação histológica, processo de quantificar por meio de morfometria de vasos, espessura do epitélio e a densidade do colágeno.

A histologia foi analisada no segmento proximal, intermediário e distal, com corte transversal na porção central dos respectivos segmentos. As lâminas receberam identificação, sendo denominadas como aquelas com fragmento do segmento proximal, intermediário e distal do grupo Controle (CT) e grupos tratados (P1, P3 e P5) do retalho cutâneo.

Foram avaliadas as fases de reparo tecidual nos segmentos do retalho na transição do tecido viável com o tecido com necrose no retalho cutâneo. Os

elementos histológicos foram analisados no segmento proximal, intermediário e distal, sendo eles: infiltrado inflamatório, morfometria do número de vasos, espessura do epitélio, densidade do colágeno, e as dosagens de fatores de crescimento (VEGF e TGF- β 1), respectivamente.

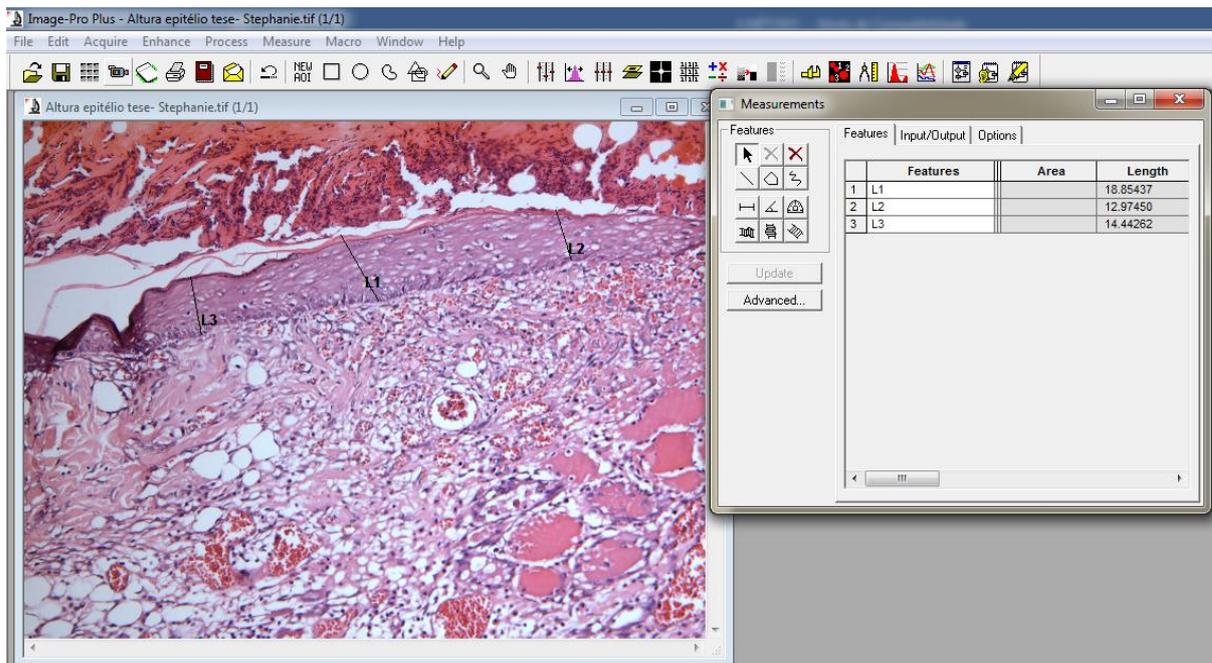
Análises morfométricas foram realizadas em todas as lâminas dos três segmentos dos retalhos cutâneos. Na porção central do corte histológico foi realizada a morfometria do número de vasos, bem como da espessura do epitélio, dos segmentos proximal, intermediário e distal. A densidade do colágeno nos quatro grupos foi obtida a partir da captura, binarização das imagens e densitometria de todos os campos do corte histológico do fragmento do retalho cutâneo⁶⁰.

Para a análise morfométrica dos elementos histológicos foram obtidas imagens de cortes sequenciais de cada segmento de pele: 25 campos (514,764 μm^2) para o número de vasos, 10 campos (30,815 μm^2) para espessura do epitélio e 20 campos (137,910 μm^2) para densidade de colágeno⁶⁰.

A quantificação do número de vasos e espessura do epitélio, assim como da densidade do colágeno em cada campo, foi feita a partir de imagens digitalizadas obtidas dos campos histológicos em microscópio de luz com objetiva planacromática de 40 vezes^{20,32,60-63}.

As imagens foram capturadas com uma objetiva planapocromática 40x (ampliação final = 400x), 20x (ampliação final = 200x) e 100x (ampliação final = 1000x), respectivamente, logo em seguida foram digitalizadas por meio de uma microcâmera JVC TK-1270/JCB e transferidas para um analisador (*software Image Pró-Plus 4.5, Média Cybernetics, Inc. Silver Spring, MD, (Estados Unidos da América - USA)*), tela do programa de morfometria *Image Pró-Plus 4.5* com a espessura do epitélio (FIG. 12).

Figura 12 – Imagem da captura de tela do programa de morfometria *Image Pró-Plus* 4.5



Mensuração em micrômetros (μm) da espessura do epitélio (setas pretas)
 Fonte: da autora

Para a quantificação de colágeno, foi utilizado o corante *Picrosirius Red* (PSR), sendo um composto aniônico que distingue a espessura e densidade das fibras colágenas pela coloração emitida sob a luz polarizada. A luz foi utilizada para visibilizar e identificar as fibras colágenas pela coloração *Picrosirius red* e reconhecer a densidade do colágeno no centro de cada segmento do retalho nos três segmentos (proximal, intermediário, distal). Enquanto as fibras finas dissociadas são fracamente birrefringentes e coraram-se em verde, as fibras mais densas, fortemente associadas, são intensamente birrefringentes e emitem cores com comprimento de ondas maiores, como o vermelho e o amarelo. Lâminas coradas em *Picrosirius red* foram estudadas com objetiva de 10 vezes para a quantificação das áreas de colágeno. De cada 20 campos/ lâmina foram obtidas imagens em áreas de maior concentração de fibras colágenas. As densidades dos *pixels* das regiões ocupadas pelas fibras colágenas foram selecionadas na imagem real para subsequente criação de uma imagem binária, visando à quantificação densitométrica 29,35,38,60

A metodologia empregada para captura, segmentação de imagens e definição das condições do ensaio enzimático seguiu os passos do protocolo padronizado pelo fornecedor do *Kit DuoSet* (R&D)⁶⁰⁻⁶³.

4.3.1 Dosagens de VEGF e TGF- β 1

Os fatores de crescimento são citocinas, moléculas de polipeptídios responsáveis pela interação celular e, quando ativados, no caso, pelo trauma cirúrgico, promovem a expressão de proliferação endotelial, angiogênese, reepitelização e atividade pró-inflamatória.

As dosagens bioquímicas de *VEGF* foram para quantificar o estímulo à angiogênese. A dosagem de *TGF- β 1* foi empregada para quantificar o estímulo à deposição de colágeno^{35,60}.

Para a determinação de *VEGF* e *TGF- β 1* nos retalhos cutâneos e soro dos animais, foram utilizados 80 μ L do sobrenadante restante do homogenato da amostra do fragmento de pele do retalho. Para a dosagem dos níveis sistêmicos foram utilizados 80 μ L do soro dos animais. Foi realizada a quantificação *VEGF* e *TGF- β 1* na amostra de fragmento de pele do retalho cutâneo (peso médio de 20g) e no soro sanguíneo de três animais (n=3) de cada grupo.

O ensaio enzimático foi realizado seguindo os passos do protocolo padronizado pelo fornecedor do *Kit DuoSet* (R&D Systems). Diluições de sobrenadantes livres de células foram adicionadas em duplicata à placa de *enzyme-linked immunoabsorbent assay* (ELISA), que tinham um anticorpo monoclonal específico para rato contra a citocina, seguido da adição um segundo anticorpo de detecção. Após lavagem para remover anticorpos que não se ligaram, uma solução de substrato foi adicionada à placa de ELISA (50 μ L de uma 1:1 solução de peróxido de hidrogênio e 10 mg/mL de OPD). A reação foi paralisada após 20 min de incubação com 2N de ácido sulfúrico (50 μ L) e a intensidade da cor foi quantificada a 540 nm em leitor de microplaca (*Thermoplate*). Os padrões foram diluições das citocinas recombinantes de ratos de 7,5 pg a 1.000 pg mL (100 μ L). Os resultados foram expressos como picograma de citocina por miligrama de peso úmido ou mililitro de soro⁶⁰.

4.3.2 Análise estatística e variáveis estudadas

O cálculo amostral foi realizado de acordo com número suficiente de animais investigados para se obter representatividade estatística para as análises das variáveis: dimensão total do retalho, dimensão do tecido com necrose, dimensão do tecido viável, número de vasos, reepitelização e densidade do colágeno^{4,55,56,58}.

O nível de significância foi considerado entre 0,01 e 0,05, coeficiente de variação de 15 a 20% para as diferenças entre o grupo Controle (CT) e os grupos tratados com a pentoxifilina (P1, P3 e P5).

A variável peso foi avaliada para verificar a higidez dos animais, aferida no dia da operação (D1) e do dia da eutanásia (D10).

As variáveis medidas das dimensões: total do retalho, do tecido viável e do tecido com necrose, no dia da eutanásia (D10) e nos quatro grupos estudados, foram analisadas pelos testes análise de variância, ANOVA (*One Way Analysis of Variance*) e Kolmogorov-Smirnov para avaliar eventuais diferenças entre as médias das variáveis analisadas e quantificadas nos grupos CT, P1, P3 e P5, no *software R Core Version 3.0.1* (2013:05:116). Foram calculadas as porcentagens das medidas da dimensão total, do tecido com necrose e do tecido viável do retalho.

As variáveis do reparo tecidual quantificadas foram: número de vasos, espessura do epitélio, densidade do colágeno, com número de animais de oito por grupo. As dosagens de *VEGF* e *TGF-β1*, com número de animais de três por grupo.

Os resultados foram analisados pelo *software GraphPad Prism 5.0* e elaborados gráficos a partir dos dados das tabelas.

As variáveis medidas da dimensão total do retalho, do tecido com necrose, do tecido viável, assim como, a quantificação do número de vasos, da espessura do epitélio, da densidade do colágeno, e as dosagens de *VEGF* e *TGF-β1*, foram analisadas com a contribuição do Núcleo de Bioestatística da Faculdade de Medicina da UFMG e do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

O pós-teste de Newman-Keuls foi aplicado para comparar e detectar diferenças significantes entre as médias dos quatro grupos, variáveis com distribuição paramétrica, sendo essas as medidas da dimensão total do retalho, do tecido viável e do tecido com necrose e densidade do colágeno, *VEGF*, *TGF-β1*.

O teste de Kruskal-Wallis e o pós-teste de Dunn's foram realizados para os dados com distribuição não paramétrica, para comparar e detectar diferenças

significantes entre as médias dos quatro grupos, das variáveis: espessura de epitélio e número de vasos, respectivamente.

Os resultados foram apresentados com média e desvio-padrão de mais ou menos (\pm) e comparados entre os quatro grupos.

Os dados foram distribuídos e relacionados em tabelas e gráficos. Compararam-se as medidas das dimensões do retalho, do tecido viável e do tecido com necrose, análises morfométricas do número de vasos/campo, da densidade do colágeno e da espessura do epitélio em oito animais de cada grupo. As dosagens de *VEGF* e *TGF- β 1* foram obtidas em três animais de cada grupo⁵⁵.

5 RESULTADOS

Os animais dos grupos CT, P1, P3, P5 permaneceram hígidos durante o experimento. Não foram observados sinais de sofrimento nos animais dos quatro grupos.

Um animal do grupo Controle (CT) morreu no pós-operatório imediato, e foi substituído.

5.1 Análise macroscópica da vitalidade dos retalhos cutâneos

No 10º dia de pós-operatório, foi aferida a dimensão total, do tecido com necrose e do tecido viável do retalho cutâneo, de cada animal, por meio de paquímetro digital, nos quatro grupos, (FIG. 13).

Figura 13 - Fotografias representativas da aferição das medidas das dimensões dos tecidos com necrose nos retalhos cutâneos, no 10º dia de pós-operatório, com paquímetro digital, comparando-se as medidas nos animais dos quatro grupos: CT, P1, P3 e P5



Fonte: da autora

Os valores da média da dimensão total do retalho nos grupos, CT: 75,05 mm ($\pm 1,38$), e P5: 68,58 ($\pm 1,13$)*. Observou-se diferença significativa na média da

dimensão total do retalho entre os grupos CT e P5 e valor de $p= 0,0176$, (TAB. 1, GRÁF. 1A).

Os valores da média da dimensão do tecido com necrose nos grupos, CT: 35,85 mm ($\pm 1,95$), P1: 29,75 mm ($\pm 2,12$); P3: 23,44 mm ($\pm 1,55$)^{***} e P5: 22,73 mm ($\pm 0,87$)^{***/o}. Denotou-se diferenças significantes na média da dimensão do tecido com necrose entre os grupos CT e P3, CT e P5, e valor de p menor que 0,0001, (TAB. 1, GRÁF. 1- Apêndice B.).

O valor da média da dimensão do tecido viável no grupo CT: 39,2 mm ($\pm 1,62$), menor, quando comparado à média dos grupos tratados. Os valores da média da dimensão do tecido viável nos grupos, P1: 42,45 mm ($\pm 1,55$)^{*}, P3: 45,74 ($\pm 2,06$)^{*}, P5: 45,85 mm ($\pm 0,8074$). Evidenciaram-se diferenças significantes entre os grupos: CT e P1; CT e P3, CT e P5, e valor de p igual a 0,0164. A diferença entre os grupos do valor da média da dimensão do tecido viável ocorreu a partir do grupo P1, (TAB. 1).

Tabela 1 - Dimensão do retalho cutâneo: total, do tecido com necrose e do tecido viável (mm), média, desvio-padrão (\pm DP) e percentagem (%), comparação entre os grupos CT, P1, P3 e P5, valor de p

| Dimensão do retalho cutâneo | Dimensões (mm) média (\pm DP) / % | | | | P |
|-----------------------------|--------------------------------------|---|---|---|----------|
| | Grupo CT | Grupo P1 | Grupo P3 | Grupo P5 | |
| Total | 75,05 ($\pm 1,38$) 93,75% | 69,62 ($\pm 2,0$) 87,03% | 71,37 ($\pm 0,90$) 89,21% | 68,58 ($\pm 1,13$) 85,73% | 0,0176 |
| Tecido com necrose | 35,85 ($\pm 1,95$) 43,75% | 29,75 ($\pm 2,12$) 37,10% | 23,44 ($\pm 1,55$) ^{***} 29,30% | 22,73 ($\pm 0,87$) ^{***/o} 28,41% | < 0,0001 |
| Tecido viável | 39,2 ($\pm 1,62$) 49,00% | 42,45 ($\pm 1,55$) [*] 53,06% | 45,74 ($\pm 2,06$) [*] 57,18% | 45,85 ($\pm 0,8074$) [*] 57,31% | 0,0164 |

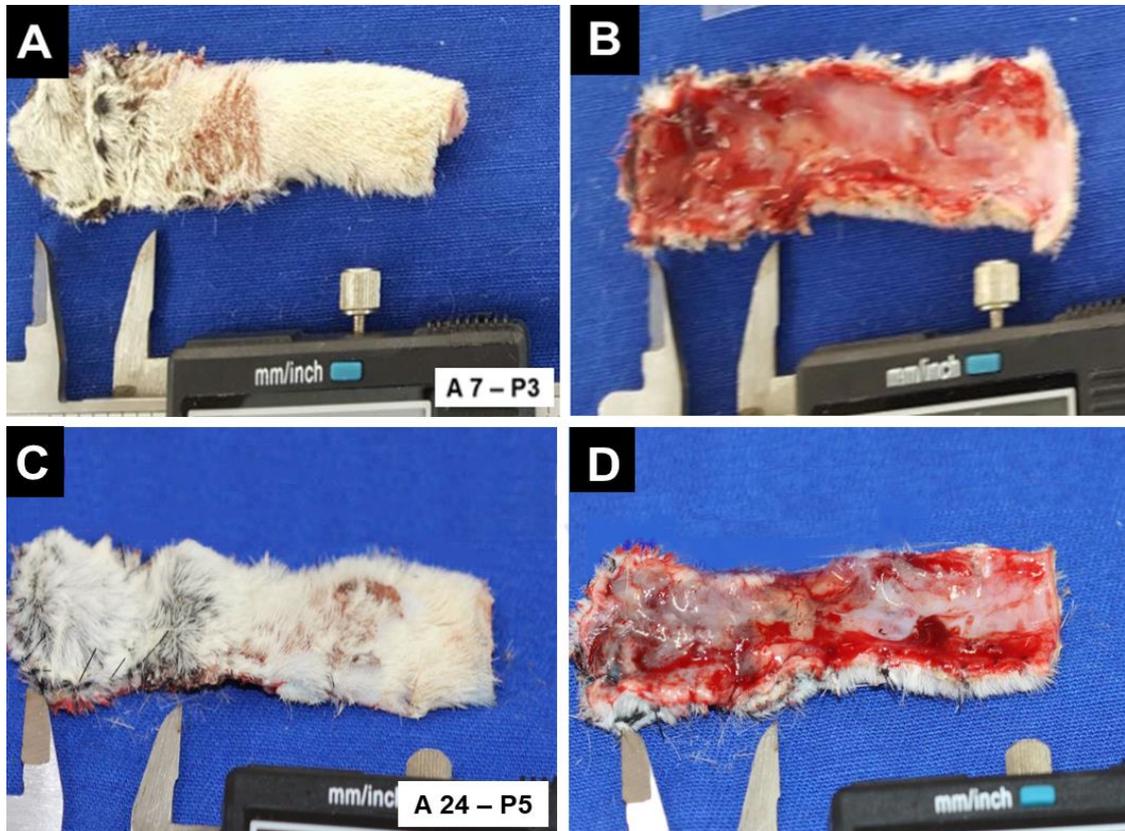
*Significância: $*p < 0,05$. Os valores são expressos em média \pm DP, $n = 8$ por grupo. ⁷⁰ Comparação dos grupos: CT, P1, P3 e P5. Testes: ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls.

Houve diferença significativa entre as medidas da dimensão total do retalho entre os grupos CT e P5.

Constatou-se que as medidas das dimensões do tecido com necrose do retalho cutâneo menores nos grupos P3 e P5. Esses grupos apresentavam o tecido com necrose na superfície dorsal e essa necrose se restringia à camada superficial

da pele do animal. Em correlação, a superfície ventral desses retalhos, apresentavam tecidos com vitalidade na camada abaixo da necrose (FIG. 14).

Figura 14 - Fotografias de peça cutânea retangular, superfície dorsal e ventral, grupos P3 e P5 (A e B)



Fotografias de amostras do retalho cutâneo do grupo P3 (C e D) Fotografias das amostras do retalho cutâneo do grupo P5. (A,B,C e D) superfície dorsal e superfície ventral do retalho cutâneo
Fonte: da autora

5.2 Avaliação histológica das amostras do retalho cutâneo

5.2.1 Morfometria do número de vasos

Houve diferença significativa na análise morfométrica do número de vasos/campo nos segmentos proximal, intermediário, distal do retalho cutâneo, na comparação entre o grupo CT e o grupo P5.

No segmento proximal do retalho cutâneo, o valor do número de vasos/campo, nos quatro grupos, CT: 27 ($\pm 0,8$), P1: 26 ($\pm 0,2$), P3: 34($\pm 0,2$)^{***/000}, P5: 41($\pm 1,3$)^{***/000}, (TAB. 2).

O valor do número de vasos /campo, no segmento proximal, no grupo P5: 41($\pm 1,3$)^{***/000}, e no segmento distal do mesmo grupo P5: 40($\pm 5,0$)^{*/0}, (TAB. 2).

No segmento intermediário do retalho cutâneo, houve maior estímulo a angiogênese, com aumento do número de vasos/campo. Notaram-se diferenças significantes no número de vasos/campo entre os grupos: CT: 34 ($\pm 2,4$) e P5: 50 ($\pm 5,4$)^{**/000} vasos /campo e valor de igual a 0,0007, (TAB. 2).

No segmento distal a comparação dos valores do número de vasos /campo dos grupos: CT: 21 ($\pm 3,4$), P1: 23 ($\pm 2,2$), P3: 30 ($\pm 4,8$) e P5: 40($\pm 5,0$)^{*/0}. Houve diferença significativa entre CT e P5, P1 e P3, P3 e P5 e valor de p igual a 0,0174 (TAB. 2).

A comparação da análise morfométrica do número de vasos/campo, entre os grupos CT, P1, P3 e P5, mostrou que houve aumento de vasos nos grupos tratados pela pentoxifilina.

Tabela 2 – Análise morfométrica do número de vasos/campo, segmentos: proximal, intermediário, distal dos grupos CT, P1, P3, P5; média, \pm desvio-padrão, comparação entre os grupos: CT, P1, P3 e P5, valor de p

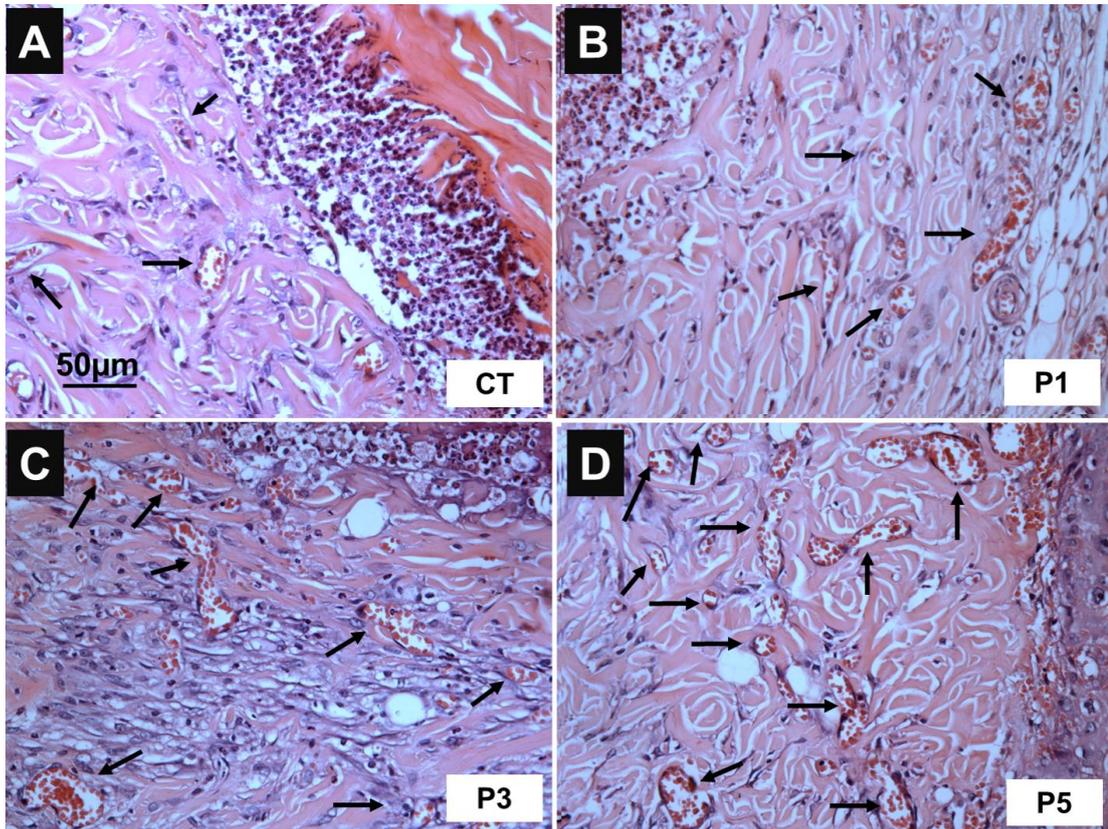
| Segmentos do retalho cutâneo | Número de vasos/campo (μm) média (\pm DP) | | | | P |
|------------------------------|---|------------------|------------------------------------|------------------------------------|----------|
| | Grupo CT | Grupo P1 | Grupo P3 | Grupo P5 | |
| Proximal | 27 ($\pm 0,8$) | 26 ($\pm 0,2$) | 34($\pm 0,2$) ^{***/000} | 41($\pm 1,3$) ^{***/000} | < 0,0001 |
| Intermediário | 34 ($\pm 2,4$) | 34 ($\pm 1,5$) | 36 ($\pm 0,5$) | 50($\pm 5,4$) ^{**/000} | 0,0007 |
| Distal | 21 ($\pm 3,4$) | 23 ($\pm 2,2$) | 30 ($\pm 4,8$) | 40($\pm 5,0$) ^{*/0} | 0,0174 |

Significância, $p < 0,05$. Os valores são expressos em média \pm DP, $n = 8$ por grupo.⁷⁰ Comparação dos grupos: CT, P1, P3 e P5. Testes: ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls

Houve diferença significativa no segmento proximal, observada entre os grupos CT, P3 e P5. No segmento intermediário houve diferença significativa entre o grupo CT e P5. No segmento distal notou-se diferença significativa, evidente entre o grupo CT e grupo P5, mas com diferenças entre CT e P1, P1 e P3, CT e P3 (TAB.2).

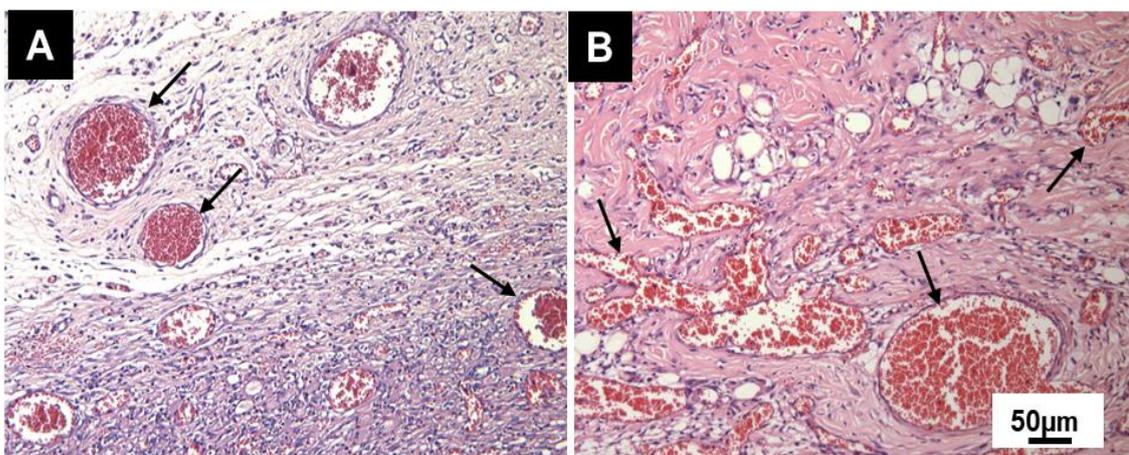
As fotomicrografias dos cortes histológicos do tecido de granulação dos animais dos grupos CT, P1, P3 e P5 mostram crescente aumento da angiogênese nos animais dos grupos tratados com a administração de pentoxifilina, sendo esse aumento mais evidente nos grupos P3 e P5, grupos tratados maior número de dias (FIG. 15 e 16).

Figura 15 - Fotomicrografias representativas de cortes histológicos do segmento intermediário do tecido de granulação de amostras do retalho cutâneo dos grupos: CT, P1, P3, P5.



(A-D) Elementos histológicos: vasos, nos grupos CT, P1, P3 e P5. Setas pretas indicam vasos. Cortes histológicos corados em H.E, captura com objetiva de 40x, aumento 400x, 50 µm.
Fonte: da autora

Figura 16 - Fotomicrografias representativas de cortes histológicos do segmento intermediário do retalho cutâneo do grupo P5, mostra vasos do tecido de granulação



(A - B) Tecido de granulação exuberante com numerosos vasos, região central do segmento intermediário, cortes histológicos, corados em H.E, captura com objetiva de 20x, aumento 200x, 50 µm
Fonte: da autora

5.2.2 Morfometria da espessura do epitélio

A espessura do epitélio aumentou nos três segmentos do retalho cutâneo, dos grupos P1, P3 e P5 quando comparada ao grupo CT. No segmento proximal dos grupos – CT: 36 μm ($\pm 3,4$), P1: 49 μm ($\pm 3,5$), P3: 56 μm ($\pm 5,8$), P5: 58 μm ($\pm 6,4$)^{*} e o valor de p foi 0,0116. No segmento Intermediário, a espessura do epitélio, dos grupos – CT: 13 μm ($\pm 0,8$), P1: 16 μm ($\pm 3,1$), P3: 23 μm ($\pm 4,1$), P5: 28 ($\pm 4,6$)^{*} e valor de p foi 0,0146. No segmento distal, a espessura do epitélio, dos grupos – CT: 9 μm ($\pm 0,5$), P1: 10 μm ($\pm 0,7$), P3: 11 μm ($\pm 1,0$), P5: 15 μm ($\pm 1,1$)^{***000} e valor de p menor que 0,0001, (TAB. 3).

A comparação do grupo CT com o grupo P5 mostrou diferença significativa, sendo que, no segmento proximal do retalho, essa diferença ocorreu também entre o grupo CT e P3 (TAB. 3)

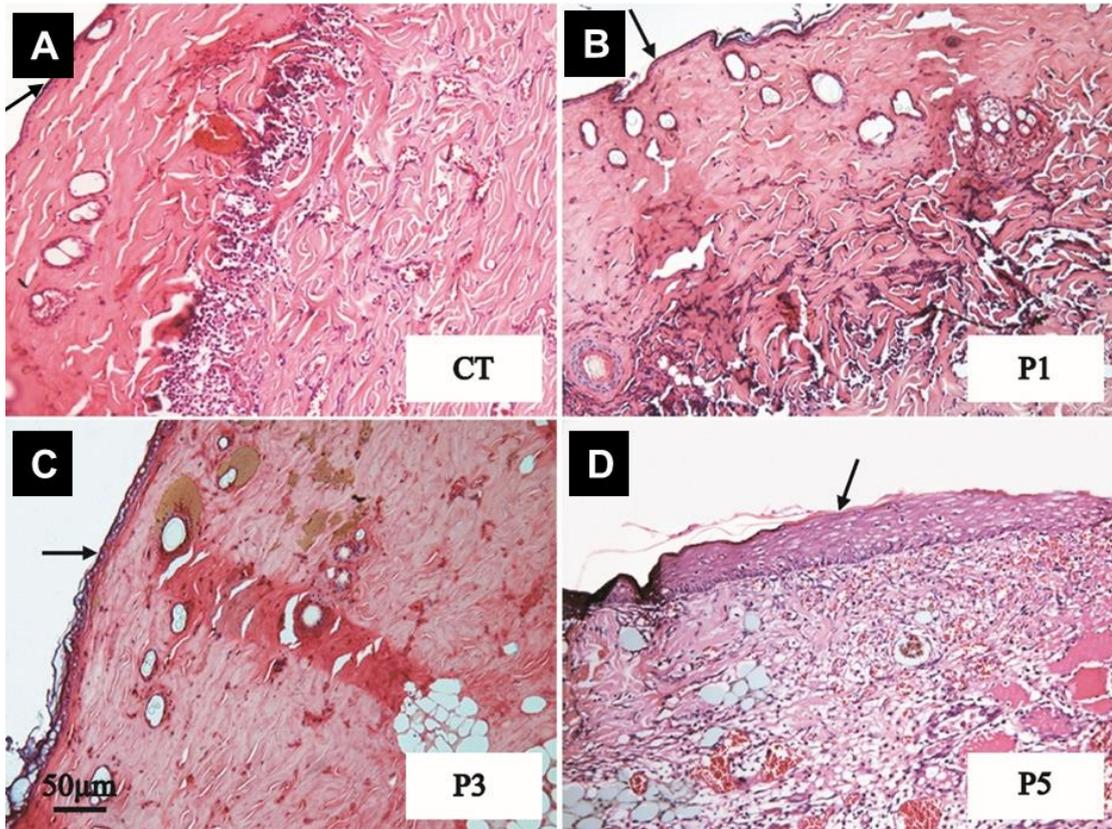
Tabela 3 – Análises morfométricas da espessura do epitélio (μm) nos segmentos: proximal, intermediário, distal dos retalhos nos grupos CT, P1, P3 e P5; média, \pm desvio-padrão, valor de p

| Amostra de Segmento do retalho cutâneo | Espessura do epitélio (μm) ($\pm\text{DP}$) | | | | P |
|--|--|------------------|-------------------------------|------------------------------------|----------|
| | Grupo CT | Grupo P1 | Grupo P3 | Grupo P5 | |
| Proximal | 36 ($\pm 3,4$) | 49 ($\pm 3,5$) | 56 ($\pm 5,8$) [*] | 58 ($\pm 6,4$) [*] | 0,0116 |
| Intermediário | 13 ($\pm 0,8$) | 16 ($\pm 3,1$) | 23 ($\pm 4,1$) | 28 ($\pm 4,6$) [*] | 0,0146 |
| Distal | 9 ($\pm 0,5$) | 10 ($\pm 0,7$) | 11 ($\pm 1,0$) | 15 ($\pm 1,1$) ^{***000} | < 0,0001 |

Significância: * $p < 0,05$, ⁷⁰ Comparação entre os grupos CT, P1, P3 e P5, $n=8$ por grupo, Testes: Kruskal–Wallis e pós- teste de Dunn's

A análise das amostras de segmento intermediário dos grupos CT, P1, P3 e P5, ilustradas com fotomicrografias, observaram-se necrose da epiderme em todos os grupos de animais, mais evidente no grupo CT. Nos animais dos grupos P1, P3 e P5, tratados com pentoxifilina, houve crescente aumento da espessura do epitélio, (FIG. 17).

Figura 17 - Fotomicrografias representativas de cortes histológicos do segmento intermediário do tecido de granulação de amostras do retalho cutâneo dos grupos: CT, P1, P3, P5



(A) Necrose subepitelial margeada por infiltrado inflamatório e recoberta por uma fina camada epitelial no grupo CT (B) necrose subepitelial evidente com marginação inflamatória aumentada e epitélio fino no grupo P1; (C) infiltrado inflamatório decrescendo e aumento da espessura epitélio no grupo P3 (D) discreto infiltrado inflamatório, epitélio mais espesso com adelgaçamento das fibras colágenas na derme, poucas áreas de necrose e tecido de granulação vascularizado, setas pretas indicam aumento da espessura do epitélio no grupo P5. Cortes histológicos corados em H.E, captura com objetiva de 20x, aumento 200x, 50 μm

Fonte: da autora

5.2.3 Morfometria da densidade do colágeno

A comparação entre o grupo CT e os grupos P1, P3 e P5, mostrou que houve diminuição da densidade do colágeno nos grupos tratados pela pentoxifilina.

Os valores da média da densidade do colágeno no segmento intermediário do retalho dos grupos - CT: $177100 \mu\text{m}^2 (\pm 9919)$, P1: $137900 \mu\text{m}^2 (\pm 23220)$, P3: $106100 \mu\text{m}^2 (\pm 14830)^*$, P5: $75920 (\pm 11110)^{**/\circ}$, e valor de p igual a 0,0015.

Os valores da média da densidade do colágeno no segmento distal do retalho dos grupos - CT: 138000 μm^2 (± 3330), P1: 79900 μm^2 (± 11620)^{**}, P3: 60270 μm^2 (± 11830)^{***}, P5: 34430 μm^2 (± 5321)^{***/oo} e valor de p igual a 0,0001.

Tabela 4 – Análise morfométrica da densidade do colágeno (μm^2) nos segmentos proximal, intermediário, distal dos retalhos nos grupos: CT, P1, P3 e P5, média, \pm desvio-padrão, valor de p

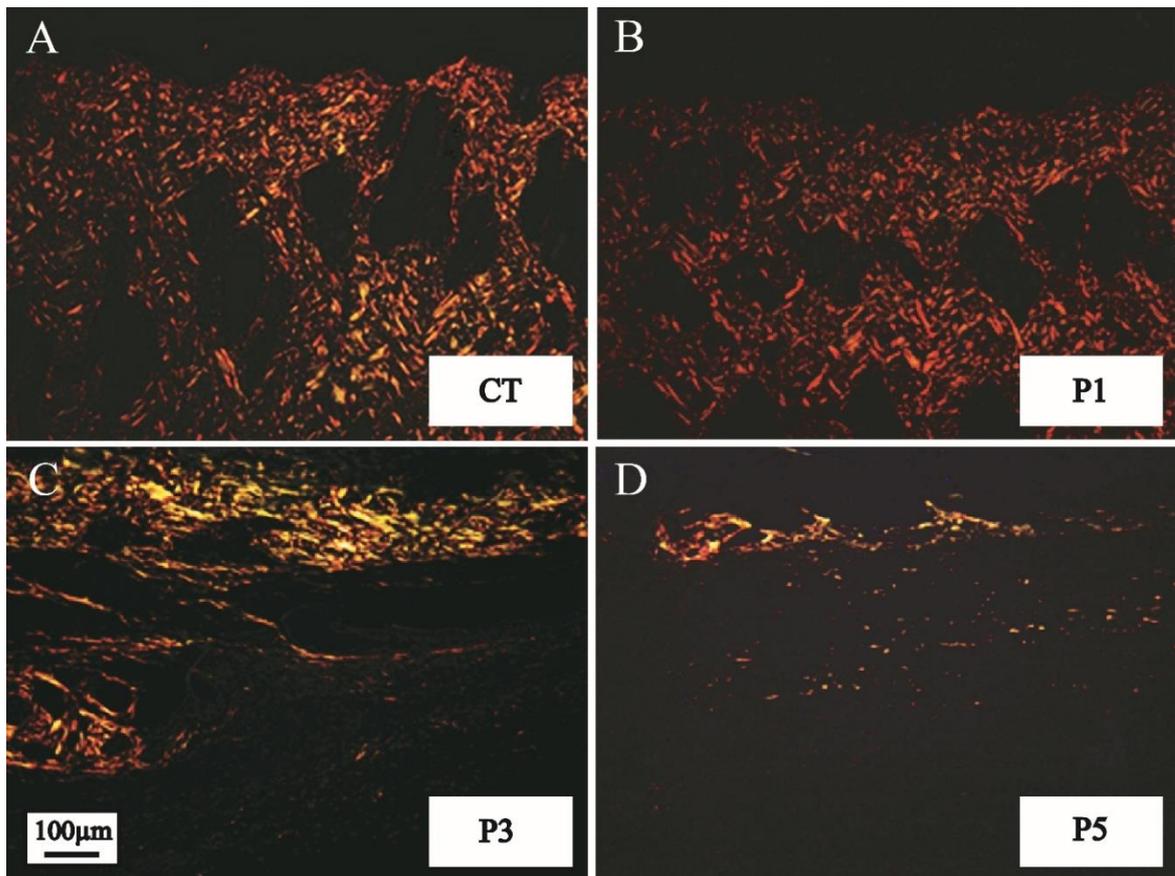
| Segmento do retalho cutâneo | Densidade do colágeno (μm^2) média (\pm DP) | | | | P |
|-----------------------------|---|--|--|---|----------|
| | Grupo CT | Grupo P1 | Grupo P3 | Grupo P5 | |
| Proximal | 296700 (± 19680) | 278600 (± 25310) | 220300 (± 15000) ^{*/o} | 184600 (± 13850) ^{***/oo} | 0,0014 |
| Intermediário | 177100 (± 9919) | 137900 (± 23220) | 106100 (± 14830) [*] | 75920 (± 11110) ^{***/oo} | 0,0015 |
| Distal | 138000 (± 3330) | 79900 (± 11620) ^{**} | 60270 (± 11830) ^{***} | 34430 (± 5321) ^{***/oo} | < 0,0001 |

Significância* $p < 0,05$. ^o Comparação entre os CT, P1, P3 e P5, n=8 por grupo, Testes: ANOVA e pós- teste de Newman-Keuls

A análise morfométrica da densidade do colágeno mostra diminuição da fibrogênese nos segmentos proximal, intermediário, distal dos grupos tratados- P1, P3, P5, quando comparados com o grupo CT. No segmento distal, diferenças significantes ocorreram entre o grupo CT e os grupos P1, P3 e P5, (TAB. 4)

Observou-se maior densidade do colágeno no grupo CT, com fibras fortemente birrefringentes de cor vermelha e laranja. Nos grupos P1, P3 e P5, os cortes histológicos mostraram fibras do colágeno com diminuição decrescente da birrefringência. Os animais dos grupos tratados, P1, P3, P5, apresentaram diminuição decrescente da densidade do colágeno, denotando diminuição da densidade das fibras colágenas nas amostras dos segmentos dos retalhos, (Fig. 18)

Figura 18 - Fotomicrografias representativas de cortes histológicos do segmento intermediário, amostras do retalho cutâneo dos grupos: CT, P1, P3, P5



(A – D) Fotomicrografias do segmento intermediário dos grupos: CT, P1, P3, P5. Observa-se diminuição decrescente da birrefringência, nos grupos, respectivamente. A cor vermelha e laranja expressam fibras colágenas fortemente associadas, birrefringentes no grupo CT. Cortes histológicos corados com *Picrossirius Red*, captura com objetiva 40x, aumento de 400x, 100µm
Fonte: da autora

5.3 Dosagem bioquímica do VEGF e TGF- β 1 na pele e no soro dos animais

5.3.1 Fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) na pele e no soro dos animais

Os níveis do VEGF foram maiores na pele do retalho em comparação ao soro dos animais. Na comparação entre os grupos CT e P5, verificou-se que os níveis de VEGF na pele, no grupo CT: 246,8 pg/mg (\pm 25,8) e no grupo P5: 471,1 pg/mg (\pm 33,8). Os valores no soro, grupo CT: 145,2 pg/mg (\pm 5,1), grupo P5: 223,9 pg/mg (\pm 25,2). Os resultados sugerem ação estimuladora da pentoxifilina nessa potente molécula angiogênica, com aumento no nível de VEGF na pele e no soro dos animais do grupo P5, p menor que 0,0001 na pele, (TAB. 5).

Tabela 5 - Fator de crescimento do endotélio vascular (*VEGF*) dos grupos CT, P1, P3, P5, na pele e no soro, média, desvio-padrão (\pm DP), μ g/mg, valor de p

| Dosagem <i>VEGF</i> | Fator de crescimento do endotélio vascular (<i>VEGF</i>) μ g/mg(\pm DP) | | | | <i>P</i> |
|------------------------|--|--------------------|---------------------|--------------------------------------|----------|
| | Grupo CT | Grupo P1 | Grupo P3 | Grupo P5 | |
| Pele | 246,8(\pm 25,8) | 333,6(\pm 21,7) | 274,6 (\pm 38,7) | 471,1(\pm 33,8) ^{***/00} | < 0,0001 |
| Soro | 145,2 (\pm 5,1) | 153,9 (\pm 7,8) | 132,9 (\pm 0,4) | 223,9 (\pm 25,2) ^{**/0} | 0,005 |

Significância: * $p < 0,05$. ^{*/0} Comparação entre os grupos CT, P1, P3, P5. Valores expressos em média \pm DP, n=3 cada grupo. Testes: ANOVA e pós-teste de Newman-Keuls

5.3.2 Fator de crescimento transformador beta-1 (*TGF- β 1*) na pele e no soro dos animais

Os níveis do *TGF- β 1* foram maiores no soro em comparação aos valores da pele dos animais. Na comparação entre os grupos CT, P1, P3, P5, os valores das dosagens de *TGF- β 1* na pele nos grupos CT: 162,1 μ g/mg (\pm 22,9), P1: 93,8 μ g/mg (\pm 25,9), P3: 73,0 μ g/mg (\pm 26,9), P5 :46,4 μ g/mg (\pm 17,20) e o valor de p igual a 0,0187. Os valores da dosagem de *TGF β -1* no soro dos grupos - CT: 313,9 μ g/mg (\pm 28,5), P1: 259,1 μ g/mg (\pm 20,5), P3: 225,8 μ g/mg (\pm 23,3, P5: 191,3 μ g/mg (\pm 15,9) e o valor de p igual a 0,0063.

Houve redução decrescente nos níveis dessa citocina na pele e no soro, sendo mais acentuada no soro em comparação à pele, nos grupos CT, P1, P3, P5, (TAB. 6).

Tabela 6 - Fator de crescimento transformador beta-1 (*TGF- β 1*) dos grupos CT, P1, P3, P5, na pele e no soro, média, desvio-padrão (\pm DP), μ g/mg, valor de p

| Dosagem do <i>TGF-β1</i> | Fator de crescimento transformador (<i>TGF-β1</i>) μ g/mg(\pm DP) | | | | <i>P</i> |
|--|---|---------------------|---------------------|-----------------------------------|----------|
| | Grupo CT | Grupo P1 | Grupo P3 | Grupo P5 | |
| Pele | 162,1 (\pm 22,9) | 93,8 (\pm 25,9) | 73,0 (\pm 26,9) | 46,4 (\pm 17,20) [*] | 0,0187 |
| Soro | 313,9 (\pm 28,5) | 259,1 (\pm 20,5) | 225,8 (\pm 23,3) | 191,3 (\pm 15,9) ^{**} | 0,0063 |

Significância: * $p < 0,05$. ^{*/0} Comparação entre os grupos CT, P1, P3, P5. Valores expressos em média \pm DP, n=3 por grupo. Testes: ANOVA e pós-teste de Newman-Keuls

6 DISCUSSÃO

Pesquisas experimentais sobre as diversas maneiras de interferir e modificar as condições que acarretam a necrose de retalhos cutâneos empregaram fármacos e outras modalidades terapêuticas com o fito de atenuar o processo de formação de radicais livres, estimular o reparo tecidual e diminuir o edema tecidual e, assim, assegurar a vitalidade e sobrevivência do retalho cutâneo, principalmente no segmento distal, diminuindo ou mesmo evitando a necrose.

O animal de experimentação usado na presente pesquisa foi o rato, devido à disponibilidade de aquisição, custo baixo e facilidade no manejo. A escolha do modelo foi embasada no uso tradicional e consagrado em estudos de retalho cutâneo da literatura, com o modelo rato, sendo o animal mais usado em pesquisas nas quatro bases de dados da literatura^{4-26,29,32-34,36-38}. Aproximadamente 85% dos artigos da *Medical Literature Analysis and Retrieval System On-line* (MEDLINE) e 70,5% dos artigos da Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS) são referentes a experimentos com ratos e camundongos^{4-26,29,32-34,36,55-57}. O motivo deste estudo foi vislumbrar a validação dos resultados alcançados no modelo animal para possível extrapolação e aplicabilidade na prática médica.

Mcfarlane (1965) descreveu o modelo de retalho cutâneo no dorso do rato e Adamson (1967) o reproduziu e o modificou. Camargo *et al.* (2014) compararam o retalho do modelo de Gemperli, com base do pedículo cranial, sendo que a necrose ocorreu em 3% dos casos e no modelo do retalho de Mcfarlane, a necrose aconteceu em 37%. Os autores do trabalho de Gemperli concluíram que o modelo de pedículo cranial, de dimensão de 3,0 x 10,0 cm, quando comparado ao modelo de Mcfarlane, seria o mais apropriado para estudos experimentais^{49,59,64-66}. Acevedo Bogado *et al.* (2002) observaram que o retalho de base caudal favoreceu o aumento da pressão capilar devido à dificuldade do retorno venoso, com aumento do edema no retalho e conseqüente diminuição da perfusão^{9,48,49,64}.

De acordo com Rohrich, o fármaco ideal para melhorar a vitalidade do retalho deve ter as seguintes características: disponibilidade, facilidade na administração, alto índice terapêutico, reprodutibilidade de resultados, viabilidade de tratamento, custo acessível, mecanismo de ação conhecido, biodisponibilidade e efeitos protetores da necrose. Contudo, nenhuma substância atendeu a todos os requisitos e a ideal ainda não foi encontrada^{66,67}. As investigações científicas prosseguiram

para encontrar a substância, que seria capaz de manter a vitalidade do retalho cutâneo e reduzir eventual necrose, principalmente no segmento distal.

O fármaco eleito para este trabalho foi a pentoxifilina, pois contemplou muitos dos atributos da substância ideal, inclusive o efeito protetor da necrose dos retalhos, quando utilizado pela via oral e parenteral. O motivo da escolha da pentoxifilina foi o alto índice terapêutico, mecanismo de ação conhecido e as inúmeras propriedades, entre elas, de potente antioxidante, imunomodulador e o efeito hemorreológico na microcirculação. Entretanto, a pentoxifilina foi administrada pela via subcutânea, com a vantagem sobre a via parenteral como a repercussão sistêmica mínima, e sobre a via oral, pois não demanda de doses repetidas para atingir o nível sérico desejado^{5,20}. A escolha da via subcutânea se justificou pela eficácia da absorção de fluídos, dispersão adequada sendo uniforme e lenta, com concentração no local onde a ação é esperada, facilidade de aplicação^{5,20,22,27,48-50}. A pentoxifilina, refere-se a substância com característica farmacológica de ser hidrossolúvel (77.000 mg/L-25°), condição para administração pela via subcutânea²⁷. Conquanto, a administração do fármaco pela via subcutânea, a dose ideal, a periodicidade de administração, as ações nos elementos histológicos do reparo tecidual requerem outras pesquisas para corroborar com os resultados alcançados.

A propriedade hemorreológica da pentoxifilina se manifesta pelo aumento da deformabilidade dos eritrócitos e redução da viscosidade sanguínea. Conseqüentemente, a melhora o fluxo sanguíneo acarreta aumento da oxigenação nos tecidos, exercendo efeito modulador da resposta inflamatória, estimulando a angiogênese nos tecidos^{1,15,20,27-30,32-35,37-39,41,67-71}. Além disso, a pentoxifilina desempenha papel nas respostas de elementos celulares, como neutrófilos, monócitos e macrófagos, reduzindo a ação inflamatória, com a diminuição da ativação e adesividade dos leucócitos ao endotélio, e à conseqüente redução do dano endotelial resultante. Atua como potente antioxidante, inibindo a síntese de ânion superóxido, diminuindo o estresse oxidativo, reduzindo os metabólitos tóxicos da reperfusão e, como resultado, diminuição do dano tecidual e aumento da vitalidade do retalho^{1,7,27,29,32-34}. Pode interferir nos níveis de VEGF e TGFβ1, entre outras citocinas^{1,6-8,15,20,27,29,35,39,47}.

O presente estudo buscou avaliar o centro da cicatrização do retalho cutâneo, com análises das alterações no reparo tecidual sob a ação da administração da pentoxifilina. A escolha pela análise histológica no centro do retalho teve o fito de

minimizar as possíveis interferências na cicatrização que ocorrem nos bordos da ferida²⁰.

Diversos estudos foram propostos em modelos semelhantes com a utilização da pentoxifilina, pela via parenteral, com diferentes esquemas e doses, variando de 1 a 50 mg/kg, com a finalidade de melhorar a vitalidade dos tecidos^{15,20,29-40,67-71}.

No modelo de retalho cutâneo de 4,0 x 10,0 cm, pedículo caudal, foi administrada a pentoxifilina na dose de 12,5 mg/kg, via intraperitoneal, 1x/dia, por sete, oito e 14 dias, com diferentes esquemas de administração, inclusive no pré-operatório, por um e sete dias²⁹. Os autores compararam a sobrevivência dos retalhos dos três grupos tratados com o grupo-controle. Todos os animais tratados com a pentoxifilina apresentaram aumento da sobrevivência do retalho, atingindo 92,3 a 94,3%²⁹.

Empregando modelo de retalho cutâneo de 4,0 x 12,0 cm com pedículo caudal e administrando a pentoxifilina na dose de 24 mg/kg, pela via intraperitoneal, 1x/dia, no peroperatório, e com outro esquema diariamente por 10 dias, os autores confirmaram que a pentoxifilina, pela via parenteral, aumentou a sobrevivência dos retalhos cutâneos em ratos³².

Estudo dos efeitos da pentoxifilina, na dose de 20 mg/kg, via intraperitoneal, 2x/dia, por sete dias, e do cloridrato de buflomedil na dose de 34,2 mg/kg, intraperitoneal, 2x/dia, por sete dias, no pós-operatório não obteve resultados com significância estatística, apesar de verificar melhora na vascularização dos retalho¹⁵. Estudo experimental apurou que a pentoxifilina foi altamente benéfica no tratamento das injúrias de pele³³.

Em modelo experimental de ratos foram investigadas a isquemia e reperfusão de musculoesquelético, do sóleo, sob a influência da pentoxifilina na dose de 40 mg/kg, via intraperitoneal, variando o esquema de administração, imediatamente anterior ao início da isquemia ou imediatamente anterior ao início da reperfusão. Obteve-se como resultados a diminuição das modificações morfológicas no tecido muscular, devido ao decréscimo do edema e do infiltrado inflamatório, quando o fármaco foi aplicado no início da isquemia, com redução da expressão da caspase-3³⁴.

Avaliação de feridas em ratos com diabetes induzidas por streptozotocin mostrou que a pentoxifilina na dose de 25 mg/kg, via intraperitoneal, 2x/dia,

melhorou todos os parâmetros biomecânicos da pele, de maneira significativa, com redução da inflamação e da expressão das metaloproteinases³⁶.

O efeito do pré-tratamento com a pentoxifilina na dose de 20 mg/kg, via intraperitoneal, por 30 dias antes do procedimento cirúrgico, foi o significativo aumento da sobrevivência dos retalhos cutâneos, cicatrização das feridas e reversão de alterações ultraestruturais decorrentes da hipóxia no endotélio dos vasos sanguíneos⁶⁷.

Os autores, em pesquisa de mestrado, compararam o uso do dimetilsulfóxido a 5% e da pentoxifilina, dose 20mg/kg, modelo de retalho de Mcfarlane (1965) modificado^{48,49}, em ratos e verificaram significativa melhora no reparo tecidual quando administraram os fármacos por via subcutânea, no peroperatório, com maior evidência para a pentoxifilina²⁰. Diante desse resultado, decidiu-se aprofundar as análises e avaliar a vitalidade e a sobrevivência do retalho com a proposta de aumentar a dose do fármaco para 100mg/Kg, a periodicidade e o esquema de administração. A segurança da dose de administração da pentoxifilina foi embasada nos valores da dose letal mediana (DL50). Em camundongos, após administração intraperitoneal, é de 195mg/kg e após administração oral de 1385 mg/kg de peso corpóreo. A DL50 do fármaco, em ratos, após administração intraperitoneal é de 230 mg/kg e após a administração oral é de 1.770 mg/kg de peso corpóreo^{15,20,27,30}. Os animais dos grupos tratados pelo fármaco permaneceram hígidos e sem sinais de sofrimento durante o experimento, assim, estabelecendo a segurança da dose no presente estudo.

Na presente pesquisa, verificou-se à análise macroscópica, que os grupos de animais tratados com a pentoxifilina, quando comparados com o grupo CT, apresentaram redução significativa das dimensões da necrose e a formação de tecido de granulação com vascularização exuberante na derme e hipoderme, caracterizando assim, necrose superficial apenas da epiderme e em algumas amostras da derme superficial, ou seja, as camadas profundas do retalho cutâneo permaneceram preservadas. Por outro lado, houve aumento significativo das dimensões do tecido viável nos retalhos cutâneos, variável que mostrou a influência da pentoxifilina na vitalidade e no reparo tecidual dos retalhos cutâneos em ratos.

Quando ocorre necrose do segmento do retalho faz-se necessária a abordagem cirúrgica secundária. No entanto, na presença de granulação apropriada nas camadas subjacentes à necrose, pode ser um fator importante para tratamento

mais célere, pois abreviaria o tempo de espera para granulação adequada para possível cobertura cutânea dessa área, aumentando assim a possibilidade de sucesso. Esse resultado mostra relevância para possível correlação com a prática médica.

A avaliação histológica do retalho cutâneo do presente trabalho foi feita em componentes do tecido de granulação, como a morfometria dos vasos sanguíneos. Os achados histológicos como o aumento do número de vasos nos retalhos cutâneos, principalmente nos grupos com esquema de administração de maior período de dias no pós-operatório, mostram que os grupos tratados com pentoxifilina, obtiveram maior estímulo à angiogênese. Deve ser ressaltado que o aumento da angiogênese ocorreu nos três segmentos do retalho cutâneo e que os efeitos da pentoxifilina foram observados no terceiro dia administração do fármaco, inclusive no segmento distal do retalho, aquele mais distante do pedículo vascular.

Em estudo administrando pentoxifilina e heparina, verificou-se que os efeitos pró-angiogênicos da pentoxifilina, como o aumento de número de vasos em tecidos isquêmicos de segmentos de retalhos cutâneos expostos ao tabaco, mostrou que a administração desse fármaco deve ser preconizada no pré-operatório, por via parenteral, por maior tempo. A comparação entre pentoxifilina e heparina em modelo de retalho isquêmico submetidos à reperfusão, a heparina foi mais eficaz na emergência¹⁷.

Pesquisa em ratos sobre a viabilidade de retalhos cutâneos foram administradas hialuronidase intradérmica e pentoxifilina intraperitoneal por 14 dias. A administração somente da pentoxifilina estimulou a angiogênese, enquanto que a associação de pentoxifilina e hialuronidase foi mais eficaz para reduzir a celularidade de macrófagos na derme³⁸.

Em modelo de estudo de anastomose intestinal após isquemia/reperfusão, verificou-se que a pentoxifilina na dose de 50 mg/kg, administrada via intraperitoneal e com esquemas diferentes no pós-operatório, pode atenuar os efeitos negativos da isquemia/reperfusão e promover a síntese de colágeno na anastomose⁶⁸.

O fármaco foi administrado pela via intraperitoneal nas doses de 1 e 10 mg/kg e com esquemas diferentes, na análise dos efeitos protetores da pentoxifilina no intestino delgado após o evento isquemia/reperfusão. As respostas moleculares e os efeitos protetores do fármaco foram examinados em um modelo de isquemia/reperfusão (I/R) intestinal grave. O papel da pentoxifilina em isquemia

grave do intestino delgado foi investigado, assim como o tempo e a dose administrada, para determinar o efeito desse agente em diferentes condições. Os achados bioquímicos, histopatológicos e imuno-histoquímicos sugerem que doses baixas de pentoxifilina podem efetivamente melhorar o dano isquêmico no modelo experimental de ratos⁶⁹.

Os efeitos pró-angiogênicos da pentoxifilina, como o aumento de número de vasos em tecidos isquêmicos, foram observados em vários estudos. No trabalho sobre modificação histológica de retalho miocutâneo do reto abdominal (*TRAM*) monopediculado caudal em ratos tratados com pentoxifilina foram observadas mudanças no sistema da microcirculação, redução da necrose e aumento do número de capilares na zona de isquemia (zona IV) no retalho, com a administração de 20 mg/kg/dia, via intraperitoneal⁷⁰.

Quanto à ferida, a migração dos queratinócitos faz-se necessária para manter a função de barreira da pele e restabelecer o equilíbrio daquele tecido e dos tecidos adjacentes, sendo uma etapa crítica no processo cuidadosamente orquestrado de cicatrização de feridas, sendo, portanto, a reepitelização parte importante desse processo^{3,22,51-53,72}.

Considerando a avaliação da reepitelização nos retalhos cutâneos na presente pesquisa, os grupos de animais submetidos à administração da pentoxifilina tiveram aumento na espessura do epitélio nos três segmentos do retalho cutâneo, sendo que, observou-se no segmento proximal, aumento a partir do terceiro dia de administração do fármaco. Realizou-se a morfometria da espessura do epitélio nos quatro grupos estudados e foram observadas influência e ação do fármaco, como a migração dos queratinócitos, e o estímulo à reepitelização, para se completar o reparo tecidual dos retalhos. Houve aumento progressivo da espessura do epitélio, à medida que o fármaco foi administrado por maior número de dias, sugestivo da correlação entre o estímulo ao reparo tecidual e administração do fármaco por maior número de dias e maior sobrevivência dos retalhos nos grupos tratados pelo fármaco. Abaixo da crosta necrótica do retalho, observou-se achados nos elementos histológicos número de vasos, espessura do epitélio e densidade do colágeno, com tecido de granulação exuberante da derme até a hipoderme, analisados à microscopia. O aumento da espessura do epitélio foi significativo no segmento proximal quando se compararam os grupos P1 e P3. O aumento da espessura do epitélio foi evidente e significativo nos grupos P3 e P5, em todos os

segmentos do retalho, sugerindo a ação da pentoxifilina no reparo tecidual, denotando relação entre o estímulo ao reparo tecidual a partir do aumento da periodicidade na sua administração.

Em pesquisa com a pentoxifilina sobre a proliferação *in vitro* de fibroblastos dérmicos normais em humanos de colágeno, glicosaminoglicanas, a produção de fibronectina e aumento da atividade das colagenases. Os fibroblastos ensaiados como culturas confluentes produziram quantidades subnormais de colágeno, glicosaminoglicanos (GAGs) e fibronectina de um modo dependente da concentração de pentoxifilina. Em contraste, os fibroblastos expostos à pentoxifilina elaboraram o dobro da atividade colagenase produzida por fibroblastos normais, não tratados. Ao contrário da inibição da produção de colágeno e fibronectina induzida pela pentoxifilina, que foi detectada apenas em culturas suplementadas com soro, a pentoxifilina inibe, em grau semelhante, a produção de glicosaminoglicano constitutiva e induzida pelo soro³⁰.

Estudo comparativo entre pentoxifilina e triancinolona, administraram-se pentoxifilina via oral e intralesional e triancinolona via intralesional em queloides. Sendo que, os autores obtiveram resultados clínicos semelhantes com ambos os fármacos e sugeriram a pentoxifilina como tratamento alternativo e eficaz no tratamento da maioria das lesões queloidianas³¹.

A análise da ação da pentoxifilina, *in vitro*, em fibroblastos oriundos de cicatrizes hipertróficas pós-queimadura e de pele não cicatricial revelou que o fármaco reduziu a proliferação de fibroblastos, exercendo seletividade na inibição da síntese de colágenos, mais expressiva no tipo III que no tipo I³⁵.

Na comparação do uso da pentoxifilina, 1,0 mg/mL, via intradérmica, com a triancinolona para o tratamento de queleide, a pentoxifilina teve resposta clínica e morfológica semelhante à da triancinolona nos casos tratados com os fármacos³⁹.

As propriedades da pentoxifilina de atuar sobre a organização e síntese do colágeno, diminuindo a matriz extracelular e, conseqüentemente, diminuindo a produção de colágeno, glicosaminoglicanos, fibronectina, além de aumentar a atividade das colagenases, foram referidas também nos trabalhos de vários pesquisadores^{30,31,35,38,39,41}. Entretanto, devido à importância dessa opção terapêutica na prática médica para os pacientes com cicatrizes hipertróficas e queloidianas, outros estudos serão necessários para elucidar o mecanismo de ação, estabelecer a dose ideal e definir a via subcutânea como uma opção de tratamento

com a pentoxifilina.

Na presente pesquisa, a análise morfométrica da densidade do colágeno mostrou que houve diminuição nos segmentos proximal, intermediário e distal dos grupos tratados com a pentoxifilina, assim como a diminuição da dosagem de TGF- β 1, na pele e no soro. Denotando ação anti-fibrogênica, sendo que, tais resultados encontram-se em concordância com a literatura.

Muitos dos eventos celulares associados à migração de queratinócitos são induzidos e regulados por fatores de crescimento individuais ou a combinação de fatores de crescimento que estão presentes e que têm estímulo local de moléculas encontradas próximo à injúria^{3,22,25,34,38,51-53,72}.

No processo de cicatrização da pele há a participação de vários fatores e, entre eles, o fator crescimento do endotélio vascular (*VEGF*). Esse fator foi pesquisado na pele e no soro de animais^{22,60}. Na presente pesquisa os níveis de *VEGF* foram maiores na pele do retalho em comparação ao soro dos animais. E em ambos, houve significativo aumento do *VEGF*. Esse resultado sugere que a pentoxifilina estimulou a molécula angiogênica e encontra-se em concordância com os resultados da literatura⁷¹.

Foram relatados efeitos da pentoxifilina na dose de 25 mg/kg/dia, via intraperitoneal, na cicatrização de defeitos ósseos segmentares e angiogênese, em modelo com defeitos ósseos da diáfise do rádio em ratos⁷¹. Os grupos tratados com o fármaco mostraram angiogênese mais acentuada com aumento dos níveis de *VEGF* e na imunohistoquímica do *CD31* com diferenças significantes entre os grupos estudados. De acordo com os autores, a pentoxifilina parece promover a cicatrização dos defeitos segmentares ósseos e a capacidade para melhorar a osteogênese e a vascularização do defeito local⁷¹.

No presente estudo, verificou-se aumento do nível de *VEGF*, indicando aumento da liberação dessa potente molécula angiogênica, quando o esquema de administração foi por um período maior no pós-operatório. As dosagens de *VEGF* e *TGF- β 1* corroboraram com a investigação sobre as ações da pentoxifilina na vitalidade e no reparo tecidual dos retalhos cutâneos em ratos. O número reduzido de animais para avaliação dessas variáveis foi em função do escopo da pesquisa, que focou as análises histológicas dos segmentos do retalho. Os resultados das dosagens das citocinas demonstraram, entretanto, a necessidade de ampliar a pesquisa com maior número de animais.

A densidade do colágeno e a dosagem dos níveis de *TGF-β1* na pele e no soro dos animais, também, foram analisadas, com a dose de 100 mg/kg/dia de pentoxifilina. Observou-se que a pentoxifilina atuou na liberação de *TGF-β1* em nível local e sistêmico. Houve redução significativa no nível desse fator de crescimento na pele dos animais tratados com pentoxifilina quando comparados o grupo P5 com o grupo CT. A redução dos níveis de *TGF-β1* no soro dos animais tratados foi maior nos grupos de animais que receberam a pentoxifilina por mais dias, sugerindo o papel anti-fibrogênico do fármaco. O tecido de granulação desenvolvido, nos grupos P3 e P5 apresentaram-se com exuberância da vascularização, com maior organização das fibras colágenas, quando comparado com os grupos CT e P1. Estudos relataram que o fármaco tem ação de diminuição da síntese de colágeno e diminuição dos níveis de *TGF-β1*^{30,31,35}. O fator de crescimento transformador beta-1 (*TGF-β1*), na presente pesquisa, mostrou que seus níveis foram maiores no soro em comparação à pele dos animais, mas tanto no soro quanto na pele houve redução dos níveis dessa citocina, embora com reparo tecidual eficaz, esses resultados encontram-se em concordância com a literatura^{30,31,35}.

Ademais, as dosagens dos fatores de crescimento *VEGF* e *TGF-β1* foram realizadas em três animais de cada grupo, no segmento proximal, uma vez que o escopo da pesquisa foi verificar ação da pentoxifilina nos elementos do reparo tecidual.

Na presente pesquisa, a análise morfométrica mostrou que houve aumento do número de vasos nos segmentos proximal, intermediário e distal dos grupos P3 e P5. Aumento da dosagem de *VEGF*, na pele e no soro, nos grupos P1, P3 e P5, respectivamente. Demonstrando aumento da angiogênese e, por conseguinte, aumento da vitalidade dos retalhos cutâneos dos grupos tratados com a pentoxifilina. A morfometria da densidade do colágeno dos retalhos cutâneos mostrou que houve diminuição da deposição desse e maior organização do tecido conjuntivo, sobretudo quando a pentoxifilina foi administrada por maior número de dias. As evidências dessas alterações foram encontradas a partir do terceiro dia de administração em todos os segmentos dos retalhos, e a partir do primeiro dia no segmento distal. Esses resultados estão em conformidade com a literatura, embora as pesquisas tenham sido elaboradas com metodologias diferentes^{29,30,32,35,36,38}.

A morfometria da espessura do epitélio, do número de vasos, densidade do colágeno, as dosagens dos níveis de *VEGF* e *TGF-β1*, bem como as análises

morfológicas dos segmentos do retalho acusaram ações da pentoxifilina na sobrevivência dos retalhos, com evidente ação sobre a angiogênese nos grupos tratados, com benefícios para vitalidade e reparo tecidual e, conseqüentemente, diminuição da necrose.

Os achados podem contribuir para promover o aumento da sobrevivência do retalho, com a estratégia farmacológica de um medicamento disponível, administrado via subcutânea. Além dos benefícios como o custo acessível, fácil administração, alto índice terapêutico, resultados eficazes, viabilidade de tratamento, mecanismo de ação conhecido quando administrado pelas vias oral e parenteral, biodisponibilidade e efeitos protetores da necrose.

A pentoxifilina sugere que é dose-dependente, com possível variabilidade dos vários efeitos a partir da dose, do esquema, da via, e do período de administração^{20,27,29,32-34,36,67-71}.

Não foram encontradas na literatura experiências comparáveis. No entanto, os resultados mostraram que o esquema proposto, com a dose de 100mg/kg/dia, pela via subcutânea, foi eficaz para aumentar a vitalidade e a sobrevivência do retalho. Houve estímulo à angiogênese, com aumento do número de vasos, aumento de *VEGF* e à reepitelização, com aumento da espessura do epitélio, fases que integram o reparo tecidual, com conseqüente redução da necrose tecidual. Mostrou efeito anti-fibrogênico, com diminuição da densidade do colágeno e redução e *TGF-β1* de retalho cutâneo em ratos.

A relevância dos benefícios da pentoxifilina, administrada via subcutânea, no retalho no dorso de rato, permite inferir eficácia sobre a vitalidade, efeito protetor sobre a necrose, estímulo à angiogênese e redução da fibrogênese.

Certamente, ainda existem diversos caminhos para investigações, a fim de elucidar e ampliar os conhecimentos sobre o fármaco e sua aplicabilidade. Os mecanismos exatos de ação da pentoxifilina administrada via subcutânea, necessitam de outras pesquisas para aclarar sobre a dose, assim como, outros testes para padronizar a dose ideal. Pesquisas com estudos comparativos da pentoxifilina, administrada via subcutânea, com doses diferentes e sua ação no reparo tecidual. Bem como, testes com o uso da pentoxifilina, administrada via subcutânea, na dose de 100mg/kg, nas cicatrizes queloidianas.

A contribuição dessa pesquisa foi estabelecer que a pentoxifilina, administrada via subcutânea, na dose de 100mg/kg, seja uma opção adequada por

outra via de administração do fármaco, que até o momento, foi utilizada pelas vias parenteral e oral.

Todavia, o presente estudo mostrou que o uso da pentoxifilina foi uma estratégia para diminuir a necrose no retalho cutâneo de rato e, mesmo quando presente, propiciou a formação de tecido de granulação nas camadas da derme profunda e hipoderme. Condição importante para o sucesso de cobertura cutânea em procedimentos secundários. Diante do efeito anti-fibrogênico da pentoxifilina, estudos com o fármaco, na dose de 100 mg/kg, esquema diversificado, pela via subcutânea em cicatrizes hipertróficas e queloidianas também podem ser propostos.

A perspectiva desta pesquisa foi validar e extrapolar tais contribuições para a prática médica, da mesma maneira que, sugerir a administração da pentoxifilina por via subcutânea, na dose de 100mg/kg, como estratégia terapêutica para minimizar a necrose nos retalhos cutâneos, assim, diminuir procedimentos secundários e os custos assistenciais decorrentes da necrose do retalho.

7 CONCLUSÕES

A pentoxifilina, administrada via subcutânea, na dose de 100 mg/kg/dia, aumentou a vitalidade e o reparo tecidual, nos grupos de ratos tratados por maior número de dias.

As ações da pentoxifilina foram caracterizadas por:

- Aumento da angiogênese e do número de vasos, corroborada pelo aumento de *VEGF*, na pele e no soro dos animais;
- Aumento da espessura do epitélio e da reepitelização;
- Efeito anti-fibrogênico com diminuição da densidade do colágeno, corroborado pela redução de *TGF-β1*, na pele e no soro dos animais.

REFERÊNCIAS

- 1 - Flores LRP. Retalhos cutâneos: fisiologia, classificação, principais retalhos. *In*: Mélega JM, Viterbo F, Mendes FH. Cirurgia Plástica: os princípios e a atualidade. Rio de Janeiro: Grupo Gen-Guanabara Koogan. 2011; 64-71.
- 2 - Tardelli HC, Souto C. Cicatrização da pele. *In*: Mélega JM, Viterbo F, Mendes FH. Cirurgia Plástica: os princípios e a atualidade. Rio de Janeiro: Grupo Gen-Guanabara Koogan. 2011; 3-8.
- 3 - Medeiros AC, Dantas Filho AM. Resposta metabólica ao trauma. *Journal of Surgical and Clinical Research*. 2017; 8(1):56-76. DOI: <https://doi.org/10.20398/jscr.v8i1.13036>.
- 4 - Fagundes DJ, Taha MO. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2004; 19(1):59-65.
- 5 - Almeida KGD, Fagundes DJ, Manna MCB, Montero EFDS. Ação do dimetil-sulfóxido na isquemia de retalhos randômicos de pele em ratos. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2004; 19(2). DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-86502004000600012>.
- 6 - Cymrot M, Percário S, Ferreira LM. Comportamento do estresse oxidativo e da capacidade antioxidante total em ratos submetidos a retalhos cutâneos isquêmicos. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2004; 19(1):18-19. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-86502004000600012>.
- 7 - Campos EBPD, Yoshida WB. O papel dos radicais livres na fisiopatologia da isquemia e reperfusão em retalhos cutâneos: modelos experimentais e estratégias de tratamento. *Jornal Vascular Brasileiro*. 2004; 3(4):357-66.
- 8 - De Lima Silva JJ, Pompeu DG, Ximenes NC, Duarte ASG, Gramosa NV, De Moraes Carvalho K, *et al*. Effects of kaurenoic acid and arginine on random skin flap oxidative stress, inflammation, and cytokines in rats. *Aesthetic Plastic Surgery*. 2015; 39(6); 971-977. PMID: 26408387.
- 9 - Acevedo-Bogado CE, Bins-Ely J, d'Acampora AJ, Neves RD. Efeito da hialuronidase na sobrevida de retalhos cutâneos em ratas. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2002; 17(1):14-16. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-86502002000700004>.
- 10 - Barral SM, Araújo ID, Vidigal PVT, Mayrink CAC, Carvalho FG, Matias GN, *et al*. Effects of sildenafil on the viability of random skin flaps. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2011; 26(4): 314-19. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-86502011000400012>.
- 11 - Guimarães MVTN, Moreira GHG, Rocha LP, Nicoluzzi JEL, Souza CJF, Domingues JC. L-arginine action in cutaneous flap evolution under nicotine exposure in rat. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*. 2013; 40(1):049-054. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-69912013000100009>.

- 12 - Bittencourt RDC, Biondo-Simões MDLP, Paula JBD, Martynetz J, Groth A. Influence of minoxidil on ischemic cutaneous flaps in rats. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2005; 20(6):450-454. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-86502005000600010>.
- 13 - Toutain CE, Brouchet L, Raymond-Letron I, Vicendo P, Berges H, Favre J, *et al.* Prevention of skin flap necrosis by estradiol involves reperfusion of a protected vascular network. *Circulation Research*. 2009; 104(2):245-254. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1875-2136\(09\)72255-7](https://doi.org/10.1016/S1875-2136(09)72255-7).
- 14 - Moura TD, Marques ADA, Bernal SO, Gagliocca GD, Gemperli R, Ferreira MC. Estudo da ação da estreptoquinase e do alopurinol em retalhos cutâneos em ilha submetidos à isquemia prolongada: estudo experimental em ratos. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 2009; 55(5):601-605. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-42302009000500027>.
- 15 - Leal P, Cammarota M, Sbalchiero J, Marques M, Moreira M. Efeitos da pentoxifilina e o cloridrato de buflomedil em retalhos randomizados em ratos sob influência da nicotina. *Revista Brasileira de Cirurgia Plástica*. 2001; 19(3):37-42.
- 16 - Camargo CP, Jacomo AL, Battlehner CN, Lemos M, Saldiva PH, Martins MA, *et al.* Botulinum toxin type A on cutaneous flap viability in diabetic and tobacco-exposed rats. *Acta Cirurgica Brasileira*. 2015; 30(9): 639-645. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-865020150090000009>.
- 17 - Freitas FA, Piccinato CE, Cherri J, Marchesan WG. Effects of pentoxifylline and heparin on reperfusion injury island skin flaps in rats exposed to tobacco. *Journal of Surgical Research*. 2010; 164(1):139-145. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jss.2010.05.028>.
- 18 - Esteves Júnior I, Ferreira LM, Liebano RE. Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina por iontoforese na viabilidade de retalho cutâneo randômico em ratos. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2004; 19(6): 626-629. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-86502004000600008>.
- 19 - Zhou KL, Zhang YH, Lin DS, Tao XY, Xu HZ. Effects of calcitriol on random skin flap survival in rats. *Scientific Reports*. 2016; 6:18945.
- 20 - Pedretti SLC, Rena CL, Castãnon MCMN, Duque APN, Pereira FH, Nunes TA. Efeito do dimetilsulfóxido e da pentoxifilina na vitalidade dos retalhos cutâneos em ratos. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*. 2017; 44(5):457-464. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/0100-69912017005006>.
- 21 - Rocha FPD, Fagundes DJ, Pires JA, Rocha FSTD. Efeito da oxigenação hiperbárica e da N-acetilcisteína na viabilidade de retalhos cutâneos em ratos. *Revista Brasileira de Cirurgia Plástica*. 2011; 26(4):555-560. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1983-51752011000400003>.

- 22 - Kryger Z, Zhang F, Lineaweaver WC, Dogan T, Cheng C, Buncke HJ. The effects of VEGF on survival of a random flap in the rat: examination of various routes of administration. *British Journal of Plastic Surgery*. 2000; 53(3):234-239. DOI: <https://doi.org/10.1054/bjps.1999.3315>.
- 23 - Jafari S, Morteza S, Shafighi M, Beltraminelli H, Geiser T, Hunger RE, *et al.* Improvement of flap necrosis in a rat random skin flap model by in vivo electroporation-mediated HGF gene transfer. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2017;139(5):1116e-1127e. DOI <https://doi.org/10.1097/PRS.00000000000003259>.
- 24 - Freitas ALP. Células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo na viabilidade do retalho musculofasciocutâneo abdominal transversal do músculo reto do abdome em ratos [tese] [Internet]. São Paulo; Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP); 2016.
- 25 - Li W, Enomoto M, Ukegawa M, Hirai T, Sotome S, Wakabayashi Y, *et al.* Subcutaneous injections of platelet-rich plasma into skin flaps modulate proangiogenic gene expression and improve survival rates. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2012; 129(4):858-866. DOI: <https://doi.org/10.1097/PRS.0b013e3182450ac9>.
- 26 - Prado RP, Pinfieldi CE, Liebano RE, Hochman BS, Ferreira LM. Effect of application site of low-level laser therapy in random cutaneous flap viability in rats. *Photomedicine and Laser Surgery*. 2009; 27(3):411-416. DOI: <https://doi.org/10.1089/pho.2008.2320>.
- 27 - National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=4740. [acesso em 2019 jan. 05]. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4740>.
- 28 - Silva JME. Perspectivas e importância clínica da hemorreologia-influência da deformabilidade eritrocitária. *Acta Médica Portuguesa*. 1984; 5:151-153
- 29 - Roth AG, Briggs PC, Jones EW, Heckler FR. Augmentation of skin flap survival by parenteral pentoxifylline. *British Journal of Plastic Surgery*. 1988; 41(5):515-520. DOI: [https://doi.org/10.1016/0007-1226\(88\)90010-0](https://doi.org/10.1016/0007-1226(88)90010-0).
- 30 - Berman B, Duncan MR. Pentoxifylline inhibits normal human dermal fibroblast in vitro proliferation, collagen, glycosaminoglycan, and fibronectin production, and increases collagenase activity. *Journal of Investigative Dermatology*. 1989; 92(4):605-610.
- 31 - Iskandarian K, Miranda Y, Nahy C, Cacciabando G, Sánchez M, Malave L, *et al.* Estudio comparativo entre pentoxifilina y triamcinolona en el tratamiento de queloides. *Salus Militiae*. 1993; 18:9-12. Bvs: LILACS: 199182.
- 32 - Topalan M, Arinci A, Erer M, Guvenc H. The effect of parenteral pentoxifylline therapy on skin flap survival. *European Journal of Plastic Surgery*. 1993; 16(1):33-35. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/BF00192704>.

- 33 - Oztuna V, Eskandari MM, Unal S, Colak M, Karabacak, T. The effect of pentoxifylline in treatment of skin degloving injuries: an experimental study. *Injury*. 2006; 37(7):638-641. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.injury.2006.02.025>.
- 34 - Brasileiro JL, Fagundes DJ, Miji LON, Oshima CTF, Teruya R, Marks G, *et al.* Isquemia e reperfusão de músculo sóleo de ratos sob ação da pentoxifilina. *Jornal Vascular Brasileiro*. 2007; 6(1):13. DOI; <http://dx.doi.org/10.1590/S1677-54492007000100008>.
- 35 - Isaac C. Estudo *in vitro* da ação de pentoxifilina em fibroblastos oriundos de cicatrizes hipertróficas pós-queimadura e de pele não-cicatricial [tese] [Internet]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2007. DOI: 10.11606/T.5.2007.tde-19022009-101816.
- 36 - Babaei S, Bayat M, Nouruzian M, Bayat M. Pentoxifylline improves cutaneous wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. *European Journal Pharmacology*. 2013; 700:165-72. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.11.024>.
- 37 - Milcheski DA, Nakamoto HA, Tuma Jr P, Nóbrega L, Ferreira MC. Experimental model of degloving injury in rats: effect of allopurinol and pentoxifylline in improving viability of avulsed flaps. *Annals of Plastic Surgery*. 2013; 70(3):366-369. DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/SAP.0b013e318230601a>.
- 38 - António NN, Costa AMA, Marques RG. Viability of randomized skin flaps: an experimental study in rats. *Journal of Surgical Research*. 2017; 207:92-101. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jss.2016.08.065>.
- 39- Vana LPM, Miranda MVDF, Isaac C, Battlehner CN, Caldini EG, Alonso N. Estudo comparativo entre pentoxifilina e triancinolona no tratamento das cicatrizes hipertróficas pós-queimadura quanto à remodelação do colágeno e das fibras do sistema elástico. *Revista Brasileira de Queimaduras*. 2014; 13(4):240-244.
- 40 - McCarty MF, O'Keefe JH, DiNicolantonio JJ. Pentoxifylline for vascular health: a brief review of the literature. *Open Heart*. 2016; 3:e000365. DOI: 10.1136/openhrt-2015-000365.
- 41- Hassan I, Dorjay K, Anwar P. Pentoxifylline and its applications in dermatology. *Indian Dermatology Online Journal*. 2014; 5(4):510. DOI: 10.4103/2229-5178.142528.
- 42 - Khan P, Shambharkar MS, Khan L, Gupta P. To evaluate the role of pentoxifylline in optic atrophy induced by tuberculosis. *International Journal of Basic & Clinical Pharmacology*. 2016; 5(2):528-530. DOI: <http://dx.doi.org/10.18203/2319-2003.ijbcp20160774>.

- 43 - Lopes de Jesus CC, Atallah ÁN, Valente O, Trevisani VFM. Pentoxifylline for diabetic retinopathy. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2008; 2. DOI: 10.1002/14651858.CD006693.pub2.
- 44 - Ramalho JRO. Epidermal growth factor and pentoxifylline in subacute tympanic membrane perforations. *International Archive of Otorhinolaryngol*. 2007; 11(1):15-22.
- 45 - Karacaoğlan N, Akbaş H. Effect of parenteral pentoxifylline and topical nitroglycerin on skin flap survival. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery*. 1999; 120(2):272-274. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0194-5998\(99\)70419-5](https://doi.org/10.1016/S0194-5998(99)70419-5).
- 46 - Parker R, Armstrong MJ, Corbett C, Rowe IA, Houlihan DD. Systematic review: pentoxifylline for the treatment of severe alcoholic hepatitis. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2013;37(9):845-854. DOI: <https://doi.org/10.1111/apt.12279>.
- 47 - Minicucci M, Oliveira F, Santos P, Polegato B, Roscani M, Fernandes AA, *et al*. A pentoxifilina atenua a remodelação cardíaca induzida pela exposição à fumaça de cigarros. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 2016; 106(5):396-403. DOI: <http://dx.doi.org/10.5935/abc.20160057>.
- 48 - McFarlane RM, DeYoung G, Henry RA, McFarlane RM. The design of a pedicle flap in the rat to study necrosis and its prevention. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 1965; 35(2):177-182.
- 49 - Adamson JE, Horton CE, Crawford HH, Ayers JR WT. The effects of dimethyl sulfoxide on the experimental pedicle flap: A preliminary report*+. *plastic and reconstructive surgery*. 1966; 37(2):105-110. PubMed; PMID: 5325288
- 50 - Pontalti G, Rodrigues ESA, Firmino F, Fabris M, Stein MR, Longaray VK. Via subcutânea: segunda opção em cuidados paliativos. *Revista do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Universidade Federal do Rio Grande do Sul*. 2012;32(2):199-207.
- 51 - Medeiros AC, Dantas-Filho AM. Cicatrização das feridas cirúrgicas. *Journal of Surgical and Clinical Research*. 2017; 7(2):87-102. DOI: <https://doi.org/10.20398/jscr.v7i2.11438>.
- 52 - Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature*. 2008; 453(7193):314. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature07039>.
- 53 - Gonzalez ACDO, Costa TF, Andrade ZDA, Medrado ARAP. Wound healing-A literature review. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 2016; 91(5):614-620. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/abd1806-4841.20164741>.
- 54 - Duque APDN. Avaliação do potencial cicatrizante do extrato em acetato de etila 2% e 5% de *Cecropia pachystachya* em lesão cutânea de ratos Wistar.

- Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Universidade Federal de Juiz de Fora; 2013.
- 55 - Eckelman WC, Kilbourn MR, Joyal JL, Labiris R, Valliant JF Justifying the number of each experiment. *Nuclear Medicine and Biology*. 2007; 34:229-232. PubMed; PMID: 17383571.
- 56 - Brasília. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações, Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA. Resolução normativa n 33. Brasília; 2016. [acesso em 2019 jul 7]. Disponível em: https://www.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquivos/legislacao/resolucoes_normativas/Resolucao-Normativa-CONCEA-n-33-de-18.11.2016-D.O.U.-de-21.11.2016-Secao-I-Pag.-05.pdf.
- 57 - Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP. Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA. Guia anestesia e analgesia em animais de laboratório. CEUA – UNIFESP. São Paulo. 2017.
- 58 - Rittié L. Cellular mechanisms of skin repair in humans and other mammals. *Journal of Cell Communication and Signaling*. 2016;10(2):103-120. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12079-016-0330-1>.
- 59 - Pace D, Campos A, Graf R. Efeito de substâncias antioxidantes (vitamina C, vitamina E e ginkgo biloba) na viabilidade de retalho cutâneo dorsal em ratos. *Revista Brasileira de Cirurgia Plástica*. 2001; 21(2):77-81.
- 60 - Socarras TO, Vasconcelos AC, Campos PP, Pereira NB, Souza JP, Andrade SP. Foreign body response to subcutaneous implants in diabetic rats. *Plos One*. 2014; 9(11):e110945. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110945>.
- 61 - Martins NLP, Malafaia O, Ribas-Filho JM, Heibel M, Baldez RN, Vasconcelos PRL, *et al*. Análise comparativa da cicatrização da pele com o uso intraperitoneal de extrato aquoso de *Orbignya phalerata* (babaçu). Estudo controlado em ratos. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2006; 21(Suppl 3):66-75. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-86502006000900010>.
- 62 - Garros IC, Campos ACL, Tâmbara EM, Tenório SB, Torres OJM, Agulham MA, *et al*. Extrato de *passiflora edulis* na cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos: estudo morfológico e histológico. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2006; 21(3):55-65. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-86502006000900009>.
- 63 - Costa W, Silva ALD, Costa GR, Nunes TA. Histology of the rectus abdominis muscle in rats subjected to cranial and caudal devascularization. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2012; 27(2):162-167. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-86502012000200011>.
- 64 - Camargo CP, Margarido NF, Guandelini E, Vieira GAB, Jacomo AL, Gemperli R. Description of a new experimental model skin flap for studying skin viability in

rats. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2014; 29(3):166-170. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-86502014000300004>

- 65 - Kelly CP, Gupta A, Keskin M, Jackson IT. A new design of a dorsal flap in the rat to study skin necrosis and its prevention. *Journal Plastic Reconstructive Aesthetic Surgery*. 2010; 63(9):1553–6. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjps.2009.08>.
- 66 - Karaçal N, Ambarcioğlu 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. *Journal of Surgical Research*. 2005; 124(1):134-138. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jss.2004.08.035>.
- 67 - Bayat M, Chelcheraghi F, Piryaee A, Rakhshan M, Mohseniefar Z, Rezaie F, *et al*. The effect of 30-day pretreatment with pentoxifylline on the survival of a random skin flap in the rat: An ultrastructural and biomechanical evaluation. *Medical Science Monitor*. 2006;12(6):BR201-BR207. PubMed; PMID: 16733477.
- 68 - Tireli GA, Salman T, Özbey H, Abbasoglu L, Toker G, Çelik A. The effect of pentoxifylline on intestinal anastomotic healing after ischemia. *Pediatric Surgery international*. 2003; 19(1-2):88-90. DOI: [org/10.1007/s00383-002-0741-3](http://dx.doi.org/10.1007/s00383-002-0741-3).
- 69 - Eğin S, İlhan M, Bademler S, Gökçek B, Hot S, Ekmekçi H, *et al*. Protective effects of pentoxifylline in small intestine after ischemia–reperfusion. *Journal of International Medical Research*. 2018; 46(10):4140-4156.
- 70 - Lucca AFD, Brasolin AG, Feitosa RGF, Gomes HFDC, Ferreira LM. Histological modification in TRAM flap in rats treated with pentoxifylline. *Acta cirurgica brasileira*. 2014; 29:34-37. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-86502014001400007>.
- 71 – Çakmak G, Sahin MS, Özdemir BH, Karadeniz E. Effect of pentoxifylline on healing of segmental bone defects and angiogenesis. *Acta Orthopaedic et Traumatologica Turcica*. 2015; 49(6):676-82. DOI: 10.3944/AOTT.2015.15.0158.
- 72 - Sonnemann KJ, Bement WM. Wound repair: toward understanding and integration of single-cell and multicellular wound responses. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 2011; 27:237-263. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154251>.

ANEXOS E APÊNDICES

ANEXO A – Parecer ético: CEUA - UFMG

| | |
|---|---|
|  | UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS |
| UFMG | CEUA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS |
| CERTIFICADO | |
| Certificamos que o Protocolo nº. 97 / 2016, relativo ao projeto intitulado “Ação da pentoxifilina no reparo tissular e na vitalidade dos retalhos cutâneos em ratos”, que tem como responsável Tarcizo Afonso Nunes, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 07/06/2016. Este certificado espira-se em 07/06/2021. | |
| CERTIFICATE | |
| We hereby certify that the Protocol nº. 97 / 2016, related to the Project entitled “Action of pentoxifylline in tissue repair and vitalityof cutaneous flaps in rats”, under the supervision of Tarcizo Afonso Nunes, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 07/06/2016. This certificates expires in 07/06/2021. | |
| Cleuza Maria de Faria Rezende Coordenador(a) da CEUA/UFMG Belo Horizonte, 07/06/2016. | |
| Atenciosamente. | |
| Sistema CEUA-UFMG https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/ | |
| Universidade Federal de Minas Gerais Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592 www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br | |

ANEXO B – Parecer ético: CEUA - UFJF



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA**

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº. 036/2016 – CEUA sobre “AÇÃO DA PENTOXIFILINA NO REPARO TISSULAR E NA VITALIDADE DOS RETALHOS CUTÂNEOS EM RATOS” projeto de pesquisa sob a responsabilidade de TARCIZO AFONSO NUNES com a colaboração de CÍCERO DE LIMA RENA e STEPHANIE LUZIA DA COSTA PEDRETTI está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 19/07/2016. Para o desenvolvimento da pesquisa serão utilizados 32 ratos Wistar (32 machos) de 3 meses dias de idade, conforme solicitado e que serão utilizados no período 01/11/2016 a 01/11/2018.

CERTIFICATE

We certify that the protocol no. 036/2016 – CEUA about “AÇÃO DA PENTOXIFILINA NO REPARO TISSULAR E NA VITALIDADE DOS RETALHOS CUTÂNEOS EM RATOS” under responsibility of TARCIZO AFONSO NUNES and collaboration of CÍCERO DE LIMA RENA and STEPHANIE LUZIA DA COSTA PEDRETTI is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian Council for Control of Animal Experimentation (Concea) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL HANDLING (CEUA) in 19/07/2016. For the development of this research 32 Wistar rats (32 males) of 3 months of age, will be delivered as requested in the period of 01/11/2016 a 01/11/2018

Juiz de Fora, 1º de setembro de 2016

Coordenadora
CEUA

Vice-coordenadora
CEUA

APÊNDICE A – Banco de dados

Quadro 3 – Animal/grupo, variáveis: peso/operação; peso/eutanásia; dimensão total retalho; dimensão tecido necrose; dimensão tecido viável; observação

| Animal/grupo | Peso/ operação | Peso/ eutanásia | Dimensão total retalho | Dimensão tecido necrose | Dimensão tecido viável | Observação |
|---------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------------------|--|---------------------------------------|-------------------|
| A1 – P3 | 24/04: 336 g | 04/05: 324 g | 72,34 mm | 26,39 mm | 45,95 mm | Sg + tecido |
| A2 – P3 | 24/04: 317 g | 04/05: 305 g | 70,00 mm | 20,02 mm | 49,98 mm | Sg + tecido |
| A3 – P1 | 25/04: 313 g | 05/05: 299 g | 79,21 mm | 33,27 mm | 45,94 mm | Sg + tecido |
| A4 – P1 | 25/04: 310 g | 08/05: 295 g | 74,66 mm | 32,45 mm | 42,21 mm | Sg + tecido |
| A5 – Controle | 26/04: 310 g | 08/05: 314 g | 74,60 mm | 34,28 mm | 40,32 mm | Sg + tecido |
| A6 – Controle | 26/04: 328 g | 08/05: 336 g | 76,20 mm | 31,94 mm | 44,26 mm | Sg + tecido |
| A7 – P3 | 02/05: 324 g | 12/05: 310 g | 72,63 mm | 24,44 mm | 48,19 mm | Formol |
| A8 – P3 | 02/05: 339 g | 12/05: 321 g | 70,14 mm | 30,90 mm | 39,24 mm | Formol |
| A9 – P1 | 02/05: 352 g | 15/05: 345 g | 63,43 mm | 41,62 mm | 21,81 mm | Formol |
| A10 – P1 | 03/05: 320 g | 15/05: 310 g | 64,79 mm | 25,51 mm | 39,28 mm | Formol |
| A11 – P1 | 03/05: 351 g | 15/05: 347 g | 64,66 mm | 23,74 mm | 40,92 mm | Formol |
| A12 – Controle | 04/05: 334 g | 16/05: 330 g | 79,06 mm | 46,04 mm | 33,02 mm | Formol |
| A13 – Controle | 05/05: 321 g | 16/05: 301 g | 77,81 mm | 41,36 mm | 36,45 mm | Formol |
| A14 – Controle | 05/05: 340 g | 16/05: 331 g | 77,71 mm | 37,77 mm | 39,94 mm | Formol |
| A15 – P5 | 08/05: 318 g | 19/05: 295 g | 73,32 mm | 27,13 mm | 46,19 mm | Sg + tecido |
| A16 – P5 | 08/05: 328 g | 19/05: 305 g | 70,65 mm | 21,93 mm | 48,72 mm | Sg + tecido |
| A17 – P5 | 08/05: 322 g | 19/05: 302 g | 70,82 mm | 24,75 mm | 46,07 mm | Sg + tecido |
| A18 – P3 | 09/05: 333 g | 22/05: 330 g | 76,06 mm | 40,92 mm | 35,14 mm | Sg + tecido |
| A19 – P3 | 10/05: 321 g | 25/05: 310 g | 72,29 mm | 20,07 mm | 52,22 mm | Formol |
| A20 – P3 | 10/05: 310 g | 25/05: 290 g | 70,05 mm | 20,14 mm | 49,91 mm | Formol |
| A21 – P3 | 10/05: 314 g | 25/05: 315 g | 67,45 mm | 22,15 mm | 45,30 mm | Formol |
| A22 – P1 * | 29/05: 310 g | 08/07: 297 g | 74,18 mm | 24,47 mm | 49,71 mm | Sg + tecido |
| A23 – P5 | 15/05: 337 g | 26/05: 312,5 g | 65,86 mm | 21,44 mm | 44,42 mm | Formol + HE + TG |
| A24 – P5 | 15/05: 315 g | 26/05: 306 g | 68,86 mm | 23,14 mm | 45,72 mm | Formol |
| A25 – P5 | 15/05: 313 g | 26/05: 299 g | 67,25 mm | 23,55 mm | 43,70 mm | Formol |
| A26 – P1 | 21/05: 328 g | 01/06: 328 g | 68,79 mm | 26,75 mm | 42,04 mm | Formol |
| A27 – P1 | 21/05: 316 g | 01/06: 311 g | 67,21 mm | 30,16 mm | 37,05 mm | Formol |
| A28 – P5 | 29/05: 316 g | 08/06: 306,5 g | 68,79 mm | 19,58 mm | 49,21 mm | Formol |
| A29 – P5 | 29/05: 305 g | 08/06: 291 g | 63,08 mm | 20,37 mm | 42,71 mm | Formol |
| A30 – Controle | 29/05: 310 g | 08/06: 294 g | 76,00 mm | 31,16 mm | 44,84 mm | Sg + tecido |
| A31 – Controle | 29/05: 354 g | 08/06: 360g | 67,19 mm | 34,00 mm | 33,19 mm | Sg + tecido |
| A32 – Controle | 30/05: 360 g | 09/06: 34 6g | 71,79 mm | 30,23 mm | 41,56 mm | Formol |

APÊNDICE B – Resultados

Análise estatística das variáveis: peso dia da cirurgia, peso dia da eutanásia, dimensão total do retalho, dimensão do tecido com necrose, dimensão do tecido viável.

Quadro 4 - Variáveis peso, dimensão total do retalho, tecido com necrose, tecido viável variável, grupo, de normalidade, de teste Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk

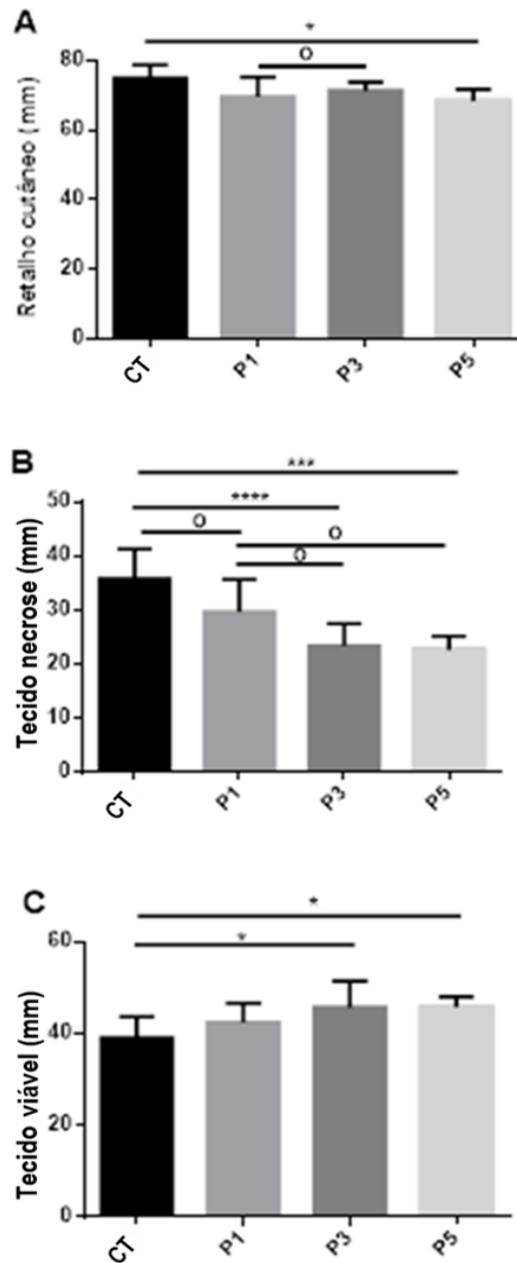
Testes de normalidade

| Variável | Grupo | Kolmogorov-Smirnov ^a | | | Shapiro-Wilk | | |
|---------------------------|----------|---------------------------------|----|-------|--------------|----|------|
| | | Statistic | Df | Sig. | Statistic | df | Sig. |
| Peso/cirurgia | Controle | ,132 | 8 | ,200* | ,937 | 8 | ,587 |
| | P1 | ,238 | 8 | ,200* | ,804 | 8 | ,032 |
| | P3 | ,168 | 8 | ,200* | ,940 | 8 | ,607 |
| | P5 | ,176 | 8 | ,200* | ,964 | 8 | ,849 |
| Peso/eutanásia | Controle | ,187 | 8 | ,200* | ,967 | 8 | ,873 |
| | P1 | ,228 | 8 | ,200* | ,866 | 8 | ,138 |
| | P3 | ,151 | 8 | ,200* | ,965 | 8 | ,859 |
| | P5 | ,161 | 8 | ,200* | ,973 | 8 | ,924 |
| Dimensão total do retalho | Controle | ,222 | 8 | ,200* | ,880 | 8 | ,190 |
| | P1 | ,182 | 8 | ,200* | ,904 | 8 | ,311 |
| | P3 | ,186 | 8 | ,200* | ,939 | 8 | ,604 |
| | P5 | ,151 | 8 | ,200* | ,981 | 8 | ,968 |
| Dimensão tecido necrose | Controle | ,237 | 8 | ,200* | ,899 | 8 | ,285 |
| | P1 | ,191 | 8 | ,200* | ,895 | 8 | ,260 |
| | P3 | ,220 | 8 | ,200* | ,812 | 8 | ,039 |
| | P5 | ,128 | 8 | ,200* | ,972 | 8 | ,916 |
| Dimensão tecido viável | Controle | ,189 | 8 | ,200* | ,913 | 8 | ,373 |
| | P1 | ,242 | 8 | ,188 | ,857 | 8 | ,112 |
| | P3 | ,220 | 8 | ,200* | ,903 | 8 | ,307 |
| | P5 | ,190 | 8 | ,200* | ,945 | 8 | ,665 |

a. Correção de Significância- (*Lilliefors Significance Correction*)

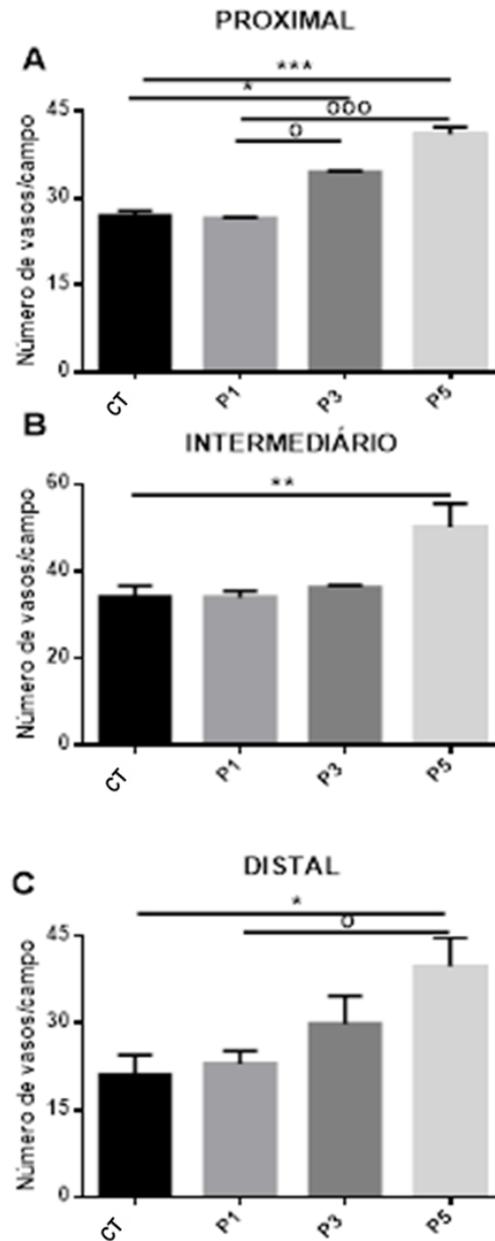
*.Limite inferior da significância verdadeira (*Lower bound of the true significance*)

Gráfico 1 - Representação gráfica da macroscopia: dimensão total do retalho, do tecido com necrose, do tecido viável, comparação entre os grupos: CT, P1, P3, P5, (A-C)



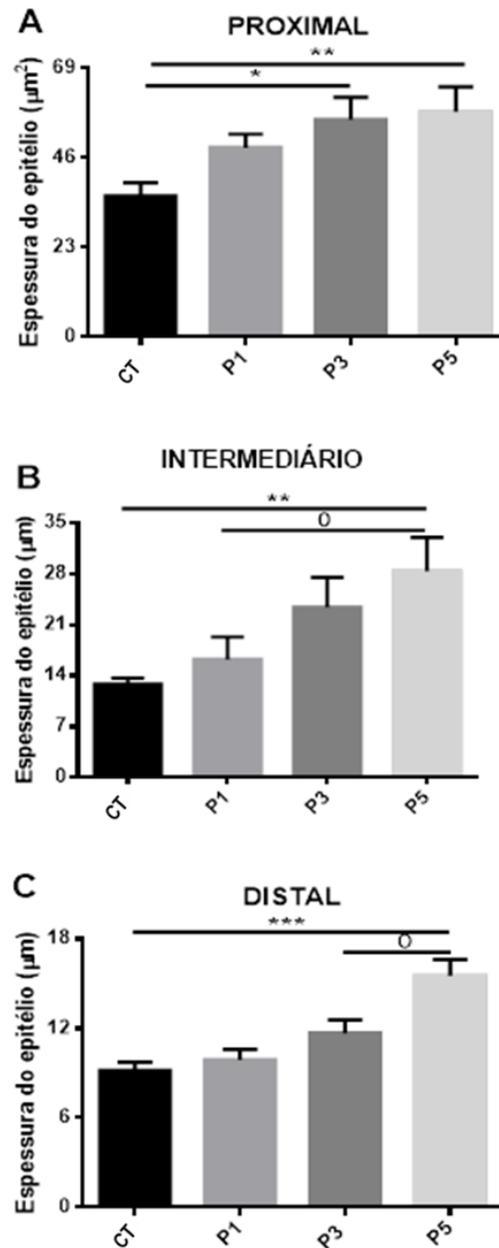
(A) Dimensão total do retalho nos grupos CT, P1, P3, P5 (B) Diferença significativa das dimensões do tecido com necrose entre grupo CT e P5 (C) Diferença significativa das dimensões do tecido viável entre grupo CT e P3.

Gráfico 2 - Representação gráfica da morfometria do número de vasos/campo nos segmentos: proximal, intermediário, distal do retalho cutâneo e comparação entre os grupos CT, P1, P3, P5 (A-C)



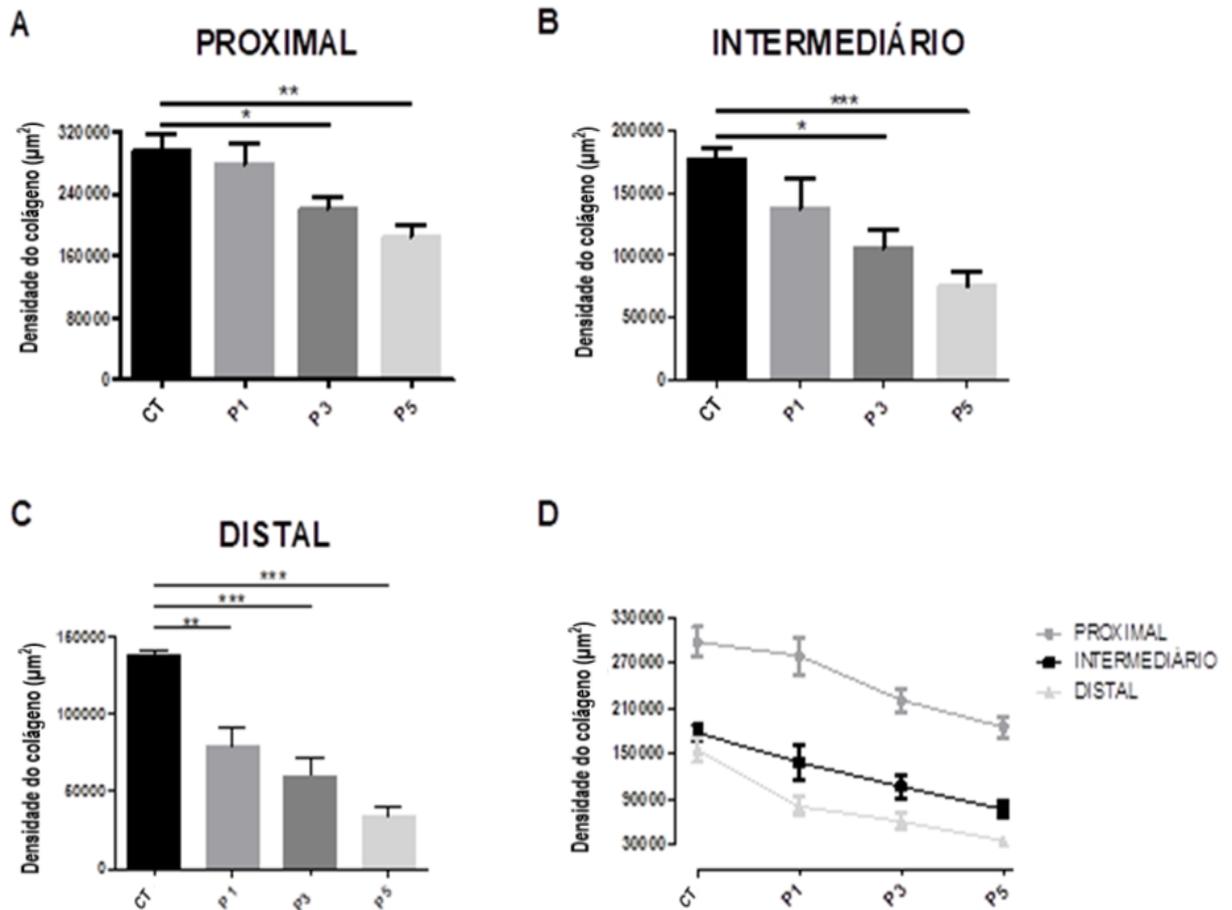
(A) Diferença entre o grupo CT e grupos P3 e P5. (B) no segmento intermediário do retalho observa-se a diferença entre os grupos CT, P1, P3 e o grupo P5. (C) O segmento distal mostra diferença entre os grupos CT e P5, e P1 e P5.

Gráfico 3 - Representação gráfica da morfometria da espessura do epitélio nos segmentos: proximal, intermediário, distal do retalho cutâneo e comparação entre os grupos CT, P1, P3, P5



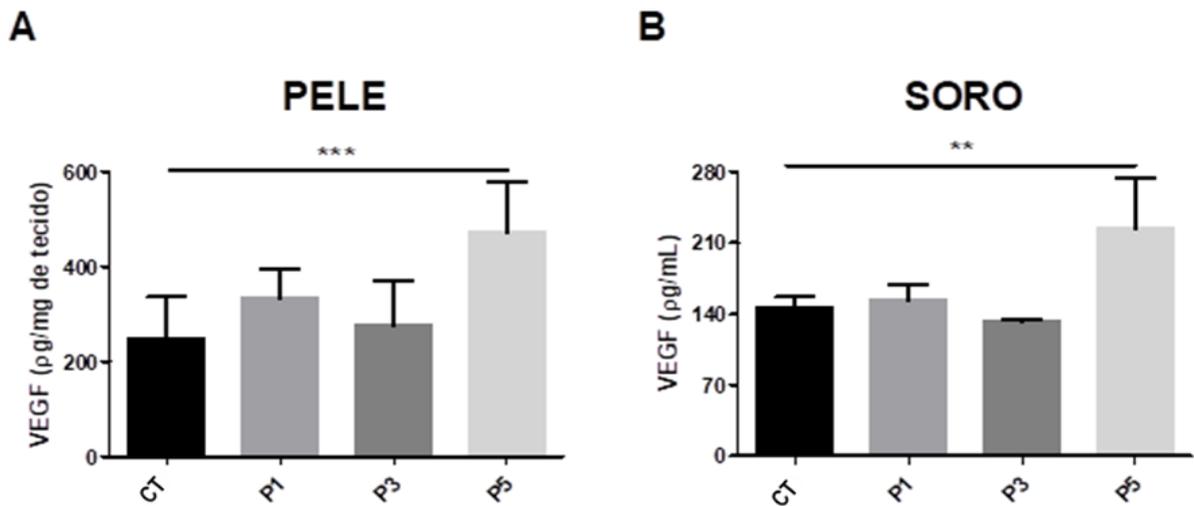
(A) Segmento proximal: diferença significativa entre CT, P3 e P5 (B) Segmento intermediário: diferença significativa entre CT e P5 e P1 e P5 (C) Segmento distal: diferença significativa entre CT e P5, P3 e P5.

Gráfico 4 - Representação gráfica da morfometria da densidade do colágeno nos segmentos: proximal, intermediário, distal do retalho cutâneo e comparação entre os grupos CT, P1, P3, P5



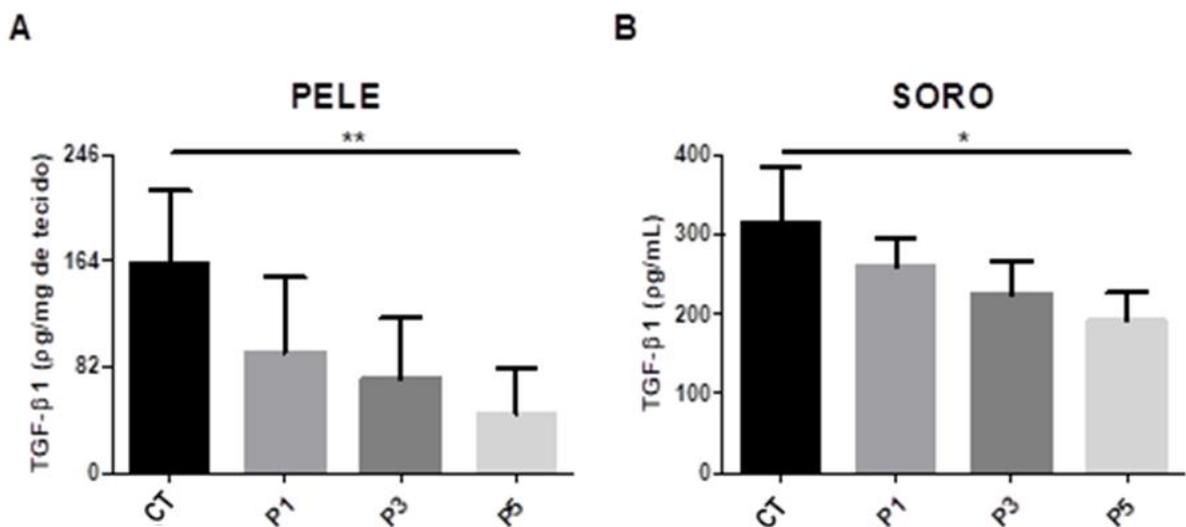
(A - B) No segmento proximal e intermediário verifica-se diferença entre os grupos CT, P3 e P5. (C) No segmento distal, nota-se diferença entre o grupo CT e grupos P1, P3 e P5. (D) Densidade do colágeno nos segmentos proximal, intermediário, distal. Os valores expressos em média, \pm DP, $n = 8$ por grupo, $*p < 0,01$, $^{\circ}$ Comparação entre os grupos. Testes: ANOVA e pós-teste de Newman-Keuls

Gráfico 5 - Representação gráfica da dosagem de *VEGF*, comparação na pele (A) e no soro (B) nos grupos: CT, P1, P3, P5



(A) Nota-se diferença significativa entre os grupos CT e P5, P1 e P5 na pele. (B) Diferença significativa entre CT e P5 no soro dos animais. Significância: * $p < 0,05$, /^o Comparação entre os grupos. Os valores expressos em média, \pm DP, $n=3$ por grupo. Testes: ANOVA e pós-teste de Newman-Keuls.

Gráfico 6 - Representação gráfica da dosagem de *TGF- β 1*, comparação na pele(A) no soro(B) nos grupos: CT, P1, P3, P5



(A – B) Denota diferença significativa entre os grupos CT e P5 na pele e no soro. Significância: * $p < 0,05$. /^o Comparação entre os grupos CT, P1, P3 e P5. Valores expressos em média \pm DP, $n=3$ por grupo. Testes: ANOVA e pós-teste de Newman-Keuls.

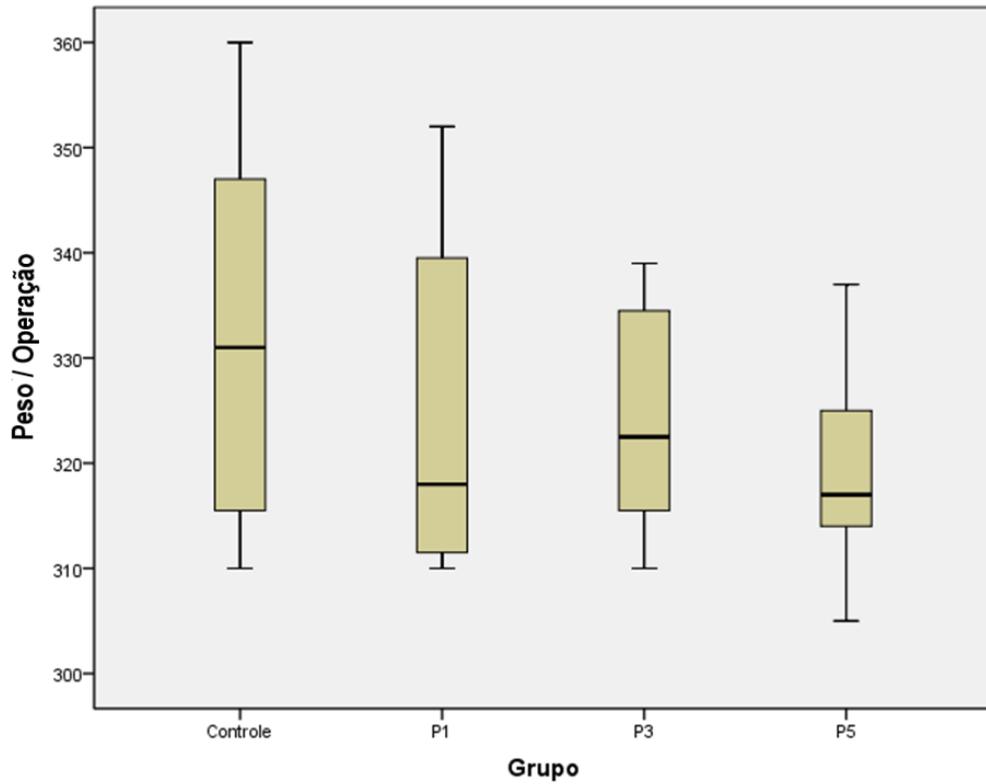
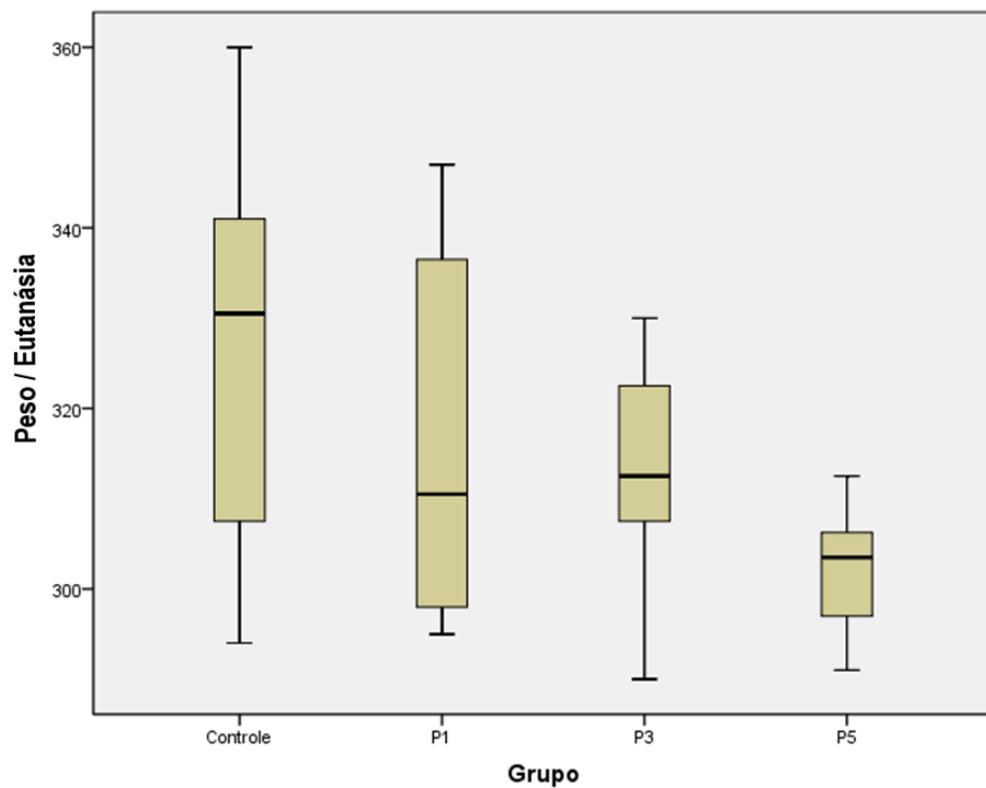
Gráfico 7 - Diagrama de caixa (*box-plot*): peso no dia da operaçãoGráfico 8 - Diagrama de caixa (*box-plot*): peso no dia da eutanásia

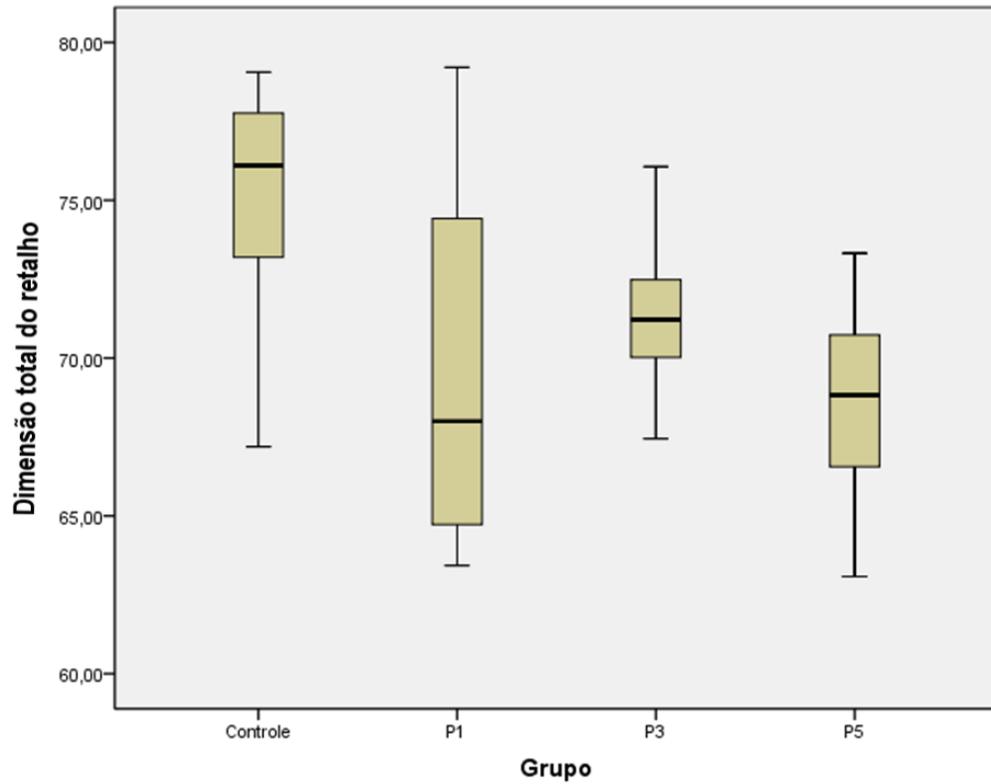
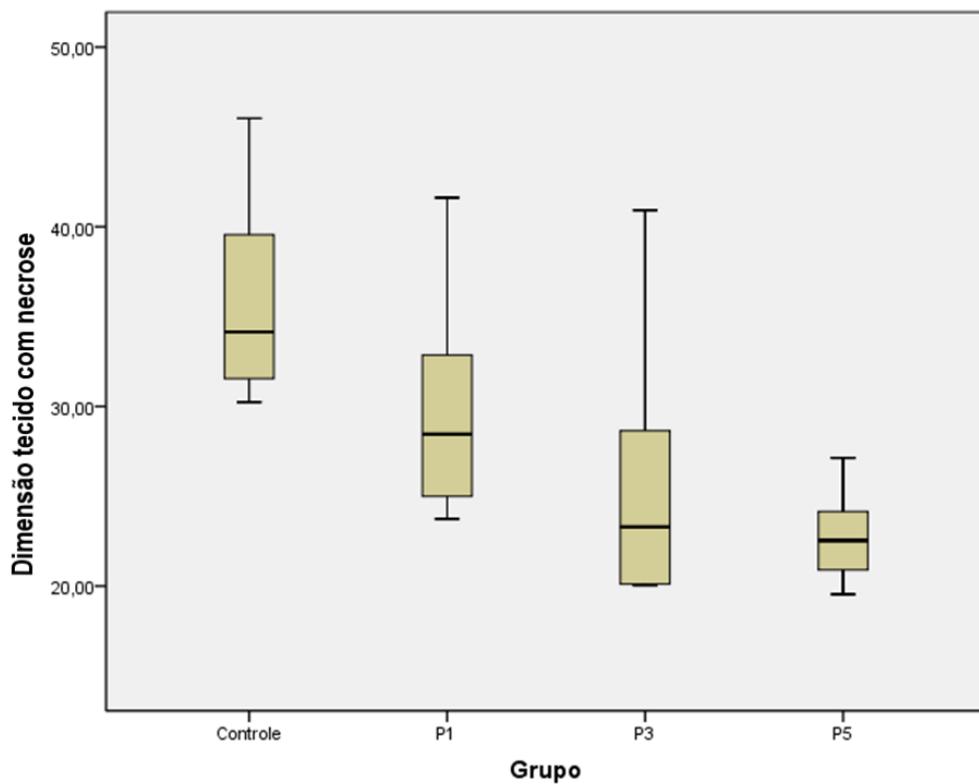
Gráfico 9 - Diagrama de caixa (*box-plot*): dimensão total do retalhoGráfico 10 - Diagrama de caixa (*box-plot*): dimensão do tecido com necrose

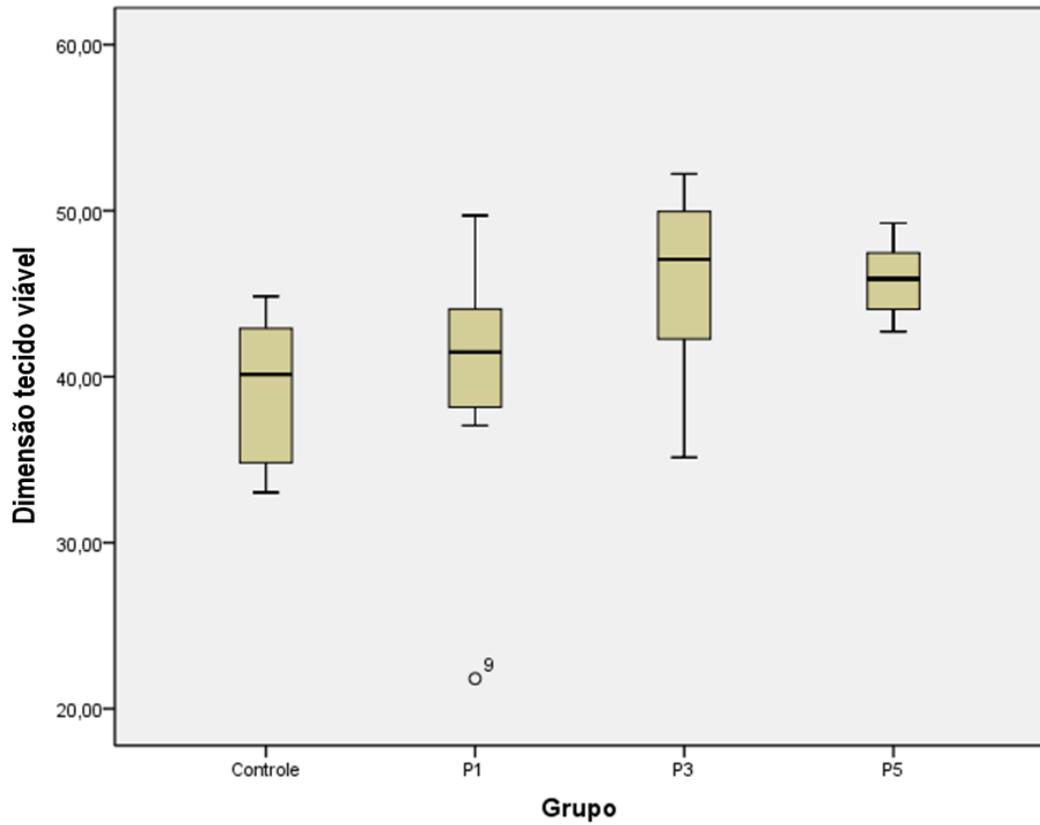
Gráfico 11 - Diagrama de caixa (*box-plot*): dimensão do tecido viável

Gráfico 12 - Representação gráfica das dimensões total do retalho, do tecido com necrose, do tecido viável

