

**SUMARA MARQUES BARRAL**

**O USO DO SILDENAFIL NA VIABILIDADE DE RETALHOS CUTÂNEOS EM  
RATAS.**

**Belo Horizonte**

**2010**

SUMARA MARQUES BARRAL

O USO DO SILDENAFIL NA VIABILIDADE DE RETALHOS CUTÂNEOS EM  
RATAS.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Medicina.

Orientador: Dra. Ivana Duval Araujo

Co-orientador: Dr. Paulo Roberto da Costa

Instituição: Faculdade de Medicina

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte (MG) – Brasil

Belo Horizonte

2010

Barral, Sumara Marques.  
B268u O uso de citrato de sildenafil na viabilidade de retalhos cutâneos em ratas [manuscrito]. / Sumara Marques Barral. - - Belo Horizonte: 2010. 93f.: il.

Orientadora: Ivana Duval Araújo.  
Co-Orientador: Paulo Roberto da Costa.  
Área de concentração: Ciências Aplicadas à Cirurgia e Oftalmologia.  
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Cicatrização de Feridas. 2. Inibidores de Fosfodiesterase/farmacologia. 3. Ratos. 4. Dissertações Acadêmicas. I. Araújo, Ivana Duval. II. Costa, Paulo Roberto da. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WO 185

## **UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS – UFMG**

### **REITORIA**

Reitor: Prof. Dr. Clélio Campolina Diniz

Vice-Reitora: Profa. Dra. Rocksane de Carvalho Norton

Pró-Reitor de Pós-Graduação: Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez

Pró-Reitor de Pesquisa: Prof. Dr. Renato de Lima Santos

### **FACULDADE DE MEDICINA**

Diretor da Faculdade de Medicina: Prof. Dr. Francisco José Penna

Vice-Diretor da Faculdade de Medicina: Prof. Dr. Tarcizo Afonso Nunes

Coordenador do Centro de Pós-Graduação: Prof. Dr. Manoel Otávio da Costa Rocha

Subcoordenadora do Centro de Pós-Graduação: Profa. Dra. Tereza Cristina de Abreu Ferrari.

### **DEPARTAMENTO DE CIRURGIA**

Chefe do Departamento de Cirurgia: Prof. Dr. Marcelo Eller Miranda

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia: Prof. Dr. Marcelo Dias Sanches

Subcoordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia: Profa. Dra. Ivana Duval Araujo

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

Prof. Dr. Edson Samesima Tatsuo

Prof. Dr. Marcelo Dias Sanches

Prof. Dr. Alcino Lázaro da Silva

Prof. Dr. Márcio Bittar Nehemy

Prof. Dr. Marco Aurélio Lana Peixoto

Prof. Dr. Tarcizo Afonso Nunes

Representante discente: Lívia Garcia Ferreira

Dissertação apresentada em sessão pública pela aluna Sumara Marques Barral, do Curso de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, para a comissão examinadora:

---

Professor Doutor Fabrício Carvalho Torres - Titular

---

Professor Doutor Tarcizo Afonso Nunes – Titular

---

Professor Doutor Cláudio Léo Gelape – Suplente

---

Professor Doutor Rafael Calvão Barbuto - Suplente

---

Professora Doutora Ivana Duval Araujo – Orientadora

---

Professor Doutor Paulo Roberto da Costa – Co-orientador

À minha mãe – prosopopéia da  
coragem, personificação da destemidez.

Ao meu pai – perseguição pela exatidão  
das congruências.

Ao meu irmão – irreverência  
contagante.

Ao meu esposo – companheirismo.

Ao tio Eduardo, Maria Célia e Raphael – afetuosa família.

À D. Ilva Duarte e à D. Neuza Marques –  
lapidárias de aptidões.

À memória do saudoso Prof. Dr. Sérgio Luiz  
Zouain Ferreira – descanse sob o olhar de Deus, mas não durma, pois sua vida foi  
sinônimo de determinação, norteadada por belos horizontes...

## AGRADECIMENTOS

Em especial, à minha orientadora, Profa. Dra. Ivana Duval Araujo, professora e amiga, cujo entusiasmo e cuja dedicação personificam o verdadeiro sentido da carreira docente e cujo espírito arguto representa a real alma do pensamento científico.

Ao acadêmico de Medicina Cláudio Alvarenga Campos Mayrink. Abdicou de finais de semana e feriados, esteve presente apesar da dor e do edema resultantes de uma contusão e soube pincelar descontração ao Laboratório de Cirurgia Experimental.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Paulo Roberto da Costa, um dos principais responsáveis pela minha formação em Cirurgia Plástica.

À Profa. Dra. Paula Vieira Teixeira Vidigal, pela dedicação e disponibilidade ao realizar o estudo histológico, sempre com uma simpatia contagiante.

À arquiteta Adriana Duval Araujo, quem realizou com paciência e interesse o cálculo das áreas de necrose, sofrimento e viabilidade dos retalhos, tornando possível a conclusão deste projeto.

À minha mãe, Maria de Fátima Marques Barral, quem participou de todas as etapas desse estudo: desde a elaboração do projeto, passando pela fase de experimentação no Laboratório de Cirurgia Experimental, até a sua apreciação pela Banca Examinadora.

Ao meu pai, Carlos Alberto Barral, que não poupou esforços para a realização desse projeto. A constante brincadeira de desenhar durante a infância se transforma agora em responsabilidade, ao representar graficamente os retalhos cutâneos.

Ao Lenio: presença diária, cumplicidade!

Ao Núcleo de Apoio de Bioestatística, especialmente à estimada Prof<sup>a</sup>. Dra. Emília Sakurai, coordenadora dessa grandiosa iniciativa da Faculdade de Medicina/ Universidade Federal de Minas Gerais, e à Administradora de Empresas, Mestranda do Programa de Saúde Coletiva e Monitora do Departamento de Estatística, Daniele Araújo Campos Szuster, quem acolheu meus questionamentos e magistralmente me auxiliou durante a etapa de análise dos resultados.

À Médica Veterinária Dra. Vanessa Mendonça Castro, pela amizade imediata. Anjo bom, que, no jargão literal, apareceu entre meus trajetos ao Laboratório!

Ao Prof. Dr. Rafael Calvão Barbuto, quem, juntamente com a Prof<sup>a</sup>. Dra. Ivana Duval Araujo, me apresentaram a lógica e o encantamento da Experimentação Animal, com sabedoria e dedicação.

Aos funcionários do Biotério da Faculdade de Medicina, difícil seria enumerar toda a solidariedade!

Ao Diretor da Faculdade de Medicina, Prof. Dr. Francisco José Penna e ao Vice-Diretor, Prof.Dr. Tarcizo Afonso Nunes. Ao incentivarem que esse estudo fosse realizado no Laboratório de Cirurgia Experimental, em função das reformas no Biotério da Faculdade de Medicina, viabilizaram a conclusão desse projeto.

À Capes, pelo apoio financeiro.

À Universidade Federal de Minas Gerais, casa de diversidade e saber.

"Todos nós temos um certo pudor em admitir, em falar sobre nossas próprias lutas. O ser que pensa e produz sabe que não produziu o suficiente. E julga que o que fez é uma parte do muito que poderá ainda fazer. A superação de nossa obra pelos que nos sucedem é o que define o progresso da humanidade. A grande alegria é se sentir um elo que prepara o próximo da corrente."

Ivo Pitanguy

## LISTA DE ABREVIATURAS :

a.C. - antes de Cristo

AM - Amazonas

CE - Ceará

CETEA - Comitê de Ética em Experimentação Animal

cm - centímetro

cm<sup>2</sup> - centímetro quadrado

D - derme

DF - Distrito Federal

GMPc - guanosina monofosfato cíclica

GC - guanil-ciclase

HE – Hematoxilina e Eosina

ICB - Instituto de Ciências Biológicas

IP - intraperitoneal

Kg - quilograma

mg - miligrama

MG - Minas Gerais

ml - mililitro

NO - óxido nítrico

P – panículo carnosos

PMN - polimorfonuclear

PMNs - polimorfonucleares

ppi - pixels por polegada

SD – subdérmico

SP - São Paulo

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

X- vezes

## LISTA DE TABELAS:

Tabela 01 – Medidas das áreas de viabilidade, de sofrimento e de necrose teciduais, no sétimo dia após a confecção de retalhos dorsais à McFarlane em ratos Wistar, que receberam sildenafil (grupo Estudo) ou solução salina (grupo Controle) pela via subdérmica. .... 28

Tabela 02 – Número absoluto de casos de granulação, granulação (Gr) associada à presença de necrose (Nc) ou granulação associada à presença de polimorfonucleares (PMNs) em biópsias coletadas no sétimo dia pós-operatório, dos terços proximal, médio e distal de retalhos à McFarlane após injeção de sildenafil (grupo Estudo – E) ou de solução salina (grupo Controle – C) pela via subdérmica. .... 30

Tabela 03 – Medidas das áreas de viabilidade, de sofrimento e de necrose teciduais, no sétimo dia após a confecção de retalhos dorsais à McFarlane em ratos Wistar, que receberam sildenafil (grupo Estudo) ou solução salina (grupo Controle) pela via intraperitoneal. .... 32

Tabela 04 – Número absoluto de casos de granulação, granulação (Gr) associada à presença de necrose (Nc) ou granulação associada à presença de polimorfonucleares (PMNs) em biópsias coletadas no sétimo dia pós-operatório, dos terços proximal, médio e distal de retalhos à McFarlane após injeção de sildenafil (grupo Estudo – E) ou de solução salina (grupo Controle – C) pela via intraperitoneal. .... 35

Tabela 05 – Medidas das áreas de viabilidade, de sofrimento e de necrose teciduais, no sétimo dia após a confecção de retalhos dorsais à McFarlane em ratos Wistar, que receberam sildenafil pela via subdérmica (grupo Estudo SD) ou pela via intraperitoneal (grupo Estudo IP). .....	38
Tabela 06 – Número absoluto de casos de granulação, granulação (Gr) associada à presença de necrose (Nc) ou granulação associada à presença de polimorfonucleares (PMNs) em biópsias coletadas no sétimo dia pós-operatório, dos terços proximal, médio e distal de retalhos à McFarlane após injeção de sildenafil pela via subdérmica (SD) ou pela via intraperitoneal (IP). .....	42

## LISTA DE GRÁFICOS E DE FIGURAS

### Gráficos:

- Gráfico 01 – Comparação das áreas de necrose (valores absolutos) entre os grupos Estudo SD e Controle SD ( $p=0,003$ ). ..... 27
- Gráfico 02 – Comparação das áreas finais dos retalhos dorsais entre os grupos Estudo SD e Controle SD. .... 29
- Gráfico 03 – Casos de granulação, granulação associada à necrose e granulação associada a polimorfonucleares, no terço distal de retalhos à McFarlane, em ratos que receberam (Estudo) ou não (Controle) sildenafil por via subdérmica,  $p=0,057$ . ..... 31
- Gráfico 04 – Comparação das áreas finais dos retalhos dorsais entre os grupos Estudo IP e Controle IP, ( $p=0,019$ ). ..... 33
- Gráfico 05 – Casos de granulação, granulação associada à necrose e granulação associada a polimorfonucleares, no terço médio de retalhos à McFarlane, em ratos que receberam (Estudo) ou não (Controle) sildenafil por via intraperitoneal,  $p=0,011$ . .... 35
- Gráfico 06 – Casos de granulação, granulação associada à necrose e granulação associada a polimorfonucleares, no terço distal de retalhos à McFarlane, em ratos que receberam (Estudo) ou não (Controle) sildenafil por via intraperitoneal,  $p=0,001$ . .... 36

Gráfico 07 – Comparação das áreas de necrose (valores absolutos) entre os grupos Estudo SD e Estudo IP (p=0,000). .....	37
Gráfico 08 – Comparação das áreas de viabilidade (valores absolutos) entre os grupos Estudo SD e Estudo IP (p=0,038). .....	38
Gráfico 09 – Comparação das áreas finais dos retalhos dorsais entre os grupos Estudo SD e Estudo IP. ....	39
Gráfico 10 – Comparação das áreas de necrose (valores percentuais) entre os grupos Estudo SD e Estudo IP (p=0,009). ....	40
Gráfico 11 – Comparação das áreas de viabilidade tecidual (valores percentuais) entre os grupos Estudo SD e Estudo IP (p=0,007). ....	41
Gráfico 12 – Casos de granulação, granulação associada à necrose e granulação associada a polimorfonucleares, na parte distal de retalhos à McFarlane, em ratos que receberam sildenafil pela via subdérmica (Estudo SD) ou pela via intraperitoneal (Estudo IP), p=0,057. ....	43

## **Figuras:**

- Figura 01 – Fotografia do animal em decúbito ventral, com as patas em extensão. Observar a marcação do retalho dorsal, baseado cefalicamente, tomando-se como referência o ponto médio entre os ângulos inferiores das escápulas. .... 11
- Figura 02 – Fotografia do retalho dorsal dissecado do seu leito, no plano do panículo carnoso. Animal em decúbito ventral com as patas dianteiras estendidas. .... 12
- Figura 03 – Fotografia de animal em decúbito ventral, sob sedação, evidenciando o molde confeccionado em acetato, com nove janelas (setas amarelas) para a aplicação do sildenafil ou da solução salina pela via subdérmica. .... 13
- Figura 04 – (I): Imagem digitalizada das lâminas de retroprojeter, representando com o sinal “+” as regiões de necrose, com sinal “-“ a região de isquemia e com o sinal “Ø” as regiões de viabilidade tecidual. (II): Imagem reproduzida do programa AutoCAD Release, na qual as áreas de cada retalho foram preenchidas por cores diferentes para representar as regiões de necrose (em azul), isquemia (em vermelho) e viabilidade (em verde). .... 17
- Figura 05 - Esquema gráfico representado o retalho dorsal do animal dividido em três regiões no sentido crânio-caudal e os três fragmentos de 0,5 X 0,5 cm localizados na extremidade de cada uma das regiões, margeando a borda direita do retalho. .... 18

Figura 06 – Fotomicrografia panorâmica de corte histológico de pele murina incluindo as camadas: epiderme (*), derme (D) e panículo carnosos (P). HE-25X. ....	20
Figura 07 – Fotomicrografia da área de granulação, evidenciando a presença de edema (**), vaso neoformado (A) e de infiltrado inflamatório (no detalhe) em fragmento de retalho dorsal de animal do grupo Controle SD. HE – 200X. ....	21
Figura 08 – Fotomicrografia de corte histológico de pele murina do grupo Controle IP evidenciando área de granulação (***) com a presença de edema e células inflamatórias esparsas. HE – 100X. No detalhe superior, presença de células polimorfonucleares. HE – 200X. No detalhe inferior, células polimorfonucleares em aumento de 400X. ....	22
Figura 09 – Fotomicrografia de corte histológico de pele murina do grupo Estudo IP evidenciando necrose superficial (Nc) associadamente à presença de células polimorfonucleares (PMN), área de granulação (G) com neoformação vascular (setas) e infiltrado inflamatório. HE – 50X. ....	23
Figura 10 – Fotomicrografia do corte histológico anterior em maior aumento, evidenciando de necrose superficial (Nc) com eosinofilia, associadamente à presença de células polimorfonucleares (PMN), área de granulação (**) com neoformação vascular e infiltrado inflamatório. HE – 100X. ....	24

Figura 11 – Líquido (seta) sobre o plano de dissecção do retalho dorsal de rata que recebeu o sildenafil pela via subdérmica. Sétimo dia pós-operatório. Animal em decúbito ventral, com as patas estendidas. .... 26

Figura 12 – Fotografia de uma rata do grupo Estudo SD em decúbito ventral. Região de necrose na porção distal do retalho (seta azul), região de isquemia na transição do terço médio para o proximal (seta amarela) e região de viabilidade tecidual na porção proximal do retalho (seta vermelha). .... 28

Figura 13 – Fotografia evidenciando o aspecto macroscópico de um dos retalhos do grupo Estudo IP no sétimo dia pós-operatório. Extensa região de viabilidade tecidual (seta vermelha) com necrose da porção distal do retalho (seta azul). .... 34

## ÍNDICE:

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	5
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	8
<b>3. MATERIAIS E MÉTODO</b> .....	9
3.1 Animais utilizados e cuidados dispensados .....	9
3.2 Método .....	9
3.2.1 - Delineamento experimental .....	10
3.2.2 - Confeção do retalho cutâneo dorsal .....	10
3.2.3 - Administração do sildenafil .....	12
3.2.4 - Administração da solução salina .....	14
3.2.5 - Eutanásia .....	14
3.2.6 - Documentação fotográfica .....	15
3.2.7 - Representação gráfica .....	15
3.2.8 - Análise macroscópica e cálculo das áreas .....	16
3.2.9 - Coleta das amostras .....	18
3.2.10 - Avaliação microscópica morfológica .....	19
3.2.11 - Estudo estatístico .....	25

<b>4. RESULTADOS</b> .....	26
4.1- Avaliação do uso do sildenafil subdérmico .....	26
4.1.1- Avaliação macroscópica .....	27
4.1.2 - Avaliação histológica .....	30
4.2- Avaliação do uso do sildenafil intraperitoneal .....	31
4.2.1- Avaliação macroscópica .....	32
4.2.2 - Avaliação histológica .....	34
4.3- Comparação entre as vias de administração do sildenafil .....	36
4.3.1- Avaliação macroscópica .....	36
4.3.2 - Avaliação histológica .....	42
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	44
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	55
<b>7. PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	56
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	57
<b>9. ANEXO</b> .....	65
9.1 - Revisão da literatura .....	65
9.1.1 - Mecanismos envolvidos no reparo tecidual .....	65
9.1.2 - Mediadores intervenientes no reparo .....	68
9.1.3 - Cobertura tecidual de feridas – um desafio histórico .....	70
9.1.4 - Sildenafil – recurso ancilar para a cicatrização de feridas? .....	7

## RESUMO

**Introdução:** O sildenafil pertence a uma classe relativamente nova de medicamentos, cujo mecanismo de ação ocorre por inibição da fosfodiesterase-5, que é responsável pela degradação intracelular da guanosina monofosfato cíclica (GMPc). A GMPc promove vasodilatação, alteração no perfil de granulação plaquetária e angiogênese. Nesse contexto, seus efeitos vasoativos podem aumentar o fluxo sanguíneo de retalhos, melhorando a sua viabilidade. **Objetivo:** 1- Avaliar a viabilidade dos retalhos cutâneos dorsais em ratas, após o uso do sildenafil pelas vias subdérmica ou intraperitoneal. 2- Comparar as duas vias de administração do sildenafil. **Método:** Quarenta ratas Wistar foram submetidas à confecção de retalhos cutâneos dorsais com base cefálica e distribuídas em quatro grupos: Estudo Subdérmico (aplicação de sildenafil subdérmico), Controle Subdérmico (aplicação da solução salina 0,9% subdérmica), Estudo Intraperitoneal (aplicação de sildenafil intraperitoneal), Controle Intraperitoneal (aplicação da solução salina 0,9% intraperitoneal). Sete dias após a intervenção cirúrgica, os retalhos foram fotografados e representados graficamente, para serem analisados com o programa de informática AutoCAD. Três fragmentos de cada retalho foram coletados para estudo histológico. **Resultados:** Por meio da análise macroscópica, observou-se que os animais do grupo Estudo Subdérmico apresentaram maiores áreas de necrose ( $p=0,003$ ) nos retalhos cutâneos dorsais. Além disso, a análise histológica do terço distal desses retalhos evidenciou pior formação de tecido de granulação. À análise macroscópica, o uso do sildenafil pela via intraperitoneal esteve associado a uma maior contração tecidual ( $p=0,019$ ). O estudo histológico evidenciou menor formação de granulação associada a polimorfonucleares no terço distal dos retalhos ( $p=0,001$ ) e mais necrose interpondo os locais de granulação no terço médio

dos retalhos ( $p=0,011$ ), no grupo Estudo Intraperitoneal. **Conclusão:** O sildenafil, pelas duas vias de administração, não esteve associado a um aumento da viabilidade dos retalhos cutâneos de ratas. Comparando-se as duas vias de administração, o sildenafil subdérmico esteve associado a uma pior viabilidade dos retalhos e a uma menor contração tecidual.

**Descritores:** Cicatrização de Feridas, Inibidores de fosfodiesterase, Ratos

## **ABSTRACT:**

**Introduction:** Sildenafil citrate belongs to a relatively new class of drugs which mechanism of action occurs by the inhibition of phosphodiesterase-5 that is responsible for the degradation of intracellular cyclic guanosine monophosphate (cGMP). The cGMP promotes vasodilatation, alteration on platelet degranulation and angiogenesis. In this context, its vasoactive effects may increase the flaps blood flow, improving their viability. **Purposes:** 1- To evaluate the viability of the dorsal cutaneous flaps in female rats, using sildenafil, by the pathway subdermic or intraperitoneal. 2- To compare these pathways. **Methods:** Forty females rats Wistar were submitted to a confection of cranially based dorsal cutaneous flaps and arranged into four groups: Subdermic study group (application of sildenafil subdermic), Subdermic control group (application of saline solution 0,09% subdermic), Intraperitoneal study group (application of sildenafil intraperitoneal), Intraperitoneal control group (application of saline solution 0,09% intraperitoneal). Seven days after the surgery, the flaps were photographed and graphically represented, in order to be analyzed with AutoCad software. Three samples of each flap were collected for histological analyses. **Results:** By the macroscopic analyses, the animals belonging to the group Subdermic study group presented larger areas of necrosis ( $p=0,003$ ) of the dorsal flaps. Also, the histological analyses of the distal third of these flaps showed poor formation of granulation tissue. By the macroscopic analyses, its use intraperitoneal was associated to a better tissue contraction ( $p=0,019$ ), although there was less presence of granulation tissue with polymorphonuclears into the distal third of the flaps ( $p=0,001$ ) and more necrosis interposing the areas of granulation into the middle third of the flaps ( $p=0,001$ ), in the

Intraperitoneal study group. **Conclusion:** The sildenafil citrate, applied by the two routes of administration, was related to a poor viability of the dorsal cutaneous flaps of female rats. Comparing the two pathways of administration, the sildenafil subdermic was associated to poor flap viability and worse tissue contraction.

**Keywords:** Wound healing, Phosphodiesterase Inhibitors, Rats

## 1- INTRODUÇÃO:

A confecção de retalhos para o tratamento de perdas teciduais constitui um dos procedimentos cirúrgicos de maior relevância na história da Cirurgia Plástica, com referências nas descrições de Sushruta (600 a.C.), nos estudos de Celsus durante o Classicismo Grego-Romano e no legado deixado por Gaspare Tagliacozzi (1545-1599)<sup>1</sup>. É compreensível que esse procedimento tenha modificado o desenvolvimento técnico e científico da Cirurgia Plástica de uma maneira incontestável, uma vez que a necessidade de se criar estratégias para prover cobertura de feridas está historicamente atrelada à antropogênese. Nesse contexto, as primeiras perdas teciduais decorrentes de traumas diversos suscitaram o seu cuidado. A partir daí, o estabelecimento de novas estratégias para garantir maior viabilidade de retalhos impulsiona pesquisas que objetivam não somente a redução dos efeitos deletérios, mas a amplificação dos mediadores que atuam positivamente para a cicatrização de feridas.

Conceitualmente, um retalho cutâneo se difere de um enxerto por apresentar aporte sangüíneo intrínseco. O enxerto de pele normalmente deve ser posicionado sobre um leito vascular adequado, capaz de lhe prover nutrientes por meio de embebição plasmática, até que uma nova rede vascular seja estabelecida<sup>2,3</sup>.

Os retalhos cutâneos, de uma maneira mais ampla, podem ser classificados como axiais ou randômicos. Os retalhos axiais são confeccionados tomando-se como referência, uma ou mais artérias nutridorais específicas. Os retalhos randômicos, porém, são baseados em um plexo vascular subdérmico ou subfascial, apresentando uma conseqüente limitação nas suas dimensões, cuja relação do comprimento dividido pela base deve variar entre dois a um e meio, por um<sup>3</sup>. Uma vez que a perfusão

microcirculatória é dependente da proximidade dos vasos nutridores, os retalhos axiais são muito mais viáveis que os randômicos <sup>4</sup>.

Além de estar relacionada com o aporte vascular, a viabilidade dos retalhos cutâneos depende de vários fatores, dentre os quais se destacam a ausência de congestão venosa e de hematoma, a pressão de perfusão adequada e o respeito aos princípios cirúrgicos <sup>5</sup>. A presença de edema, de trombose ou de vasoespasmos, bem como a liberação de radicais livres pode, durante as diferentes fases da cicatrização, resultar em isquemia e até necrose, particularmente nas porções distais <sup>4</sup>. Associado a essas características, o formato e as dimensões dos retalhos também estão relacionados à viabilidade, principalmente no que diz respeito aos retalhos randômicos, que são comumente utilizados nas cirurgias reconstrutoras <sup>3</sup>.

Historicamente, os esforços para se maximizar a viabilidade de retalhos cutâneos baseiam-se no controle de fatores reversíveis, que incluem o tabagismo, o estado nutricional do paciente, a hemostasia adequada, a preservação da rede anastomótica, dentre outros princípios técnicos <sup>6, 7</sup>. Entretanto, não foi encontrado na literatura nenhum tratamento para o retalho com baixo fluxo de perfusão, que seja bem estabelecido, unanimemente aprovado e amplamente aceito.

Alguns recursos terapêuticos auxiliares foram propostos, na tentativa de se melhorar a sobrevida dos retalhos, tais como a autonomização <sup>3, 4, 8</sup>, o uso intramuscular de ketoralato <sup>9</sup>, de corticoesteróides e de carnitina <sup>10</sup>, da oxigenoterapia hiperbárica <sup>11-14</sup>, da pentoxifilina <sup>15, 16</sup>, do buflomedil <sup>16-18</sup> e até mesmo do sildenafil isoladamente, associado ao fator de crescimento vascular do endotélio, ou à cola de fibrina <sup>19-23</sup>. Contudo, evidências clínicas têm sugerido que a resposta a esses tratamentos sistêmicos pode estar associada a efeitos colaterais, dentre os quais se destacam hipotensão,

amnésia, angina, distúrbios visuais, migrânea, alterações auditivas e até mesmo acidentes vasculares<sup>24</sup>.

Inibidores da fosfodiesterase, como o sildenafil, pertencem a uma classe relativamente nova de medicamentos, cujas aplicações clínicas ainda não foram completamente exploradas pela literatura. Em linhas gerais, o sildenafil é um composto aromático solúvel em água. Seu mecanismo de ação ocorre pela inibição da fosfodiesterase tipo 5, estimulando a vasodilatação mediada pela via óxido nítrico (NO)/guanil-ciclase (GC)/ guanosina monofostato cíclico (GMPc). O óxido nítrico induz vasodilatação, inibe a agregação plaquetária e promove angiogênese<sup>24-27</sup>.

De fato, estudos a respeito do aumento da síntese de óxido nítrico em feridas sugerem que os efeitos vasoativos do sildenafil poderiam aumentar o fluxo sanguíneo de retalhos, melhorando a sua sobrevida<sup>28, 29</sup>. Ademais, uma vez que as plaquetas apresentam receptores para a fosfodiesterase tipo 5, esse medicamento poderia atuar sobre o seu perfil de ativação, acelerando a cicatrização<sup>24-26</sup>. Nesse contexto, seria correto se supor que o sildenafil poderia ser utilizado com o intuito de melhorar a sobrevida de retalhos cutâneos randômicos, quando utilizado por via sistêmica e mesmo tópica, de modo a atenuar seus efeitos colaterais.

## **2- OBJETIVOS:**

1- Avaliar macro e microscopicamente a viabilidade de retalhos cutâneos de ratas<sup>30-32</sup>, após a utilização do sildenafil pela via subdérmica ou pela via intraperitoneal.

3- Comparar as duas vias de administração do sildenafil (subdérmica e intraperitoneal).

### **3- MATERIAIS E MÉTODO:**

#### 3.1- Animais utilizados e cuidados dispensados:

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) - Protocolo 094/09.

Foram utilizados 40 ratos Wistar fêmeas, adultas, pesando entre 215g a 255g, fornecidas pelo Biotério do Instituto de Ciência Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Todos os animais passaram por um período de observação de 15 dias, sob temperatura, umidade e ciclo de luz ambientes controlados.

#### 3.2- Método:

À admissão no Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina da UFMG, os animais foram avaliados clinicamente, pesados, distribuídos aleatoriamente em quatro grupos e mantidos em gaiolas coletivas para cinco animais. A dieta oferecida foi ração comercial padrão para ratos (Labina, Purina, Contagem, MG) e água *ad libitum*.

### 3.2.1- Delineamento experimental:

Confecção do retalho cutâneo dorsal e aplicação do sildenafil ou da solução salina, de acordo com os grupos aos quais pertenciam os animais.

Grupo Estudo Intraperitoneal (IP) (n=10): aplicação de sildenafil intraperitoneal.

Grupo Estudo Subdérmico (SD) (n=10): aplicação de sildenafil subdérmico.

Grupo Controle Intraperitoneal (IP) (n=10): aplicação intraperitoneal de solução salina a 0,9%.

Grupo Controle Subdérmico (SD) (n=10): aplicação subdérmica de solução salina a 0,9%.

Os animais que morreram durante a pesquisa foram repostos nos respectivos grupos.

### 3.2.2- Confecção do retalho cutâneo dorsal:

Os animais foram anestesiados com a solução de 80mg/Kg de quetamina (Ketamina Agener 10%, Agener União, Embu-Guaçu, SP) associada à 8mg/Kg de xilazina, (Xilasina 2%, Calmium, Agener União, Embu-Guaçu, SP) pela via intraperitoneal. Após antissepsia com digluconato de clorexidina 2,0% (Handex Degermante, Laboratório Farmacêutico Ltda, Brasília, DF) e álcool etílico a 70% (Miyako do Brasil Ind. Com. Ltda, Guarulhos, SP), foram confeccionados retalhos cutâneos dorsais retangulares de três por sete centímetros (21 cm<sup>2</sup>), com base tangencial aos ângulos inferiores das escápulas e cujo ponto médio coincidia com uma linha imaginária interescapular equidistante do rebordo ósseo, tomando como referência um molde confeccionado com filme de acetato (Figura 01). O retalho foi dissecado do

panículo carnoso e reposicionado no leito com sutura contínua do tipo chuleio, em náilon monofilamentar 4,0 (Figura 02). O procedimento foi realizado utilizando-se técnica asséptica, com imersão do instrumental em glutaraldeído (Glutaron II, Rioquímica, São José do Rio Preto, SP) durante trinta minutos.

Ao término da operação, administrou-se acetaminofenol em solução oral (Tylenol, Jonshon&Jonshon, São José dos Campos, SP) na dose de 2 mg/ml na água do bebedouro, durante 48 horas<sup>33</sup>.



Figura 01 – Fotografia do animal em decúbito ventral, com as patas em extensão. Observar a marcação do retalho dorsal, baseado cefalicamente, tomando-se como referência o ponto médio entre os ângulos inferiores das escápulas.



Figura 02 – Fotografia do retalho dorsal dissecado do seu leito, no plano do panículo carnoso. Animal em decúbito ventral com as patas dianteiras estendidas.

### 3.2.3- Administração do sildenafil:

Os animais do grupo Estudo SD receberam sildenafil em solução aquosa (FarmaVet, Belo Horizonte, MG), administrado por via subdérmica (dose de 0,5 mg/Kg), com agulha de 8 mm de comprimento e 0,3 mm de calibre (Injex Indústrias Cirúrgicas, Ourinhos, SP), uma vez ao dia. A primeira dose foi administrada imediatamente ao término da operação e a segunda, 48 horas após. O volume total da substância foi fracionado e administrado em nove pontos diferentes do retalho, seguindo uma demarcação previamente estabelecida a partir de um molde confeccionado com acetato, posicionado sobre o dorso do animal (Figura 03). Para administração do fármaco, os animais foram sedados com solução de quetamina na dose de 40 mg/Kg

(Ketamina Agener 10%, Agener União, Embu-Guaçu, SP), associada xilazina na dose de 04 mg/Kg (Xilasina 2%, Calmium, Agener União, Embu-Guaçu, SP), através da via intraperitoneal.

Os animais do grupo Estudo IP também foram sedados e receberam o sildenafil em solução aquosa, na mesma posologia, porém, utilizando-se a via intraperitoneal, por meio de uma única punção.

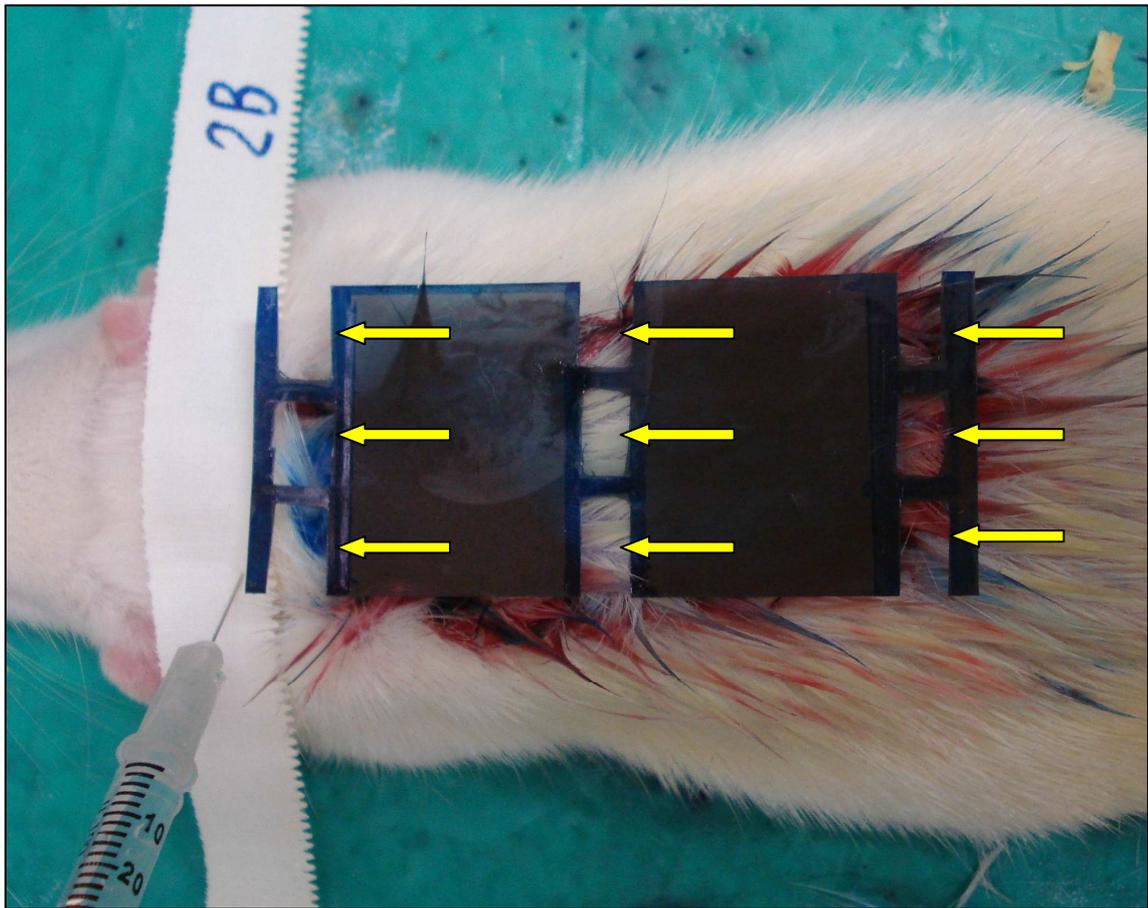


Figura 03 – Fotografia de animal em decúbito ventral, sob sedação, evidenciando o molde confeccionado em acetato, com nove janelas (setas amarelas) para a aplicação do sildenafil ou da solução salina pela via subdérmica.

### 3.2.4- Administração da solução salina:

A solução salina a 0,9% (Isofarma Industrial Farmacêutica, Fortaleza, CE) foi administrada nos animais do grupo Controle SD por via subdérmica, no volume de 5ml/Kg, uma vez ao dia. A primeira dose foi administrada imediatamente ao término da operação e a segunda, 48 horas após. Todos os animais foram previamente sedados com a solução de quetamina (Ketamina Agener 10%, Agener União, Embu-Guaçu, SP) na dose de 40 mg/Kg, associada à 4mg/Kg de xilazina (Xilasina 2%, Calmium, Agener União, Embu-Guaçu, SP). O volume total da substância foi fracionado e administrado em nove pontos do retalho diferentes, de acordo com demarcação previamente estabelecida, posicionando-se um molde confeccionado com acetato sobre o dorso do animal (Figura 03).

Os animais do grupo Controle IP receberam a mesma solução, respeitando-se a posologia e o tempo de administração, bem como a sedação prévia. Entretanto, a via utilizada nesse grupo foi intraperitoneal, por meio de uma única punção.

### 3.2.5- Eutanásia:

No sétimo dia de observação, os animais foram submetidos à eutanásia, por sobredose anestésica de pentobarbital sódico na dose de 150mg/Kg, administrado pela via intraperitoneal (Thiopentax, Cristália, Itapira, SP), seguindo as recomendações do Comitê de Ética em Experimentação Animal - CETEA/UFMG<sup>34</sup>.

### 3.2.6- Documentação fotográfica:

Os animais foram colocados individualmente em decúbito ventral sobre um suporte de isopor revestido de plástico verde. Foi utilizada câmera digital com resolução de 7,2 Mega Pixels (*Cyber-shot* DSC-W35, Sony Brasil Ltda, Manaus, AM) posicionada por meio de tripé sobre cada animal, a uma distância de 17 cm do suporte. A câmera foi posicionada de maneira a capturar as imagens dos animais a partir do tronco, excluindo-se o segmento cefálico. O modo de ajuste automático sem iluminador foi utilizado associadamente com a função Macro em todos os animais.

### 3.2.7 – Representação gráfica:

Os retalhos foram representados graficamente, utilizando-se lâminas transparentes de acetato transparentes e caneta marcadora permanente (Figura 04). Os desenhos foram feitos por avaliador que desconhecia a que grupo pertencia cada animal. Os critérios para a classificação foram baseados na inspeção e na palpação. Os retalhos foram delimitados de acordo com as suas características em:

1- Região de necrose: identificada com o sinal “+”. Caracterizada por coloração que variou entre tons de marrom e preto e por consistência cadavérica à palpação.

2- Região de isquemia: identificada com o sinal “-”, que apresentava cor violácea e com maleabilidade palpatória.

3- Região de viabilidade tecidual : identificada com o sinal “Ø”, com coloração e textura habituais de pele murina.

### 3.2.8- Análise macroscópica e cálculo das áreas:

As figuras foram colocadas sobre papel milimetrado e digitalizadas (Multifuncional Hewlett-Packard Brasil, Deskjet F4180, São Paulo, SP), com a resolução de 600 ppi. O documento digital foi trabalhado no programa AutoCAD Release (Versão 13.1, 1995) de maneira a se plotar os perímetros de cada região do retalho (necrose, isquemia e viabilidade tecidual) com cores diferentes e, a partir daí, se calcular as respectivas áreas, com até quatro casas decimais de aproximação (Figura 04). Foram calculados os valores das áreas de necrose, de isquemia e de pele viável. Os valores absolutos das áreas referem-se aqueles calculados em centímetros quadrados com o programa AutoCAD. Os valores percentuais significam a porcentagem que cada um das áreas de necrose, de isquemia e de viabilidade tecidual representam em relação ao tamanho final do retalho.

Essa etapa do estudo foi conduzida por pesquisador que desconhecia a que grupo pertenciam as representações gráficas dos retalhos cutâneos.

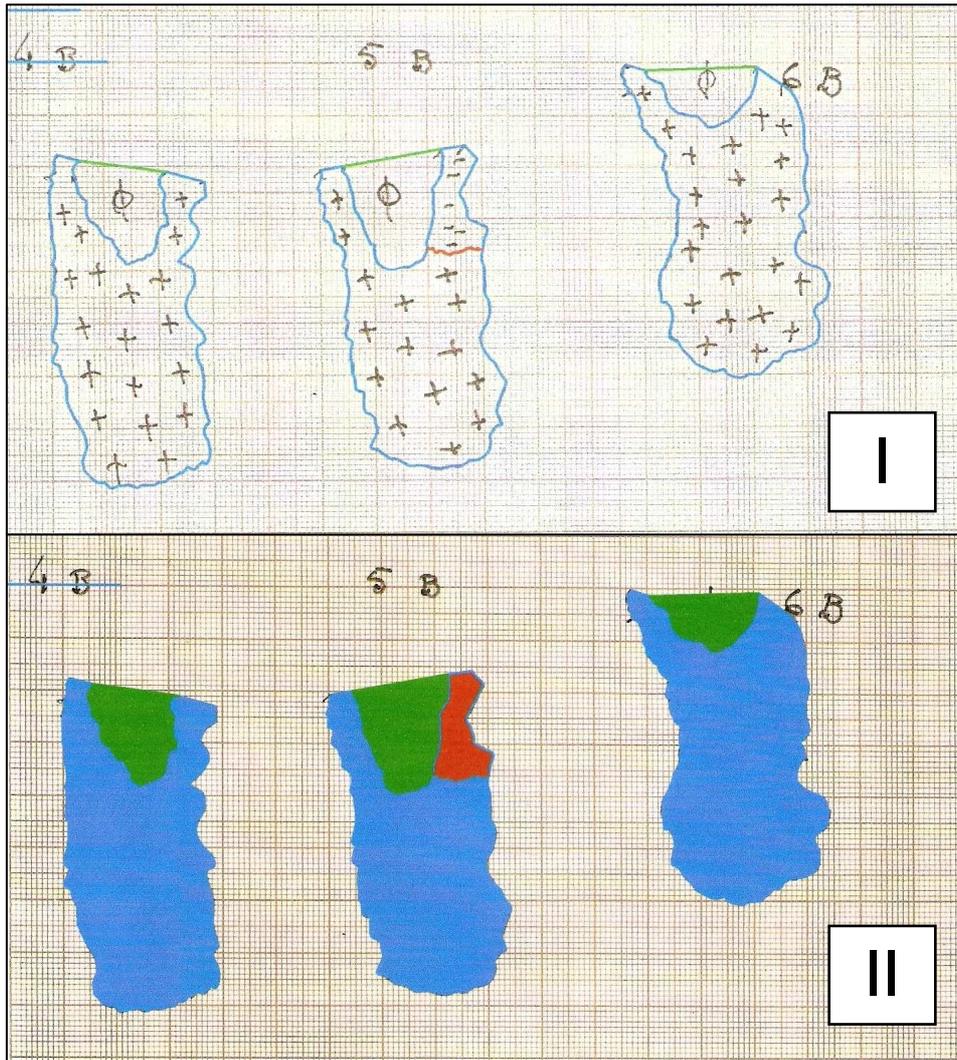


Figura 04 – (I): Imagem digitalizada das lâminas de acetato transparentes, representando com o sinal “+” as regiões de necrose, com sinal “-“ a região de isquemia e com o sinal “∅” as regiões de viabilidade tecidual. (II): Imagem reproduzida do programa AutoCAD Release, na qual as áreas de cada retalho foram preenchidas por cores diferentes para representar as regiões de necrose (em azul), isquemia (em vermelho) e viabilidade tecidual (em verde).

### 3.2.9 - Coleta das amostras:

Foram traçadas linhas imaginárias dividindo o retalho simetricamente em três partes no sentido crânio-caudal e em metade direita e esquerda. Na extremidade caudal de cada uma das regiões delimitadas foi coletada uma amostra de 0,5 cm X 0,5 cm, margeando a borda medial da metade direita do retalho (Figura 05).

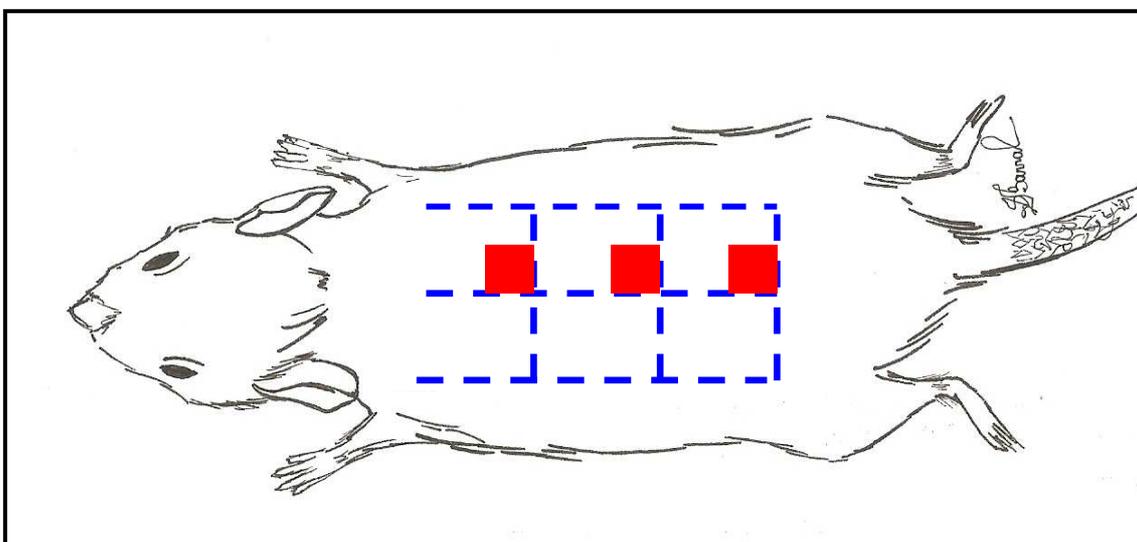


Figura 05- Esquema gráfico representado o retalho dorsal do animal dividido em três regiões no sentido crânio-caudal e os três fragmentos de 0,5 X 0,5 cm localizados na extremidade de cada uma das regiões, margeando a borda direita do retalho.

As amostras de tecido foram embebidas em formol tamponado neutro a 10% (Amphora, Belo Horizonte, MG), submetidas a desidratação com álcool, diafanização em xilol e inclusão em parafina. Os blocos de parafina foram cortados em micrótomos com espessura variando de 4 a 6 micrômetros e as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina.

### 3.2.10 - Avaliação microscópica morfológica (Figuras 06 a 10):

As lâminas foram estudadas por um médico patologista que desconhecia a que grupo pertencia a amostra, e descritas de acordo com os seguintes critérios:

- I) tecido de granulação;
- II) necrose tecidual;
- III) presença de polimorfonucleares (PMNs);
- IV) associação de tecido de granulação e de necrose tecidual;
- V) associação de tecido de granulação, necrose tecidual e polimorfonucleares (PMNs);
- VI) associação de tecido de granulação e de polimorfonucleares (PMNs);
- VII) associação de tecido de necrose tecidual e de polimorfonucleares (PMNs).

Os critérios histológicos foram transformados em variáveis categóricas e analisados em relação à ocorrência de granulação isoladamente, granulação associada a PMNs ou granulação associada à necrose, respectivamente para o terço proximal, médio e distal do retalho (n=10 para cada grupo).

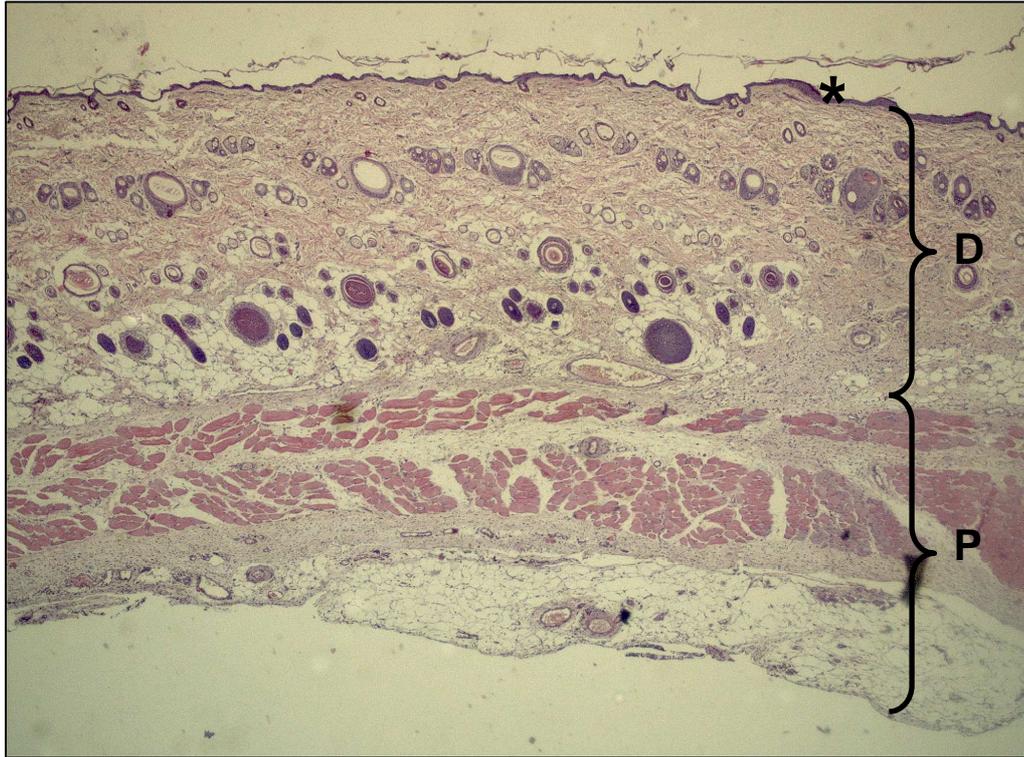


Figura 06 – Fotomicrografia panorâmica de corte histológico de pele murina incluindo as camadas: epiderme (\*), derme (D) e panículo carnoso (P). HE-25X.



Figura 07 – Fotomicrografia da área de granulação, evidenciando a presença de edema (\*\*), vaso neoformado (A) e de infiltrado inflamatório (no detalhe) em fragmento de retalho dorsal de animal do grupo Controle SD. HE – 200X.

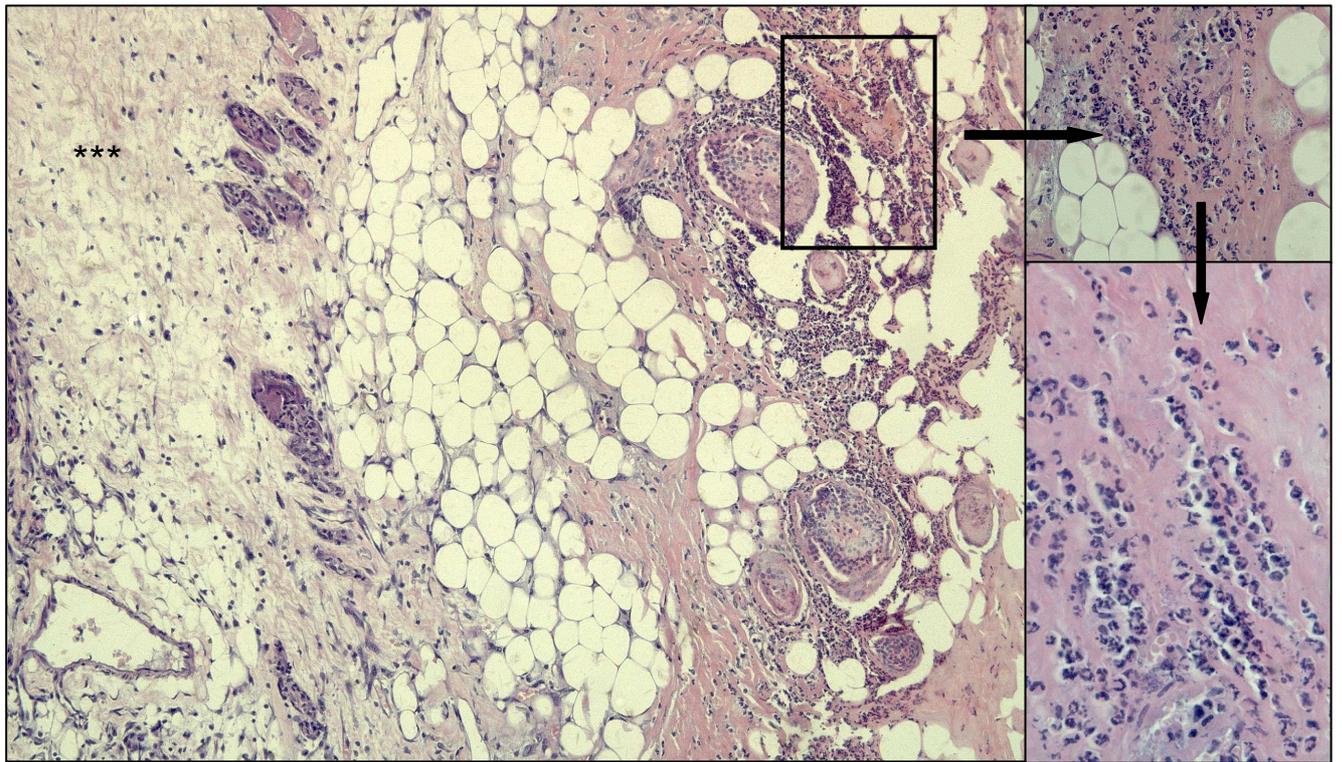


Figura 08 – Fotomicrografia de corte histológico de pele murina do grupo Controle IP evidenciando área de granulação (\*\*\*) com a presença de edema e células inflamatórias esparsas. HE – 100X. No detalhe superior, presença de células polimorfonucleares. HE – 200X. No detalhe inferior, células polimorfonucleares em aumento de 400X.

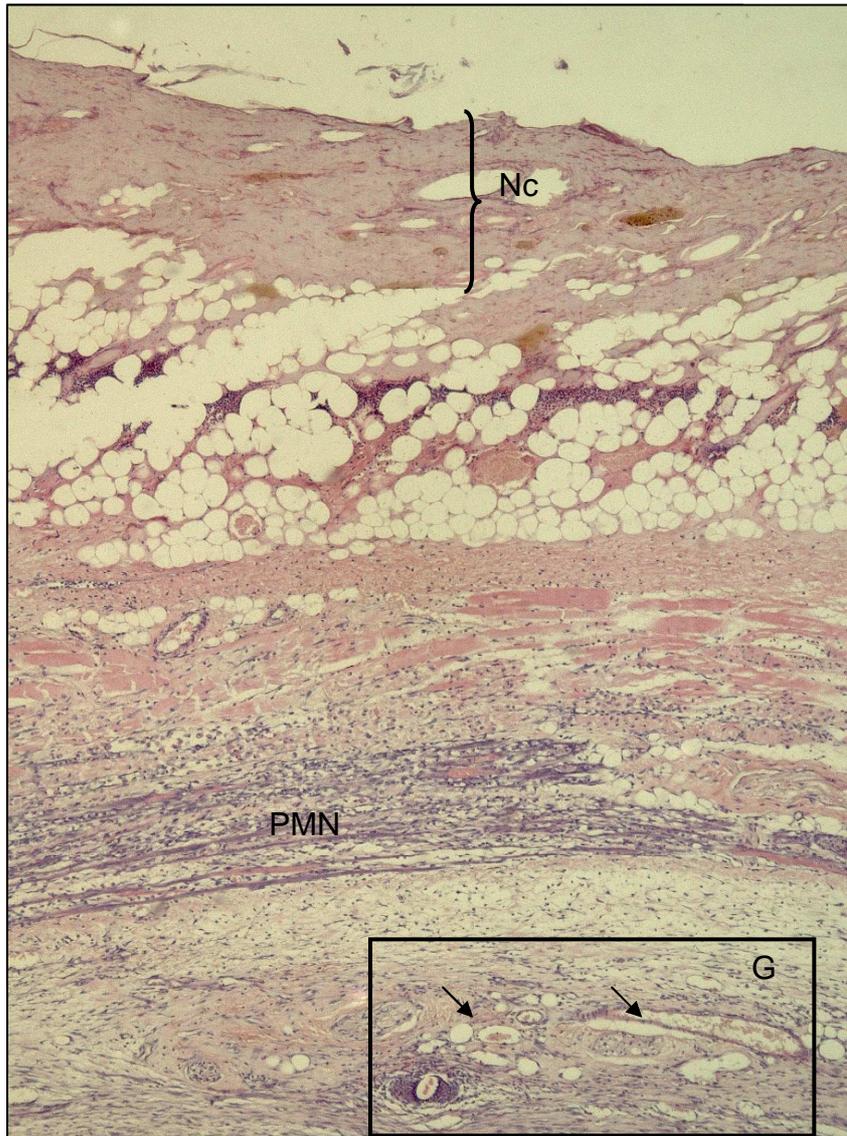


Figura 09 – Fotomicrografia de corte histológico de pele murina do grupo Estudo IP evidenciando necrose superficial (Nc) associadamente à presença de células polimorfonucleares (PMN), área de granulação (Gr) com neoformação vascular (setas) e infiltrado inflamatório. HE – 50X.

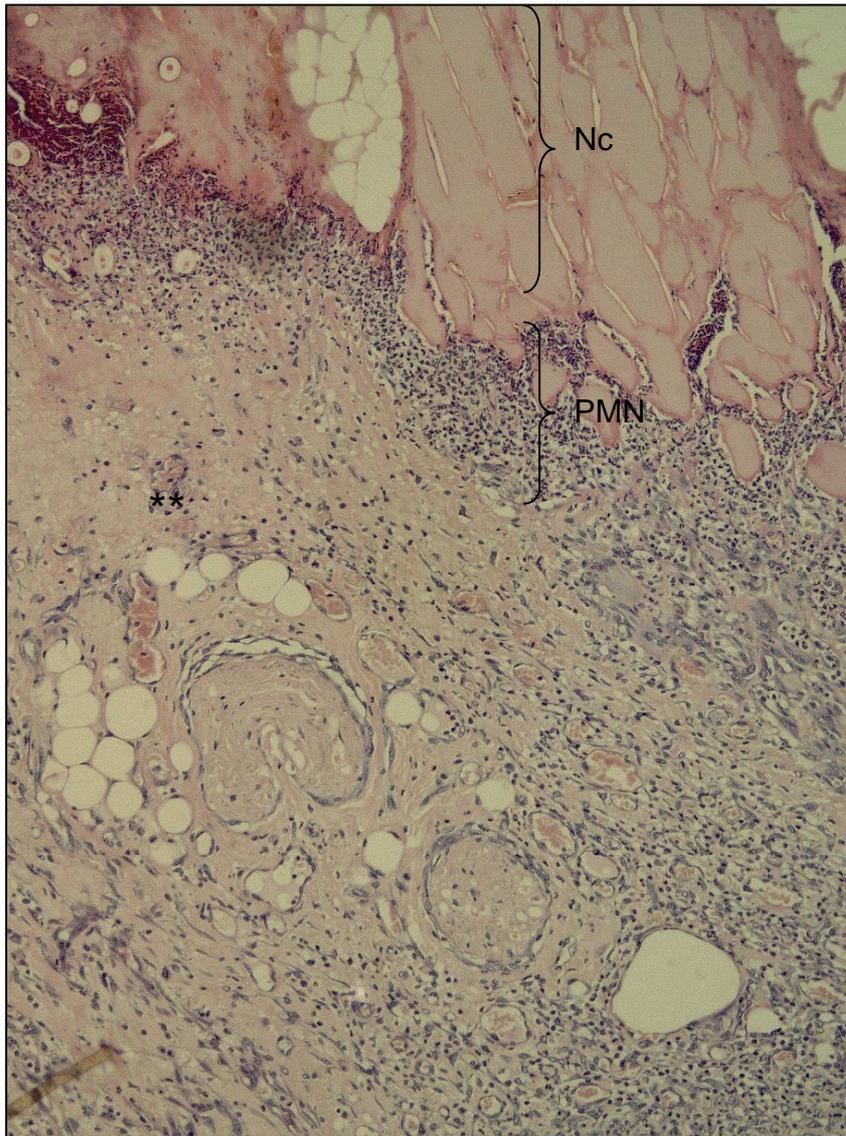


Figura 10 – Fotomicrografia do corte histológico anterior em maior aumento, evidenciando de necrose superficial (Nc) com eosinofilia, associadamente à presença de células polimorfonucleares (PMN), área de granulação (\*\*), com neoformação vascular e infiltrado inflamatório. HE – 100X.

### 3.2.11 - Estudo estatístico:

Essa etapa do estudo foi realizada em conjunto com o Núcleo de Apoio de Bioestatística da Faculdade de Medicina/ Universidade Federal de Minas Gerais. A análise estatística foi feita com o programa de informática SPSS versão 13.0.

Para a comparação dos dados da avaliação macroscópica, o Teste de Mann-Whitney e a Soma dos postos de Wilcoxon foram utilizados, considerando-se como significativos os valores em módulo de Z maiores que 1,96; isto é, ignorando-se os sinais negativos. Valores da Significância Exata Bilateral menores que 0,05 ( $p < 0,05$ ) indicaram que as médias dos grupos comparados foram significativamente diferentes <sup>35, 36</sup>.

Os dados obtidos a partir da avaliação histológica foram analisados pelo Teste Exato de Fisher ou pelo Teste Qui-quadrado de Pearson, conforme o número de células com valor esperado menor do que cinco <sup>35, 36</sup>. Considerou-se significativo o valor de  $p < 0,05$ .

#### 4- RESULTADOS:

##### 4.1- Avaliação do uso do sildenafil subdérmico:

Imediatamente após uso do sildenafil subdérmico, houve morte de três animais. Em dois animais desse mesmo grupo observou-se a presença de líquido livre entre o retalho e o plano muscular, como observado na figura 11.



Figura 11 – Líquido (seta) sobre o plano de dissecção do retalho dorsal de rata que recebeu o sildenafil pela via subdérmica. Sétimo dia pós-operatório. Animal em decúbito ventral, com as patas estendidas.

#### 4.1.1- Avaliação macroscópica (Figura 12):

Em valores absolutos, as áreas de necrose no grupo Estudo SD foram significativamente maiores do que aquelas observadas no grupo Controle SD ( $p=0,003$ ), como pode ser observado no gráfico 1. As médias e as medianas das áreas de necrose, de isquemia e de viabilidade tecidual podem ser analisadas na tabela 1.

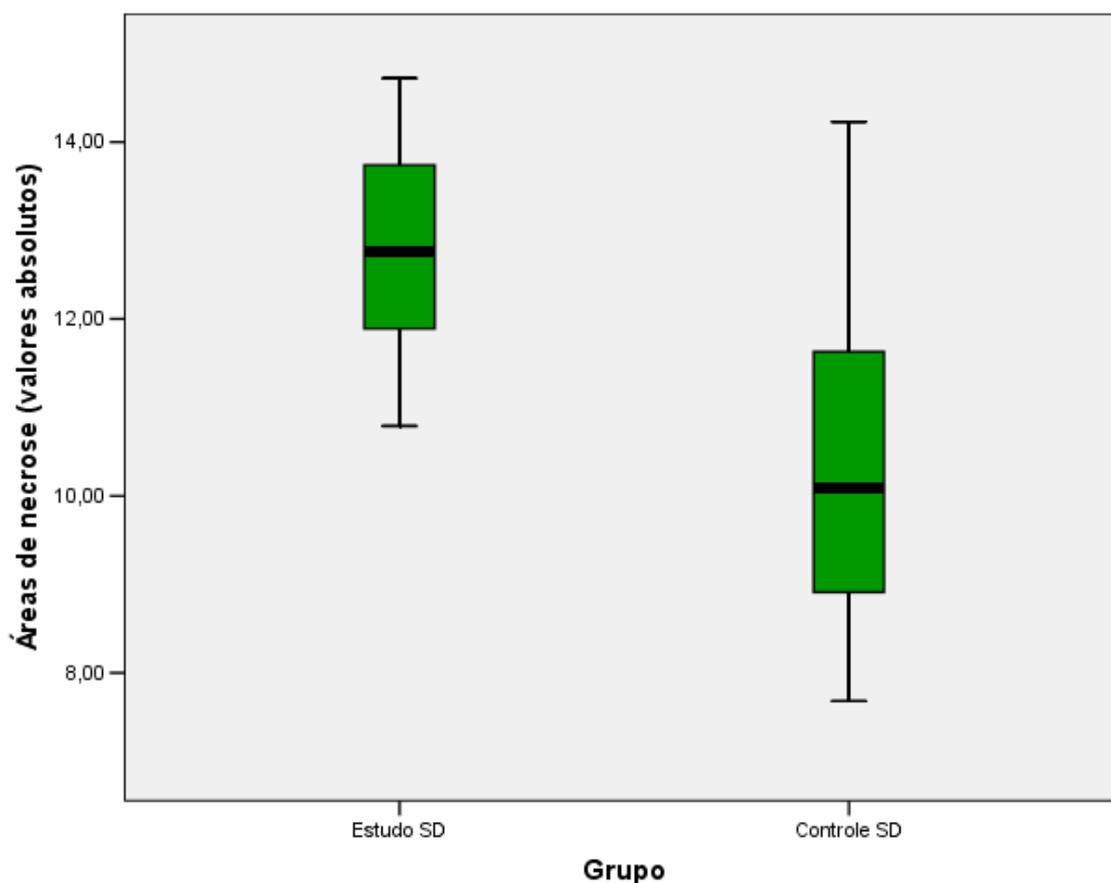


Gráfico 01 – Comparação das áreas de necrose (valores absolutos) entre os grupos Estudo SD e Controle SD ( $p=0,003$ ).

Tabela 01 – Medidas das áreas de viabilidade tecidual, de isquemia e de necrose, no sétimo dia após a confecção de retalhos dorsais à McFarlane em ratas Wistar, que receberam sildenafil (grupo Estudo) ou solução salina (grupo Controle) pela via subdérmica.

Parâmetro avaliado	Grupo Estudo		Grupo Controle		p
	Média ± DPM	Mediana (mínimo – máximo)	Média ± DPM	Mediana (mínimo – máximo)	
Necrose	12,85 ± 1,26	12,76 (10,79 – 14,72)	10,28 ± 1,97	10,09 (7,68 – 14,23)	0,003
Isquemia	0,40 ± 0,91	0,00 (0,00 – 2,71)	0,86 ± 2,15	0,00 (0,00 – 6,75)	0,861
Viabilidade	2,48 ± 1,63	2,50 (0,00 – 5,80)	3,72 ± 2,41	3,65 (0,00 – 8,19)	0,063

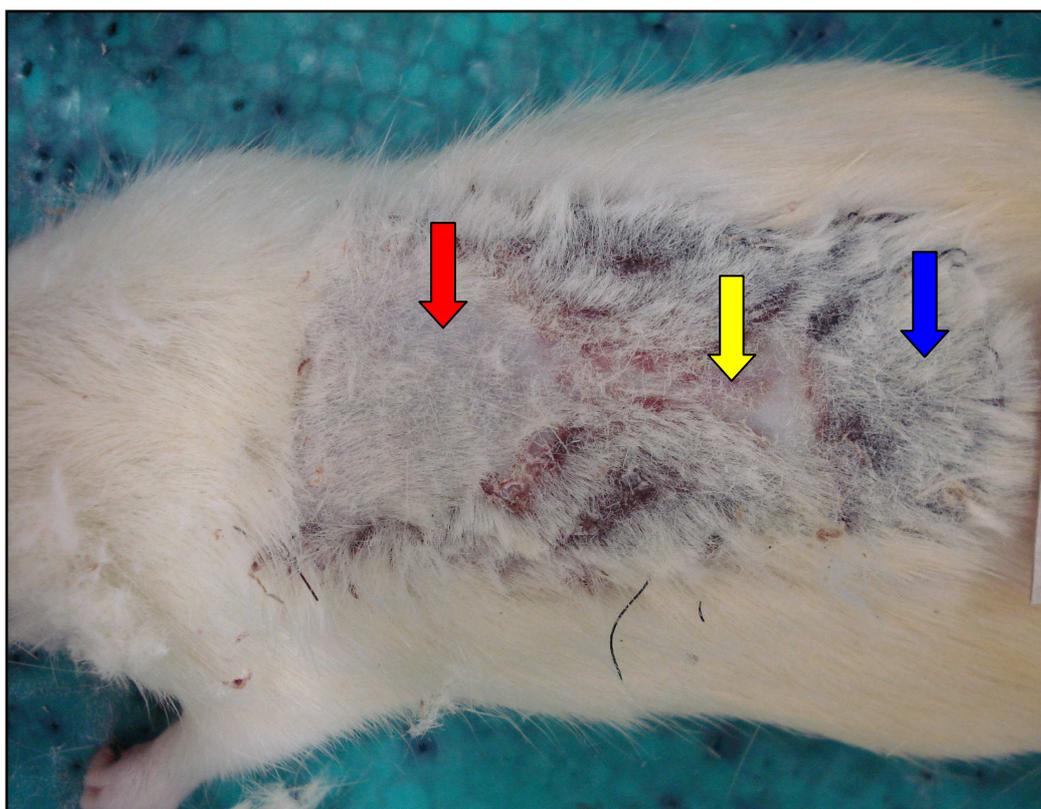


Figura 12 – Fotografia de uma rata do grupo Estudo SD em decúbito ventral. Região de necrose na porção distal do retalho (seta azul), região de isquemia na transição do terço médio para o proximal (seta amarela) e região de viabilidade tecidual na porção proximal do retalho (seta vermelha).

Observou-se diminuição das áreas dos retalhos em relação ao tamanho inicial (21 cm<sup>2</sup>) em todos os animais, independente dos grupos aos quais pertenciam. Entretanto, essa diferença não foi significativa entre os grupos Estudo SD e Controle SD (Gráfico 02).

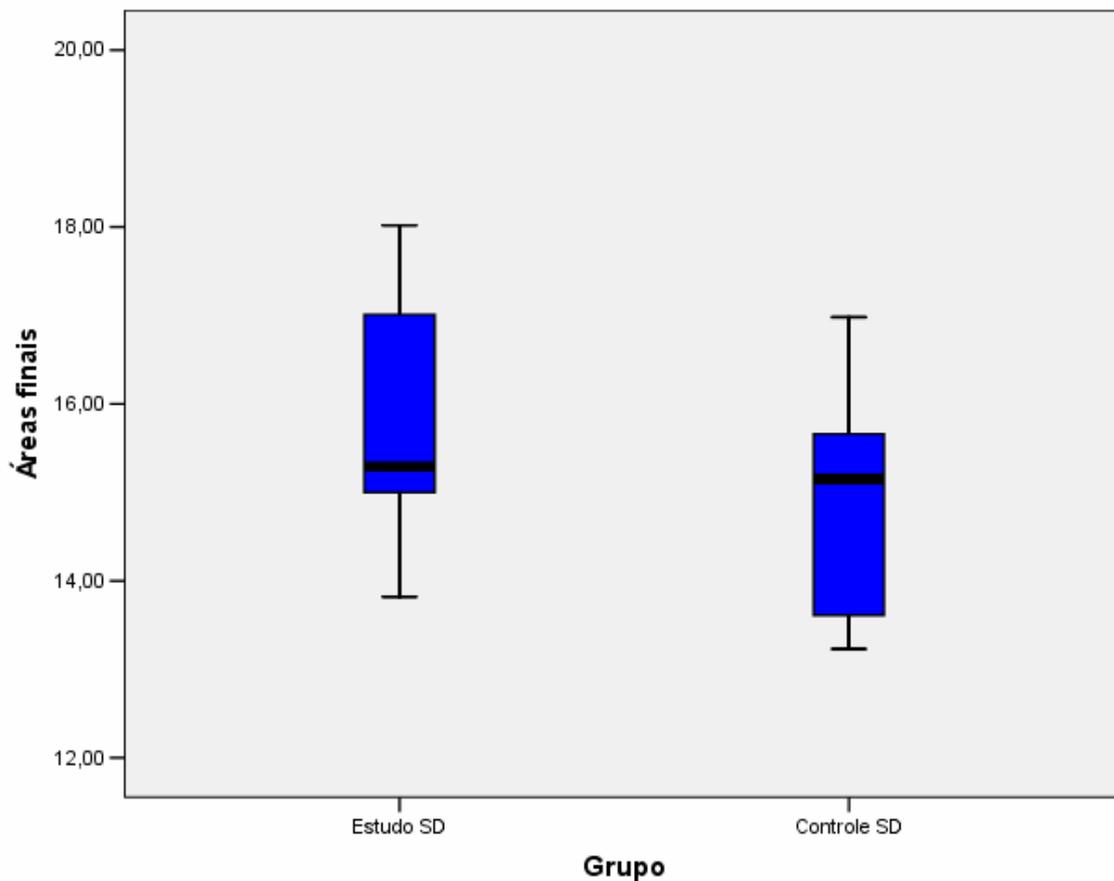


Gráfico 02 – Comparação das áreas finais dos retalhos dorsais entre os grupos Estudo SD e Controle SD.

Macroscopicamente, os percentuais das áreas de necrose, de viabilidade e de isquemia não apresentaram diferença significativa comparando-se o grupo Estudo SD com o grupo Controle SD.

#### 4.1.2 - Avaliação histológica:

À avaliação dos terços proximal e médio do retalho, não houve diferença quando comparados os grupos Estudo SD e Controle SD em relação aos parâmetros granulação, granulação associada à presença de polimorfonucleares e granulação associada à necrose (Tabela 02). Já no terço distal do retalho, observou-se tendência a menor presença de tecido de granulação nos animais onde foi feita a aplicação subdérmica do sildenafil (Tabela 02, Gráfico 03).

Tabela 02 – Número absoluto de casos de granulação, granulação (Gr) associada à presença de necrose (Nc) ou granulação associada à presença de polimorfonucleares (PMNs) em biópsias coletadas no sétimo dia pós-operatório, dos terços proximal, médio e distal de retalhos à McFarlane após injeção de sildenafil (grupo Estudo – E) ou de solução salina (grupo Controle – C) pela via subdérmica.

Parâmetro avaliado	Terço proximal		Terço médio		Terço distal		p	
	Grupo	E	C	E	C	E		C
Granulação		8	10	4	8	1*	6*	*0,057
Gr/Nc		1	0	1	0	0	0	
Gr/PMNs		1	0	2	2	3	4	

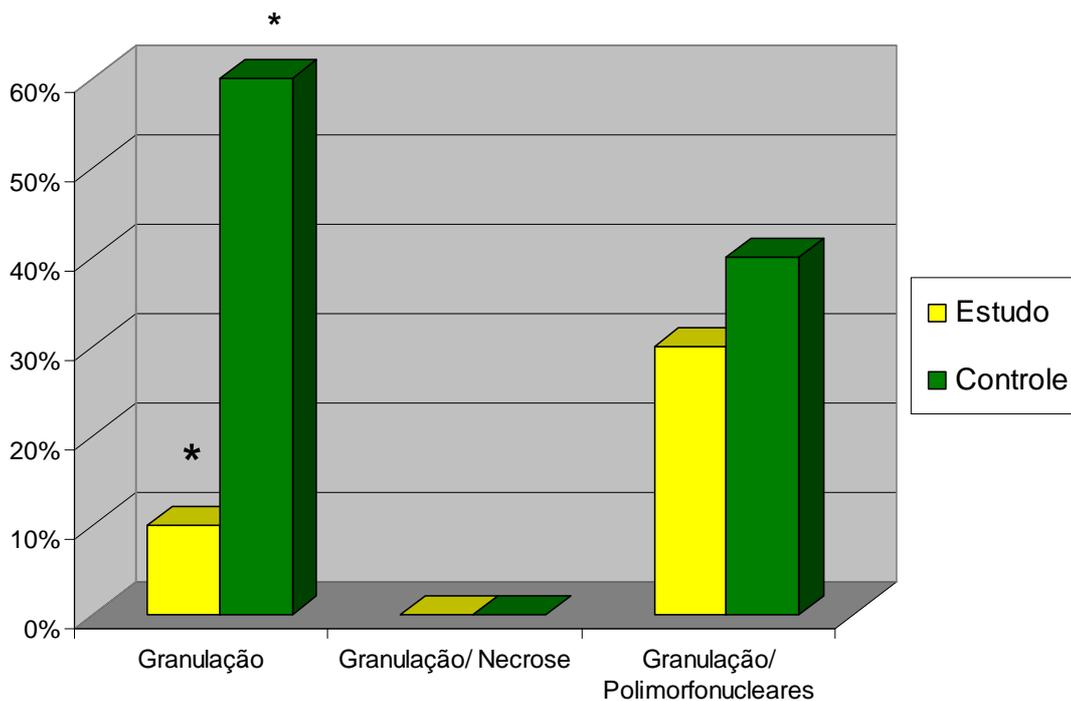


Gráfico 03 – Casos de granulação, granulação associada à necrose e granulação associada a polimorfonucleares, no terço distal de retalhos à McFarlane, em ratos que receberam (Estudo) ou não (Controle) sildenafil por via subdérmica,  $p=0,057$ .

#### 4.2- Avaliação do uso do sildenafil intraperitoneal:

Dois animais do grupo estudo morreram após a primeira aplicação do sildenafil pela via intraperitoneal. Um animal desse mesmo grupo sofreu parada cardiorespiratória, sobrevivendo às manobras de reanimação (massagem bi-digital e ventilação, utilizando-se um êmbolo de seringa de um ml).

#### 4.2.1- Avaliação macroscópica (Figura 13):

Em valores absolutos, as áreas de necrose, de isquemia e de viabilidade tecidual não foram significativamente diferentes entre os grupos Estudo IP e Controle IP. As médias e as medianas das áreas de necrose, de viabilidade e de isquemia podem ser analisadas na tabela 03.

Tabela 03 – Medidas das áreas de viabilidade, de isquemia e de necrose, no sétimo dia após a confecção de retalhos dorsais à McFarlane em ratas Wistar, que receberam sildenafil (grupo Estudo) ou solução salina (grupo Controle) pela via intraperitoneal.

Parâmetro avaliado	Grupo Estudo		Grupo Controle		p
	Média ± DPM	Mediana (mínimo – máximo)	Média ± DPM	Mediana (mínimo – máximo)	
Necrose	8,02 ± 3,09	7,85 (2,94 – 13,56)	8,99 ± 3,44	8,94 (2,73 – 13,78)	0,529
Isquemia	0,79 ± 1,04	0,00 (0,00 – 2,51)	1,80 ± 2,98	0,00 (0,00 – 7,66)	0,981
Viabilidade	5,52 ± 4,46	3,74 (1,59 – 15,08)	6,86± 2,63	5,90 (3,91 – 13,35)	0,089

Os animais do grupo Estudo IP apresentaram áreas finais dos retalhos significativamente menores do que aqueles do grupo Controle IP ( $p=0,019$ ) - Gráfico 04.

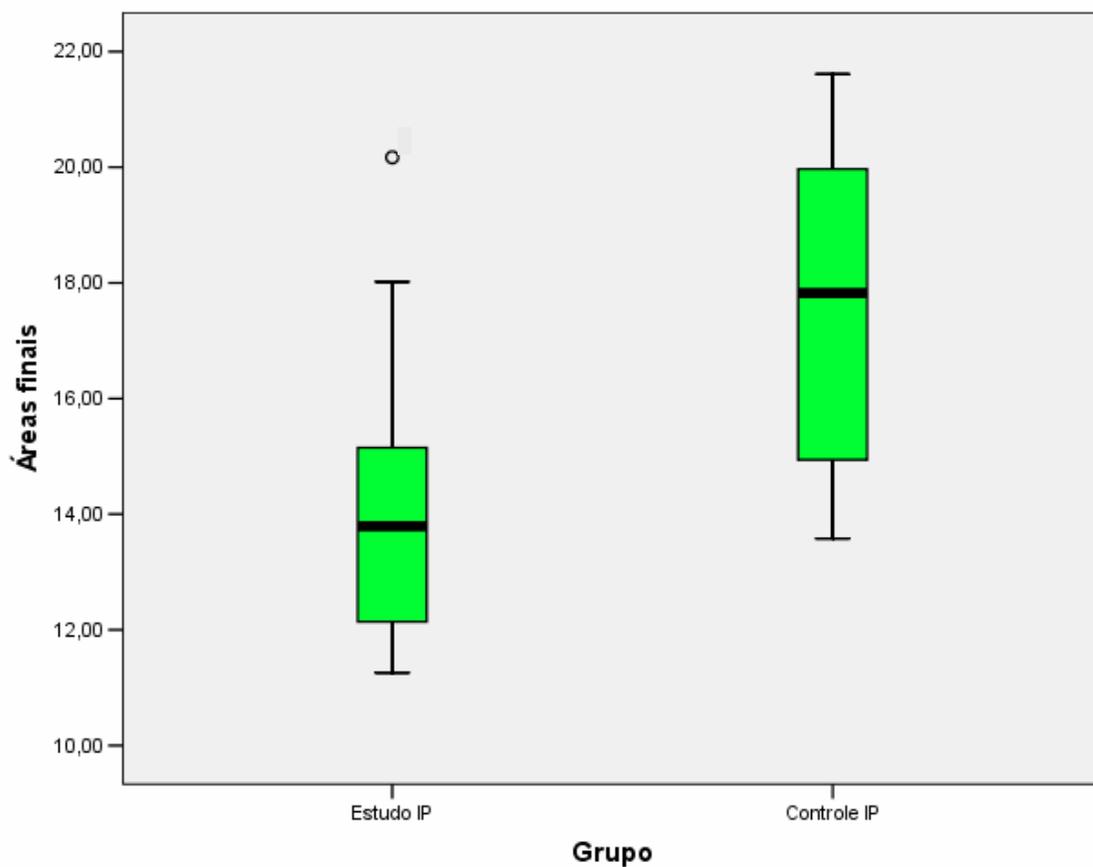


Gráfico 04 – Comparação das áreas finais dos retalhos dorsais entre os grupos Estudo IP e Controle IP, ( $p=0,019$ ).

Os percentuais das áreas de necrose, de viabilidade e de isquemia não apresentaram diferença significativa comparando-se o grupo Estudo IP com o grupo Controle IP.

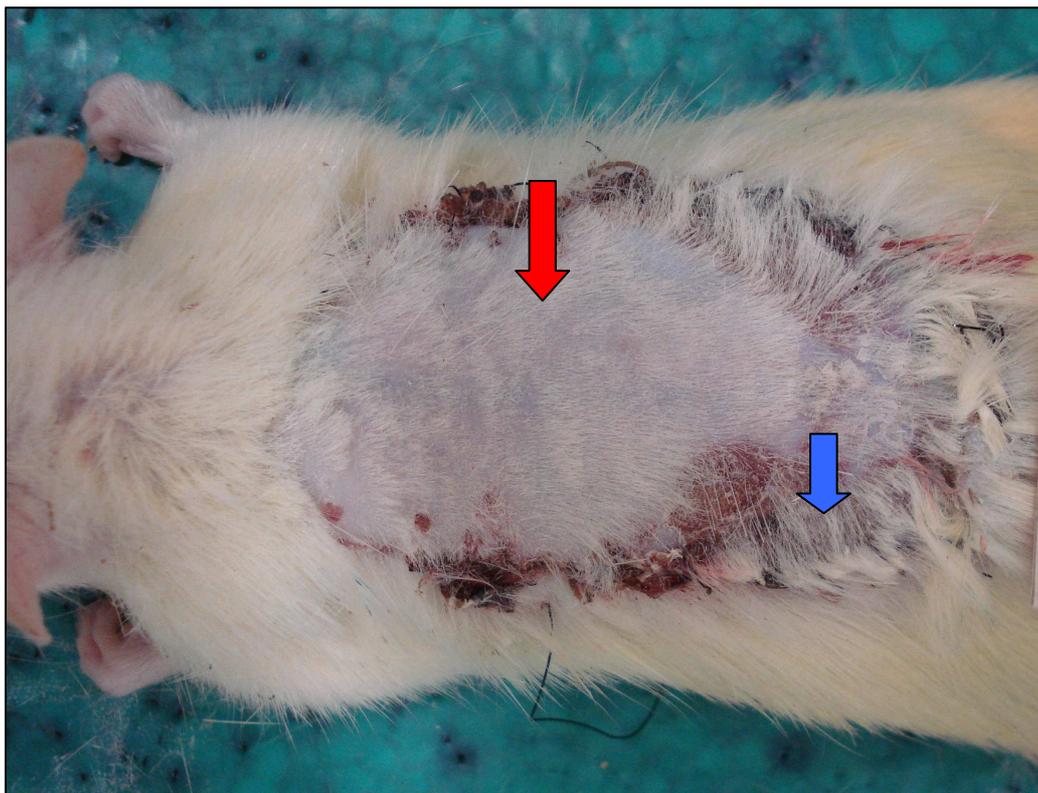


Figura 13 – Fotografia evidenciando o aspecto macroscópico de um dos retalhos do grupo Estudo IP no sétimo dia pós-operatório. Extensa região de viabilidade tecidual (seta vermelha) com necrose da porção distal do retalho (seta azul).

#### 4.2.2 - Avaliação histológica:

À avaliação do terço proximal dos retalhos cutâneos, não se observou a presença de granulação associada à necrose ou de granulação associada a polimorfonucleares. A ocorrência de granulação isoladamente foi observada em todas as amostras avaliadas do terço proximal dos retalhos, independente do grupo aos quais pertenciam os animais. Quando avaliado o terço médio, observou-se que o grupo Estudo IP apresentou significativamente mais granulação associada à necrose do que o grupo Controle IP ( $p=0,011$ ) - Gráfico 05, Tabela 04. A análise do terço distal dos retalhos evidenciou significativamente menos granulação associada a polimorfonucleares no grupo Estudo IP do que no Controle ( $p=0,001$ ) – Gráfico 06, Tabela 04.

Tabela 04 – Número absoluto de casos de granulação, granulação (Gr) associada à presença de necrose (Nc) ou granulação associada à presença de polimorfonucleares (PMNs) em biópsias coletadas no sétimo dia pós-operatório, dos terços proximal, médio e distal de retalhos à McFarlane após injeção de sildenafil (grupo Estudo – E) ou de solução salina (grupo Controle – C) pela via intraperitoneal.

Parâmetro avaliado	Terço proximal		Terço médio		Terço distal		p
	Grupo E	Grupo C	Grupo E	Grupo C	Grupo E	Grupo C	
Granulação	10	10	4	6	0	0	
Gr/Nc	0	0	6*	0*	3	0	* 0,011
Gr/PMNs	0	0	0	1	0†	8†	† 0,001

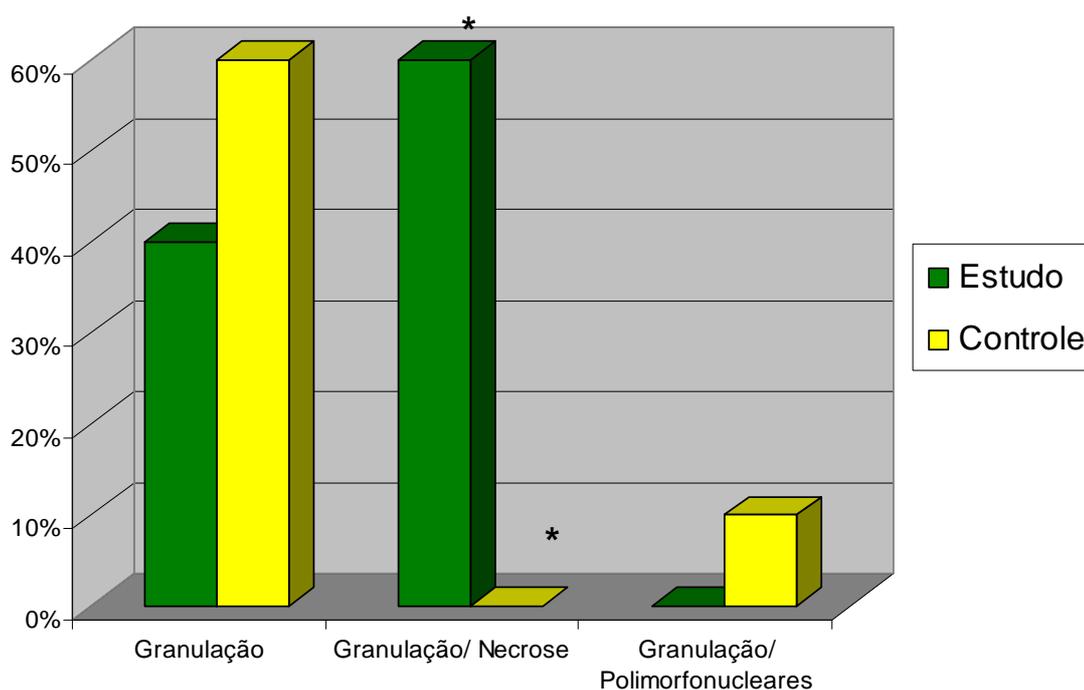


Gráfico 05 – Casos de granulação, granulação associada à necrose e granulação associada a polimorfonucleares, no terço médio de retalhos à McFarlane, em ratos que receberam (Estudo) ou não (Controle) sildenafil por via intraperitoneal, p=0,011.

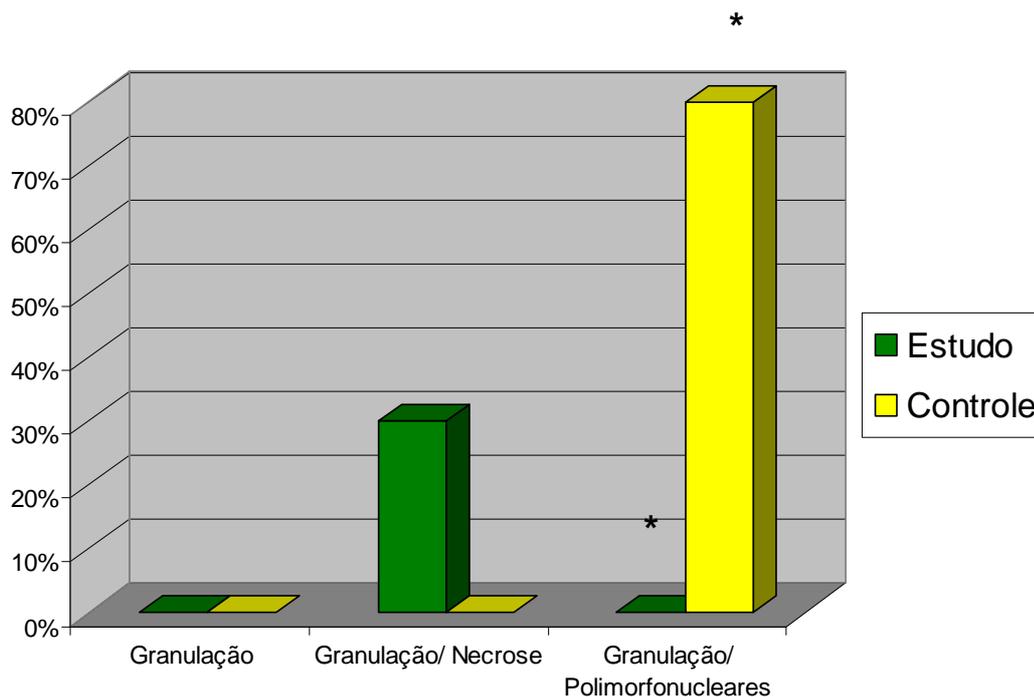


Gráfico 06 – Casos de granulação, granulação associada à necrose e granulação associada a polimorfonucleares, no terço distal de retalhos à McFarlane, em ratos que receberam (Estudo) ou não (Controle) sildenafil por via intraperitoneal,  $p=0,001$ .

#### 4.3- Comparação entre as vias de administração do sildenafil:

##### 4.3.1- Avaliação macroscópica:

Em valores absolutos, o grupo que recebeu o sildenafil pela via SD apresentou áreas de necrose significativamente maiores do que o grupo no qual a via intraperitoneal foi utilizada ( $p=0,000$ ) – Gráfico 07, Tabela 05. Além disso, as áreas de viabilidade em valores absolutos foram significativamente menores no grupo que recebeu o sildenafil pela via SD ( $p=0,038$ ), como pode ser observado no Gráfico 08 e na Tabela 05.

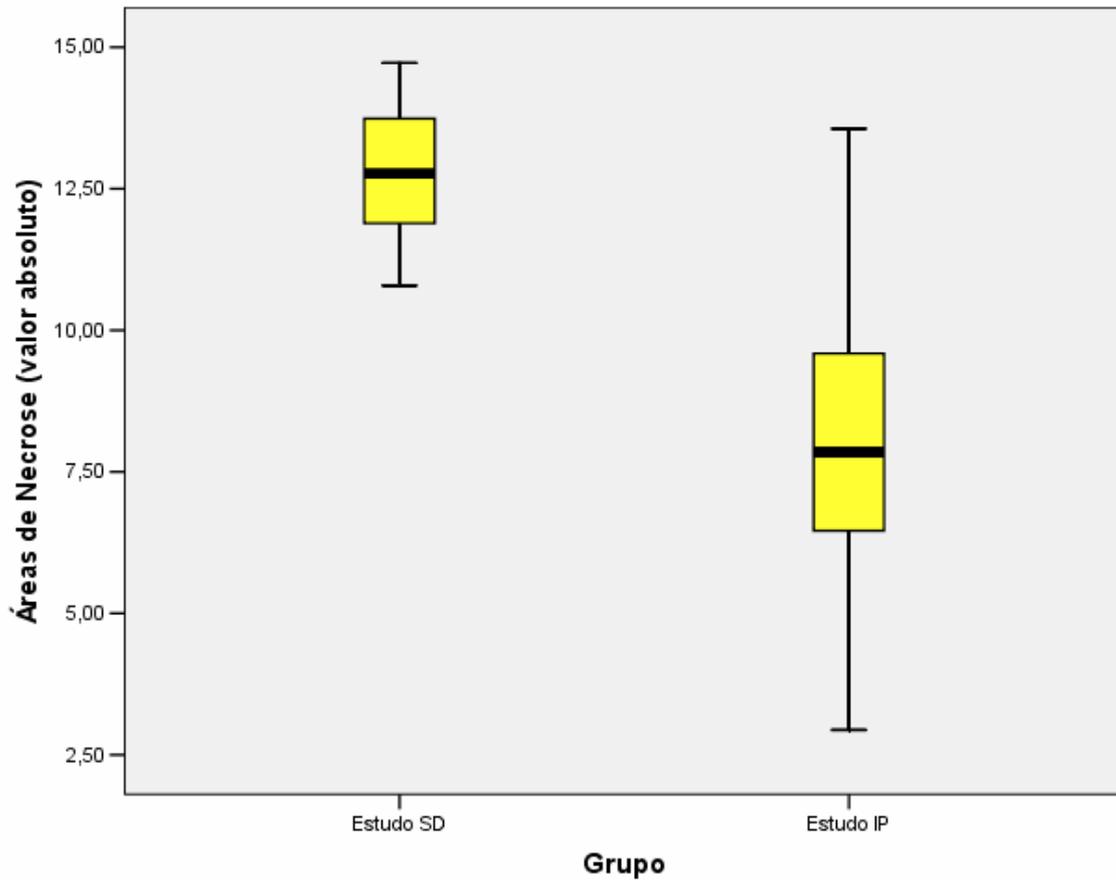


Gráfico 07 – Comparação das áreas de necrose (valores absolutos) entre os grupos Estudo SD e Estudo IP (p=0,000).

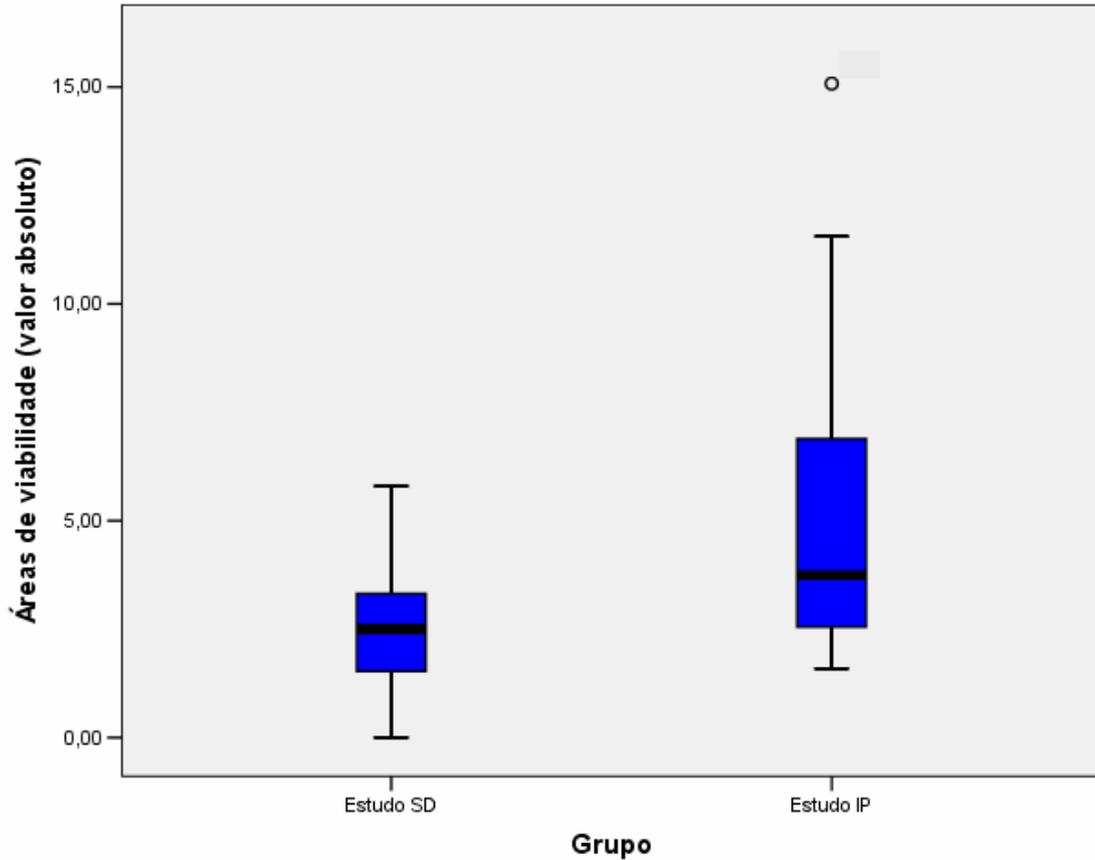


Gráfico 08 – Comparação das áreas de viabilidade (valores absolutos) entre os grupos Estudo SD e Estudo IP ( $p=0,038$ ).

Tabela 05 – Medidas das áreas de viabilidade, de isquemia e de necrose, no sétimo dia após a confecção de retalhos dorsais à McFarlane em ratas Wistar, que receberam sildenafil pela via subdérmica (grupo Estudo SD) ou pela via intraperitoneal (grupo Estudo IP).

Parâmetro avaliado	Grupo Estudo SD		Grupo Estudo IP		p
	Média ± DPM	Mediana (mínimo – máximo)	Média ± DPM	Mediana (mínimo – máximo)	
Necrose	12,85 ± 1,26	12,76 (10,79 – 14,72)	8,02 ± 3,09	7,85 (2,94 – 13,56)	0,000
Isquemia	0,40 ± 0,91	0,00 (0,00 – 2,71)	0,79 ± 1,04	0,00 (0,00 – 2,51)	0,217
Viabilidade	2,48 ± 1,63	2,50 (0,00 – 5,80)	5,52 ± 4,46	3,74 (1,59 – 15,08)	0,038

Não foi observada diferença significativa nas áreas finais dos retalhos, quando comparados os grupos Estudo SD com Estudo IP, embora o grupo Estudo IP tenha apresentado tendência à maior contração tecidual ( $p=0,063$ ) - Gráfico 09.

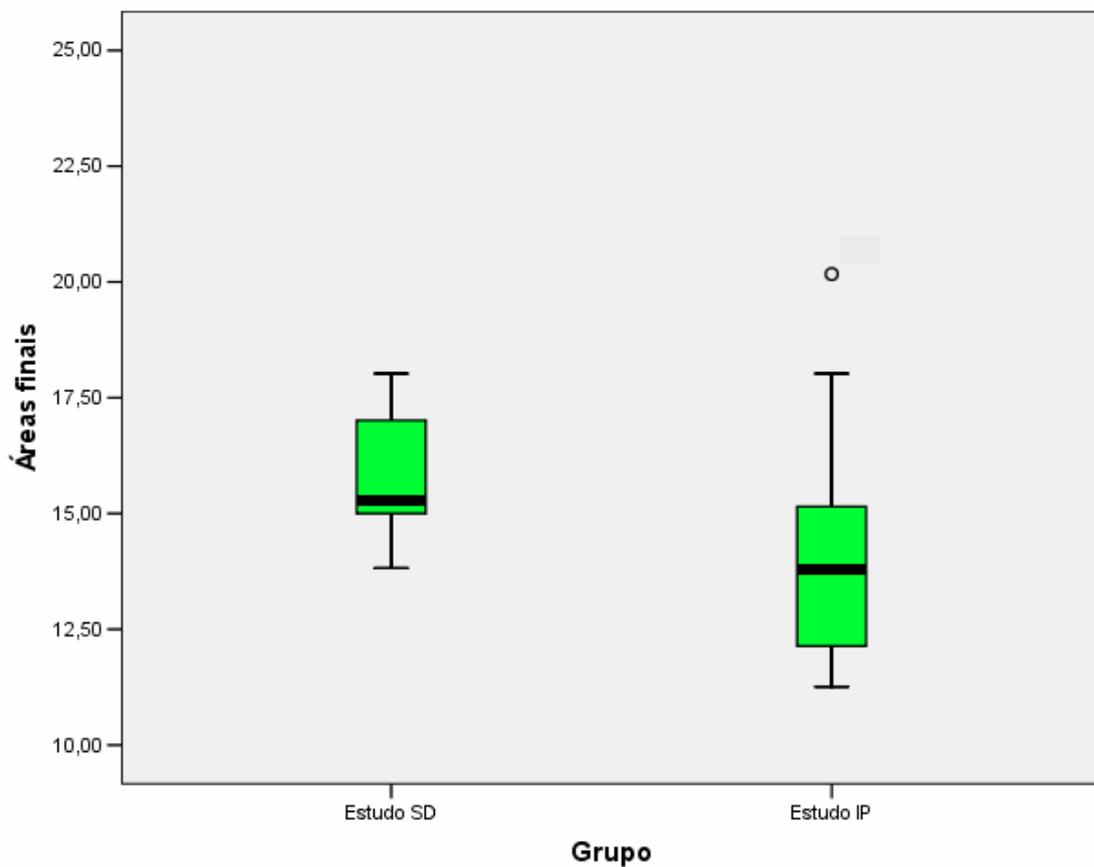


Gráfico 09 – Comparação das áreas finais dos retalhos dorsais entre os grupos Estudo SD e Estudo IP.

Os animais que receberam o sildenafil pela via SD apresentaram maiores áreas percentuais de necrose do que aqueles que receberam a mesma substância pela via IP ( $p=0,009$ ) – Gráfico 10.

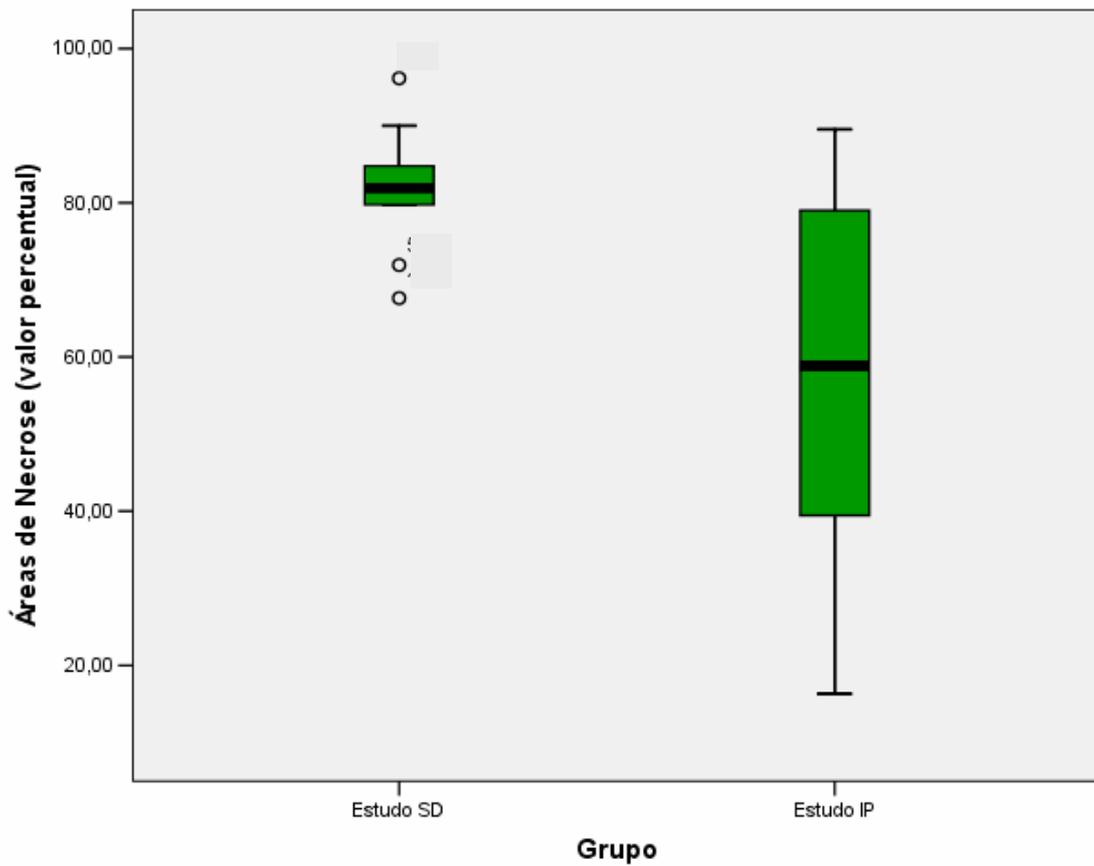


Gráfico 10 – Comparação das áreas de necrose (valores percentuais) entre os grupos Estudo SD e Estudo IP ( $p=0,009$ ).

Os animais que receberam o sildenafil pela via SD apresentaram menores áreas percentuais de viabilidade tecidual do que aqueles que receberam essa substância pela via IP ( $p=0,007$ ) – Gráfico 11. Não houve diferença em relação às áreas percentuais de isquemia entre as duas vias de administração do sildenafil.

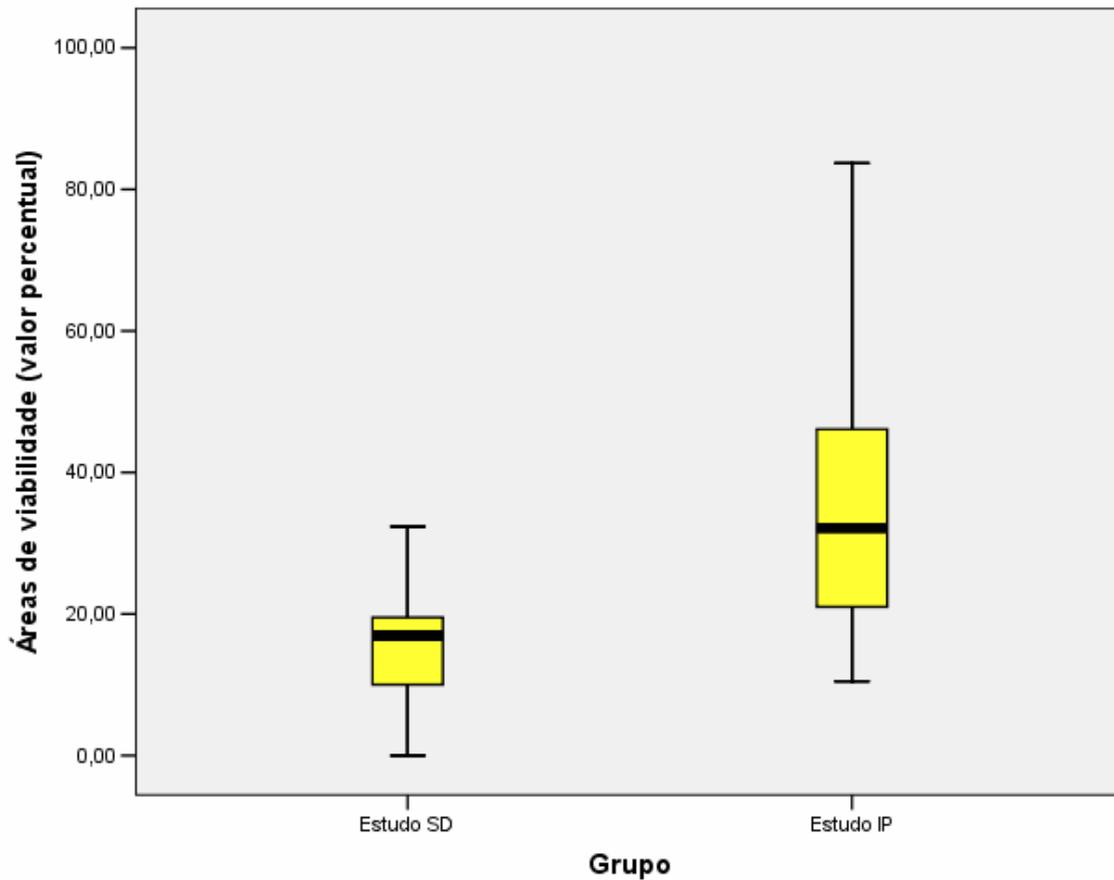


Gráfico 11 – Comparação das áreas de viabilidade tecidual (valores percentuais) entre os grupos Estudo SD e Estudo IP ( $p=0,007$ ).

#### 4.3.2 - Avaliação histológica:

À avaliação histológica dos terços proximal e distal do retalho não se observou diferença entre os grupos Estudo SD e Estudo IP, em relação aos parâmetros granulação, granulação associada a PMNs e granulação associada à necrose (Tabela 06). Quando avaliado o terço médio do retalho, o grupo Estudo SD apresentou uma tendência à maior presença de tecido de granulação associado à necrose do que o grupo Estudo IP ( $p=0,057$ ) - Gráfico 12, Tabela 06.

Tabela 06 – Número absoluto de casos de granulação, granulação (Gr) associada à presença de necrose (Nc) ou granulação associada à presença de polimorfonucleares (PMNs) em biópsias coletadas no sétimo dia pós-operatório, dos terços proximal, médio e distal de retalhos à McFarlane após injeção de sildenafil pela via subdérmica (SD) ou pela via intraperitoneal (IP).

Parâmetro avaliado	Terço proximal		Terço médio		Terço distal		p	
	Grupo	SD	IP	SD	IP	SD		IP
Granulação		10	8	4	4	1	0	
Gr/Nc		0	1	6*	1*	0	3	* 0,057
Gr/PMNs		0	1	0	2	3	0	

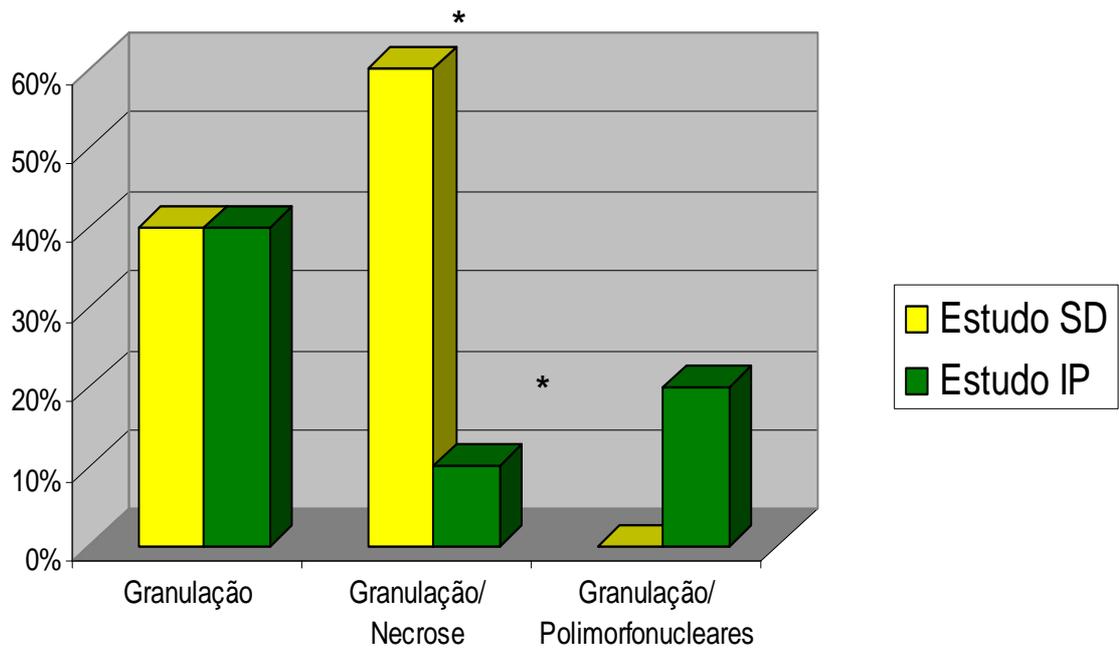


Gráfico 12 – Casos de granulação, granulação associada à necrose e granulação associada a polimorfonucleares, na parte distal de retalhos à McFarlane, em ratas que receberam sildenafil pela via subdérmica (Estudo SD) ou pela via intraperitoneal (Estudo IP),  $p=0,057$ .

## 5- DISCUSSÃO:

A viabilidade de retalhos cutâneos apresenta fundamental importância tanto para cirurgias com finalidade reconstrutora, como para os procedimentos estéticos. Embora o sucesso dessas cirurgias esteja intrinsecamente ligado à sua programação adequada e à sua execução técnica<sup>3,4</sup>, vários estudos estão sendo realizados com o objetivo de avaliar os fatores que interferem na vascularização desses retalhos, além de propor substâncias que possam intervir positivamente na sua viabilidade<sup>19-21, 23, 37-42</sup>.

Definidos como a materialização de uma parte da realidade, os modelos experimentais, devem apresentar precisão adequada, comprovada por meio de estudos prévios, além de demonstrar as reais limitações em relação à realidade que representam<sup>43</sup>. Apesar das semelhanças fisiológicas entre as peles de humanos e de suínos<sup>44, 45</sup>, o modelo de retalho cutâneo em ratos foi utilizado em função da facilidade de manuseio, da sua adaptação a espaços físicos menores e dos baixos custos. Além disso, trata-se de um modelo experimental cujas precisão e limitações já foram comprovadas em estudos anteriores<sup>32, 37-41</sup>.

Em função dos seus efeitos vasoativos e de sua ação sobre o perfil de ativação plaquetária, seria correto se supor que o sildenafil possa ser indicado clinicamente para o tratamento de retalhos cutâneos com debilidade perfusional<sup>24-26, 28, 29</sup>. Ademais, estudos em retalhos cutâneos de ratos com base caudal corroboraram essa suposição, a partir da utilização dessa substância de maneira isolada, ou associadamente a fatores de crescimento, evidenciando melhora na sua viabilidade<sup>19-22</sup>. Nesse contexto, o presente estudo baseou-se na escolha de um modelo experimental de retalho randômico cujas características já foram estabelecidas e nos efeitos vasoativos e plaquetários do sildenafil, para avaliar a viabilidade de retalhos que evoluem distalmente com isquemia.

A utilização de uma barreira de filme plástico interposta entre o retalho e a fáschia muscular do dorso dos ratos, com o objetivo de impedir a formação de vasos a partir do leito de dissecação representou uma contribuição recente ao retalho original descrito por McFarlane<sup>23, 32, 37-42</sup>. De fato, a interposição do filme tornou-se um recurso auxiliar para pesquisas acerca da viabilidade dos retalhos cutâneos dorsais em ratos. Entretanto, ela não foi utilizada nesse estudo, para não acrescentar mais um fator interveniente. Além disso, como uma das propostas dessa pesquisa foi avaliar a administração subdérmica do sildenafil, com a finalidade de se evitar seus efeitos sistêmicos, a interposição do aparato plástico iria tornar impraticável a aplicação da substância por essa via e, mais, interromper a provável participação dos vasos do leito de dissecação, que poderiam contribuir para a neoformação vascular do retalho.

O retalho de McFarlane é baseado cefalicamente, randômico e tem 4 cm de base por 10 cm de comprimento, tomando como referência as escápulas do animal<sup>30-32</sup>. Conceitualmente, o retalho randômico baseado no plexo subdérmico deve apresentar a relação do comprimento dividido pela base entre 1,5 a 2. Uma vez aumentada essa proporção, maiores são as chances de necrose quando o retalho é dissecado do seu leito<sup>3</sup>. O retalho original descrito por McFarlane<sup>30-32</sup> apresenta a relação do comprimento dividido pela base de 2,5. Nesse estudo, optou-se por diminuir as dimensões do retalho, mantendo-se a proporção de 2,3 em função do tamanho dos animais da amostra. Adita-se a isso o fato de outro estudo ter utilizado previamente alterações nas dimensões do retalho original, mantendo a relação do comprimento pela base e obtendo bons resultados com a associação de sildenafil à cola de fibrina<sup>23</sup>. Além disso, existem variações de até 11% no comprimento desse retalho, relacionadas à posição do animal, uma vez que a cintura escapular não pode ser considerada uma referência fixa, sendo a sua posição variável de acordo com a extensão ou com a flexão total do tronco<sup>30</sup>.

O posicionamento da base desse retalho caudalmente otimiza a sua viabilidade, tornando-o conceitualmente um retalho axial, uma vez que seus vasos nutridores penetram na pele do rato a um centímetro cefalicamente da junção da coluna vertebral fixa com a cauda móvel. Cada pedículo vascular desse retalho caudalmente baseado se estende até um centímetro no sentido látero-medial e é capaz de prover a vascularização de um retalho medindo até 60% da distância entre o local de inserção da cauda até a segunda vértebra torácica do animal <sup>30, 47, 48</sup>. Nesse contexto, apesar dos bons resultados obtidos, os estudos prévios a respeito da utilização do sildenafil em ratos foram realizados em retalhos dorsais caudalmente baseados e, portanto, axiais <sup>19-22</sup>.

O sildenafil inibe seletivamente a fosfodiesterase tipo 5, resultando em vasodilatação, elevação do fluxo sanguíneo e do aporte de oxigênio. Os efeitos dessa substância não se limitam à ereção mediada pela via do óxido nítrico, mas também incidem sobre diferentes órgãos e tecidos, dentre os quais se destacam o coração, os pulmões e até o cérebro <sup>24, 25, 27, 49-51</sup>. Um dos efeitos sistêmicos esperados para essa substância, a vasodilatação reflexa, provavelmente esteve associada à morte de três animais do grupo Estudo SD, de dois animais do grupo Estudo IP e a uma parada cardiorespiratória responsiva a manobras de reanimação no grupo Estudo IP. Esse efeito sistêmico pode ter sido potencializado pelo medicamento utilizado para promover sedação e analgesia nos animais (Xilasina 2%) <sup>52</sup>.

Hart e cols observaram uma diminuição das áreas de necrose e de isquemia associada ao uso intraperitoneal de 9 mg/Kg de sildenafil em replicações diárias, mais pronunciadamente no primeiro e terceiro, do que no quinto e sétimo dias pós operatórios <sup>20</sup>. Ayyildiz e cols utilizaram doses diárias de 1 mg/Kg da substância diariamente pela via oral ou a dose diária de 0,5 mg/Kg aplicada em uma bolsa subdérmica do retalho, obtendo melhora na cicatrização dos retalhos murinos, avaliados

no sétimo dia pós operatório <sup>19</sup>. Sarifakioglu e cols também utilizaram o sildenafil em doses orais diárias de 3mg/kg, de 10 mg/kg, ou de 20 mg/kg com bons resultados em relação à viabilidade de retalhos cutâneos dorsais de base caudal em ratos <sup>21</sup>. Tsai e cols utilizaram o sildenafil intraperitoneal na dose de 10mg/Kg/dia, associado ou não ao fator de crescimento de endotélio vascular pela via subdérmica, obtendo redução das áreas sem vascularização no grupo que recebeu somente o sildenafil <sup>22</sup>. Ulusoy e cols também obtiveram bons resultados com a aplicação tópica de 10 mg de sildenafil associado à cola de fibrina <sup>23</sup>. Como se percebe, os estudos prévios não foram unânimes quanto ao estabelecimento das dosagens do sildenafil. A escolha da dose de 0,5 mg/Kg inicialmente foi baseada nos estudos de Ayyildiz e cols, que também utilizaram a via subdérmica <sup>19</sup> e não foi aumentada em função da resposta sistêmica que culminou com a morte de cinco animais.

Apesar de Tsai e cols terem aplicado o sildenafil pela via intraperitoneal diariamente, o uso subdérmico do fator de crescimento foi realizado uma única vez, logo após a confecção do retalho <sup>22</sup>. Por outro lado, Ayyildiz e cols relataram o uso diário do sildenafil pela via subdérmica, embora não descrevessem o tipo de contensão que foi necessária para esses animais <sup>19</sup>. Obviamente, para se administrar o sildenafil pelas vias oral e intraperitoneal, não é necessária uma sedação prévia. Entretanto, observou-se na prática dificuldades técnicas relacionadas à resistência tecidual e à movimentação do animal, para a administração da substância utilizando-se a via subdérmica, o que tornou necessária a contensão com o uso de medicamento. Em função dos efeitos simpaticolíticos da xilasina, optou-se por não utilizar o sildenafil diariamente, sob risco potencializar a vasodilatação sistêmica causando morte de mais animais do estudo <sup>52</sup>.

Por outro lado, a opção pela via subdérmica esteve relacionada à possibilidade de se diminuir os efeitos sistêmicos do fármaco que são observados quando ele é administrado pelas vias oral ou intraperitoneal <sup>24, 26</sup>, o que contraditoriamente não pôde ser prevenido, uma vez que três animais do grupo Estudo SD sofreram parada cardiorespiratória não responsiva às manobras de reanimação.

Para a avaliação das áreas de necrose, de isquemia e de viabilidade tecidual, o método de representação gráfica com análise por meio de programa de informática tem sido descrito com frequência <sup>19, 23, 38, 40, 41, 47, 48</sup>, embora a técnica de Imagem Espectral de Polarização Ortogonal <sup>20, 22, 42</sup>, a análise de fotografias digitais por meio de programas específicos <sup>20, 21</sup> e a avaliação de cortes histológicos <sup>19, 22, 23, 42, 46</sup> também possam ser utilizadas. Nesse estudo, optou-se pelo cálculo das áreas com o programa AutoCAD, por se tratar de um método exato, de baixo custo e examinador independente, além de já ter sido descrito por estudos prévios <sup>19, 23</sup>. A coleta de amostras teciduais para a avaliação histológica foi feita de maneira semelhante às realizadas em estudos anteriores, obtendo-se três fragmentos dos retalhos de regiões distintas: proximal, média e distal <sup>22, 42, 46</sup>.

Macroscopicamente, o sildenafil aplicado pela via subdérmica esteve associado a maiores valores absolutos das áreas de necrose, contradizendo o que fora observado em um estudo prévio <sup>19</sup>. Entretanto, Ayyildiz e cols avaliaram o uso tópico dessa substância aplicada em um único ponto nos retalhos de base caudal, cujo aporte vascular é dado pelas artérias circunflexas ilíacas profundas <sup>47, 48</sup>. Considerando-se que retalhos axiais apresentam uma maior pressão de perfusão vascular <sup>4</sup>, seria coerente se supor que o sildenafil apresentasse concentrações séricas satisfatórias na suas extremidades distais, estimulando a neoformação vascular e a viabilidade tecidual desses retalhos. Por outro lado, apesar de, no presente estudo, o sildenafil subdérmico ter sido administrado em

diferentes pontos do retalho, garantindo uma distribuição mais uniforme dessa substância, o seu efeito pode ter sido prejudicado pela debilidade de uma rede vascular capaz de manter uma concentração do princípio ativo constante durante as etapas da cicatrização, além de viabilizar o aporte de mediadores intervenientes ao processo de reparo. Essa suposição pode ser corroborada pelo estudo realizado por Ulusoy e cols, que evidenciou menores áreas de necrose nos retalhos randômicos de ratos tratados com a associação de sildenafil e cola de fibrina <sup>23</sup>, provavelmente decorrente da sua capacidade de manter constantes as concentrações do princípio ativo do fármaco no local do dano tecidual, além de permitir a difusão de fatores da cicatrização e de células, por meio da rede de fibrina.

Ademais, o sildenafil administrado pela via intraperitoneal não promoveu aumento das áreas de viabilidade tecidual, nem diminuição das áreas de necrose, como era esperado em função da sua capacidade de induzir vasodilatação, inibir a agregação plaquetária e promover a angiogênese, contradizendo o que fora observado anteriormente para seu uso sistêmico <sup>19-22</sup>. Por outro lado, Hart e cols avaliaram retalhos cutâneos dorsais de ratos tratados com sildenafil pela via intraperitoneal, comparando-os com o grupo que recebeu somente o veículo de diluição, pela mesma via, e com o grupo no qual não foi administrada nenhuma substância. Os achados obtidos por meio da análise de Imagem Espectral de Polarização Ortogonal evidenciaram menores áreas de necrose nos animais que receberam o sildenafil, no intervalo do 1º ao 3º dias pós-operatórios. No entanto, as áreas de necrose foram semelhantes entre todos os grupos, no período entre o 5º e o 7º dias de observação, corroborando os resultados do presente estudo <sup>20</sup>.

A contração cicatricial é um processo fisiológico que resulta no fechamento da ferida pela redução de sua superfície de exposição. Esse processo de reparo acelera o tempo de cicatrização, quando comparado com a sutura ou com a epitelização isoladamente. Além disso, a cicatriz resultante é menor. Em ratos, a presença do panículo carnoso facilita a mobilidade da pele e, conseqüentemente a contração da ferida<sup>53</sup>. A análise das áreas totais dos retalhos evidenciou que para todos os animais, independente dos grupos aos quais pertenciam, houve contração da ferida. Porém, ela foi mais eficaz nos animais que receberam o sildenafil pela via intraperitoneal do que naqueles do grupo controle. Como os estudos acerca da viabilidade de retalhos cutâneos de ratos tratados com sildenafil encontrados na literatura não avaliavam essa variável, investigações futuras serão necessárias para estabelecer se o uso sistêmico dessa substância poderia alterar a expressão de  $\alpha$ -actina e de microfilamentos pelos fibroblastos em seu citoplasma, favorecendo a contração cicatricial<sup>19-23</sup>. Por outro lado, a ocorrência de áreas finas no grupo Estudo SD maiores do que no grupo Estudo IP, pode ter sido associada ao uso tópico do sildenafil, resultando no aumento local da osmolaridade e/ou na precipitação do composto químico interpondo o plano entre o retalho e o seu leito vascular. Esses dois fatores, associados a baixas tensões de oxigênio, podem ter prejudicado o amadurecimento fenotípico dos fibroblastos, inibindo a contração tecidual.

A avaliação microscópica dos terços distais dos retalhos evidenciou uma tendência à menor presença de granulação nos animais que receberam a solução sildenafil pela via subdérmica, quando comparados ao controle. Essa tendência clínica provavelmente não apresentou correspondência estatística, em função do tamanho da amostra.

Também nos terços distais dos retalhos, o uso intraperitoneal do sildenafil esteve associado a menor formação de tecido de granulação permeado por polimorfonucleares, quando comparado ao controle. Supõe-se que a presença de polimorfonucleares interpostos à granulação esteja relacionada com alguma contaminação, cujo significado clínico seja, de fato, a diminuição da viabilidade dos retalhos tratados com o sildenafil pela via intraperitoneal.

Acredita-se que a análise histológica do terço distal dos retalhos apresente maior importância clínica do que o estudo dos terços médio e proximal, uma vez que as amostras das porções distais representam os fenômenos fisiológicos esperados para um retalho com debilidade perfusional <sup>30-32</sup>. Entretanto, dependendo do grau de diminuição do aporte sanguíneo, alterações teciduais podem ser observadas não somente nas porções distais dos retalhos, atingindo inclusive o seu terço médio. Mesmo sem correlação com a avaliação macroscópica, a presença de necrose interpondo a formação de tecido de granulação, significativamente mais freqüente no terço médio dos retalhos dos animais que receberam o sildenafil pela via intraperitoneal, pode ter sido causada pela diminuição da pressão de perfusão, decorrente da associação do agente anestésico utilizado com o sildenafil <sup>52</sup>. Talvez, essas alterações não tenham sido detectadas à macroscopia, em função de terem ocorrido no nível da microcirculação, comprometendo as fístulas artério-venosas que ocorrem na derme <sup>4</sup>. Da mesma forma, era de se esperar que não fossem observadas diferenças entre os grupos, à análise do terço proximal dos retalhos, independente da via de administração e/ou das substâncias utilizadas, a não ser que a resposta sistêmica do animal fosse intensa o bastante para comprometer o aporte sanguíneo na base dos retalhos, ou que fosse utilizado um modelo experimental para debilidade cicatricial, como o uso de nicotina, de radiação ou do diabetes induzido.

Não está bem estabelecido pela literatura se o retalho à McFarlane em sua porção distal se comporta como um enxerto e, portanto apresenta as mesmas demandas metabólicas para sua manutenção, dentre as quais se incluem a presença de um leito vascular adequado subjacente, a nutrição inicial por embebição plasmática e a posterior inosculação vascular <sup>31</sup>. O que pôde ser observado nesse estudo, é que o terço distal do retalho apresentou, à análise histológica, respostas ao sildenafil bem parecidas ou ainda mais intensas do que os resultados observados à macroscopia.

Comparando os grupos Estudo SD e Estudo IP, observou-se que o uso subdérmico do sildenafil esteve associado a maiores áreas de necrose e a menores áreas de viabilidade, em valores absolutos e percentuais. E, apesar de não terem apresentado diferenças histológicas nos terços distal e proximal, constatou-se a presença de mais necrose interpondo as áreas de granulação no terço médio dos retalhos que receberam o sildenafil pela via subdérmica. Pode-se supor que essa interferência na formação de um tecido de granulação mais exuberante possa ter sido causada pela precipitação do princípio ativo sobre o leito vascular, impedindo o aporte de células e a difusão de mediadores da cicatrização. Além disso, questiona-se se a interposição do sildenafil no plano de dissecção do retalho, correlacionada macroscopicamente com a presença de exsudato em dois animais do grupo Estudo SD, possa ter contribuído para a formação de um ambiente hiperosmótico, resultando em saída de água do meio intracelular com conseqüente citólise.

Uma vez que o uso do sildenafil pela via subdérmica resultou em maiores áreas de necrose, à análise macroscópica, e em menor formação de tecido de granulação no terço distal, outros estudos poderiam ratificar se a precipitação do princípio ativo seria responsável por uma piora da viabilidade desses retalhos ou se esses resultados teriam sido uma consequência dos seus efeitos intracelulares. Sugere-se, ainda, a necessidade de novas pesquisas que avaliem a associação do sildenafil com uma substância de uso tópico, com o objetivo de se criar uma rede para o aporte de células e de mediadores da cicatrização, como a cola de fibrina utilizada por Ulusoy e cols<sup>23</sup>.

As alterações histológicas relacionadas ao uso intraperitoneal do sildenafil sugerem que o fármaco tenha sido associado a uma pior resposta tecidual, interferindo negativamente para a viabilidade dos retalhos. Por outro lado, outros estudos deverão ser conduzidos para avaliar se elas não foram resultantes da associação do sildenafil com um agente anestésico cujas propriedades vasodilatadoras sistêmicas possam ter contribuído para uma piora do aporte sanguíneo através das artérias perfurantes cutâneas<sup>52</sup>. Além disso, é possível que os resultados de uma avaliação mais precoce dos retalhos pudesse evidenciar uma resposta positiva relacionada ao uso do sildenafil, de modo semelhante ao que fora observado por Hart e cols. Esses autores constataram que, por volta do terceiro de dia de observação, os retalhos cutâneos apresentavam-se mais viáveis do que no período entre o quinto e o sétimo dia pós-operatórios<sup>20</sup>, sugerindo que o sildenafil intraperitoneal possa atuar inicialmente na indução de vasodilatação arterial e permitir um consequente afluxo de células e de mediadores. É provável, contudo, que esse mecanismo não se perpetue nas fases finais da cicatrização, o que poderia ser contornado com a associação do fármaco a fatores de crescimento.

Finalmente, a necrose tecidual causada por alterações isquêmicas da vascularização de retalhos ainda representa um desafio para a Cirurgia Plástica. Dessa forma, o desenvolvimento de outras terapias com o objetivo de melhorar a viabilidade desses retalhos deve ser contemplado por estudos futuros.

## **6- CONCLUSÕES:**

O uso do sildenafil pela via subdérmica esteve associado a uma pior viabilidade dos retalhos cutâneos dorsais de ratas. Embora o sildenafil pela via intraperitoneal tenha promovido maior contração tecidual, o seu uso não aumentou a viabilidade dos retalhos cutâneos dorsais.

Comparando-se as duas vias de administração do sildenafil, o seu uso subdérmico esteve associado a uma pior viabilidade tecidual e a uma menor contração tecidual.

## **7- PERSPECTIVAS FUTURAS:**

Os resultados desse estudo podem ser úteis para novas pesquisas a respeito do uso sildenafil, com a finalidade de estimular a contração tecidual. Além disso, estudos são necessários, para estabelecer se existe uma associação entre o uso sistêmico do sildenafil e a expressão de  $\alpha$ -actina e de microfilamentos pelos fibroblastos. Por outro lado, esse estudo forneceu dados úteis no desenvolvimento de uma linha de pesquisa focada em uma intervenção terapêutica para os retalhos à McFarlane<sup>32</sup>.

## 8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Morain WD. Historical Perspectives. *In: Mathes, SJ. Plastic Surgery (Vol. I) General Principles. 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia: Saunders-Elsevier, 2006: 27-34.*
2. Paletta CE, Pokorny JJ. Skin Grafts. *In: Mathes, SJ. Plastic Surgery (Vol. I) General Principles. 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia: Saunders-Elsevier, 2006: 293-316.*
3. Mathes SJ, Hansen SL. Flap Classification and Applications. *In: Mathes, SJ. Plastic Surgery (Vol. I) General Principles. 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia: Saunders-Elsevier, 2006: 365-481.*
4. Vedder NB. Flap Physiology. *In: Mathes, SJ. Plastic Surgery (Vol. I) General Principles. 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia: Saunders-Elsevier, 2006: 483- 506.*
5. Flores LRP. Retalhos cutâneos: fisiologia, classificação, principais retalhos. *In: Mélega JM. Cirurgia Plástica Fundamentos e Arte, Princípios Gerais. Rio de Janeiro: MEDSI, 2002: 107-120.*
6. Lee RG, Baskin JZ. Improving outcomes of locoregional flaps: an emphasis on anatomy and basic science. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg 2006; 14(4): 260-264.*
7. Myers B. Understanding flap necrosis. *Plast Reconstr Surg 1986; 78:813-814.*
8. Payement G, Cariou JL, Arcila M, Arrouvel C, Banzet P. Arterial phenomenon of autonomization of vascularized island flaps reviewed by expansion of the vascular pedicle. An experimental study in the rat. *Ann Chir Plast Esthet 1994; 39(6): 779-784.*
9. Davis RE, Cohen JI, Robinson JE, Urban SL, Cook TA. Ketorolac (Toradol) and acute random-pattern skin flap survival in rat. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1995; 121(6): 673-677.*

10. Kargi E, Deren O, Babuccu O, Hosnuter M, Erdogan B. Dual synergistic effect: the effect of dexamethasone plus carnitine on skin flap survival. *Ann Plast Surg* 2004; 53(5): 488-491.
11. Bishop A. Role of oxygen in wound healing. *J Wound Care* 2008; 17(9): 399-402.
12. Rodriguez PG, Felix FN, Woodley DT, Shim EK. The role of oxygen in wound healing: a review of the literature. *Wound Repair Regen* 2008; 16(3): 321-30. Review.
13. Tandara AA, Mustoe TA. Oxygen in wound healing - more than a nutrient. *World J Surg* 2004; 28(3): 294-300.
14. Thackham JA, McElwain DL, Long RJ. The use of hyperbaric oxygen therapy to treat chronic wounds: A review. *Wound Repair Regen* 2008; 16(3): 321-330.
15. Isken T, Serdaroglu I, Ozgentas E. The effects of the pentoxifylline on survival of the skin flaps in streptozotocin-diabetic rats. *Ann Plast Surg* 2009; 62(4): 446-450.
16. Mauad RJ Jr, Shimizu MH, Mauad T, de Tolosa EM. Buflomedil and pentoxifylline in the viability of dorsal cutaneous flaps of rats treated with nicotine. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2006; 59: 387-392.
17. Quirinia A, Gottrup F, Viidik A. Failure of buflomedil to improve wound healing in ischaemic skin flaps. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 1996; 30(2): 81-87.
18. Uhl E, Rösken F, Curri SB, Menger MD, Messmer K. Reduction of skin flap necrosis by transdermal application of buflomedil bound to liposomes. *Plast Reconstr Surg* 1998; 102(5): 1598-1604.

19. Ayyildiz A, Uysal A, Koçer U, Karaaslan O, Huri E, Germiyanoglu C, Caydere M. Effect of sildenafil citrate on viability of flaps: an experimental study in rats. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 2005; 39(4): 204-208.
20. Hart K, Baur D, Hodam J, Lesoon-Wood L, Parham M, Keith K, Vazquez R, Ager E, Pizarro J. Short- and long-term effects of sildenafil on skin flap survival in rats. *Laryngoscope* 2006; 116(4): 522-528.
21. Sarifakioglu N, Gokrem S, Ates L, Akbuga UB, Aslan G. The influence of sildenafil on random skin flap survival in rats: an experimental study. *Br J Plast Surg* 2004; 57: 769-772.
22. Tsai JW, Ayubi FS, Hart KL, Baur DA, Parham MA, Moon JK, Vazquez R, Chasen AB, Zhang Z, Pizarro JM. Evaluation of the effect of sildenafil and vascular endothelium growth factor combination treatment on skin flap survival in rats. *Aesthetic Plast Surg* 2008; 32(4): 624-631.
23. Ulusoy MG, Uysal A, Koçer U, Karaaslan O, Cruzdan SS, Ayyildiz A, Ustün H. Improved flap viability with site-specific delivery of sildenafil citrate using fibrin glue. *Ann Plast Surg* 2005; 55 (3): 292-296.
24. Uthayathas S, Karuppagounder SS, Thrash BM, Parameshwaran K, Suppiramaniam V, Dhanasekaran M. Versatile effects of sildenafil: recent pharmacological applications. *Pharmacol Reps* 2007; 59: 150-163.
25. Salcido RS. Viagra and Wound Healing: The NO Connection. *Adv Skin Wound Care* 2008; 21(3): 106-109.
26. Walker DK, Ackland MJ, James GC, Muirheads GJ, Rance DJ, Wastall P, Wright PA. Pharmacokinetics and metabolism of sildenafil in mouse, rat, rabbit, dog and man. *Xenobiotica* 1999; 29(3): 297-310.

27. Zhang R, Wang Y, Zhang L, Zhang Z, Tsang W, Lu M, Zhang L, Chopp M. Sildenafil (Viagra) induces neurogenesis and promotes functional recovery after stroke in rats. *Stroke* 2002; 33: 2675-2680.
28. Witte MB, Barbul A. Role of nitric oxide in wound repair. *Am J Surg* 2002; 183(4): 406-412.
29. Thornton FJ, Schäffer MR, Witte MB, Moldawer LL, MacKay SLD, Abouhamze A, Tannahill CL, Barbul A. Enhanced Collagen Accumulation Following Direct Transfection of the Inducible Nitric Oxide Synthase Gene in Cutaneous Wounds. *Bioch Bioph Res Com* 1998; 246(3): 654-659.
30. Briggs PC. The McFarlane flap. *Plast Reconstr Surg* 1987; Sep;80(3): 472-3.
31. Hammond DC, Brooksher RD, Mann RJ, Beernink JH. The dorsal skin-flap model in the rat: factors influencing survival. *Plast Reconstr Surg* 1993; 91(2): 316-21. Comment in: *Plast Reconstr Surg* 1993; 92(6):1203.
32. McFarlane, Deyoung G, Henry RA. The design of a pedicle flap in the rat to study necrosis and its prevention. *Plast Reconstr Surgery* 1965; 35(2): 177-182.
33. Jonh Hopkins University Animal care and use. [cited oct 2009]. Disponível em URL: <http://web.jhu.edu/animalcare/procedures/survival-rodents.html#pain>.
34. Oliveira HP, Alves GES, Rezende CMF. Eutanásia em medicina veterinária. [cited oct 2009]. Disponível em URL: <http://www.ufmg.br/coep/eutanasia.pdf>.
35. Field A. *Descobrimdo a Estatística usando o SPSS*. 2<sup>nd</sup>. Porto Alegre: Artmed, 2009. 688.
36. Motta VT, Oliveira-Filho PF. *Análise de Dados Biomédicos*. Rio de Janeiro: Bookmed, 2009. 334.
37. Abla LEF, Gomes HC, Percario S, Ferreira LM. Acetylcysteine in random skin flap in rats. *Acta Cir Bras* [online] 2005; 20(2):121-123.

38. Campos H, Ferreira LM, Santos WLC, Araújo MCM. Efeitos da nicotina nos retalhos cutâneos em ratos. *Acta Cir Bras* [serial online] 2001; 16(4). Disponível em: URL: <http://scielo.br/acb>.
39. Duarte IS, Gomes HFC, Percário S, Santos PC, Scardoeli CAC, Médici CA, Ferreira LM. Efeito do Dimetil Sulfóxido na necrose da porção distal de retalhos cutâneos randômicos em ratos. *J Biomolec Med Free Rad* 1997; 3(1): 29-33.
40. EstevesJunior I, Ferreira LM, Liebano RE. Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina por iontoforese na viabilidade de retalho cutâneo randômico em ratos. *Acta Cir Bras* 2004; 19(6): 626-629.
41. Fonseca AV, Ferreira LM, Gomes HC, Percário S. Terazosin and propranolol as bolockers to the deleterious effect of nicotine in a random skin flap, in the rat. *Acta Cir Bras* [online] 2004; 19(3): 186-195.
42. Kim TK, Oh EJ, Chung JY, Park JW, Cho BC, Chung HY. The effects of botulinum toxin A on the survival of a random cutaneous flap. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2009; 62(7): 906-13.
43. Ferreira LM, Ferreira LRK. Experimental model: historic and conceptual revision. *Acta Cir Bras* 2003; 18:1-3.
44. Mahl JA, Vogel BE, Court M, Kolopp M, Roman D, Nogues V. The minipig in dermatotoxicology: methods and challenges. *Exp Toxicol Pathol* 2006; 57(5-6): 341-345.
45. Bollen P, Ellegaard L. The Göttingen minipig in pharmacology and toxicology. *Pharmacol Toxicol* 1997; 80 Suppl 2: 3-4.
46. Estevão LRM, Medeiros JP, Scognamillo-Szabó MVR, Baratell-Evêncio L, Guimarães EC, Câmara CAG, Evêncio-Neto J. Neoangiogênese de retalhos

- cutâneos em ratos tratados com óleo de copaíba. *Pesq Agropec Bras* 2009; 44(4): 406-412.
47. Minh TC, Ichioka S, Harii K, Shibata M, Ando J, Nakatsuka T. Dorsal bipedicle island skin flap: a new flap model in mice. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*. 2002; 36(5): 262-267.
48. Minh TC, Ichioka S, Nakatsuka T, Tawai J, Shibata M, Ando J, Harii K. Effect of hyperthermic preconditioning on the survival of ischemia-reperfusion skin flaps: a new skin-flap model in the mouse. *J Reconstr Microsurg*. 2002; Feb 18(2): 115-119.
49. Farooq MU, Naravetla B, Moore PW, Majid A, Gupta R, Kassab MY. Role of sildenafil in neurological disorders. *Clin Neuropharmacol* 2008; 31: 353-362.
50. Hussain IF, Brady CM, Swinn MJ, Mathias CJ, Fowler CJ. Treatment of erectile dysfunction with sildenafil citrate (Viagra) in parkinsonism due to Parkinson's disease or multiple system atrophy with observations on orthostatic hypotension. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2001; 71: 371-374.
51. Raffaele R, Vecchio I, Giammusso B, Morgia G, Brunetto MB, Rampello L. Efficacy and safety of fixed-dose oral sildenafil in the treatment of sexual dysfunction in depressed patients with idiopathic Parkinson's disease. *Eur Urol* 2002; 41: 382-386.
52. Pereira DA, Marques JA. Uso de morfina, xilazina e meloxicam para o controle da dor pós-operatória em cadelas submetidas à ovariossalpingo-histerectomia. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2009; 61(2): 353-361.
53. Lorenz HP, Longaker MT. Wound Healing: Repair Biology and Wound and Scar Treatment. *In: Mathes, SJ. Plastic Surgery (Vol. I) General Principles*. 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia: Saunders-Elsevier, 2006: 209-234.

54. Araujo ID, Barbuto RC. Fisiologia da Cicatrização. *In: Petroianu A. Clínica Cirúrgica*, Rio de Janeiro, 2001:71-79.
55. Balbino CA, Pereira LM, Curi R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Rev Bras Cien Farm* 2005; 41(1): 27-50.
56. Singer AJ, Clark RAF. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* 1999; 341:738-746.
57. Hinz B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J Invest Dermatol* 2007; 127(3): 526-537.
58. Mélega JM, Freitas AG. *In: Mélega JM. Cirurgia Plástica Fundamentos e Arte, Princípios Gerais*. Rio de Janeiro: MEDSI, 2002: 9-14.
59. Mauad-Júnior RJ. Cicatrização de Feridas. *In: Carreirão S, Cardim V, Goldenberg D. Cirurgia Plástica*. São Paulo: Atheneu, 2005: 139-142.
60. Moustakas A, Pardali K, Gaal A, Heldin CH. Mechanisms of TGF- $\beta$  signaling in regulation of cell growth and differentiation. *Immunol Lett* 2002; 82: 85-91.
61. Akira S, Taga T, Kishimoto T. Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv Immunol* 1993; 54:1-78.
62. Mateo RB, Jonathan SR, Jorge EA. Interleukin-6 activity in wounds. *Am J Physiol* 1994; 266: 1840-1844.
63. Jenkins JK, Malyak M, Arend WP. The effects of interleukin-10 on interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 beta production in human monocytes and neutrophil. *Lymphokine Cytokine Res* 1994; 13(1):47-54.
64. Wallis RM, Corbin JD, Francis SH, Ellis P. Tissue distribution of phosphodiesterase families and the effects of sildenafil on tissue cyclic nucleotides, platelet function, and the contractile responses of trabeculae carneae and aortic rings in vitro. *Am J Cardiol* 1999; 83: 3C-12C.

65. Zesiewicz TA, Helal M, Hauser RA. Sildenafil Citrate (Viagra) for the treatment of erectile dysfunction in men with Parkinson's disease. *Mov Disord* 2000; 15(2): 305-308.

## **9- ANEXO:**

### 9.1 - Revisão da literatura:

#### 9.1.1 - Mecanismos envolvidos no reparo tecidual:

Os mecanismos envolvidos no complexo mecanismo de reparo tecidual são amplos e ainda suscitam pesquisas. Fundamentalmente, eles englobam três fases: a inflamação, a proliferação celular e a remodelação. Para cada uma dessas etapas, uma série de mediadores químicos e de fatores de crescimento está relacionada <sup>54</sup>.

Danos teciduais, de natureza química, física ou biológica, são considerados os precursores para a liberação de substâncias que, em última análise irão sinalizar a resposta tissular, seja por meio do recrutamento de mediadores pré-formados (provenientes de mastócitos, de basófilos, de plaquetas e de células pré-sinápticas), ou sintetizados após o estímulo desencadeante (como, por exemplo, o fator ativador de plaquetas). Essas substâncias, associadas a alterações no microambiente (como a presença de radicais livres, de acidez e de baixas tensões de oxigênio) são, em etapa posterior, responsáveis pela liberação de eicosanóides, citocinas, fatores de crescimento e neuropeptídeos, bem como pelo estímulo para as células endoteliais apresentarem proteínas de adesão <sup>53</sup>.

A cicatrização não ocorre em etapas estanques; porém, em processos que se sobrepõem, alternando reações anabólicas e catabólicas, que têm os leucócitos como os principais maestros <sup>54</sup>.

Imediatamente após a lesão, ocorre uma vasoconstrição transitória associada, em linhas gerais, a formação de um trombo rico em plaquetas, que tampona a lesão endotelial. Posteriormente, esse trombo é infiltrado pela fibrina (formada pela conversão da trombina, sob ação do fibrinogênio) e por eritrócitos, constituindo não somente uma barreira física para limitar a perda de células circulatórias, mas principalmente uma matriz provisória, que provém base para a iniciação do processo de deposição celular<sup>53</sup>.

As plaquetas presentes no trombo se degranulam, liberando na ferida vários fatores da inflamação, dentre os quais se destacam o Fator Transformador de Crescimento, o Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas, o Peptídeo III Ativador de Quimiocinas do Tecido Conjuntivo, além de proteínas como o fibrinogênio, a tromboplastina e a fibronectina. Essas substâncias são responsáveis pelo aumento da população celular, da qual os neutrófilos constituem cerca de 50% das células, após 24 horas de ocorrido a lesão tecidual<sup>53, 55</sup>.

Durante a fase inflamatória, o gradiente de migração celular é retroalimentado positivamente, uma vez que a liberação de substâncias quimiotáticas pelas células constitui um forte estímulo para o aumento de neutrófilos, monócitos e fibroblastos. A fase inflamatória dura cerca de três dias e, nas primeiras 24 a 48 horas após a lesão há um grande afluxo de neutrófilos para a ferida, seguindo-se de um aporte maior de macrófagos durante os dois a três dias seguintes<sup>53, 55, 56</sup>.

O papel dos neutrófilos na ferida é a fagocitose de microorganismos. Por outro lado, os macrófagos têm um papel crítico no reparo tecidual e, além de auxiliarem os neutrófilos na fagocitose, são responsáveis pela apresentação dos peptídeos do complexo maior de histocompatibilidade ao sistema imune. Além disso, os macrófagos produzem e exportam mediadores lipídicos (eicosanóides), mediadores peptídicos (citocinas e fatores de crescimento), fatores de coagulação, frações do complemento,

colagenases e matriz de metaloproteases. Sob a ação conjunta de macrófagos, de derivados de monócitos e de mediadores químicos por eles liberados, intensifica-se a migração de fibroblastos das bordas da ferida<sup>54, 56</sup>.

Conseqüentemente, a matriz extracelular, que inicialmente era formada por proteínas derivadas do plasma e das plaquetas, passa a ser secretada por células típicas da fibroplasia, como os macrófagos e os fibroblastos. Substâncias como a fibronectina, cuja função é a fixação dos fibroblastos, e o ácido hialurônico, que aumenta a resistência do tecido à compressão, em função de sua forte ligação com a água, predominam na matriz durante as fases iniciais do reparo. Entretanto, à medida que a maturação cicatricial ocorre, há diminuição na síntese de ácido hialurônico e aumento da concentração de ácido hialurônico e de glicosaminoglicanas sulfatadas, constituindo um microambiente favorável para a fixação celular e, conseqüentemente, a sua diferenciação para fenótipos mais maduros. Associadamente ocorre aumento da síntese de colágeno, que substitui a proteoglicana e a fibronectina, até se tornar o principal componente da matriz extracelular<sup>53, 54, 56</sup>.

A formação das fibras colágenas está intimamente relacionada ao amadurecimento fenotípico dos fibroblastos e é influenciada por alterações no microambiente de oxigênio. Se no início do processo a baixa tensão de oxigênio estimula a migração celular, a síntese de fatores de crescimento e a angiogênese; na fibroplasia, altas tensões são necessárias para a hidroxilação da prolina e da lisina do colágeno. Concomitantemente, em função do seu amadurecimento fenotípico, os fibroblastos passam a apresentar características funcionais semelhantes aos músculos lisos, participando do mecanismo de contração das feridas<sup>53, 57</sup>.

A migração de células epiteliais se inicia a partir do fenômeno conhecido como perda da “inibição por contato”. Uma vez estabelecida a lesão, células com potencial mitótico em latência, situadas na camada basal da epiderme, iniciam o processo de divisão celular e migram a partir dos bordos da ferida. Esse processo de migração é estimulado pela presença de uma superfície úmida e oxigenada <sup>58, 59</sup>.

O processo de remodelação da ferida se caracteriza por etapas sucessivas de síntese, degradação e orientação das fibras colágenas. Se, inicialmente, as fibras de colágeno são dispostas de maneira aleatória, após a ação da colagenase, sua disposição obedece ao sentido do tecido conjuntivo adjacente, tornando-se mais resistentes em função do estabelecimento de ligações covalentes transversais. A partir daí, em condições fisiológicas, essas fibras colágenas sofrem repetidos processos de síntese, lise, redirecionamento e de restabelecimento das ligações covalentes, resultando na formação de uma cicatriz cada vez mais regular <sup>53, 58, 59</sup>.

#### 9.1.2 - Mediadores intervenientes no reparo:

Uma grande variedade de mediadores incrementa os mecanismos de reparo tecidual, evidenciado uma relação de interdependência entre as etapas da cicatrização <sup>53, 54, 58, 59</sup>.

Durante a fase inflamatória, a Interleucina-1, a Interleucina-6, a Interleucina-10, o Fator de Necrose Tecidual  $\alpha$ , o Fator de Transformação de Crescimento  $\beta_1$ , o Fator de Crescimento derivado de Plaquetas, dentre outros mediadores, atuam sobre os receptores de células endoteliais, induzindo a síntese de óxido nítrico (NO) e de substâncias quimioatraentes, além de estimular a expressão de moléculas de adesão para neutrófilos. A expressão dessas moléculas é considerada o fator mais importante para a

migração leucocitária, uma vez que, mesmo existindo um gradiente de mediadores químicos, se elas não forem expressas pelo endotélio, não ocorrerá o aporte dessas células para o exterior do vaso<sup>53, 55</sup>.

O Fator de Transformação de Crescimento  $\beta_1$  além de atuar na quimiotaxia de neutrófilos, macrófagos e fibroblastos, exerce ação no seu mecanismo de retroalimentação positiva, uma vez que esse peptídeo induz sua própria síntese a partir de vários tipos celulares<sup>53, 60</sup>. A Interleucina-6 também apresenta ação sobre a migração de neutrófilos e, em fases mais tardias, na indução mitótica sobre os queratinócitos<sup>61, 62</sup>. A Interleucina-10 tem função atenuadora e limitadora na inflamação, inibindo a migração de neutrófilos e de macrófagos a ferida, além de regular a diferenciação de células imunológicas, de queratinócitos e de células endoteliais<sup>63</sup>.

No final da fase inflamatória, as células endoteliais passam a expressar sinalizadores para a transmigração de monócitos, que de maneira semelhante aos neutrófilos, atravessam os vasos e se depositam no interstício, assumindo o fenótipo de macrófagos derivados de monócitos. Dentre os sinalizadores que atuam nessa etapa, citam-se o Fator de Transformação do Crescimento  $\beta$ , o Fator de Crescimento derivado de Plaquetas e o Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$ .<sup>53, 54, 60</sup>

A fibroplasia é caracterizada pela formação de um tecido de granulação frouxo, rico em colágeno tipo I e tipo II, ácido hialurônico, fibronectina e fibroblastos. Esses últimos recebem estímulo mitogênico e quimioatraente do Fator de Transformação do Crescimento  $\beta$ , que também exerce papel sobre a angiogênese<sup>53, 55, 57</sup>.

Muitos dos mediadores que atuam na fibroplasia apresentam também atividade angiogênica. Dentre eles, destaca-se a Proteína 1 Químioatraente de Monócitos, que exerce papel fundamental na cicatrização, o Fator de Crescimento de Endotélio Vascular e os Fatores de Crescimento de Fibroblastos<sup>53,55</sup>.

Caracteristicamente, vários são os mediadores que participam da epitelização, tais como a Interleucina-8, o Fator de Crescimento de Endotélio Vascular, o Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos e de Granulócitos, o Fator de Crescimento de Queratinócitos e o Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$ <sup>54,55</sup>.

Dessa maneira, de um modo abrangente, a ação dos mediadores intervenientes no complexo processo de reparo ainda é um assunto que desperta novas pesquisas. Dependendo de cada etapa, a resposta a essas substâncias poderá estimular ou prejudicar a evolução da cicatriz, sendo necessária, mediante qualquer intervenção, a análise cronológica e fisiológica do mecanismo de reparo<sup>53,55,58,59</sup>.

### 9.1.3 - Cobertura tecidual de feridas – um desafio histórico:

A cobertura tecidual, realizada com o uso de retalhos ou de enxertos, ainda representa um desafio para os cirurgiões. A escolha da tática cirúrgica adequada depende de fatores como a extensão da ferida, a existência de área doadora adequada e a presença de nervos, vasos e tendões a serem preservados. Nesse contexto, a viabilidade dos retalhos é o fator primordial no planejamento cirúrgico, principalmente quando se torna necessária a confecção de retalhos randômicos<sup>4,5</sup>.

Muitas condições podem influenciar a viabilidade tecidual, incluindo a ausência de fluxo sanguíneo arterial, a congestão venosa, a presença de edema crônico e a formação de hematoma. Ademais, a necrose completa ou parcial dos retalhos pode resultar na formação de feridas crônicas, instáveis e até mesmo em úlceras de Marjolin, além de contratura com conseqüente limitação da mobilidade articular<sup>53, 58, 59</sup>.

Alterações fisiopatológicas desencadeadas pela diminuição do aporte vascular podem comprometer a perfusão tecidual, de modo que áreas de isquemia podem se tornar completamente avasculares e necróticas, caso não haja uma intervenção<sup>4, 7</sup>.

Vários tratamentos foram testados com o objetivo de melhorar a sobrevivência de retalhos cutâneos, incluindo o uso de substâncias vasodilatadoras e anti-inflamatórias, de oxigenioterapia hiperbárica, de autonomização prévia e de fatores de crescimento isolados ou associados ao sildenafil<sup>8-10, 14-16, 19-22</sup>.

Duas características específicas do sildenafil sugerem que essa substância possa aumentar a viabilidade de retalhos. Inicialmente, o sildenafil parece diminuir a agregação plaquetária, sem interferir na sua degranulação, e conseqüentemente diminuir a trombogênese. Por outro lado, esse fármaco apresenta efeito específico sobre as células musculares lisas vasculares, provocando vasodilação pela via da GMPc.<sup>24, 25, 27,</sup>

64.

#### 9.1.4 - Sildenafil – recurso ancilar para a cicatrização de feridas?

O sildenafil é um inibidor específico da fosfodiesterase tipo 5. A inibição dessa enzima provoca aumento dos níveis de guanosina monofosfato cíclica nas células musculares lisas vasculares, resultando em vasodilatação mediada pelo óxido nítrico, elevação do fluxo sanguíneo e do aporte de oxigênio. O óxido nítrico influencia o reparo tecidual em vários estágios, incluindo a angiogênese, a fase inflamatória, a proliferação celular, a deposição da matriz e a remodelação, além de atuar na proliferação e migração epitelial<sup>24-29</sup>.

A guanosina monofosfato cíclica atua também na regulação dos canais iônicos celulares e no controle da apoptose celular. Isso ocorre, porque a concentração intracelular de óxido nítrico, assim como de outras substâncias responsáveis pela homeostase tissular, não podem apresentar grandes variações. Níveis de óxido nítrico insuficientes causam debilidade de cicatrização, enquanto, em grande quantidade, o óxido nítrico passa a comandar mecanismos de apoptose celular, a exemplo dos que ocorrem no infarto do miocárdio, no acidente vascular cerebral e em outras condições isquêmicas associadas ao aporte de radicais livres, como nas feridas crônicas. Altas concentrações de óxido nítrico apresentam também correlação com o choque tóxico e com o aumento dos níveis do Fator de Necrose Tecidual<sup>24,25</sup>.

O conceito de que “óxido nítrico seja uma molécula sinalizadora do sistema cardiovascular”, que rendeu ao Dr. Robert F. Furchgott o Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina, pode ser considerado a pedra angular para a formulação do sildenafil. Os conceitos de Furchott permitiram o estabelecimento dos mecanismos de ação intra e intercelulares do óxido nítrico, de sua atuação na neurotransmissão, além de seus efeitos como mediador inflamatório<sup>25</sup>. Nesse contexto, fármacos que aumentam o aporte tecidual de óxido nítrico podem ser utilizados para o tratamento da hipertensão

pulmonar, provocando vasodilatação e prevenindo a formação de trombos, como também, no controle de pacientes com acometimento neurológico, incluindo o Mal de Alzheimer, a Doença de Parkinson e o acidente vascular cerebral <sup>24, 25, 27-29, 49, 51, 65</sup>.

O aporte de óxido nítrico está diminuído em comorbidades como o diabetes, a desnutrição e em pacientes usuários de corticoesteróides – condições normalmente associadas à dificuldade de cicatrização. Nessas condições, a debilidade na formação de um novo tecido está associada à diminuição do óxido nítrico nos fluidos corporais, o que resulta em última instância, na deficiência na formação do colágeno e na remodelação tecidual <sup>25, 28, 29</sup>.