

**DANIELE TANURI PACE**

**EFEITO DE SUBSTÂNCIAS ANTIOXIDANTES (VITAMINA C,  
VITAMINA E e *GINGKO BILOBA*) NA VIABILIDADE DE RETALHO  
CUTÂNEO DORSAL EM RATOS**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do grau acadêmico de Mestre.**

**Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Ligocki Campos**

**Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Ruth Graf**

**Coordenador: Prof. Dr. Antônio Carlos Ligocki Campos**

**CURITIBA  
2002**

Pace, Daniele Tanuri

Efeito de substâncias antioxidantes (Vitamina C, Vitamina E e *Gingko biloba*) na viabilidade de retalho cutâneo dorsal em ratos. / Daniele Tanuri Pace. Curitiba, 2002.

xvii, 85 f.

Effect of antioxidants ( Vitamin C, Vitamin E and *Gingko biloba*) on the viability of dorsal skin flaps in rats.

Tese (Mestrado)- Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Área de concentração: Clínica Cirúrgica

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Ligocki Campos

1. Experimental 2. Ratos 3. Antioxidantes 4. Retalhos cutâneos cirúrgicos 5. Neovascularização I. Título



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA CIRÚRGICA  
NÍVEL MESTRADO - DOUTORADO

**PARECER CONJUNTO DA COMISSÃO EXAMINADORA  
DA AVALIAÇÃO DE  
TESE/DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

Aluna: **DANIELE TANURI PACE**

Título da Dissertação: **"EFEITO DE SUBSTÂNCIAS ANTIOXIDANTES ( VITAMINA C, VITAMINA E e GINGKO BILOBA) NA VIABILIDADE DE RETALHO CUTÂNEO DORSAL EM RATOS"**

**CONCEITOS EMITIDOS:**

<i>Profa. Dra. Lydia Massako Ferreira</i>	- Conceito emitido	<b>A</b>	Equivalência	<b>9,5</b>
<i>Profa. Dra. Lucia de Noronha</i>	- Conceito emitido	<b>A</b>	Equivalência	<b>9,5</b>
<i>Prof. Dr. Jorge Rufino Ribas Timi</i>	- Conceito emitido	<b>A</b>	Equivalência	<b>9,5</b>

Conceito Final de Avaliação:

**APROVADA COM CONCEITO A, EQUIVALÊNCIA 9,5**

Curitiba, 16 de junho de 2003

**Profa. Dra. Lydia Massako Ferreira**

**Profa. Dra. Lucia de Noronha**

**Prof. Dr. Jorge Rufino Ribas Timi**

Dedico esta dissertação

Aos meus pais por me darem força em todos os momentos de minha vida

Às minha irmãs, Gisa e Dati, por me ajudarem a desenvolver este trabalho

Aos meus amigos pelo incentivo nos momentos difíceis.

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. ANTÔNIO CARLOS LIGOCKI CAMPOS, Coordenador do programa de Pós-graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná, UFPR, orientador e incentivador deste trabalho, pela paciência e apoio.

À Professora Dra. RUTH GRAF, professora substituta da Disciplina de Cirurgia Plástica da Universidade Federal do Paraná, pelo constante incentivo, atenção e carinho em todos os momentos da elaboração desta dissertação.

Ao Professor Dr. ALFREDO BENJAMIN DUARTE DA SILVA, professor da Disciplina de Técnica Operatória da Pontifícia Universidade Católica, PUC, pela orientação durante a realização do trabalho experimental.

À Professora Dra. LÚCIA DE NORONHA, professora adjunta do Departamento de Patologia Médica da Universidade Federal do Paraná, UFPR, e Doutora em Dermatologia, pela ajuda na descrição e interpretação das peças histológicas.

Aos Professores ALCIDES FLORIANI, professor adjunto do Departamento de Anatomia da Universidade Tuiuti do Paraná, UTP, e AIRTON CEZAR PEREIRA, professor adjunto do Departamento de Fisiologia da Universidade Tuiuti do Paraná, UTP, pela ajuda e pelo espaço para a realização deste trabalho.

À Professora MARGARETH BOGUSZEWSKI, pela ajuda na realização dos gráficos.

Ao Professor Dr. HANS GRAF, professor da Disciplina de Endocrinologia da Universidade Federal do Paraná, UFPR, pela ajuda na tradução dos textos.

Às minha irmãs, GISELE e GRACIELE TANURI PACE, pela coragem e auxílio em todas as etapas do experimento.

À secretária MARLEI VIEIRA RIBEIRO, pela dedicação no Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná, UFPR.

À bióloga ANA PAULA CAMARGO MARTINS, técnica responsável pelo Laboratório de Patologia Experimental da PUC, pela atenção e confecção das lâminas histológicas.

À estatística MÁRCIA OLANDOSKI ERBANO, pela interpretação dos dados do trabalho e paciência nos momentos de dificuldade.

Meus agradecimentos se estendem a todos que participaram em alguma etapa da elaboração da dissertação.

“ Ninguém pode construir em teu lugar  
as pontes que precisarás passar para  
atravessar o rio da vida – ninguém, exceto tu, só tu. ”

Friedrich Wilhelm Nietzsche

## SUMÁRIO

	<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>viii</b>
	<b>LISTA DE GRÁFICOS.....</b>	<b>x</b>
	<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>xi</b>
	<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>xii</b>
	<b>LISTA DE SIGLAS.....</b>	<b>xiv</b>
	<b>LISTA DE SÍMBOLOS.....</b>	<b>xv</b>
	<b>RESUMO.....</b>	<b>xvi</b>
	<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xvii</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1	OBJETIVOS.....	4
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>5</b>
2.1	MODELO DE RETALHO CUTÂNEO.....	6
2.2	SUBSTÂNCIAS QUE ALTERAM A VIABILIDADE DO RETALHO CUTÂNEO.....	9
2.3	PROCESSO NATURAL DE PEROXIDAÇÃO.....	14
2.4	SUBSTÂNCIAS ANTIOXIDANTES.....	18
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODO.....</b>	<b>22</b>
3.1	AMOSTRA.....	23
3.2	ANESTESIA.....	24
3.3	PROCEDIMENTO CIRÚRGICO.....	25
3.4	PÓS-OPERATÓRIO.....	27
3.5	ADMINISTRAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS ANTIOXIDANTES.....	27
3.5.1	Grupo controle.....	27
3.5.2	Grupo Vitamina C.....	27
3.5.3	Grupo Vitamina E.....	28
3.5.4	Grupo <i>Gingko biloba</i> .....	28
3.6	AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA.....	29



3.6.1	Planimetria digital.....	29
3.7	AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA.....	30
3.7.1	Estudo histológico.....	30
3.7.1.1	Análise histológica da neovascularização do retalho.....	32
3.7.1.2	Determinação quantitativa da neovascularização do retalho.....	32
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	33
3.8.1	Áreas do retalho.....	34
3.8.2	Índice de Viabilidade do Retalho.....	34
3.8.3	Neovascularização.....	34
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>35</b>
4.1	AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA DO RETALHO.....	36
4.1.1	Grupo controle.....	36
4.1.2	Grupo Vitamina C.....	38
4.1.3	Grupo Vitamina E.....	40
4.1.4	Grupo <i>Gingko biloba</i> .....	42
4.2	PLANIMETRIA DIGITAL.....	44
4.2.1	Avaliação da área do retalho cutâneo.....	44
4.3	ESTUDO HISTOLÓGICO.....	48
4.3.1	Avaliação histológica.....	48
4.3.1.1	Aspecto histológico da neovascularização do retalho no grupo controle.....	48
4.3.1.2	Aspecto histológico da neovascularização do retalho no grupo Vitamina C no dia 14.....	50
4.3.1.3	Aspecto histológico da neovascularização do retalho no grupo Vitamina E no dia 14.....	51
4.3.1.4	Aspecto histológico da neovascularização do retalho no grupo <i>Gingko biloba</i> no dia 14.....	53
4.3.2	Quantificação da neovascularização do retalho.....	54
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>58</b>
5.1	MODELO EXPERIMENTAL.....	59

5.1.1	Animal.....	59
5.1.2	Tipo de retalho.....	59
5.2	<b>SUBSTÂNCIAS ANTIOXIDANTES.....</b>	61
5.3	<b>VIABILIDADE DO RETALHO CUTÂNEO.....</b>	63
5.4	<b>HISTOLOGIA E MORFOMETRIA.....</b>	66
5.4.1	Método realizado.....	66
5.4.2	Resultados obtidos.....	67
6	<b>CONCLUSÕES.....</b>	70
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	72
	<b>ANEXOS.....</b>	81

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – DORSO DO RATO COM DEMARCAÇÃO DO RETALHO.....	25
FIGURA 2 – PEDÍCULO DO RETALHO DORSAL DE BASE CAUDAL.....	26
FIGURA 3 – DETALHE DO RETALHO APÓS SÍNTESE EM RATO DO GRUPO CONTROLE.....	26
FIGURA 4 – ADMINISTRAÇÃO INTRAPERITONEAL DE SUBSTÂNCIA ANTIOXIDANTE.....	28
FIGURA 5 – CÓPIA DA ÁREA POR APOSIÇÃO PARA PLANIMETRIA DIGITAL.....	29
FIGURA 6 – FRAGMENTO RETIRADO PARA BIÓPSIA.....	31
FIGURA 7 – CORTE HISTOLÓGICO DO RETALHO CUTÂNEO NO DIA 14 DO RATO DO GRUPO VITAMINA E, TG, 100 X.....	32
FIGURA 8 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA TÉCNICA DE VARREDURA.....	33
FIGURA 9 – RETALHO DO RATO DO GRUPO CONTROLE NO DIA 1.....	36
FIGURA 10 – RETALHO DO RATO DO GRUPO CONTROLE NO DIA 7.....	37
FIGURA 11 – RETALHO DO RATO DO GRUPO CONTROLE NO DIA 14.....	37
FIGURA 12 – RETALHO DO RATO DO GRUPO VITAMINA C NO DIA 1.....	38
FIGURA 13 – RETALHO DO RATO DO GRUPO VITAMINA C NO DIA 7.....	39
FIGURA 14 – RETALHO DO RATO DO GRUPO VITAMINA C NO DIA 14.....	39
FIGURA 15 – RETALHO DO RATO DO GRUPO VITAMINA E NO DIA 1.....	40
FIGURA 16 – RETALHO DO RATO DO GRUPO VITAMINA E NO DIA 7.....	41
FIGURA 17 – RETALHO DO RATO DO GRUPO VITAMINA E NO DIA 14.....	41
FIGURA 18 – RETALHO DO RATO DO GRUPO <i>GINGKO BILOBA</i> NO DIA 1.....	42
FIGURA 19 – RETALHO DO RATO DO GRUPO <i>GINGKO BILOBA</i> NO DIA 7.....	43
FIGURA 20 – RETALHO DO RATO DO GRUPO <i>GINGKO BILOBA</i> NO DIA 14.....	43
FIGURA 21 – CORTE HISTOLÓGICO DO RETALHO CUTÂNEO NO DIA 14 EM RATO DO GRUPO CONTROLE, HE, 100 X.....	49
FIGURA 22 – CORTE HISTOLÓGICO DO RETALHO CUTÂNEO NO DIA 14 EM RATO DO GRUPO CONTROLE, TG, 100 X.....	49

FIGURA 23 – CORTE HISTOLÓGICO DO RETALHO CUTÂNEO NO DIA 14 EM RATO DO GRUPO VITAMINA C, HE, 100 X.....	50
FIGURA 24 – CORTE HISTOLÓGICO DO RETALHO CUTÂNEO NO DIA 14 EM RATO DO GRUPO VITAMINA C, TG, 100 X.....	51
FIGURA 25 – CORTE HISTOLÓGICO DO RETALHO CUTÂNEO NO DIA 14 EM RATO DO GRUPO VITAMINA E, HE, 100 X.....	52
FIGURA 26 – CORTE HISTOLÓGICO DO RETALHO CUTÂNEO NO DIA 14 EM RATO DO GRUPO VITAMINA E, TG, 100 X.....	52
FIGURA 27 – CORTE HISTOLÓGICO DO RETALHO CUTÂNEO NO DIA 14 EM RATO DO GRUPO <i>GINGKO BILOBA</i> , HE, 100 X.....	53
FIGURA 28 – CORTE HISTOLÓGICO DO RETALHO CUTÂNEO NO DIA 14 EM RATO DO GRUPO <i>GINGKO BILOBA</i> , TG, 100 X.....	54

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – ÁREAS DO RETALHO NO GRUPO CONTROLE NO DIA 14.....	44
GRÁFICO 2 – ÁREAS DO RETALHO NO GRUPO VITAMINA C NO DIA 14.....	45
GRÁFICO 3 – ÁREAS DO RETALHO NO GRUPO VITAMINA E NO DIA 14.....	45
GRÁFICO 4 – ÁREAS DO RETALHO NO GRUPO GINGKO BILOBA NO DIA 14.....	46
GRÁFICO 5 – PORCENTAGEM DAS ÁREAS DE VIABILIDADE DOS RETALHOS NO DIA 14....	47
GRÁFICO 6 – IVR DOS RETALHOS NO DIA 14.....	48
GRÁFICO 7 – NÚMERO DE VASOS NA ÁREA NORMAL NÃO DESCOLADA ADJACENTE AO RETALHO E NA ÁREA DO RETALHO NO GRUPO CONTROLE NO DIA 14.....	55
GRÁFICO 8 – NÚMERO DE VASOS NAS ÁREAS NÃO DESCOLADAS ADJACENTES AOS RETALHOS NO DIA 14.....	56
GRÁFICO 9 – NÚMERO DE VASOS NAS ÁREAS DOS RETALHOS NO DIA 14.....	57

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – COMPOSIÇÃO DA RAÇÃO PARA RATOS NUVILAB CR1® (NUVITAL).....	24
TABELA 2 – ÁREAS DE VIABILIDADE EM TODOS OS GRUPOS.....	46
TABELA 3 – NÚMERO DE VASOS NO RETALHO EM TODOS OS GRUPOS .....	56
TABELA 4 – DOSES DAS SUBSTÂNCIAS ANTIOXIDANTES DE ACORDO COM O PESO DE CADA ANIMAL EM TODOS OS GRUPOS.....	82
TABELA 5 – ÁREA TOTAL, DE VIABILIDADE E NECROSE NOS RETALHOS NO GRUPO CONTROLE.....	82
TABELA 6 – ÁREA TOTAL, DE VIABILIDADE E NECROSE NOS RETALHOS NO GRUPO VITAMINA C.....	83
TABELA 7 – ÁREA TOTAL, DE VIABILIDADE E NECROSE NOS RETALHOS NO GRUPO VITAMINA E.....	83
TABELA 8 – ÁREA TOTAL, DE VIABILIDADE E NECROSE NOS RETALHOS NO GRUPO GINGKO BILOBA.....	83
TABELA 9 – VALORES DE P NOS GRUPOS SOB COMPARAÇÃO.....	83
TABELA 10 – VALORES PERCENTUAIS DA ÁREA DE VIABILIDADE EM TODOS OS GRUPOS.....	84
TABELA 11 – VALORES DE P EM RELAÇÃO AO ÍNDICE DE VIABILIDADE DO RETALHO NOS GRUPOS SOB COMPARAÇÃO.....	84
TABELA 12 – VALORES DE ÍNDICE DE VIABILIDADE DO RETALHO EM TODOS OS GRUPOS.....	84
TABELA 13 – NÚMERO DE VASOS NA ÁREA NÃO DESCOLADA ADJACENTE AO RETALHO E NA ÁREA DO RETALHO NO GRUPO CONTROLE.....	84
TABELA 14 – NÚMERO DE VASOS NA ÁREA NÃO DESCOLADA ADJACENTE AO RETALHO E NA ÁREA DO RETALHO NO GRUPO VITAMINA C.....	85
TABELA 15 – NÚMERO DE VASOS NA ÁREA NÃO DESCOLADA ADJACENTE AO RETALHO E NA ÁREA DO RETALHO NO GRUPO VITAMINA E.....	85
TABELA 16 – NÚMERO DE VASOS NA ÁREA NÃO DESCOLADA ADJACENTE AO RETALHO E NA ÁREA DO RETALHO NO GRUPO GINGKO BILOBA....	85
TABELA 17 – VALORES DE P EM RELAÇÃO AO NÚMERO DE VASOS NOS RETALHOS NOS GRUPOS SOB COMPARAÇÃO.....	85

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ATP:** adenina trifosfato

**bpm:** bytes per minute

**cm:** centímetro

**cm<sup>2</sup>:** centímetro quadrado

**Cols:** colaboradores

**Corp.:** corporação

**DNA:** ácido desoxi-ribonucleico

**dpi:** dots per inch

**Dr.:** Doutor

**Dr<sup>a</sup>.:** Doutora

**Er:Yag:** Erbium:Yttrium Aluminum Garnet

**g:** grama

**h:** hora

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** peróxido de hidrogênio

**HE:** hematoxilina-eosina

**IM:** via intramuscular

**IP:** via intraperitoneal

**IV:** via intravenosa

**IVR:** Índice de Viabilidade do Retalho

**Kg:** quilograma

**LDH:** lactato desidrogenase

**mg:** miligrama

**min:** minuto

**ml:** mililitro

**mm:** milímetro

**NADPH:** nicotinamida adeninadinucleotídio fosfatase oxidase

**O<sub>2</sub><sup>-</sup>:** superóxido

**OH:** hidroxila

**Prof.:** Professor

**Prof<sup>a</sup>:** Professora

**TG:** tricrômio de Gomori

**UI:** unidade internacional

**VO:** via oral



## LISTA DE SIGLAS

**COBEA:** Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

**Laser:** empréstimo da sigla de língua inglesa *Laser* (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*)

**PUC:** Pontifícia Universidade Católica

**UFPR:** Universidade Federal do Paraná

**UTP:** Universidade Tuiuti do Paraná

## LISTA DE SÍMBOLOS

%: percentagem

<: menor que

=: igual que

≤: menor ou igual

±: mais ou menos

*n*: número de amostra

*p*: nível de probabilidade

*x*: por (descrição de área)

*X*: vezes (aumento no microscópio)

## RESUMO

O uso de substâncias antioxidantes têm sido relacionado à menor formação de radicais livres e consequentemente, menor dano tecidual em situações de hipóxia. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de substâncias antioxidantes (vitamina C, vitamina E e *Gingko biloba*), intraperitonealmente, na viabilidade de retalho cutâneo dorsal em ratos. Foram utilizados 24 ratos da linhagem Wistar, distribuídos em 4 grupos de 6 ratos cada, correspondentes aos grupos controle, Vitamina C, Vitamina E e *Gingko biloba*. O retalho cutâneo foi desenhado no dorso de cada rato, medindo 10 x 3 cm, com pedículo caudal. No grupo controle, foi aplicado 1 ml de solução fisiológica 0,9% após 24 horas da <sup>realização</sup> confecção do retalho, intraperitonealmente por 6 dias consecutivos. No grupo Vitamina C foi aplicado vitamina C na dose 340 mg/kg de 12/12 horas, no grupo Vitamina E, foi aplicado vitamina E na dose 20 mg/kg 1x/dia e no grupo *Gingko biloba*, foi aplicado *Gingko biloba* na dose de 100 mg/kg 1x/dia, todos intraperitonealmente por 6 dias consecutivos. No décimo-quarto dia do experimento, foi realizada planimetria digital, na qual foram avaliadas a área total, área viável e área de necrose dos retalhos. A avaliação histológica foi realizada mediante biópsia da área viável para quantificar a neovascularização do retalho. No dia 14, a planimetria digital revelou que a viabilidade do retalho no grupo controle foi  $65,93 \pm 1,49 \%$ , no grupo Vitamina C foi  $78,05 \pm 5,38 \%$  ( $p = 0,0039$ ), no grupo Vitamina E foi  $75,08 \pm 7,54 \%$  ( $p = 0,0161$ ) e no grupo *Gingko biloba* foi  $72,16 \pm 5,40 \%$  ( $p = 0,0245$ ). Histologicamente, os retalhos apresentam aumento do número de vasos em todos os grupos, sendo que no grupo controle foi  $17,33 \pm 3,88$ , no grupo Vitamina C foi  $37,33 \pm 4,08$ , no grupo Vitamina E foi  $27,17 \pm 3,25$  e no grupo *Gingko biloba* foi  $37,17 \pm 9,38$ . Conclui-se que a viabilidade do retalho cutâneo dorsal em ratos é maior nos grupos que receberam substâncias antioxidantes e a neovascularização do retalho está aumentada em todos os grupos porém mais pronunciada nos grupos que receberam as substâncias antioxidantes.

Palavras-chaves: Experimental, Ratos, Antioxidantes, Retalhos Cutâneos Cirúrgicos, Neovascularização.

## ABSTRACT

The use of antioxidants has been related with less free radicals formation and consequently less tissular injury in hipoxia conditions. The goals of this study were to evaluate the effects of antioxidants (vitamin C, vitamin E and *Gingko biloba*) intraperitoneally on the viability of dorsal skin flap in rats. Twenty-four Wistar rats were studied and divided into 4 groups of 6 animals each, according to the given antioxidants Vitamin C, Vitamin E and *Gingko biloba*, and a control group given normal saline. A 10 x 3 cutaneous flap, was drawn over the dorsal portion of each animal, with caudal base. After 24 hours of the procedure, the control group received 1 ml of normal saline, the Vitamin C group received vitamin C 340 mg/kg 12/12 hours, the Vitamin E group received vitamin E 20 mg/kg/day and the *Gingko biloba* group received 100 mg/kg/day intraperitoneally for 6 days. On day 14, digital planimetry was performed to determine the total area, living and necrosis area of the flaps. Histological studies were performed through by biopsy of the living area, counting the neovascularity of the flap. On day 14, the viability of the flap in the control group was  $65,93 \pm 1,49 \%$ , Vitamin C group was  $78,05 \pm 5,38 \%$  ( $p = 0,0039$ ), Vitamin E group was  $75,08 \pm 7,54 \%$  ( $p = 0,0161$ ) and the *Gingko biloba* group was  $72,16 \pm 5,40 \%$  ( $p = 0,0245$ ). Histologically, the flaps showed a great number of vessels in all groups. The number of vessels in the flap of the control group was  $17,33 \pm 3,88$ , Vitamin C group was  $37,33 \pm 4,08$ , the Vitamin E group was  $27,17 \pm 3,25$  and the *Gingko biloba* group was  $37,17 \pm 9,38$ . It is concluded that the viability of the dorsal skin flaps and the neovascularity of the flaps in rats is improved by the use of antioxidants in all groups of rats.

Key-words: Experiments, Rats, Antioxidants, Surgical skin flaps, Neovascularity.

## **1 INTRODUÇÃO**

## 1 INTRODUÇÃO

Retalhos cutâneos são muito utilizados em cirurgia plástica, tanto reconstrutora como estética. Uma das grandes preocupações pós-operatórias é a viabilidade destes retalhos, a qual depende de vários fatores, entre os quais o tamanho e a irrigação sangüínea do retalho. Várias substâncias já foram testadas com o objetivo de diminuir a área de necrose dos retalhos de pele de maneira a favorecer o resultado cirúrgico, como substâncias vasodilatadoras, anestésicos, analgésicos, enzimas, substâncias antioxidantes, ácidos, dentre outros.

As substâncias antioxidantes são defesas naturais contra os radicais livres. O estado de redução do microambiente local representa o equilíbrio entre a atividade oxidante e antioxidante e isto é chamado de nível de estresse oxidativo. Nos sítios de inflamação, as escalas são claramente favoráveis ao estresse oxidativo (ROTSTEIN, 2001). O radical livre é resultante do metabolismo normal da célula, é uma molécula com um ou mais elétrons sem par em sua órbita. Eles tendem a reagir com outras moléculas na tentativa de emparelhar seus elétrons. Este processo resulta em lesões para muitas células, que até então não apresentavam nenhuma alteração, por danificar o DNA e as proteínas. Os radicais livres têm papel importante na reperfusão do tecido isquêmico pois são produzidos em excesso em áreas isquêmicas, principalmente quando ocorre a reperfusão de tais áreas. A necrose de um retalho pode ocorrer por infecção, deiscência ou hematoma, mas a reperfusão do tecido é o principal componente de injúria porque gera os radicais livres (BULKLEY, 1993).

De acordo com LANGER (1986) e ROTSTEIN (2001), durante a injúria

tecidual, as espécies de oxigênio reativo são derivadas de duas fontes principais:

- 1) sistema xantina / xantina-oxidase, e
- 2) sistema nicotinamida adeninad nucleotídeo fosfatase oxidase (NADPH).

Estes sistemas estão relacionados ao processo de isquemia e reperfusão tecidual. A isquemia leva à formação de hipoxantina e, durante a reperfusão, a atividade da xantina-oxidase, convertendo hipoxantina em xantina, resulta na formação de superóxidos ( $O_2^-$ ) e, subseqüentemente, na formação de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) mediante ação da superoxidase dismutase. Estas moléculas apresentam reatividade limitada e ocasionam a formação de espécies mais reativas, que incluem radicais hidroxilas ( $OH^\cdot$ ) formados através da interação com ferro. As substâncias oxidantes exercem seus efeitos na inflamação em virtude da sua toxicidade celular e sobre os lipídios, exercendo toxicidade direta sobre o plasmalema e provocando alterações na integridade da membrana celular (BULKLEY, 1993, LANGER, 1986 e ROTSTEIN, 2001).

Várias substâncias são descritas como antioxidantes, como por exemplo, vitaminas, coenzima Q-10, ácido lipóico, ervas e, muitas outras que possuem a capacidade de diminuir o nível de estresse oxidativo. A capacidade antioxidante da vitamina C, também conhecida como ácido ascórbico, baseia-se na sua ação de captar e liberar o íon hidrogênio, promovendo a diminuição da formação de radicais livres e, conseqüentemente, a agressão causada por eles (MURRAY, 1989, ROCK, JACOB e BOWEN, 1996, BAR-OR, 2001). A vitamina E, conhecida também como alfa-tocoferol, é a forma mais ativa de um grupo de substâncias denominadas tocoferóis e tocotrienóis. Como função antioxidante, a vitamina E possui mecanismo de proteção da membrana plasmática celular contra a peroxidação lipídica causada pelos radicais livres formados durante a reperfusão tecidual de retalho cutâneo isquêmico (ROCK, JACOB e BOWEN, 1996, FREEDMAN e KEANEY, 2001). O *Gingko biloba* é um extrato das folhas verdes da árvore de Gingko (nativa da Ásia). Os ingredientes ativos do extrato são ginkgoflavoneglicos, bilobalide e terpenelactones, incluindo ginkgolides A, B e C. Na Ásia, o extrato das folhas do Gingko é utilizado há mais de 5.000 anos para o tratamento de doenças cardíacas e pulmonares. Sua principal ação é no sistema

circulatório, onde promove a dilatação dos capilares e melhor oxigenação dos tecidos. Possui grande efeito antioxidante atuando como carreador dos radicais superóxidos, promovendo uma maior longevidade celular e estabilização das membranas celulares. Previne a agregação plaquetária e a formação de placas ateroscleróticas nas paredes arteriais através da inibição do fator de ativação plaquetária (McCALEB, 1994, BRICKLIN, 1995, RITCH, 2000).

Alguns trabalhos já foram realizados comprovando a ação das substâncias antioxidantes sobre a viabilidade de retalhos cutâneos. Dentre eles, pode-se citar BEKERECIOGIU, TERCAN e OZYAZGAN (1998), que estudaram substâncias como a vitamina C, deferoxamine, *Gingko biloba* e vitamina E por via IM em ratos. ZACCARIA, WEINZWEIG, YOSHITAKE, MATSUDA e COHEN (1994) estudaram o efeito da vitamina C IV em dose única logo após a injúria tecidual em ratos. HAYDEN, PANIELLO, YEUNG, BELLO e DAWSON (1987) avaliaram o uso de vitamina C e E por VO e IV somente no per-operatório em ratos. FILHO, LEAL, SBALCHIERO e MARQUES (2002) estudaram o efeito do *Gingko biloba* IP por 5 dias também em ratos.

A ação das substâncias antioxidantes é bem conhecida embora existam poucos trabalhos experimentais que comprovem a sua eficácia em melhorar a viabilidade e a neovascularização nos tecidos em particular nos retalhos cutâneos.

## 1.1 OBJETIVOS

Este estudo tem por objetivo analisar a ação de substâncias antioxidantes (vitamina C, vitamina E e *Gingko biloba*) por via intraperitoneal na viabilidade de retalho cutâneo dorsal em ratos, mediante os seguintes parâmetros:

1. Macroscopia: área de viabilidade do retalho.
2. Microscopia: neovascularização do retalho.





## 2 REVISÃO DA LITERATURA

A presente revisão da literatura foi dividida didaticamente nos seguintes aspectos: modelo de retalho cutâneo, substâncias que alteram a viabilidade do retalho cutâneo, processo natural de peroxidação e substâncias antioxidantes.

### 2.1 MODELO DE RETALHO CUTÂNEO

McFARLANE, DeYONG e HENRY (1965) descreveram retalho cutâneo dorsal em ratos de 10 x 4 cm, com índice comprimento/largura de 2,5/1,0, seguindo o eixo da coluna vertebral com pedículo cranial, tendo como pontos de referência os ângulos da escápula. Foram realizados três grupos; no primeiro grupo foi feita a elevação do retalho sem autonomização; no segundo a elevação do retalho com autonomização (segundo tempo após 14 dias) e no último grupo, remoção do retalho como enxerto livre. Referem que a autonomização do retalho preveniu a necrose em 80% dos retalhos e que a situação crítica entre viabilidade e necrose do retalho se encontrava na sua ponta distal. Dezenove dos 90 retalhos sofreram necrose da ponta, apesar da autonomização. Foi possível comprovar que, em 3 a 4 dias de pós-operatório, o retalho se tornava necrótico e o primeiro sinal de necrose era a rigidez da ponta. Entre 7 e 10 dias ocorria epidermólise e, posteriormente, deiscência. Houve necrose de 25% do retalho e não mais que sua metade distal. Um critério fundamental para o sucesso deste trabalho foi o comprimento do retalho e a demonstração de que a

autonomização previne a necrose de um retalho pediculado.

McFARLANE, HEAGY, RADIN, AUST e WERMUTH (1965) estudaram o fenômeno de autonomização em modelo experimental semelhante e não encontraram explicação para o aumento da viabilidade dos retalhos após a autonomização, embora não houvesse aumento significativo do número e do calibre dos vasos ou do fluxo sanguíneo para a porção distal do retalho.

McFARLANE e WERMUTH (1966) avaliaram a influência do tratamento com oxigênio hiperbárico sobre a viabilidade de retalho cutâneo dorsal em ratos. Concluíram que o oxigênio hiperbárico atuou aumentando a área de viabilidade do retalho e estava diretamente relacionado às atmosferas de pressão de oxigênio utilizadas e ao número e tempo das sessões.

REINISCH (1974), observando a autonomização de retalhos em porcos, propôs que a circulação na porção distal de retalhos ocorre mediante a abertura de pontes artério-venosas que têm como característica não permitir a troca metabólica entre os tecidos, promovendo a necrose tecidual. Essa abertura seria devido à perda do controle simpático por secção da inervação, que posteriormente retornaria ao seu tônus normal. O benefício da autonomização seria promover esta abertura enquanto o retalho é bipediculado, prevenindo as isquemias distais.

KERRIGAN (1983) estudou a vascularização de retalhos cutâneos em porcos por meio do uso de marcadores sanguíneos (cromo, microesferas de estrôncio e cerium 141) e concluiu que a maior causa de necrose distal do retalho é o fluxo sanguíneo inadequado.

KHOURI, ANGEL e EDSTROM (1986) modificaram o retalho de Mc Farlane para retalho de mesmas dimensões com pedículo caudal, onde há duas artérias nutridoras do retalho ao invés de somente uma. Inicialmente criaram quatro modelos diferentes de retalho com 10 cm de comprimento e com a largura variando de 3 a 4 cm, com base do pedículo caudal *versus* cranial. No oitavo dia de pós-operatório, as margens do retalho e a área de necrose foram medidas. Os resultados foram expressos em % de área viável do retalho total. Com base nestes dados, foi calculado o número de ratos para mostrar de 10 a 20% das diferenças terapêuticas do tratamento hipotético

com 95% de confiabilidade. Tiveram como resultados que os retalhos com base caudal apresentaram pedículo com dois vasos sacrais constantes, com viabilidade maior do que os retalhos com base cranial, que eram perfundidos por um único vaso escapular. Também observaram que a largura de 3 cm é mais adequada por apresentar um menor desvio padrão quando comparados aos outros grupos e que o retalho de 10 x 3 cm com base caudal apresenta resultados mais previsíveis e consistentes, necessitando amostra menor de animais em estudos experimentais.

ANGEL, RAMASASTRY, NARAYANAN, ZERBE, SWARTZ e FUTREL (1986) utilizaram retalho de 3 x 10 cm em dorso de ratos para estudar a importância do leito do retalho na viabilidade da porção distal isquêmica. Demonstraram, por meio da fluoresceína, que a viabilidade da região distal do retalho é menor se for privado o contato entre o retalho e seu leito.

KHOURI, EDSTROM e ANGEL (1987) publicaram revisão de 91 trabalhos, nos quais o retalho dorsal em ratos foi utilizado como meio de estudo da fisiologia dos retalhos cutâneos. Estudaram 26 diferentes desenhos de retalho, com diversidades também em parâmetros como peso, sexo e idade dos animais, dieta, condições de alojamento, anestesia, material e técnica para sutura e hemostasia, curativo, data de avaliação da viabilidade e o método utilizado. Esta publicação reforçou a necessidade de uma padronização. A partir desses estudos os autores consideraram o retalho com 10 x 3 cm e pedículo caudal como retalho cutâneo dorsal em ratos descrito por McFARLANE, DeYONG e HENRY (1965) e modificado por KHOURI, EDSTROM e ANGEL (1987) como os mais adequados para os estudos experimentais. São descritos alguns exemplos abaixo.

ANGEL, RAMASASTRY, WARTZ, NARAYANAN, KUHN, BASFORD e FUTRELL (1988) apresentaram hipótese que explicaria os resultados obtidos no estudo anterior. Referem que o enxerto de pele representa um estado de completa isquemia e que a porção distal de um retalho apresenta perfusão marginal responsável pela produção de radicais livres, promotores da morte tecidual.

HAMMOND, BROOKSHER, MANN e BEERNINK (1993) estudaram o suporte metabólico que influencia a viabilidade dos retalhos. Concluíram que a parte

distal do retalho se comporta como um enxerto livre e que a sua viabilidade depende do leito sob o retalho, ao contrário do que ocorre em humanos, onde os retalhos elevados dependem principalmente do pedículo para seu suporte metabólico e, progressivamente ocorre a revascularização da periferia e o fluxo sanguíneo do pedículo torna-se menos importante.

SCHWEIZER, SYLVESTER, CHICK e TANG (1995) encontraram menor necrose distal, após sete dias, em animais jovens comparados com animais velhos (idade de 180, 360 e 720 dias). Discutem as causas deste achado e referem que não se alterariam os resultados obtidos em experimentos, pois quando bem planejados, os animais, tanto do grupo experimento como do controle, apresentaram a mesma média de idade, geralmente adultos jovens de 180 dias.

## 2.2 SUBSTÂNCIAS QUE ALTERAM A VIABILIDADE DO RETALHO CUTÂNEO

A partir dos trabalhos de McFARLANE, muitos autores passaram a estudar experimentalmente a influência de substâncias e outros fatores na viabilidade de variados formatos de retalhos cutâneos que apresentavam necrose distal isquêmica, como podem ser observados nos trabalhos abaixo.

ADAMSOM, HORTON, CRAWFORD e AYERS (1967) estudaram a influência da dimetil-sulfoxide tópica na viabilidade de retalho dorsal em ratos, de 9 x 3 cm (proporção comprimento-largura 3:1), pedículo caudal e necrose distal do grupo controle de 30 a 60%. Referiram diminuição da necrose no grupo experimento para 20% em média, justificando-a pelo efeito vasodilatador da substância aplicada. Observou-se também o efeito desta substância nos pequenos vasos da orelha de coelhos por meio de técnicas de microscopia óptica.

COHEN, HARMON e PHIZACKERLEY (1983) descreveram as alterações do metabolismo da glicose em retalhos abdominais de ratos de 11 x 3 cm, com clampeamento do pedículo e em retalhos de 5 x 3 cm, sem clampeamento. Após 3 dias

da elevação do retalho ocorria aumento no consumo de glicose no retalho e aumento na produção de lactato. Em condições anaeróbicas, o consumo de glicose estava aumentado, levando à diminuição das reservas e ao aumento de ácido láctico, favorecendo a necrose.

LAWRENCE, MURPHY, ROBSON e HEGGERS (1984) utilizaram retalho de 10 x 4 cm de base cefálica e avaliaram os efeitos da nicotina sobre a viabilidade do retalho. No grupo controle a área viável após 7 dias foi de 75%, enquanto no grupo que ficou exposto à nicotina esta foi de apenas 40%, devido ao efeito vasoconstritor e à trombose causados pela nicotina.

NOLAN, JENKINS, KURHARA e SCHULTZ (1985) utilizaram retalho de 10 x 2,5 cm de base caudal e estudaram os efeitos da nicotina na viabilidade de retalhos dorsais de ratos e demonstraram os efeitos vasoconstritores nocivos da nicotina sobre a viabilidade dos retalhos.

KAUFMAN, ANGEL, EICHENLAUB, LEVIN, HURWITZ e FUTREL (1985) utilizaram retalho de 10 x 3 cm de base caudal em dorso de ratos, com o objetivo de avaliar o leito do retalho e as influências da pressão e umidade sobre este retalho. Concluíram que a umidade pode diminuir a viabilidade do retalho, e que o suprimento sanguíneo de 45% da área proximal do retalho provém do pedículo do retalho e, em 55% da porção distal a vascularização provém do tecido suprafascial areolar. Assim, esta região distal comporta-se como enxerto e depende de bom contato com o leito do retalho.

MONTEIRO, SANTAMORE e NEMIR (1986), avaliaram o efeito da pentoxifilina sobre a viabilidade de retalho de 9 x 3 cm, de base caudal em ratos e evidenciaram que a pentoxifilina diminuiu o percentual de necrose distal do retalho.

SUAREZ, GARCIA e GARCIA (1992) avaliaram os efeitos da clorpromazina, pentoxifilina, terbutalina, alopurinol, fenoxibenzamina, naftidrofuril, hidralazina e trimetazidina sobre a viabilidade de retalhos cutâneos dorsais em ratos. Estas substâncias foram utilizadas topicamente em 108 ratos divididos em 9 grupos de 12 animais cada. Todos os grupos que receberam estas substâncias apresentaram maior viabilidade do retalho quando comparados ao grupo controle. Comparações realizadas

entre os diferentes grupos evidenciaram melhores resultados nos grupos que receberam trimetazidina e hidralazina, seguidos daqueles que receberam naftidrofuril e fenoxibenzamina.

HAYDEN e SNYDER (1993) estudaram a influência da pentoxifilina IV na viabilidade de retalho cutâneo dorsal em ratos. O único grupo que demonstrou aumento da viabilidade do retalho foi o que recebeu pentoxifilina imediatamente após o retalho ser elevado. O uso da droga no pré-operatório não influenciou a viabilidade do retalho.

DAVIS, COHEN, ROBINSON, URBEN e COOK (1995) estudaram a influência da analgesia pós-operatória na viabilidade do retalho. Avaliando a necrose distal após 14 dias, não encontraram diferença significativa entre o grupo controle e o grupo experimento no qual havia sido aplicado “ketorolac tomethamine” (antiinflamatório não-hormonal) em dose analgésica, por IM, em diferentes dosagens. Embora estes antiinflamatórios promovam vasodilatação e inibição de prostaglandinas, o que favoreceria a viabilidade do retalho, quando usados em doses analgésicas não possuem tais efeitos.

MOST, HOYT, SIBLEY e PRESS (1996) avaliaram o papel das citocinas na isquemia e necrose da porção distal do retalho até 48 h. Encontraram uma elevação abrupta do nível de citocinas na base do retalho após 8 h de sua confecção, embora não houvesse isquemia evidente neste estágio. Após 16 h, houve outro pico de elevação de citocinas, com evidência clínica de isquemia distal. Sugeriram que o pico de citocinas poderia ser um marcador precoce da necrose dos retalhos.

QUIRINIA, GOTTRUP e VIIDIK (1996) avaliaram o efeito do bufomedil e isoxsuprine sobre retalhos cutâneos em ratos. As drogas eram administradas um dia antes da cirurgia e 2 x/dia, IP, durante nove dias. As feridas operatórias eram testadas biomecanicamente após 10 e 20 dias da cirurgia e o comprimento da superfície de necrose do retalho foi mensurada no décimo dia de pós-operatório. Este estudo não mostrou diferenças funcionais nas feridas isquêmicas comparadas ao grupo controle, mesmo com 10 e 20 dias de pós-operatório, assim como não houve diferença no comprimento da superfície de necrose dos retalhos. Concluíram que as substâncias

testadas não apresentaram nenhum efeito sobre retalhos cutâneos em ratos.

AKER, MANCOLL, LEWIS e COLEN (1997) estudaram o efeito da pentoxifilina em animais submetidos à ação da nicotina, que foi injetada no subcutâneo durante 24 semanas, com o objetivo de avaliar se esta alteraria a viabilidade do retalho, avaliada após 7 dias. Observaram que a viabilidade do retalho no grupo que recebeu nicotina foi 59%, comparada com o controle, que foi 73%. A administração de pentoxifilina, concomitante à nicotina, durante 30 dias de pré-operatório e 7 dias no pós-operatório, aumentou a viabilidade do retalho em 80%. A suspensão da nicotina 2 semanas antes da confecção do retalho, tendo sido utilizada nas 22 semanas anteriores, levou a viabilidade semelhante à do controle em 73%.

DAVIS, WACHHOLZ, JASSIR, PERLYN E AGRAMA (1999) avaliaram a eficácia de agentes tópicos antiisquêmicos em retalhos cutâneos em ratos. Foram utilizados 61 ratos divididos em 6 grupos que receberam as substâncias nifedipina, trolamine-salicilato, nitroglicerina, combinação de trolamine-salicilato e nitroglicerina, combinação de nifedipina, trolamine-salicilato e nitroglicerina e um grupo controle. O tratamento foi iniciado imediatamente após o fechamento do retalho e continuado a cada 6 h por 7 dias. A terapia com agentes tópicos antiisquêmicos demonstrou significativa redução na necrose do retalho para cada droga testada (isolada ou combinada) em 44,2% quando comparado ao grupo controle. A combinação de nitroglicerina e trolamine-salicilato apresentou melhor resultado. Concluíram que tais agentes são efetivos em reduzir a área de necrose.

KOMOROWSKA-TIMEK, CHEN, ZHANG DOGAN, LINEAWEAVER e BUNCKE (1999) avaliaram o efeito da lidocaína e do verapamil sobre retalhos cutâneos em ratos. Foram utilizados 45 ratos Sprague-Dawley submetidos à confecção de retalhos cutâneos de parede abdominal baseados nos vasos femorais. Foi introduzido cateter subcutâneo para a aplicação de verapamil e de lidocaína nos grupos experimento (diluídas em 0,5 ml de solução de 12/12 h por 5 dias) e no grupo controle (0,5 ml de solução salina). No quinto dia de pós-operatório não havia diferenças entre os grupos. A área de necrose do retalho foi significativamente menor no grupo que recebeu verapamil ( $p = 0,01$ ) e lidocaína ( $p = 0,012$ ) quando comparados ao grupo



controle. Concluíram que o uso de verapamil e lidocaína tópica por 5 dias no pós-operatório diminui a área de necrose em retalhos cutâneos em ratos.

KARACAOGLAN e AKBAS (1999) avaliaram o efeito de pentoxifilina IV e da nitroglicerina tópica sobre a viabilidade de retalhos cutâneos em ratos. A média de comprimento viável do retalho no grupo controle (n=15) foi de  $6,160 \pm 0,936$  cm. No grupo tratado com pentoxifilina e nitroglicerina (n=15), a média de comprimento viável do retalho foi de  $6,907 \pm 0,617$  cm. Os resultados demonstraram que essas drogas foram efetivas em promover a viabilidade dos retalhos cutâneos.

KRYGER, ZHANG, CHENG, LINEAWEAVER e BUNCKE (2000) estudaram os efeitos do fator de crescimento vascular na viabilidade do retalho de McFARLANE em ratos. Realizaram a elevação do retalho em 72 ratos, divididos em 6 grupos, sendo em 5 grupos injetado o fator de crescimento vascular endovenoso, subdérmico, subfascial e tópico e, um último grupo sendo o controle. Os estudos histológicos mostraram mais tecido de granulação e neovascularização no grupo experimento, sugerindo que o fator de crescimento vascular pode recuperar tecido hipóxico através da angiogênese e que fatores de crescimento como o fator de crescimento vascular são promissores no aumento da viabilidade do retalho.

MATSUMURA, YOSHIKAWA, VEDDER e WATANABE (2001) realizaram o pré-condicionamento do clampeamento do pedículo proximal ao acaso, pela administração IV de drogas como a adenosina, para poder melhorar a viabilidade do retalho cutâneo em ratos. Foram retalhos bipediculados dorsais de 2 x 8 cm. No grupo isquêmico, submetido ao pré-condicionamento, o pedículo cranial foi seccionado, produzindo retalho de base caudal de padrão randomizado. No grupo pré-condicionado foi injetada adenosina na metade cranial do retalho antes de ser seccionado e, no grupo controle, solução salina. Observou-se que no sétimo dia a viabilidade do retalho nos dois grupos foi significativamente maior que no grupo controle.

LANDECKER, KATAYAMA, MAMMANA, LEITÃO, SACHETTA, GEMPERLI e NEVES (2001) avaliaram o uso de ácido retinóico e ácido glicólico sobre retalhos dorsais de ratos, de 3 x 10 cm de base cranial e concluíram que estes

ácidos não alteram a área de necrose dos retalhos, causando somente adelgaçamento da camada córnea e aumento da vascularização da derme superficial.

RIPPEL (2002) analisou a vascularização de um retalho cutâneo dorsal em ratos submetidos à aplicação do laser de Er:YAG sobre a superfície cutânea, comparando-o com a pele adjacente; avaliando a sua viabilidade e histologia com contagem do número de vasos. O autor concluiu que a aplicação do laser de Er:YAG em retalho cutâneo dorsal de ratos prolonga a reepitelização, não altera a viabilidade do retalho e não interfere na angiogênese.

### 2.3 PROCESSO NATURAL DE PEROXIDAÇÃO

Vários estudos avaliaram as enzimas envolvidas nas reações metabólicas do processo de formação dos radicais livres, como podem ser observados nos trabalhos abaixo.

DONI, FALANGA, DELAINI, VICENZI, TOMASIAK e DONATI (1984) estudaram os efeitos da deficiência de vitamina E e de selênio sobre o balanço de oxidação-antioxidação em ratos mediante avaliação da toxicidade tecidual. Um grupo de ratos recebeu dieta com deficiência de vitamina E e selênio e o outro grupo, dieta com suplementação desses elementos por 3 a 7 meses. Após isso foram dosadas a vitamina E e o selênio plasmáticos. A enzima malondialdeído cardíaca e renal, um produto típico da peroxidação lipídica, estava aumentada após 3 meses de dieta nos ratos que receberam dieta com deficiência de vitamina E e de selênio. A enzima glucagon peroxidase estava aumentada nos ratos com dieta com suplementação de selênio. A enzima malondialdeído plaquetária, cuja produção é induzida pelo ácido aracdônico, encontrava-se aumentada nos ratos com dieta deficiente em selênio, e principalmente, no grupo deficiente em vitamina E. Concluíram que tais substâncias são os marcadores periféricos da redução do potencial de antioxidação nos tecidos.

MIKI, TAMAI, MINO, YAMAMOTO e NIKI (1987) avaliaram a oxidação de células sangüíneas vermelhas em ratos produzida por oxigênio molecular realizada em suspensão aquosa com composto iniciador de radical livre. As células sangüíneas

vermelhas dos ratos foram oxidadas por mecanismo de cadeia de radicais livres, resultando em hemólise. A extensão da hemólise foi proporcional à concentração de radical livre. Vitamina E nas membranas das células vermelhas suprimiu a oxidação e a hemólise. Entre os lipídios da membrana celular, fosfatidiletanolamine, fosfatidilserine e ácido aracdônico foram oxidados na ausência da vitamina E. Porém, na presença da vitamina E esses lipídios foram suprimidos durante 120 min, mesmo quando a hemólise já havia iniciado. As proteínas da membrana, assim como os lipídios, foram oxidados. Este estudo mostrou claramente o dano das membranas celulares das hemácias causadas pelo radical livre derivado do oxigênio e sugere que a vitamina E, mesmo com níveis abaixo do mínimo, pode suprimir a oxidação lipídica mas não pode prevenir a oxidação protéica e a hemólise.

ANGEL, RAMASASTRY, SWARTZ, NARAYANAN, KUHNS, BASFORD E FUTRELL (1988) estudaram a ação de duas enzimas, xantina-oxidase e malonildialdeído, que fazem parte do metabolismo do radical livre, em enxertos e retalhos cutâneos. Foram realizados retalhos de 10 x 3 cm no dorso de 42 ratos, divididos em 7 grupos, e foram realizadas biópsias a 2,5, 5,5 e 8,5 cm da base do retalho em horas pré-determinadas para avaliar os níveis de xantina-oxidase e malonildialdeído. Os resultados evidenciaram que a xantina-oxidase foi significativamente maior em todas as biópsias proximais, e que este aumentou com o tempo. A malonildialdeído aumentou com o tempo e com a distância de sua base. Biópsias na parte distal do retalho em 24h apresentaram nível maior de malonildialdeído quando comparadas ao enxerto cutâneo. Concluíram que, com o passar das horas, os níveis de malonildialdeído e xantina-oxidase eram altos na parte distal do retalho, evidência indireta da produção aumentada de radicais livres. Isto está correlacionado com os dados histológicos prévios e com a hipótese de que o enxerto cutâneo representa um estado isquêmico completo enquanto a parte distal do retalho apresenta isquemia incompleta, o que promove a produção deletéria de radicais livres.

SBAZO, DROY-LEFAIX, DOLY e BRAQUET (1991) estudaram os efeitos da superoxide-dismutase e do extrato de *Gingko biloba* 761 sobre a retina de ratos. A isquemia da retina dos ratos foi induzida por oclusão da artéria central da retina

seguida pela reperfusão. Noventa min de isquemia regional seguida por 24 h de reperfusão resultou em edema da retina dentro da camada plexiforme e migração de neutrófilos. O grupo de ratos que recebeu a enzima superoxide-dismutase e o grupo que recebeu o extrato de *Gingko biloba* 761 apresentaram diminuição do edema de retina e migração de neutrófilos. Os resultados obtidos indicaram que os radicais livres têm papel importante no desenvolvimento da lesão tecidual induzida após a reperfusão pós-isquemia, e que o tratamento com carreadores de radicais livres, no caso a enzima superoxide-dismutase e o extrato de *Gingko biloba* 761, podem reduzir a gravidade do dano de reperfusão tecidual.

CARPENTER, ANGEL e MORGAN (1993) investigaram o efeito da enzima dimetil-sulfoxide na viabilidade de retalhos cutâneos de 9 x 4 cm baseados nos vasos epigástricos submetidos à oclusão venosa. Concluíram que a dimetil-sulfoxide, administrada na reperfusão e no pós-operatório por 5 dias, aumentou significativamente a viabilidade dos retalhos. Estes achados reforçam a hipótese que a enzima dimetil-sulfoxide é potente carreador de radicais livres.

SEIF-EL-NASR e EL-FATTAH (1995) estudaram a influência do extrato de *Gingko biloba* sobre a produção de peroxidase lipídica, glucagon e níveis de fosfolipídios (superoxide-dismutase e LDH) no cérebro de ratos após a oclusão das carótidas comuns. Dois modelos experimentais foram estudados: 60 min de isquemia sem reperfusão e 60 min de isquemia seguidos por 60 min de reperfusão. O grupo submetido a isquemia seguida de reperfusão apresentou aumento de LDH e peroxide lipídica e diminuição de superoxide-dismutase e fosfolipídios. A administração pré-isquêmica de extrato de *Gingko biloba* (150 mg/kg, VO) normalizou a atividade da superoxide-dismutase e diminuiu a peroxidase lipídica e fosfolipídios no cérebro dos ratos. Concluíram que o extrato de *Gingko biloba*, por apresentar atividade antioxidante, protege contra a injúria pós-isquêmica.

JANSSESNS, MICHIELS, DELAIVE, ELIAERS, DRIEU e RAMACLE (1995) demonstraram os efeitos do extrato de *Gingko biloba* e um dos seus derivados, o bilobalide, em inibir a diminuição do ATP nas células endoteliais *in vitro* durante a hipóxia, fator este que leva a liberação de mediadores inflamatórios. Em modelo

experimental em ratos que receberam extrato de *Gingko biloba* VO, foi evidenciado aumento da capacidade respiratória da mitocôndria no fígado. A proteção à diminuição do ATP e a demora da ativação da glicólise observada durante a hipóxia, na presença de extrato de *Gingko biloba* e bilobalide, é a melhor explicação para a proteção da atividade respiratória da mitocôndria, pelo menos nos primeiros 60 min de hipóxia. Concluíram que ambos os produtos possuem a habilidade de formar ATP e, conseqüentemente, diminuir a necessidade celular de induzir a glicólise, protegendo a célula do dano causado pela hipóxia.

SENEL, CETINKALE, OZBAY, AHCIOGLU e BULAN (1997) investigaram os mecanismos dos radicais livres em feridas isquêmicas na pele. Foram realizados retalhos cutâneos em forma de “H”, em dorso de ratos, nos quais o teste da ferida isquêmica ocorre na linha horizontal do “H”. Para inibir os radicais livres os ratos receberam alopurinol e dismutase-superoxidase. Os grupos que receberam estas substâncias apresentaram melhora na cicatrização da ferida e, na avaliação histopatológica, evidenciou-se maior concentração e organização do colágeno quando comparado ao grupo controle. Estes resultados demonstram que os radicais livres de oxigênio desempenham importante papel na evolução da isquemia na ferida e que os antioxidantes auxiliam na cicatrização.

KOUL, MISHIRA e NEHRU (2000) estudaram os efeitos da vitamina C e/ou vitamina E, em várias doses, na geração de peroxidação lipídica hepática e no sistema de defesa dos antioxidantes em ratos. Os vários grupos de animais foram alimentados, por VO, com diferentes doses de vitamina C, vitamina E ou ambos, por oito semanas. Os resultados evidenciaram declínio significativo na peroxidação lipídica hepática em todos os grupos hepáticos, exceto no grupo que recebeu 50 mg de vitamina C. O estudo concluiu que a combinação de vitamina C e vitamina E em doses baixas é efetiva no combate ao estresse oxidativo no fígado.

CHEN, TOUYZ, PARK e SCHIFFRIN (2001) determinaram a influência da vitamina C e da vitamina E na hipertensão vascular através da modulação da atividade da NADPH oxidase e superoxide-dismutase. Foram provocados hipertensão e derrame cerebral em ratos, divididos em 3 grupos: controle (n=6), tratados com vitamina C,

1000 mg/dia (n=7) e tratados com vitamina E, 1000 UI/dia (n=8). A pressão arterial foi medida semanalmente e após 6 semanas de tratamento, os ratos foram mortos e as artérias mesentéricas foram estudadas por quimioluminescência, sendo avaliada a atividade da NADPH oxidase e da superoxide-dismutase. Os grupos que receberam vitamina C e vitamina E apresentaram aumento plasmático de antioxidantes, associados à diminuição da atividade da NADPH oxidase e da superoxide-dismutase. Os resultados demonstraram que a vitamina C e a vitamina E reduzem o estresse oxidativo, melhoram a estrutura e a função vascular e previnem a progressão da hipertensão via modulação do sistema enzimático que gera os radicais livres.

VAN den BRANDEN, DEMAN, CEYSSENS, PAUWELS, EMPSEN e VERBEELEN (2002) investigaram o efeito da vitamina E sobre a atividade enzimática antioxidante na córtex renal e nos glomérulos de ratos tratados com Adriamicina que desenvolveram insuficiência renal crônica. Os ratos foram divididos em 4 grupos, dois receberam Adriamicina na dose de 2 mg/kg IV por duas vezes, com intervalo de vinte dias e desenvolveram insuficiência renal crônica. Os outros grupos receberam solução salina. A ração oferecida aos ratos com insuficiência renal crônica continha suplemento de vitamina E calculado em 250 mg/kg/dia enquanto a ração padrão continha 33g vitamina E/kg. A glomerulosclerose, as lesões túbulo-intersticiais e os depósitos de íon ferro foram avaliados por métodos histoquímicos e, a atividade enzimática antioxidante foi mensurada por espectrofotometria. Concluíam que a suplementação dietética com vitamina E protege a atividade enzimática antioxidante no córtex e glomérulo renal e atenua a evolução para a fase terminal da insuficiência renal crônica em ratos tratados com Adriamicina.

## 2.4 SUBSTÂNCIAS ANTIOXIDANTES

HAYDEN, PANIELLO, YEUNG, BELLO e DAWSON (1987) avaliaram os efeitos do glucagon, vitamina A, vitamina C e vitamina E na viabilidade aguda de retalhos cutâneos de parede abdominal de dimensões 8 x 8 cm em 84 ratos divididos em 6 grupos. A vitamina A foi administrada na dose de 250 mg/kg por VO, a vitamina

E na dose de 1000 UI/kg, Vitamina C na dose de 1000 UI/kg e o glucagon na dose de 500 mg/kg, todos por IV. As substâncias foram administradas 1 h após a elevação do retalho. Os resultados obtidos evidenciaram maior viabilidade dos retalhos nos grupos que receberam estas substâncias, em média de 84 a 89% comparados ao grupo controle que apresentou viabilidade média de 67% ( $p < 0,0005$ ).

IHARA, YAMADA, TOYOKUNI, BAN, KUROE e SEINO (1993) estudaram os efeitos antioxidantes da vitamina E sobre o controle glicêmico em ratos diabéticos tipo II não-obesos. Os ratos foram alimentados com dieta com 0, 20 ou 500 mg/kg de vitamina E por 4 semanas. O teste de tolerância à glicose intraperitoneal após a dieta com vitamina E revelou aumento significativo da secreção de insulina em 30 min e diminuição da glicose sanguínea em 30 e 120 min nos ratos diabéticos que receberam dieta com altas doses de vitamina E. Estes achados indicam que acúmulo de vitamina E nas ilhotas pancreáticas produz efeito carreador de radicais livres derivados do oxigênio, resultando em melhora da tolerância da glicose e do controle da diabetes. Concluíram que a suplementação com a vitamina E associa-se à melhor controle glicêmico em ratos diabéticos tipo II não-obesos.

ZACCARIA, WEINZWEIG, YOSHITAKE, MATSUDA e COHEN (1994) investigaram o papel da vitamina C na redução da isquemia durante o processo de reperfusão de uma área isquêmica em retalhos cutâneos em parede abdominal, medindo 6 x 3,5 cm, em 24 ratos divididos em 2 grupos. Foram elevados os retalhos epigástricos em ilha no lado direito baseados na artéria epigástrica superficial. Os pedículos foram isolados e ocluídos por 6 h. O grupo controle recebeu 2,5 ml/kg de solução salina pela artéria femoral 15 min antes da reperfusão e o grupo da vitamina C recebeu 2,5 ml/kg de vitamina C diluída em solução salina (27mg/ml) em dose única. Os animais foram observados por 7 dias e a porcentagem de viabilidade do retalho do grupo da vitamina C foi maior quando comparado ao grupo controle, com  $p < 0,025$ . Concluíram que a vitamina C reduz ou limita a injúria causada pela reperfusão após 6 h de isquemia.

BEKERECIOGIU, TERCAN e OZYAZGAN (1998) realizaram estudos em ratos utilizando o modelo de retalho dorsal de dimensões de 10 x 3 cm com pedículo

caudal, dividindo em 5 grupos de 10 animais cada. Um grupo foi denominado controle e os outros receberam vitamina C 340 mg/kg de 12/12 h, deferoxamine 150 mg/kg de 8/8 h, extrato de *Gingko biloba* 761 100 mg/kg 1x/dia, todos por via IP e vitamina E, 20 mg/kg em dias alternados, por via IM. O início da administração das substâncias foi 24 h após a elevação do retalho, e foram observados por 10 dias. Observou-se que a área de necrose do retalho foi significativamente menor no grupo de deferoxamine ( $p < 0,05$ ), *Gingko biloba* ( $p < 0,001$ ) e vitamina C ( $p < 0,05$ ) comparado com o grupo controle. O grupo de vitamina E não teve nenhum efeito sobre a necrose distal do retalho.

UMEGAKI, SHINOZUKA, WATARAI, TAKENAKA, YOSHIMURA, DAOHUA e ESASHI (2000) analisaram o efeito do extrato de *Gingko biloba* no desenvolvimento de hipertensão, ativação plaquetária e disfunção renal em ratos hipertensos. Tanto os ratos hipertensos como os normotensos foram alimentados com dieta contendo *Gingko biloba* a 2% por vinte dias. O desenvolvimento da hipertensão foi atenuado nos ratos que receberam dieta com *Gingko biloba* e, o aumento do peso do coração, um indicador de pressão arterial elevada, foi inibido significativamente. Este efeito antihipertensivo do *Gingko biloba* não foi detectado nos ratos normotensos. Em contraste, o efeito inibitório de *Gingko biloba* no tamanho do coração foi independente do tempo e foi observado tanto nos ratos normotensos como nos hipertensos. Estes resultados indicam que o *Gingko biloba* tem ação antihipertensiva e bradicárdica.

GALLAGHER, COHEN e LANGE (2002) estudaram os efeitos do extrato de *Gingko biloba* sobre o coração e sobre a atividade reprodutiva em ratos machos. Um grupo recebeu o extrato de *Gingko biloba* por VO por longo período enquanto o outro grupo recebeu placebo. Os resultados evidenciaram diferenças significativas entre os dois grupos, com diferenças anatômicas no tecido cardíaco e testicular no grupo que recebeu o extrato de *Gingko biloba*.

FILHO, LEAL, SBALCHIERO e MARQUES (2002) avaliaram se o extrato de *Gingko biloba* é efetivo na melhoria da taxa de viabilidade de retalhos cutâneos. Para tanto, utilizaram o modelo experimental de retalho de dorso de rato descrito por



McFARLANE e modificado por HAMMOND de dimensões 2 x 7 cm, com pedículo caudal. Um segmento triangular de pele de 2 cm foi confeccionado no ápice do retalho e foi retirado o panículo adiposo para viabilizar sua enxertia na base do retalho. A ferida cirúrgica foi fechada e o retalho suturado, sendo desta forma totalmente isolado do leito subjacente. Os animais receberam por 5 dias, extrato de *Gingko biloba* (100 mg/kg, IP, 1x/dia) ou solução salina (0,9%, IP, 1x/dia) no grupo controle, com início do uso 24 h após o retalho ter sido elevado. Os ratos foram sacrificados no sexto dia para avaliação dos resultados. A média da área de viabilidade do retalho no grupo controle foi de  $2,702 \pm 0,195 \text{ cm}^2$  (n= 9) enquanto o grupo que recebeu extrato de *Gingko biloba* foi de  $5,490 \pm 0,283 \text{ cm}^2$  (n= 8). Os resultados demonstraram que o tratamento dos animais com extrato de *Gingko biloba* aumentou de forma significativa ( $p < 0,001$ ) a taxa de viabilidade dos retalhos cutâneos randomizados.



### 3 MATERIAL E MÉTODO

Este estudo foi realizado no Laboratório de Fisiologia da Universidade Tuiuti do Paraná. Neste local, os animais foram mantidos durante todo o período experimental e foram coletados os dados para avaliação clínica e histológica. As peças retiradas do experimento foram levadas para o Laboratório de Patologia Experimental da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, onde foram realizados os estudos histológicos. Foram seguidas as Normas para Apresentação de Documentos Científicos da Universidade Federal do Paraná, UFPR (2000); foi utilizada a *Nomina Anatomica Veterinaria* (1983) e foram obedecidos os princípios éticos em experimentação animal, preconizados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, COBEA, instituição filiada ao *International Council for Laboratory Animal Science*.

#### 3.1 AMOSTRA

Foram utilizados 24 ratos ( *Ratus Norvegicus albinus*), da linhagem Wistar, machos, adultos, com peso entre 200-500g, saudáveis, provenientes do biotério da Universidade Tuiuti do Paraná. Os animais permaneceram no biotério em caixas plásticas padrão, mantidos em temperatura e umidade naturais do ambiente, em ciclo circadiano claro/escuro de 12 h controlado eletronicamente, com livre acesso à água potável e ração própria para ratos Nuvilab CR1<sup>®</sup> fornecida pela Nuvital de Curitiba conforme tabela 1. Os animais foram divididos em quatro grupos de seis ratos cada,

definidos como grupo controle, grupo Vitamina C, grupo Vitamina E e grupo *Gingko biloba*. Foi confeccionado retalho descrito por KHOURI, ANGEL e EDSTROM (1986), de base caudal em todos os animais.

TABELA 1 – COMPOSIÇÃO DA RAÇÃO PARA RATOS NUVILAB CR1® (NUVITAL)

Composição básica do produto	
Carbonato de cálcio, farelo de milho, farelo de soja, farelo de trigo, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, premix mineral vitamínico, aminoácido	
Umidade (máxima)	12,50%
Proteína bruta (mínima)	22%
Cálcio (máximo)	1,40%
Fósforo (mínimo)	0,80%
Vitaminas	
A, D3, E, K3, B1, B2, B6, B12, niacina, ácido pantotênico, ácido fólico, biotina, colina	
Microelementos	
Ferro, zinco, cobre, iodo, manganês, selênio, cobalto	

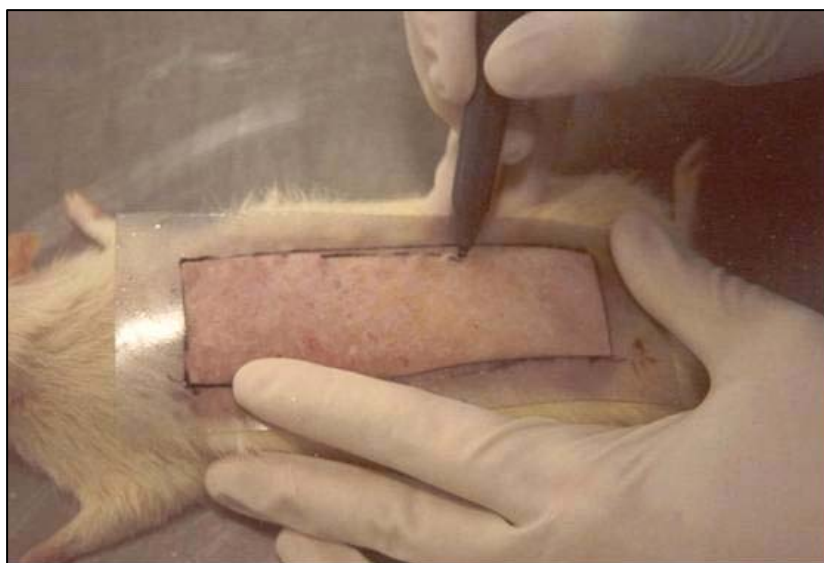
### 3.2 ANESTESIA

Utilizou-se anestesia tipo inalatória com ventilação espontânea. Cada animal foi colocado em campânula de vidro, que continha algodão embebido em éter etílico a 97%, na qual permaneceu em sistema fechado pelo tempo médio de cinco min, até a obtenção do plano anestésico. O rato foi considerado anestesiado quando este se apresentava imóvel ao manuseio e havia perda do reflexo corneano, mas com frequência e amplitude respiratórias normais. Manteve-se o plano anestésico com sistema aberto durante os procedimentos. O peso corpóreo foi determinado após anestesia, no primeiro dia do experimento em todos os animais. Foi utilizado balança eletrônica modelo UD 2000/ 02L (URANO Indústria de Balanças, Canoas, Rio Grande do Sul). O peso dos animais foi determinado em gramas.

### 3.3 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

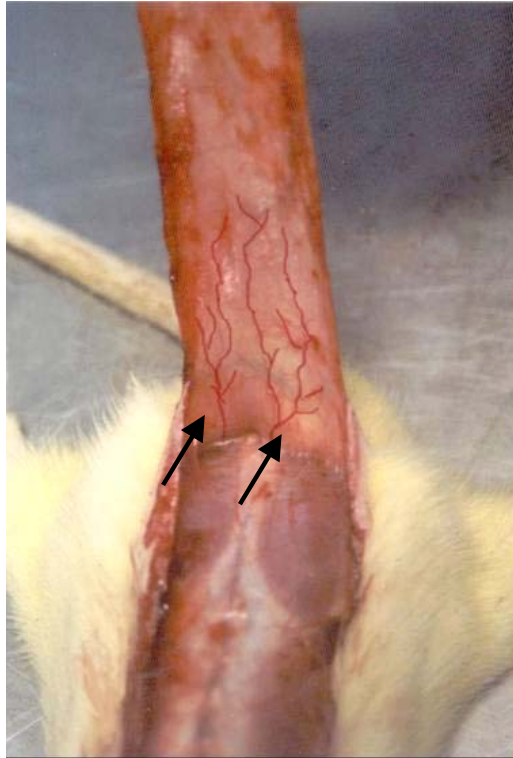
Os animais foram divididos em grupos de 6 ratos cada e foram tatuadas linhas transversais na orelha de cada rato para a sua identificação. Após a anestesia, cada animal foi posicionado em decúbito ventral para a tricotomia da região dorsal do rato, com lâmina, seguida de limpeza local com sabão neutro líquido e água corrente e secagem com gaze. Os parâmetros para delimitação e localização do retalho foram: superiormente o ângulo inferior das escápulas; inferiormente as cristas ilíacas e centralizados sobre a coluna vertebral. Foi demarcado retalho cutâneo no dorso de cada animal, com caneta de tinta solúvel em álcool, com pedículo de base caudal de 3 cm de largura por 10 cm de comprimento medido com régua graduada em cm (figura 1), conforme descrito por KHOURI, ANGEL e EDSTROM (1986).

FIGURA 1 – DORSO DO RATO COM DEMARCAÇÃO DO RETALHO



Após a anti-sepsia local com solução aquosa de polivinilpirrolidona-iodo, o retalho foi incisado com bisturi de lâmina número 15 e elevado da musculatura dorsal, constituído por pele e tela subcutânea, utilizando-se como plano de dissecação a fáscia aponeurótica. Em seguida foi realizada hemostasia dos vasos sangrantes. Tomou-se o cuidado de não lesar o pedículo do retalho, onde se encontravam os vasos sacrais (figura 2).

FIGURA 2 – PEDÍCULO DO RETALHO DORSAL DE BASE CAUDAL



NOTA: O pedículo caudal tem duas artérias sacrais ( ↗ ) para a sua nutrição que penetram na base do retalho.

O retalho foi imediatamente recolocado em sua posição original e suturado por planos. Inicialmente com pontos separados subdérmicos, em posições simétricas, com fio monofilamentar de poliglecaprone 25, 4-0 e agulha PS-2. Em seguida, utilizando o mesmo tipo de material, foi realizada sutura contínua intradérmica em todo o retalho. A ferida operatória foi mantida aberta em todos os ratos (figura 3).

FIGURA 3 – DETALHE DO RETALHO APÓS SÍNTESE EM RATO DO GRUPO CONTROLE.



### 3.4 PÓS-OPERATÓRIO

Logo após o ato cirúrgico os animais foram mantidos nas caixas específicas divididos nos seus respectivos grupos. Foram mantidas as condições anteriores de alojamento e alimentação. Todos os procedimentos de administração de substâncias antioxidantes, avaliação macroscópica e planimetria digital foram realizados igualmente em todos os grupos. As substâncias antioxidantes foram administradas do primeiro ao sexto dia de pós-operatório. Os animais foram mortos com dose inalatória letal de éter etílico a 97% para a realização dos estudos histológicos no dia 14 do experimento.

### 3.5 ADMINISTRAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS ANTIOXIDANTES

No primeiro dia, todos os animais foram pesados em balança eletrônica modelo UD 2000/02L (URANO Indústria de Balanças, Canoas, Rio Grande do Sul) e o peso foi determinado em gramas. Foi realizado o retalho já descrito e, após 24 h da confecção do retalho, iniciou-se a administração das substâncias antioxidantes, que foram obtidas da Farmácia Modelo da Universidade Tuiuti do Paraná. A quantidade destas substâncias foi obtida através do cálculo da dose de cada uma multiplicada pelo peso de cada rato em mg/kg (tabela 4 do Anexo).

#### 3.5.1 Grupo controle

No grupo controle, os animais receberam por via IP, 1 ml de solução fisiológica 0,9% nos dias 1 a 6 diariamente.

#### 3.5.2 Grupo Vitamina C

Este grupo recebeu vitamina C na dose de 340 mg/kg de 12/12h. A forma de apresentação desta substância foi em pó, armazenada em pacotes de papel alumínio esterilizados, de acordo com o cálculo do peso de cada animal deste grupo. A partir do dia 1 ao dia 6 de pós-operatório, a Vitamina C foi diluída em 1 ml de soro fisiológico a

0,9% e administrada por via IP. Os animais foram posicionados em decúbito dorsal e a medicação preparada foi injetada no quadrante inferior direito do abdome (figura 4).

FIGURA 4 – ADMINISTRAÇÃO INTRAPERITONEAL DE SUBSTÂNCIA ANTIOXIDANTE



### 3.5.3 Grupo Vitamina E

Neste grupo os animais receberam vitamina E na dose de 20 mg/kg 1x/dia. A forma de apresentação desta substância foi em pó, armazenada em pacotes de papel alumínio esterilizados, de acordo com o cálculo do peso de cada animal deste grupo. Diariamente, a partir do dia 1 ao dia 6 de pós-operatório, a vitamina E foi diluída em 1 ml de soro fisiológico a 0,9% e administrada por via IP. Os animais foram posicionados em decúbito dorsal e a medicação preparada foi injetada no quadrante inferior direito do abdome.

### 3.5.4 Grupo *Gingko biloba*

Neste grupo os animais receberam extrato seco de *Gingko biloba* na dose de 100mg/kg 1x/dia. A forma de apresentação desta substância foi em pó, armazenada em pacotes de papel alumínio esterilizados, de acordo com o cálculo do peso de cada animal deste grupo. Diariamente, a partir do dia 1 ao dia 6 de pós-operatório, o *Gingko biloba* foi diluído em 1 ml de soro fisiológico a 0,9% e administrada por via IP. Os animais foram posicionados em decúbito dorsal e a medicação preparada foi injetada



no quadrante inferior direito do abdome.

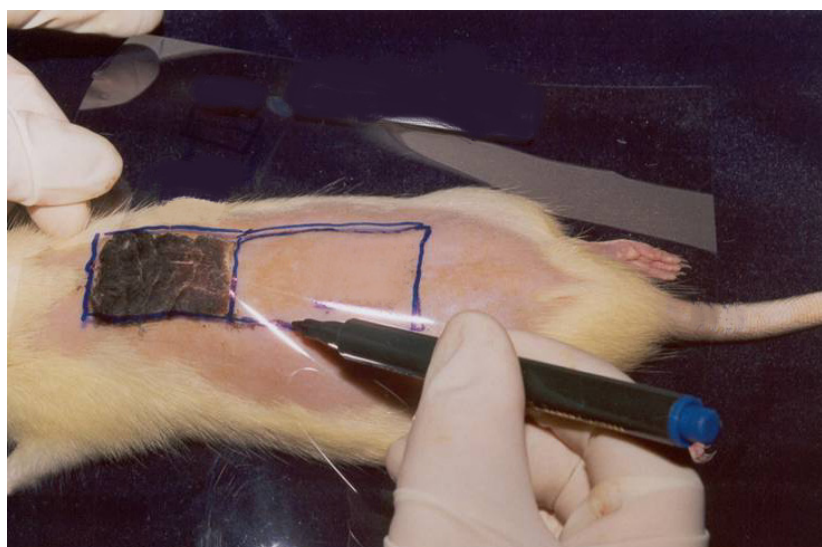
### 3.6 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA

Todos os animais foram avaliados diariamente do dia 1 ao dia 14, separados em grupos, durante todo o período do experimento. Esta avaliação incluiu o aspecto da sutura, presença de hematoma, infecção, tecido de granulação, tempo de cicatrização e área do retalho. Esses dados foram obtidos, sem anestesia, em todos os grupos, diariamente.

#### 3.6.1 PLANIMETRIA DIGITAL

Considerou-se viabilidade do retalho toda a área do retalho que apresentava aspecto normal de textura, coloração e morfologia, semelhante ao tecido não descolado. Área de necrose foi considerada toda área com textura pétrea, coloração escurecida e presença de crostas. Foi determinado a área total do retalho, área de viabilidade proximal e área de necrose distal em  $\text{cm}^2$ . A avaliação da área do retalho cutâneo foi realizada em todos os animais no 14<sup>o</sup> dia. As áreas de viabilidade e necrose do retalho de cada rato foram copiadas utilizando-se filme transparente (Transparência PPC<sup>®</sup> – 3M do Brasil Ltda) e caneta solúvel em álcool (caneta Retro Projetor<sup>®</sup> – Faber Castell) conforme demonstrado na figura 5.

FIGURA 5 – CÓPIA DA ÁREA POR APOSIÇÃO PARA PLANIMETRIA DIGITAL



As figuras obtidas foram digitalizadas através de “scanner” de mesa (Genius<sup>®</sup> – Kye Systems Corp., Nova York, Estados Unidos) com resolução óptica de 100 dpi, e enviadas a um computador Pentium<sup>®</sup> II e analisadas por meio do programa de computador Corel DRAW 9<sup>®</sup> (Corel Corp., Nova York, Estados Unidos) e seus aplicativos, Corel PHOTO-PAINT<sup>®</sup> e Corel TRACE 9<sup>®</sup>, na seguinte seqüência:

1- Após a digitalização de cada foto, foi utilizado o aplicativo Corel PHOTO-PAINT<sup>®</sup> para serem eliminados objetos indesejados e imperfeições.

2- Após a limpeza da imagem, esta foi convertida de bpm para vetor pelo aplicativo Corel TRACE 9<sup>®</sup>.

3- A imagem convertida foi enviada para o programa Corel DRAW 9<sup>®</sup>, que obteve as propriedades do objeto, entre elas, as medidas da largura e do comprimento.

4- Essas medidas foram enviadas para o aplicativo Excel 97<sup>®</sup> (Microsoft Corp., Nova York, Estados Unidos) que mediante a multiplicação da largura pelo comprimento, determinou a medida da área em cm<sup>2</sup>.

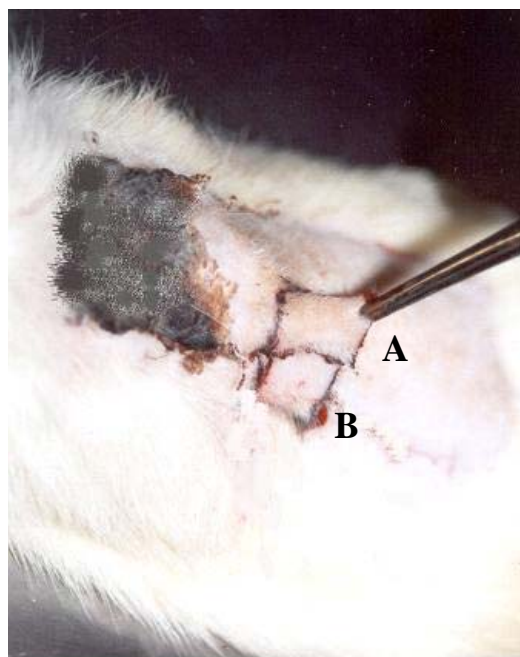
### 3.7 AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA

A avaliação microscópica foi realizada a partir do estudo histológico das biópsias obtidas das áreas dos retalhos cutâneos em todos os grupos no dia 14.

#### 3.7.1 ESTUDO HISTOLÓGICO

Para o estudo histológico foi ressecado de cada retalho um fragmento de forma retangular, medindo 20 x 5 mm, na sua porção viável, na zona de transição entre o retalho elevado e o tecido normal não descolado adjacente ao retalho (figura 6). Portanto, cada amostra continha tecido viável de retalho e fragmento de tecido adjacente, que não faz parte do retalho cutâneo. Este fragmento foi colocado com a face dérmica sobre uma tira de papel de filtro, para evitar alterações de formato, sendo então fixado em 20 ml de formol a 10%.

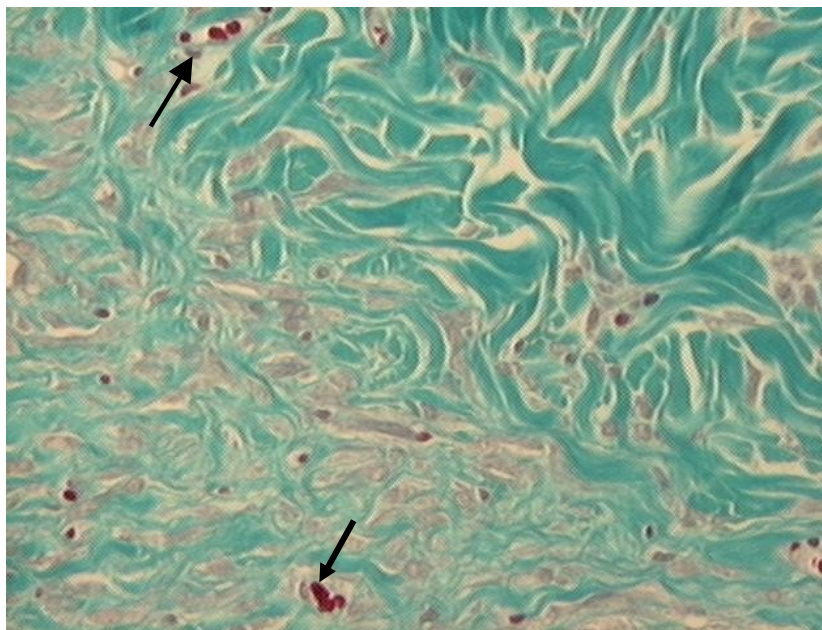
FIGURA 6 – FRAGMENTO RETIRADO PARA BIÓPSIA



NOTA: Nota-se a porção superior da biópsia (A) correspondente ao retalho viável e a porção inferior (B) ao tecido não descolado adjacente ao retalho.

Após 72 h de fixação, o material foi retirado do formol a 10%, examinado macroscopicamente e, quando necessário, foi seccionado para a sua regularização. Todos os fragmentos foram colocados em cápsulas e levados ao aparelho histotécnico modelo TP 1020 (LEICA, Nussloch, Alemanha), onde sofreram desidratação em álcool a 70%, 80% e 90% e posteriormente a diafanização em xilol e embebição em parafina diluída. Foram então emblocados em parafina sólida e cortados em micrótomo modelo RM 2145 (LEICA, Nussloch, Alemanha) na espessura de 4 micrômetros. Para cada bloco de parafina foram preparadas três lâminas contendo 2 níveis de corte histológico cada uma, conforme técnicas descritas por BANCROFT e STEVENS (1982). A primeira lâmina foi corada em hematoxilina-eosina (HE) para a avaliação do processo de cicatrização do retalho; a segunda pela elástica de Hardt e a terceira pelo Tricrômico de Gomori (TG) as quais coram os vasos sanguíneos, e portanto permitem a avaliação do número de vasos sanguíneos (figura 7).

FIGURA 7– CORTE HISTOLÓGICO DO RETALHO CUTÂNEO NO DIA 14 DO RATO DO GRUPO VITAMINA E, TG, 100X



NOTA: À esquerda observa-se a área do retalho e à direita a área normal não descolada adjacente ao retalho. Observa-se neoformação vascular composta de pequenos vasos, sendo que as hemácias em seu interior são evidenciadas pela cor vermelha ( ↗ , ↘ ).

#### 3.7.1.1 Análise histológica da neovascularização do retalho

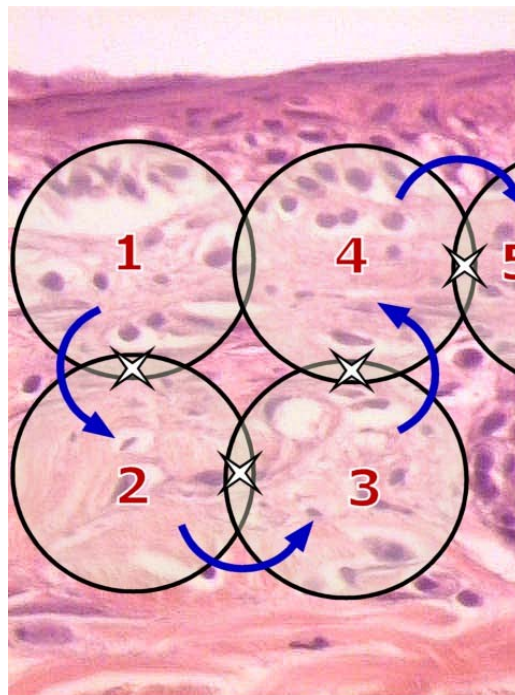
As alterações histológicas da pele foram avaliadas com a observação de cada uma das lâminas coradas com HE onde foi observado o processo de cicatrização da epiderme e da derme na pele do retalho em todos os grupos, com especial atenção para a neovascularização utilizando-se para isto a coloração elástica de Hardt.

#### 3.7.1.2 Determinação quantitativa da neovascularização do retalho

Para o estudo histológico da neoformação vascular foi utilizado equipamento composto de micrótomo binocular American Optical<sup>®</sup> modelo BX50, ocular de 10 aumentos (X) e objetivas de 4, 10, 20 e 40X, acoplado a vídeo-câmera CCD 101 Sony<sup>®</sup> (Sony Corp., Nova York, Estados Unidos) que enviou imagens a um microcomputador Pentium<sup>®</sup> II, que as digitalizou para serem analisadas pelo programa Image Proplus<sup>®</sup>. Para contabilizar o número de vasos, as lâminas foram coradas pelo

TG e o resultado foi calibrado para o programa Optymas<sup>®</sup> 6.2, em micrômetros, para a objetiva de 10X, que, associada a ocular de 10X, proporcionou aumento total de 100X. Foram realizadas 30 medidas para cada lâmina, 5 por campo, e foram excluídos os campos em que se encontravam artefatos técnicos. A técnica utilizada neste estudo foi a morfometria, com contagem de vasos realizada mediante técnica de varredura, conforme demonstrado na figura 8.

FIGURA 8– REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA TÉCNICA DE VARREDURA.



NOTA: Cada grande círculo representa um campo de aumento de 100 X. Os números e as setas representam a ordem de leitura dos campos. As estrelas representam o local de estruturas usadas como referência para evitar a sobreposição de campos.

### 3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Neste estudo foram consideradas as variáveis: área total do retalho, dividida em área viável e área de necrose, Índice de Viabilidade do Retalho (IVR) e número de vasos na área do retalho.

### 3.8.1 Áreas do retalho

Para as variáveis área total do retalho, dividida em área viável e área de necrose, foi realizada a comparação das áreas do grupo controle, grupo Vitamina C, grupo Vitamina E e grupo *Gingko biloba*. Testou-se a hipótese nula de resultados iguais nos 4 grupos *versus* a hipótese alternativa de que pelo menos um dos grupos tem resultado diferente dos demais. Para tanto, foi aplicado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. Para comparar os grupos 2 a 2, testou-se a hipótese nula de que os resultados das áreas são iguais nos 2 grupos *versus* a hipótese alternativa de resultados diferentes. Para tanto, adotou-se o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. Adotou-se o nível de significância de 5% ou  $p \leq 0,05$  para rejeição da hipótese de nulidade para ambos os testes.

### 3.8.2 Índice de Viabilidade do Retalho

O IVR foi obtido mediante divisão da área viável do retalho pela área não viável (área de necrose) do retalho. Para a variável IVR, testou-se a hipótese nula de resultados iguais nos 4 grupos *versus* a hipótese alternativa de que pelo menos um dos grupos tem resultado diferente dos demais. Para tanto adotou-se o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis e adotou-se o nível de significância de 5% ou  $p \leq 0,05$  para rejeição da hipótese de nulidade.

### 3.8.3 Neovascularização

Para a variável número de vasos, foi realizada a comparação do número de vasos na área descolada do retalho do grupo controle, grupo Vitamina C, grupo Vitamina E e grupo *Gingko biloba*. Testou-se a hipótese nula de resultados iguais nos 4 grupos *versus* a hipótese alternativa de que pelo menos um dos grupos tem resultado diferente dos demais. Para este teste foi aplicado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis e adotou-se o nível de significância de 5% ou  $p \leq 0,05$  para rejeição da hipótese de nulidade.





## 4 RESULTADOS

### 4.1 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA DO RETALHO

#### 4.1.1 Grupo Controle

A observação diária do processo de cicatrização nos 6 animais do grupo controle foi realizada do dia 1 ao dia 14. O retalho apresentou evolução para necrose de sua ponta, iniciando com edema e isquemia de sua porção distal, que foram observados em todos os animais deste grupo no dia 1 (figura 9). No dia 3, a isquemia evoluiu com necrose da porção distal do retalho, com limites imprecisos.

FIGURA 9 – RETALHO DO RATO DO GRUPO CONTROLE NO DIA 1



NOTA: 1 dpo = primeiro dia de pós-operatório



Na evolução até o dia 7, a necrose distal se tornou mais definida com a presença de crostas visíveis em todos os animais, embora a linha de transição entre o retalho viável e a área de necrose ainda não se apresentasse bem delimitada (figura 10).

FIGURA 10 – RETALHO DO RATO DO GRUPO CONTROLE NO DIA 7



Nota: 7 dpo = sétimo dia de pós-operatório

No dia 10, a transição entre retalho viável e a porção distal necrótica era bastante nítida em todos os animais. Até o dia 14, a necrose distal se manteve com limites bem definidos em todos os animais, apresentando crostas parcialmente descoladas (figura 11).

FIGURA 11 – RETALHO DO RATO DO GRUPO CONTROLE NO DIA 14



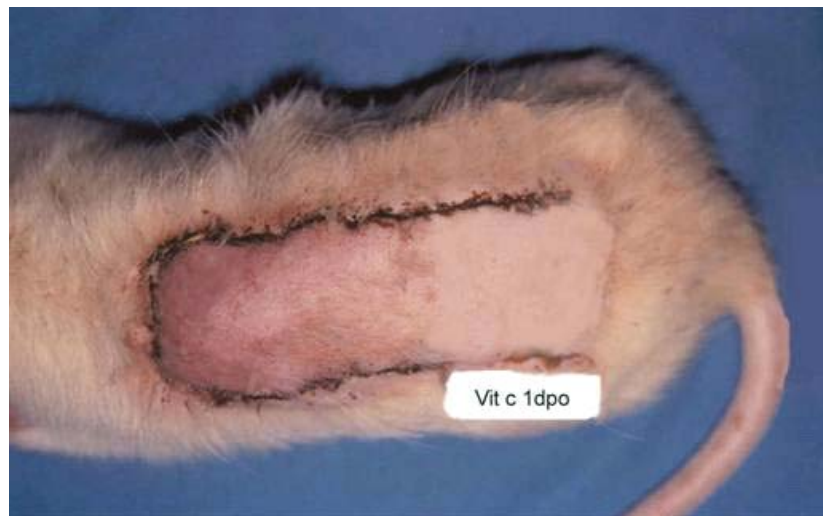
Nota: 14 dpo = décimo quarto dia de pós-operatório

Não houve hematoma, infecção ou deiscência de sutura neste grupo durante todo o período do experimento. Até o final do estudo a epiderme se mostrou de aspecto normal, semelhante à pele adjacente ao retalho. Não houve morte de nenhum animal neste grupo.

#### 4.1.2 Grupo Vitamina C

A observação diária do processo de cicatrização nos 6 animais do grupo controle foi realizada do dia 1 ao dia 14. O retalho apresentou evolução para necrose de sua ponta, iniciando com edema e isquemia de sua porção distal, que foram observados em todos os animais deste grupo no dia 1 (figura 12). No dia 3, a isquemia evoluiu com necrose da porção distal do retalho com limites imprecisos.

FIGURA 12 – RETALHO DO RATO DO GRUPO VITAMINA C NO DIA 1



Nota: 1 dpo = primeiro dia de pós-operatório

Na evolução até o dia 7, a necrose distal se tornou mais definida com a presença de crostas visíveis em todos os animais, embora a linha de transição entre o retalho viável e a área de necrose ainda não se apresentasse bem delimitada (figura 13).

FIGURA 13 – RETALHO DO RATO DO GRUPO VITAMINA C NO DIA 7



Nota: 7 dpo = sétimo dia de pós-operatório

No dia 10, a transição entre retalho viável e a porção distal necrótica era bastante nítida em todos os animais. Até o dia 14, a necrose distal se manteve com limites bem definidos em todos animais, apresentando crostas parcialmente descoladas (figura 14).

FIGURA 14 – RETALHO DO RATO DO GRUPO VITAMINA C NO DIA 14



Nota: 14 dpo = décimo quarto dia de pós-operatório

Não houve hematoma, infecção ou deiscência de sutura neste grupo durante todo o período do experimento. Até o final do estudo a epiderme se mostrou de aspecto normal, semelhante à pele adjacente ao retalho. Não houve morte de nenhum animal neste grupo.

#### 4.1.3 Grupo Vitamina E

A observação diária do processo de cicatrização nos 6 animais do grupo controle foi realizada do dia 1 ao dia 14. O retalho apresentou evolução para necrose de sua ponta, iniciando com edema e isquemia de sua porção distal, que foram observados em todos os animais deste grupo no dia 1 (figura 15). No dia 3, a isquemia evoluiu com necrose da porção distal do retalho com limites imprecisos.

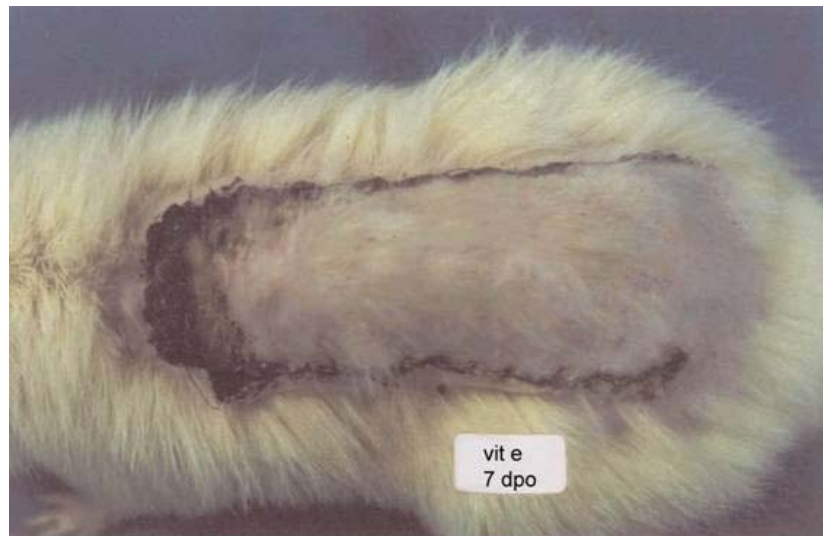
FIGURA 15– RETALHO DO RATO DO GRUPO VITAMINA E NO DIA 1



Nota: 1 dpo = primeiro dia de pós-operatório

Na evolução até o dia 7, a necrose distal se tornou mais definida com a presença de crostas visíveis em todos os animais, embora a linha de transição entre o retalho viável e a área de necrose ainda não se apresentasse bem delimitada (figura 16).

FIGURA 16 – RETALHO DO RATO DO GRUPO VITAMINA E NO DIA 7



Nota: 7 dpo = sétimo dia de pós-operatório

No dia 10, a transição entre retalho que sobreviveu e a porção distal necrótica era bastante nítida em todos os animais. Até o dia 14, a necrose distal se manteve com limites bem definidos em todos os animais, apresentando crostas parcialmente descoladas (figura 17).

FIGURA 17 – RETALHO DO RATO DO GRUPO VITAMINA E NO DIA 14



Nota: 14 dpo = décimo quarto dia de pós-operatório



Não houve hematoma, infecção ou deiscência de sutura neste grupo durante todo o período do experimento. Até o final do estudo a epiderme se mostrou de aspecto normal, semelhante à pele adjacente ao retalho. Não houve morte de nenhum animal neste grupo.

#### 4.1.4 Grupo *Gingko biloba*

A observação diária do processo de cicatrização nos 6 animais do grupo controle foi realizada do dia 1 ao dia 14. O retalho apresentou evolução para necrose de sua ponta, iniciando com edema e isquemia de sua porção distal, que foram observados em todos os animais deste grupo no dia 1 (figura 18). No dia 3, a isquemia evoluiu com necrose da porção distal do retalho com limites imprecisos.

FIGURA 18 – RETALHO DO RATO DO GRUPO *GINGKO BILOBA* NO DIA 1



Nota: 1 dpo = primeiro dia de pós-operatório

Na evolução até o dia 7, a necrose distal se tornou mais definida com a presença de crostas visíveis em todos os animais, embora a linha de transição entre o retalho viável e a área de necrose ainda não se apresentasse bem delimitada (figura 19).

FIGURA 19 – RETALHO DO RATO DO GRUPO *GINGKO BILOBA* NO DIA 7

Nota: 7 dpo = sétimo dia de pós-operatório

No dia 10, a transição entre retalho que sobreviveu e a porção distal necrótica era bastante nítida em todos os animais. Até o dia 14, a necrose distal se manteve com limites bem definidos em todos animais, apresentando crostas parcialmente descoladas (figura 20).

FIGURA 20 – RETALHO DO RATO DO GRUPO *GINGKO BILOBA* NO DIA 14

Nota: 14 dpo = décimo quarto dia de pós-operatório

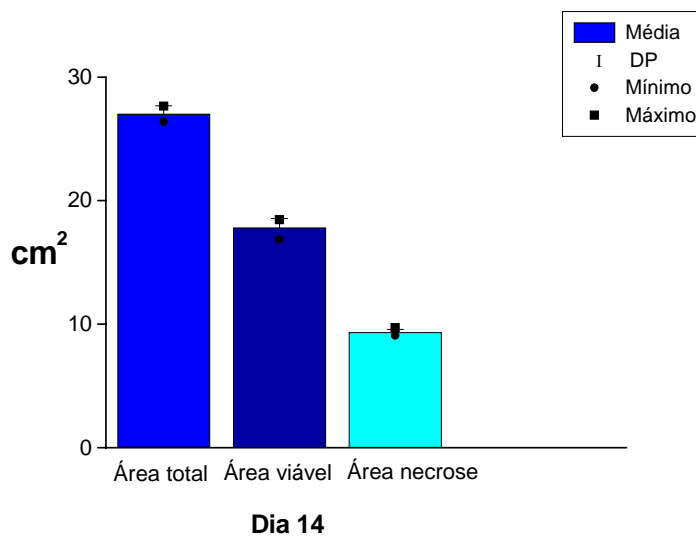
Não houve hematoma, infecção ou deiscência de sutura neste grupo durante todo o período do experimento. Até o final do estudo a epiderme se mostrou de aspecto normal, semelhante à pele adjacente ao retalho. Não houve morte de nenhum animal neste grupo.

## 4.2 PLANIMETRIA DIGITAL

### 4.2.1 Avaliação da área do retalho cutâneo

A planimetria digital, realizada no dia 14, demonstrou que os retalhos dos 6 animais do grupo controle apresentavam área total média de  $27,03 \pm 0,65 \text{ cm}^2$ , com área viável de  $17,82 \pm 0,73 \text{ cm}^2$ , percentualmente correspondente a  $65,93 \pm 1,49 \%$  e, área de necrose de  $9,34 \pm 0,22 \text{ cm}^2$ , percentualmente correspondente a  $34,58 \pm 1,20 \%$  (gráfico 1).

GRÁFICO 1 – ÁREAS DO RETALHO NO GRUPO CONTROLE NO DIA 14



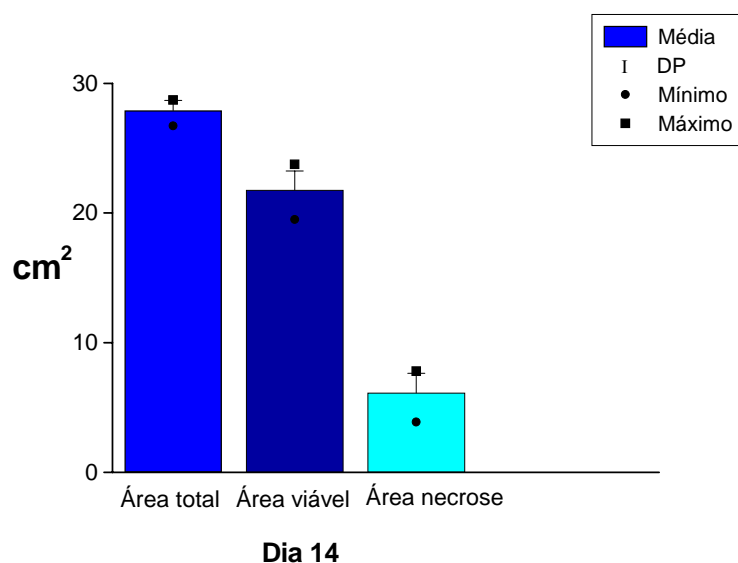
FONTE – Tabela 5 do Anexo

No grupo Vitamina C, a planimetria digital realizada no dia 14 demonstrou que a área total média do retalho era  $27,91 \pm 0,77 \text{ cm}^2$ , com área viável de  $21,77 \pm 1,48 \text{ cm}^2$ , percentualmente correspondente a  $78,05 \pm 5,38 \%$  e, área de necrose de  $6,13$



$\pm 1,52 \text{ cm}^2$ , percentualmente correspondente a  $21,95 \pm 5,38 \%$  (gráfico 2).

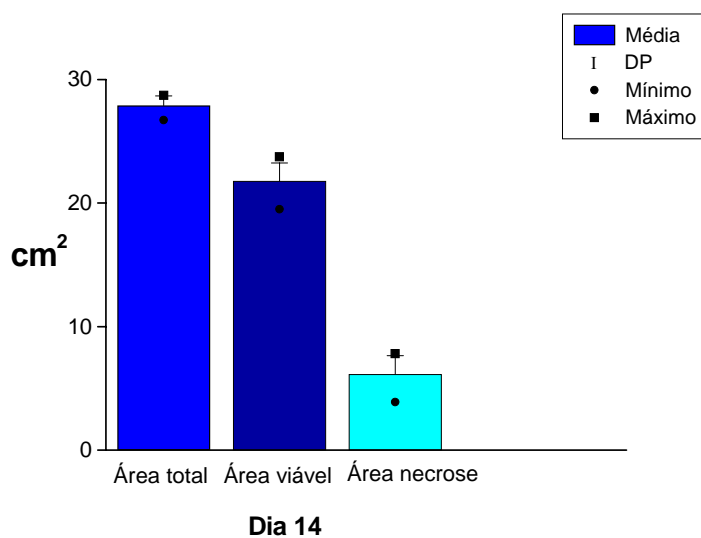
GRÁFICO 2 – ÁREAS DO RETALHO NO GRUPO VITAMINA C NO DIA 14



FONTE – Tabela 6 do Anexo

Os 6 animais do grupo Vitamina E apresentaram área total média de  $28,26 \pm 0,96 \text{ cm}^2$ , com área viável de  $21,23 \pm 2,43 \text{ cm}^2$ , percentualmente correspondente a  $75,08 \pm 7,54 \%$  e, área de necrose de  $7,03 \pm 2,10 \text{ cm}^2$ , percentualmente correspondente a  $24,92 \pm 7,54 \%$  (gráfico 3).

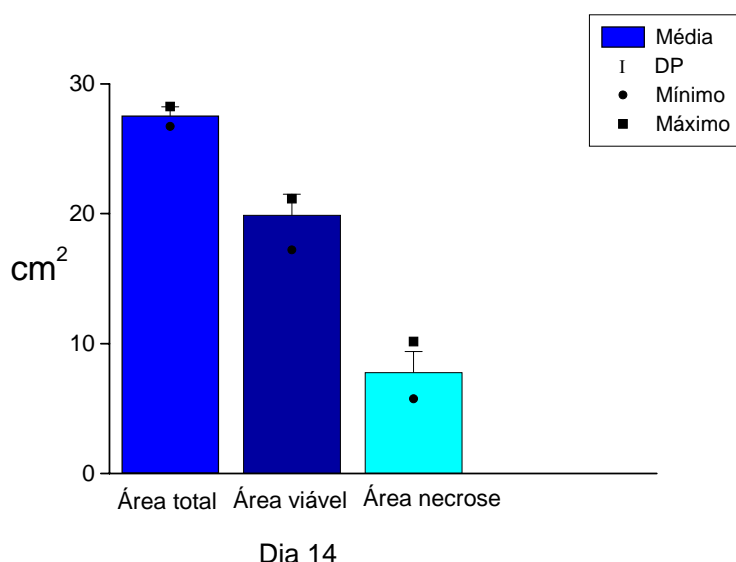
GRÁFICO 3 – ÁREAS DO RETALHO NO GRUPO VITAMINA E NO DIA 14



FONTE – Tabela 7 do Anexo

No grupo *Gingko biloba*, os 6 animais apresentaram área total média de  $27,56 \pm 0,67 \text{ cm}^2$ , com área viável de  $19,89 \pm 1,61 \text{ cm}^2$ , percentualmente correspondente a  $72,16 \pm 5,40 \%$  e, área de necrose de  $7,79 \pm 1,60 \text{ cm}^2$ , percentualmente correspondente a  $28,39 \pm 5,85 \%$  (gráfico 4).

GRÁFICO 4 – ÁREAS DO RETALHO NO GRUPO *GINGKO BILOBA* NO DIA 14



FONTE – Tabela 8 do Anexo

Os valores das áreas médias de viabilidade dos retalhos estão apresentadas respectivamente na tabela 2, assim como desvio padrão e valores de  $p$ .

TABELA 2 – ÁREAS DE VIABILIDADE EM TODOS OS GRUPOS

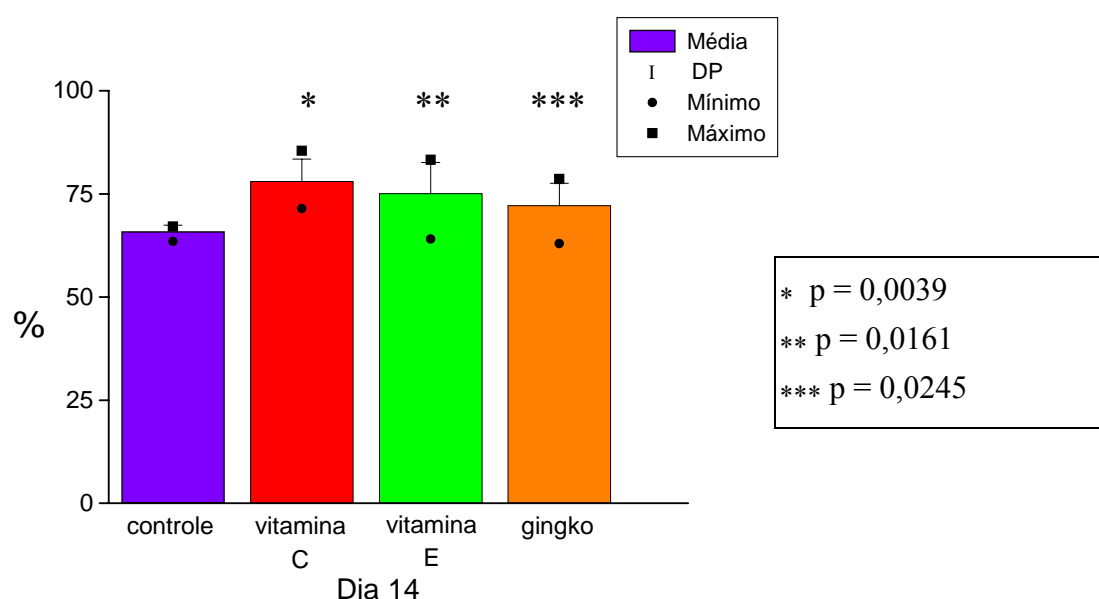
GRUPO	ANIMAIS	MÉDIA ± DESVIO PADRÃO	VALOR de $p^*$
CONTROLE	6	$17,82 \pm 0,73$	-----
VITAMINA C	6	$21,77 \pm 1,48$	0,0039
VITAMINA E	6	$21,23 \pm 2,43$	0,0161
GINGKO BILOBA	6	$19,89 \pm 1,61$	0,0245

NOTA: \* Diferenças entre os grupos vitamina C, vitamina E e *Gingko biloba* em relação ao grupo controle

FONTE – Tabelas 5 a 8 do Anexo

Pode ser observado no gráfico 5, que a porcentagem das áreas de viabilidade dos retalhos nos grupos da Vitamina C, Vitamina E e *Gingko biloba* foram maiores do que a porcentagem da área de viabilidade do grupo controle. Observou-se que a porcentagem da área de viabilidade do retalho no grupo Vitamina C ( $p = 0,0039$ ) foi superior às porcentagens das áreas de viabilidade dos retalhos nos grupos Vitamina E ( $p = 0,0161$ ) e *Gingko biloba* ( $p = 0,0245$ ).

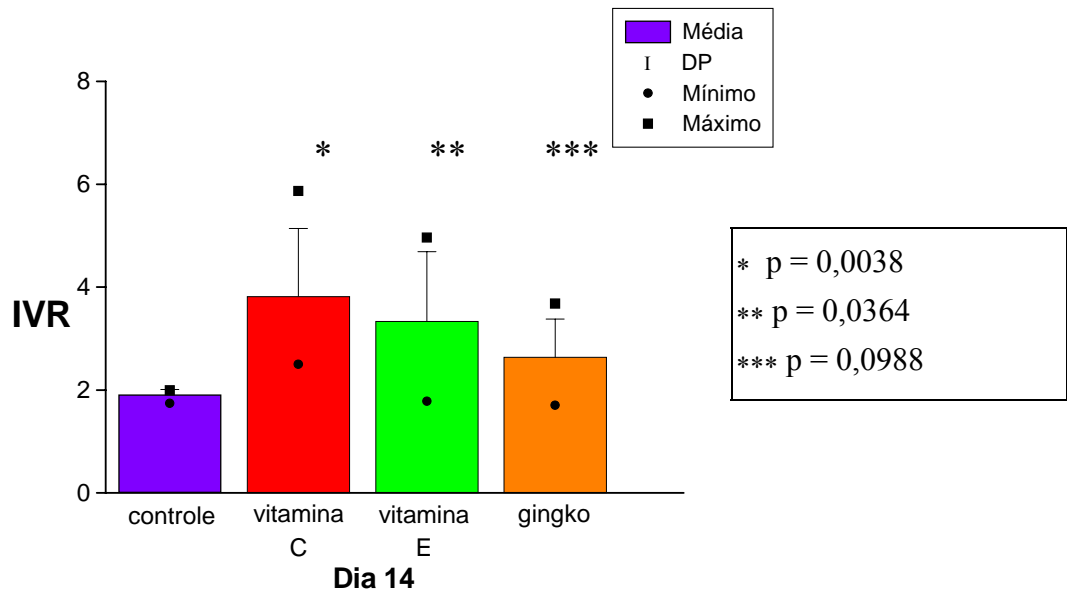
GRÁFICO 5 – PORCENTAGEM DAS ÁREAS DE VIABILIDADE DOS RETALHOS NO DIA 14



FONTE – Tabelas 9 e 10 do Anexo

Em relação ao IVR, o grupo controle apresentou IVR de  $1,91 \pm 0,10$ , o grupo Vitamina C apresentou IVR de  $3,82 \pm 1,32$ , o grupo Vitamina E de  $3,34 \pm 1,35$  e o grupo *Gingko biloba* de  $2,64 \pm 0,74$ . Pode ser observado no gráfico 6, que os IVR nos grupos da Vitamina C ( $p = 0,0038$ ), Vitamina E ( $p = 0,0364$ ) e *Gingko biloba* ( $p = 0,0988$ ) foram maiores do que o IVR do grupo controle.

GRÁFICO 6 – IVR DOS RETALHOS NO DIA 14



FONTE – Tabelas 11 e 12 do Anexo

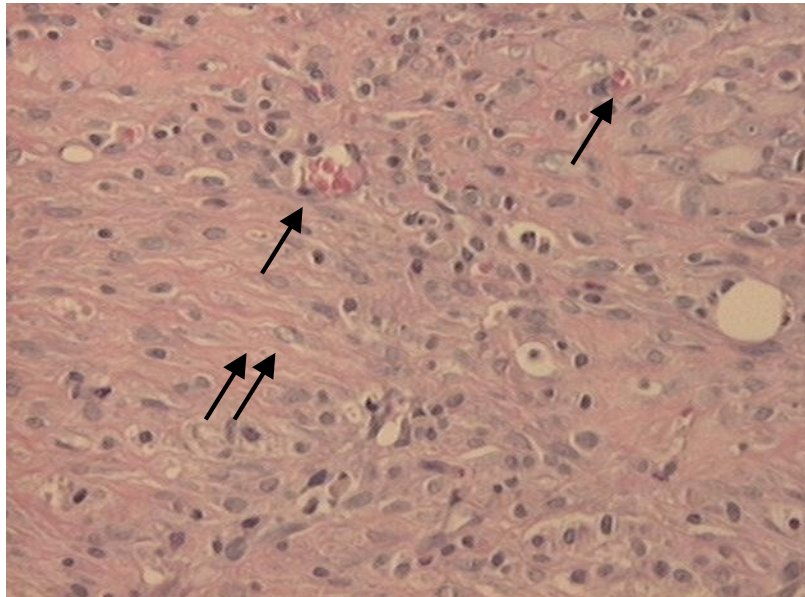
### 4.3 ESTUDO HISTOLÓGICO

#### 4.3.1 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

##### 4.3.1.1 Aspecto histológico da neovascularização do retalho no grupo controle

Observou-se grande quantidade de pequenos vasos jovens, característicos do processo de neoangiogênese. A parede era delicada e formada apenas por única camada de células endoteliais proliferadas e ativadas, as quais apresentavam citoplasma tumefeito e núcleos com nucléolos proeminentes e cromatina grumosa. Os vasos neoformados não apresentavam camada média muscular lisa e estavam imersos em uma matriz de colágeno jovem em maturação (figura 21).

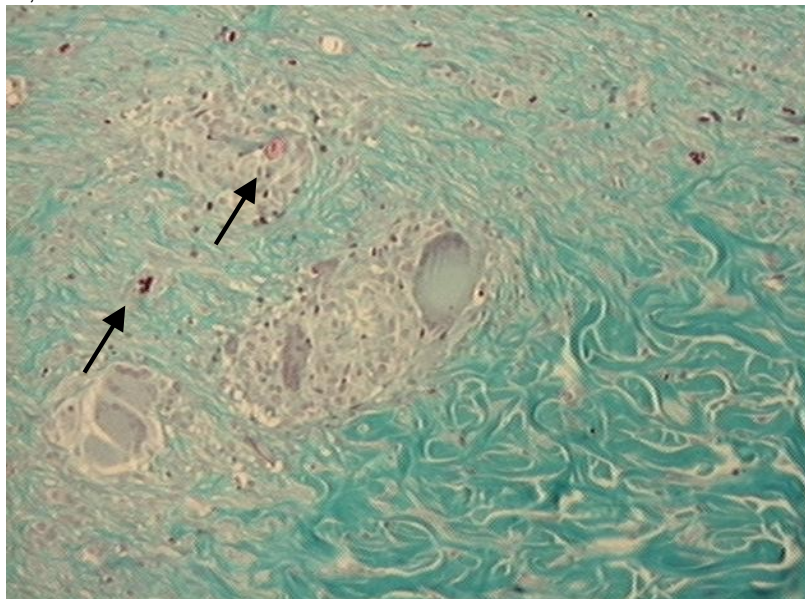
FIGURA 21 – CORTE HISTOLÓGICO DO RETALHO CUTÂNEO NO DIA 14 DO RATO DO GRUPO CONTROLE, HE, 100X



NOTA: Observa-se vasos neoformados ( ↗ ), matriz de colágeno ( ↗↗ ).

Na figura 22, observa-se a transição entre a área do retalho e a área de pele normal não descolada adjacente ao retalho. Na área do retalho há neoformação vascular composta de pequenos vasos, sendo que as hemácias em seu interior são evidenciadas pela cor vermelha.

FIGURA 22 – CORTE HISTOLÓGICO DO RETALHO CUTÂNEO NO DIA 14 DO RATO DO GRUPO CONTROLE, TG, 100X

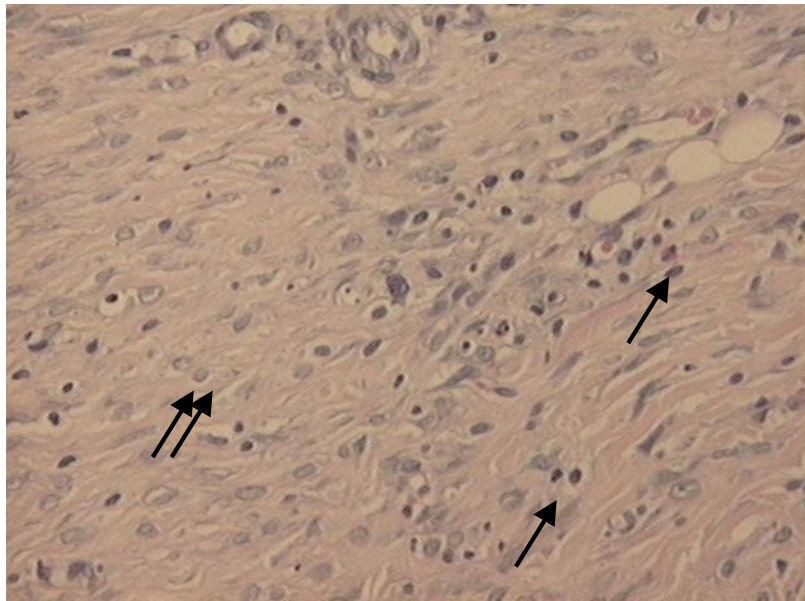


NOTA: Transição entre a área do retalho no canto superior esquerdo e a área de pele normal não descolada adjacente ao retalho no canto inferior direito. Observam-se vasos neoformados ( ↗ ) com hemácias em seu interior.

#### 4.3.1.2 Aspecto histológico da neovascularização do retalho do grupo Vitamina C no dia 14

Neste grupo, observou-se grande quantidade de pequenos vasos jovens característicos do processo de neoangiogênese. A parede era delicada e formada apenas por única camada de células endoteliais proliferadas e ativadas, as quais apresentavam citoplasma tumefeito e núcleos com nucléolos proeminentes e cromatina grumosa. Os vasos neoformados não apresentavam camada média muscular lisa e estavam imersos em uma matriz de colágeno jovem em maturação (figuras 23 e 24).

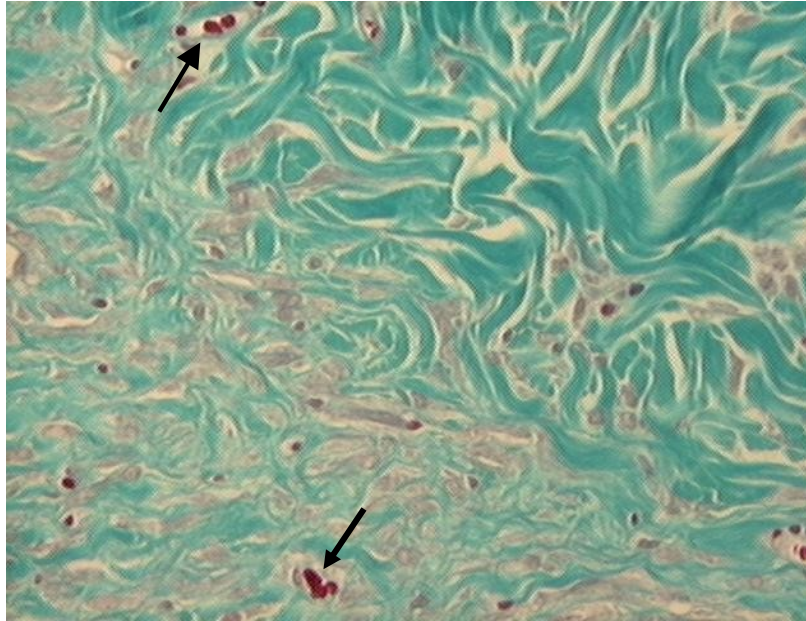
FIGURA 23 – CORTE HISTOLÓGICO DO RETALHO CUTÂNEO NO DIA 14 DO RATO DO GRUPO VITAMINA C, HE, 100X



NOTA: Observa-se a grande quantidade de vasos neoformados (↗) com paredes formadas com apenas uma camada de células endoteliais, matriz de colágeno (↗↗).



FIGURA 24 – CORTE HISTOLÓGICO DO RETALHO CUTÂNEO NO DIA 14 DO RATO DO GRUPO VITAMINA C, TG, 100X

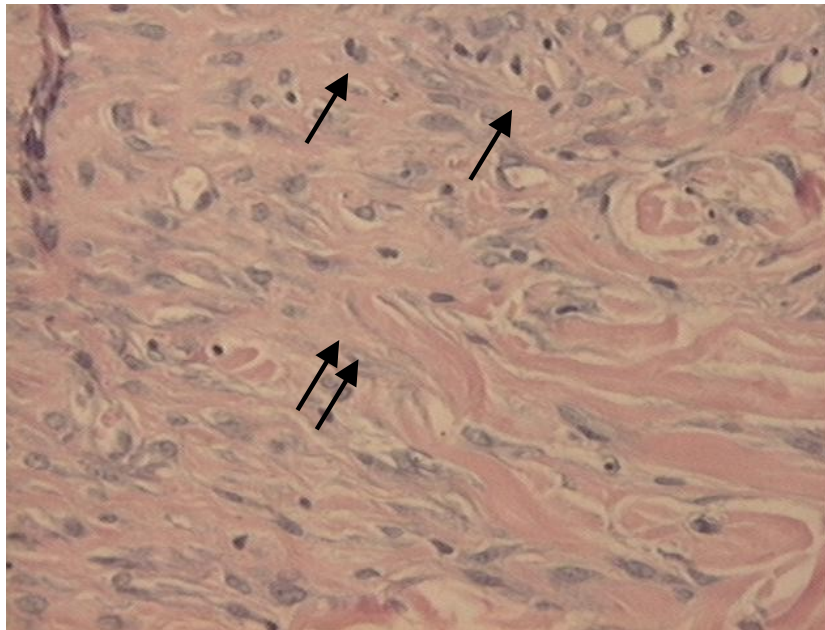


NOTA: Observa-se neoformação vascular composta de pequenos vasos na área do retalho no canto inferior esquerdo, sendo que as hemácias em seu interior são evidenciadas pela cor vermelha ( ↗ , ↘ ). Esta coloração comprova que estes vasos não tem camada muscular média lisa, a qual se coraria em púrpura por esta técnica.

#### 4.3.1.3 Aspecto histológico da neovascularização do retalho do grupo Vitamina E no dia 14

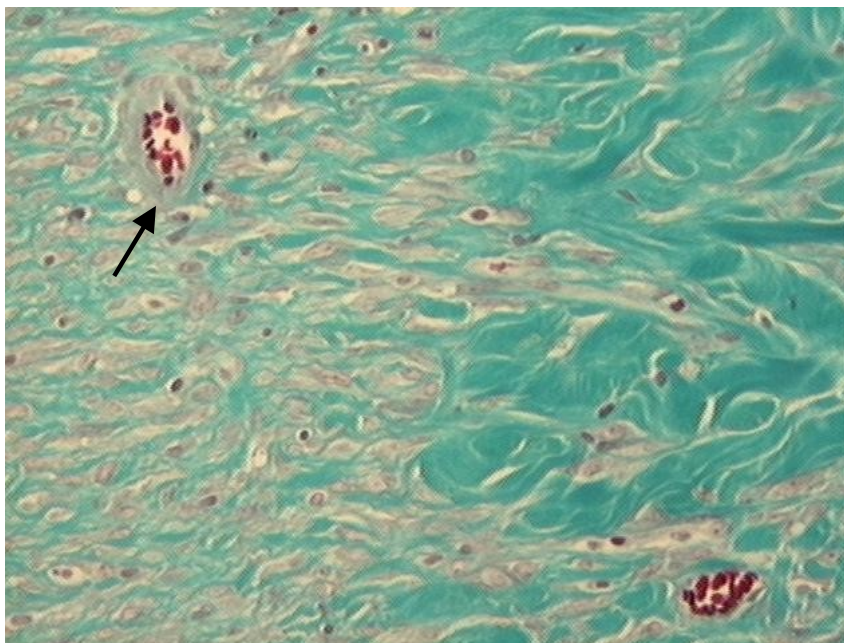
Neste grupo, observou-se grande quantidade de pequenos vasos jovens característicos do processo de neoangiogênese. A parede era delicada e formada apenas por única camada de células endoteliais proliferadas e ativadas, as quais apresentavam citoplasma tumefeito e núcleos com nucléolos proeminentes e cromatina grumosa. Os vasos neoformados não apresentavam camada média muscular lisa e estavam imersos em matriz de colágeno jovem em maturação (figuras 25 e 26).

FIGURA 25 – CORTE HISTOLÓGICO DO RETALHO CUTÂNEO NO DIA 14 DO RATO DO GRUPO VITAMINA E, HE, 100X



NOTA: Observa-se a grande quantidade de vasos ( ↗ ), matriz colágeno ( ↗↗ ).

FIGURA 26– CORTE HISTOLÓGICO DO RETALHO CUTÂNEO NO DIA 14 DO RATO DO GRUPO VITAMINA E, TG, 100X



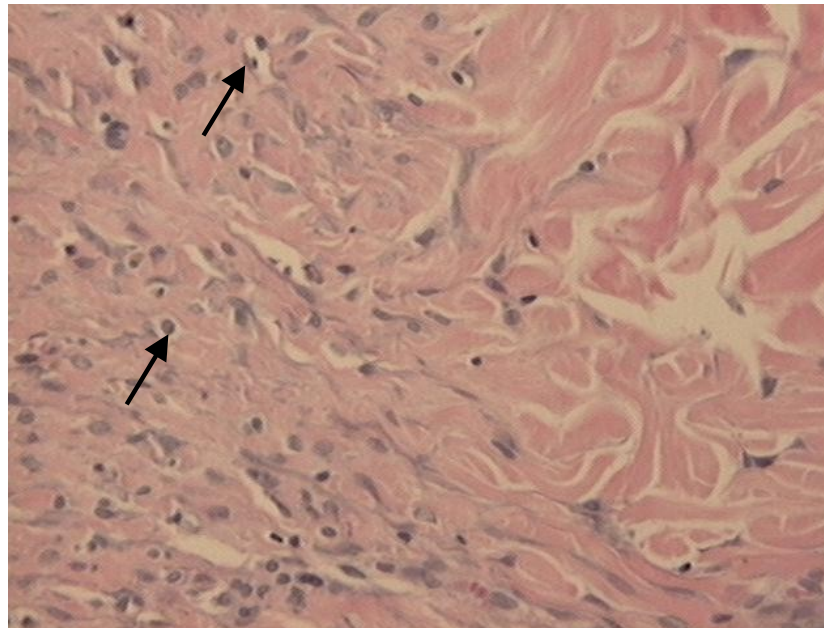
NOTA: À esquerda observa-se a área do retalho e à direita a área normal não descolada adjacente ao retalho. Observa-se neoformação vascular composta de pequenos vasos, sendo que as hemácias em seu interior são evidenciadas pela cor vermelha ( ↗ ). Esta coloração comprova que estes vasos não tem camada muscular média lisa, a qual se coraria em púrpura por esta técnica.



#### 4.3.1.4 Aspecto histológico da neovascularização do retalho do grupo *Gingko biloba* no dia 14

Observou-se grande quantidade de pequenos vasos jovens característicos do processo de neoangiogênese. A parede era delicada e formada apenas por única camada de células endoteliais proliferadas e ativadas, as quais apresentavam citoplasma tumefeito e núcleos com nucléolos proeminentes e cromatina grumosa. Os vasos neoformados não apresentavam camada média muscular lisa e estavam imersos em matriz de colágeno jovem em maturação (figura 27).

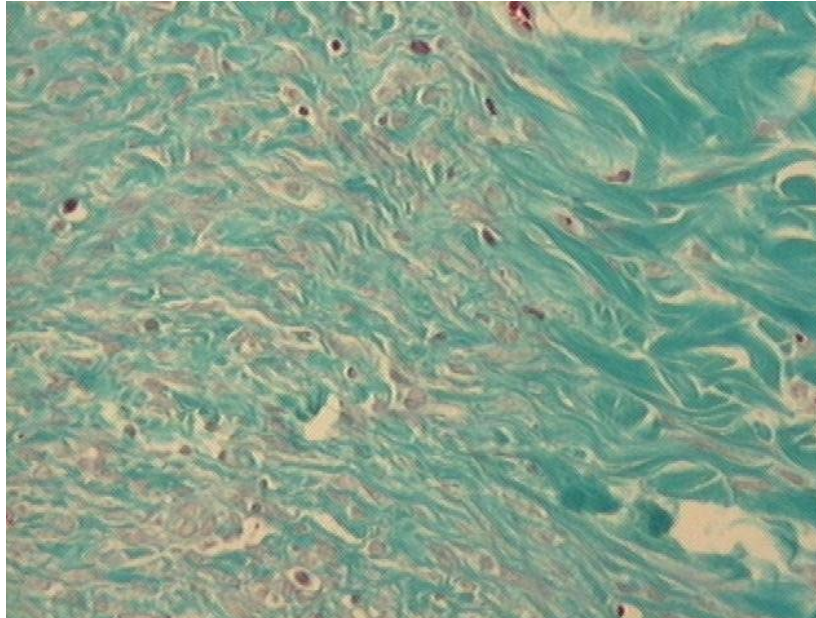
FIGURA 27 – CORTE HISTOLÓGICO DO RETALHO CUTÂNEO NO DIA 14 DO RATO DO GRUPO *GINGKO BILOBA*, HE. 100X



NOTA: Observa-se neoformação vascular composta de pequenos vasos, sendo que as hemácias em seu interior são evidenciadas pela cor vermelha ( ↗ ).

Na figura 28, observa-se a transição entre a área do retalho e a área de pele normal não descolada adjacente ao retalho.

FIGURA 28 – CORTE HISTOLÓGICO DO RETALHO CUTÂNEO NO DIA 14 DO RATO DO GRUPO *GINGKO BILOBA*, TG, 100X

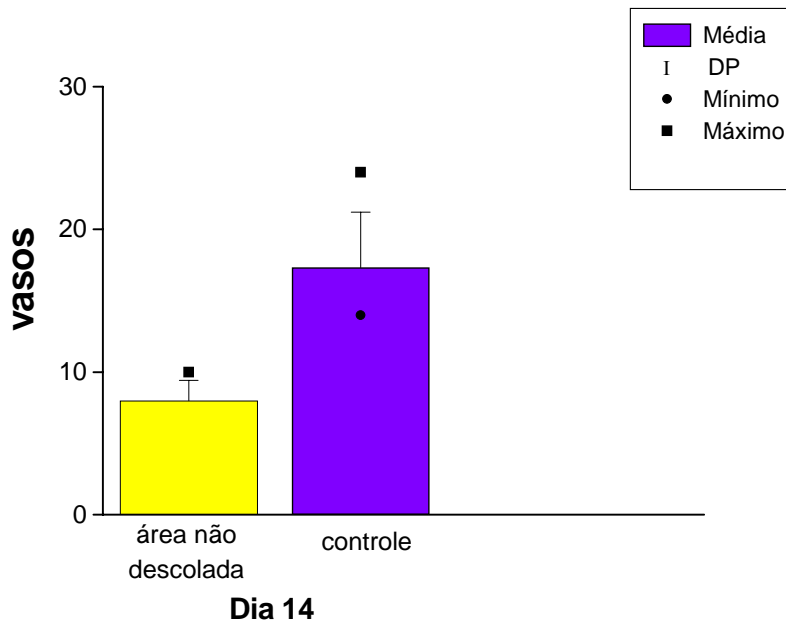


NOTA: À esquerda observa-se a área do retalho e à direita a área normal não descolada adjacente ao retalho.

#### 4.3.2 Quantificação da neovascularização do retalho

No dia 14, o número médio de vasos na área do retalho dos 6 animais do grupo controle foi de  $17,33 \pm 3,88$  e, na área normal não descolada adjacente ao retalho, o número médio de vasos foi de  $8,0 \pm 1,41$ . Como pode-se observar no gráfico 7, o número de vasos na área do retalho foi maior que o número de vasos na área normal não descolada adjacente ao retalho, evidenciando que o processo de elevação de um retalho propicia a neovascularização com aumento do número de vasos.

GRÁFICO 7 – NÚMERO DE VASOS NA ÁREA NORMAL NÃO DESCOLADA ADJACENTE AO RETALHO E NA ÁREA DO RETALHO NO GRUPO CONTROLE NO DIA 14



FONTE – Tabela 14 do Anexo

Neste mesmo dia, os 6 animais do grupo Vitamina C apresentaram número médio de vasos de  $37,33 \pm 4,08$  na área do retalho e, a área normal não descolada adjacente ao retalho, apresentava número médio de vasos de  $13,67 \pm 3,82$ . Os 6 animais do grupo Vitamina E apresentaram número médio de vasos na área do retalho de  $27,17 \pm 3,25$  e de  $11,5 \pm 1,37$  na área normal não descolada adjacente ao retalho. Os 6 animais do grupo *Ginkgo biloba* apresentaram número médio de vasos na área do retalho de  $37,17 \pm 9,38$  e de  $11,17 \pm 1,47$  na área normal não descolada adjacente ao retalho.

Os valores do número médio dos vasos dos retalhos em todos os grupos encontram-se apresentados na tabela 3, assim como o desvio padrão e valor de  $p$ .

TABELA 3 – NÚMERO DE VASOS NO RETALHO EM TODOS OS GRUPOS

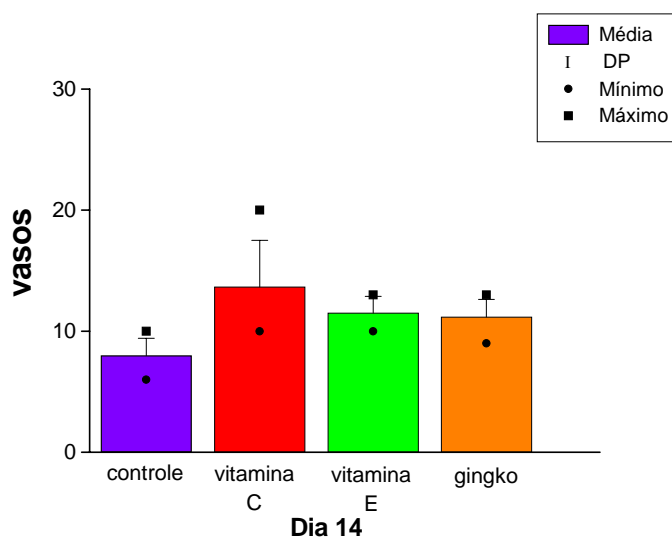
GRUPO	ANIMAIS	MÉDIA DESVIO $\pm$ PADRÃO	VALOR de $p^*$
CONTROLE	6	17,33 $\pm$ 3,88	----
VITAMINA C	6	37,33 $\pm$ 4,08	0,0039
VITAMINA E	6	27,17 $\pm$ 3,25	0,0060
GINGKO BILOBA	6	37,17 $\pm$ 9,38	0,0038

NOTA: \* Diferenças entre os grupos vitamina C, vitamina E e *Gingko biloba* em relação ao grupo controle.

FONTE – Tabelas 13 a 17 do Anexo

Como podemos observar no gráfico 8, os grupos Vitamina C, Vitamina E e *Gingko biloba* apresentaram um número maior de vasos na área normal não descolada adjacente ao retalho em comparação ao grupo controle, evidenciando um aumento do estímulo da neovascularização proporcionado pelas substâncias antioxidantes em áreas não descoladas.

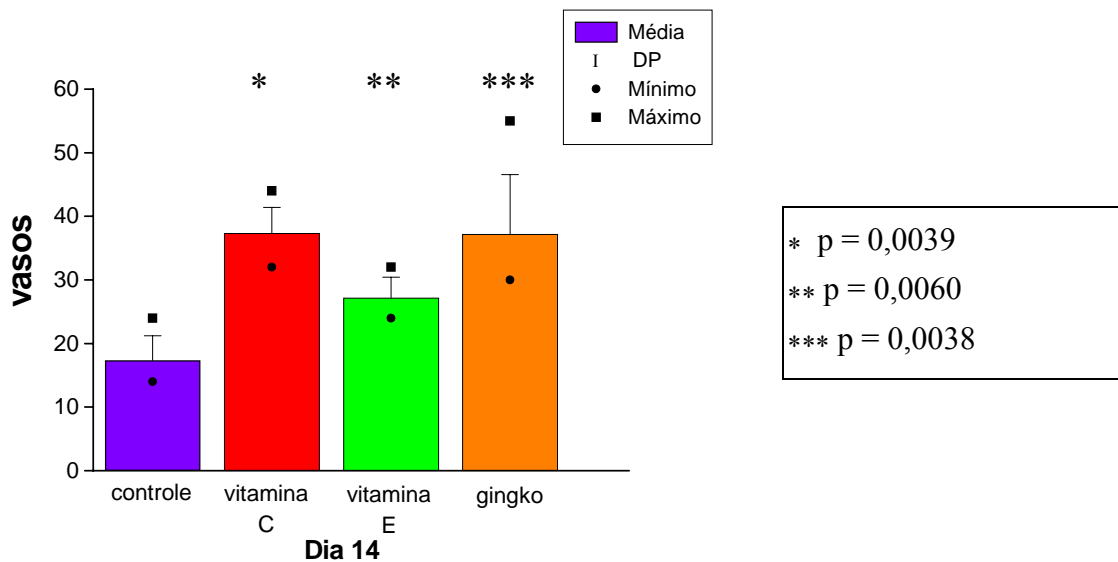
GRÁFICO 8– NÚMERO DE VASOS NAS ÁREAS NÃO DESCOLADAS ADJACENTES AOS RETALHOS NO DIA 14



FONTE – Tabela 13 do Anexo

Como podemos observar no gráfico 9, o número de vasos também encontra-se aumentado nas áreas dos retalhos nos grupos Vitamina C ( $p = 0,0039$ ), Vitamina E ( $p = 0,0060$ ) e *Gingko biloba* ( $p = 0,0038$ ) e maiores em relação ao número de vasos na área do retalho do grupo controle demonstrando o aumento da neovascularização proporcionada pelas substâncias antioxidantes sobre as áreas dos retalhos. O grupo Vitamina C e *Gingko biloba* apresentaram resultados muito semelhantes, superiores aos encontrados no grupo Vitamina E.

GRÁFICO 9 – NÚMERO DE VASOS NAS ÁREAS DOS RETALHOS NO DIA 14



FONTE – Tabelas 13 a 16 do Anexo



## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 MODELO EXPERIMENTAL

#### 5.1.1 Animal

Neste estudo o animal escolhido foi o rato da linhagem Wistar, por ser um animal de pequeno porte, de fácil aquisição e padronização no que diz respeito à idade, peso, sexo, alojamento, alimentação, cuidados de limpeza e manipulação experimental. Além disso, estes animais apresentam pequeno índice de mortalidade, são resistentes a infecções e podem ser utilizados em grande número e anestesiados, por via inalatória, intraperitoneal ou intravenosa, conforme a necessidade.

#### 5.1.2 Tipo do retalho

Neste estudo experimental da viabilidade de retalho cutâneo em dorso de ratos foram realizados retalhos semelhantes ao trabalho de KHOURI, ANGEL e EDSTROM (1986) que modificaram o retalho proposto inicialmente por Mc FARLANE, DeYONG e HENRY (1965) para retalho de 10 x 3 cm utilizando pedículo caudal. Neste retalho há duas artérias sacrais nutridoras do retalho ao invés de somente uma, o que confere maior viabilidade do retalho. Mc FARLANE, DeYONG e HENRY (1965) descreveram um retalho cutâneo dorsal em ratos de 10 x 4 cm, seguindo o eixo da coluna vertebral e pedículo cranial com necrose previsível de 25% distal do retalho. Entretanto, os trabalhos de KHOURI, ANGEL e EDSTROM (1986) demonstraram que os retalhos com base caudal com pedículo com dois vasos sacrais constantes

apresentam viabilidade maior do que os retalhos com base cranial, que eram perfundidos por um único vaso escapular; que a largura de 3 cm é mais previsível por apresentar um menor desvio padrão quando comparados aos outros grupos; que o retalho de 10 x 3 cm com base caudal apresenta resultados mais previsíveis e consistentes, necessitando amostra menor de animais para estudos experimentais. Este tipo de retalho foi utilizado neste estudo para se obter informação necessária sobre a sua viabilidade semelhante ao trabalho de BEKERECIOGIU, TERCAN e OZYAZGAN (1998) que também utilizaram retalho cutâneo dorsal com dimensões de 10 x 3 cm com pedículo caudal. Alguns autores utilizaram retalho de parede abdominal como HAYDEN, PANIELLO, YEUNG, BELLO e DAWSON (1987) que utilizaram retalho cutâneo de parede abdominal de dimensões de 8 x 8 cm. ZACCARIA, WEINZWEIG, YOSHITAKE, MATSUDA e COHEN (1994) utilizaram um retalho cutâneo de parede abdominal de 6 x 3,5 cm, em ilha. Estes tipos de retalhos não apresentam padronização tão fidedigna quanto os retalhos descritos por Mc FARLANE, DeYONG e HENRY (1965) e KHOURI, ANGEL e EDSTROM (1986). FILHO, LEAL, SBALCHIERO e MARQUES (2002) utilizaram o retalho cutâneo descrito por Mc FARLANE, DeYONG e HENRY (1965) e modificado por HAMMOND, BROOKSHER, MANN e BEERNINK (1993) de dimensões de 2 x 7 cm com pedículo caudal. Neste tipo de retalho, após a confecção do mesmo, a ferida cirúrgica é fechada e o retalho suturado sobre a área fechada. Este retalho não tem contato com o leito receptor subjacente e depende totalmente do pedículo. A viabilidade de um retalho cutâneo, após a sua confecção, depende inicialmente do fluxo sanguíneo proveniente do pedículo e, a partir de 7 dias, dos vasos neoformados no leito receptor. A função das substâncias antioxidantes em promover a neovascularização e melhora a viabilidade do retalho cutâneo, encontra-se na capacidade de acelerar o processo de angiogênese e também de aumentar o número de vasos sanguíneos no leito receptor como foi demonstrado neste trabalho, com aumento do número de vasos do retalhos nos grupos que receberam substâncias antioxidantes. FILHO, LEAL, SBALCHIERO e MARQUES (2002), ao utilizarem retalho que não tem contato com o leito receptor, deixaram de avaliar a influência do leito receptor



com um número aumentado de vasos sobre a viabilidade dos retalhos.

## 5.2 SUBSTÂNCIAS ANTIOXIDANTES

Foram encontrados na literatura escassos trabalhos que estudaram os efeitos das substâncias antioxidantes sendo que as mais estudadas foram a vitamina C, vitamina E e *Gingko biloba*, como demonstrados nos trabalhos de BEKERECIOGIU, TERCAN e OZYAZGAN (1998) que estudaram os efeitos da vitamina C, *Gingko biloba* e vitamina E; HAYDEN, PANIELLO, YEUNG, BELLO e DAWSON (1987) que avaliaram os efeitos antioxidantes da vitamina C, vitamina E e vitamina A; ZACCARIA, WEINZWEIG, YOSHITAKE, MATSUDA e COHEN (1994) que avaliaram os efeitos da vitamina C e FILHO, LEAL, SBALCHIERO e MARQUES (2002) que demonstraram a ação do *Gingko biloba*. Todavia, apresentam-se escassos na literatura trabalhos que abordem de forma mais ampla e abrangente o estudo destas substâncias. Portanto foram escolhidas a vitamina C, vitamina E e *Gingko biloba* com o intuito de avaliar a eficácia dessas substâncias sobre a viabilidade do retalho cutâneo dorsal em ratos.

Neste estudo, o início da administração das drogas ocorreu após 24 h do retalho ter sido elevado semelhante aos trabalhos de BEKERECIOGIU, TERCAN e OZYAZGAN (1998) e FILHO, LEAL, SBALCHIERO e MARQUES (2002). Optou-se pelo início do uso destas substâncias neste período porque a reperfusão tecidual começa por volta das 24 h após o retalho ter sido elevado e é responsável pelo aumento significativo de radicais livres responsáveis pela agressão tecidual, que causariam neste estudo, maior isquemia e necrose da parte distal do retalho. HAYDEN, PANIELLO, YEUNG, BELLO e DAWSON (1987) iniciaram a administração da Vitamina C e Vitamina E uma h após o retalho ter sido elevado e encontraram média de viabilidade do retalho nestes grupos de 84 a 89% com  $p < 0,005$ , superior ao encontrado no grupo controle, que foi de 67%. No presente estudo, a média de viabilidade do retalho no grupo Vitamina C foi 78% com  $p = 0,0039$  e no grupo Vitamina E foi 75,12% com  $p = 0,0161$ , resultados inferiores aos encontrados pelos autores acima. Os melhores resultados obtidos pelos autores acima em relação a

Vitamina E podem estar associados ao início precoce da administração destas substâncias e, também à simples presença de tais substâncias associadas ao retalho, que por si só já possuem a capacidade de melhorar a viabilidade do retalho. ZACCARIA, WEINZWEIG, YOSHITAKE, MATSUDA e COHEN (1994) submeteram o retalho à isquemia por 6 h, com clampeamento da artéria axial nutridora do retalho e, 15 min antes da liberação do pedículo, administraram a Vitamina C. Encontraram a média de viabilidade do retalho no grupo que recebeu a Vitamina C de 25,8% com  $p < 0,025$ , superior ao grupo controle que apresentou a média de viabilidade de 7,5%. Neste estudo, o grupo Vitamina C apresentou média de viabilidade do retalho de 78% com valor de  $p = 0,0039$ , superior ao encontrado pelo autores acima, demonstrando que o uso da Vitamina C antes do prazo de 24 h não proporcionou um resultado melhor. Pode-se observar neste estudo que o início da administração das substâncias antioxidantes 24 h após o retalho ter sido elevado foi eficaz ao proporcionar melhora da viabilidade dos retalhos cutâneos.

Neste estudo, a Vitamina C, Vitamina E e *Gingko biloba* foram aplicadas por via IP, similar ao trabalho de BEKERECIOGIU, TERCAN e OZYAZGAN (1998), que utilizaram a mesma via de administração da Vitamina C e do *Gingko biloba*, com exceção da vitamina E que foi aplicada por IM. Também no trabalho de FILHO, LEAL, SBALCHIERO e MARQUES (2002) foi utilizado a via IP para o uso de *Gingko biloba*. Outros autores utilizaram outras vias de administração destas substâncias, como HAYDEN, PANIELLO, YEUNG, BELLO e DAWSON (1987) que utilizaram a via IV para a administração da Vitamina C e VO para a Vitamina E e ZACCARIA, WEINZWEIG, YOSHITAKE, MATSUDA e COHEN (1994) que utilizaram a via IV para a administração da Vitamina C. A via IP é considerada uma via rápida, segura e de fácil acesso. O peritônio apresenta excelente capacidade absorptiva e as substâncias atingem a corrente circulatória em pouco tempo. Houve facilidade no manuseio da injeção IP ao posicionar o animal e aplicar a injeção no quadrante inferior direito do abdome a fim de evitar a punção de alguma víscera intra-abdominal, método rápido e sem necessidade de submeter o animal à anestesia inalatória.

No presente trabalho foram utilizadas as doses de vitamina C de 340 mg/kg de 12/12 h, vitamina E na dose de 20 mg/kg 1x/dia e *Gingko biloba* na dose de 100 mg/kg 1x/dia. As doses são semelhantes às utilizadas por BEKERECIOGIU, TERCAN e OZYAZGAN (1998), que utilizaram a vitamina C na dose de 340 mg/kg de 12/12 h, *Gingko biloba* na dose de 100 mg/kg por dia e vitamina E na dose de 20 mg/kg porém em dias alternados, intervalo muito prolongado uma vez que a meia vida da Vitamina E é 24 h, por um período de 6 dias. FILHO, LEAL, SBALCHIERO e MARQUES (2002) também utilizaram o *Gingko biloba* na dose de 100 mg/kg 1x/dia por um período de 5 dias. As dosagens destas substâncias antioxidantes foram obtidas pelo levantamento da literatura e os intervalos de administração foram estabelecidos de acordo com a meia vida destas drogas. As substâncias antioxidantes, carreadoras de radicais livres, foram administradas por período de 6 dias porque atuariam diminuindo progressivamente os níveis de radicais livres, responsáveis pelo dano tecidual, que encontram-se aumentados neste período após a elevação do retalho. Entretanto ZACCARIA, WEINZWEIG, YOSHITAKE, MATSUDA e COHEN (1994) utilizaram a vitamina C em dose única de 2,5 ml/kg (27 mg/ml) e HAYDEN, PANIELLO, YEUNG, BELLO e DAWSON (1987) também utilizaram dose única para a Vitamina C na dose de 1000 mg/kg porém a vitamina E foi administrada 1x/dia na dose de 1000 UI/kg. A posologia da Vitamina C em dose única pode ter sido insuficiente apesar da dose utilizada por estes últimos autores ter sido maior que a utilizada neste estudo e os resultados obtidos apresentarem valor estatístico significante, porém inferiores aos encontrados neste estudo. Neste estudo, tornou-se evidente a necessidade de administração das substâncias por período maior de tempo e com intervalos que respeitem a meia vida das drogas utilizadas.

### 5.3 VIABILIDADE DO RETALHO CUTÂNEO

Em relação ao tempo de observação do retalho após a elevação do mesmo, foi optado neste estudo pela observação por 14 dias para assegurar a definição completa da área de necrose e de viabilidade do retalho. A partir do sétimo dia de pós-operatório, a área de necrose começou a ficar mais nítida e, no décimo quarto dia, a

área de necrose já estava definida. De acordo com a fisiopatologia do processo de angiogênese, após 3 a 5 dias da elevação de um retalho começa a proliferação de pequenos vasos sanguíneos neoformados no leito receptor e, neste período, a irrigação do retalho depende somente dos vasos do pedículo. FILHO, LEAL, SBALCHIERO e MARQUES (2002) observaram o retalho por 6 dias, tempo insuficiente para a delimitação exata da área de necrose e de viabilidade apesar de que o retalho utilizado dependia somente do pedículo por não estar em contato com o leito receptor. A partir do sétimo dia, os vasos neoformados no leito receptor passam a proporcionar uma vascularização ao retalho mas ainda insuficiente, tornando-se indispensável ainda o pedículo do retalho. HAYDEN, PANIELLO, YEUNG, BELLO e DAWSON (1987) e ZACCARIA, WEINZWEIG, YOSHITAKE, MATSUDA e COHEN (1994) observaram o retalho por 7 dias; enquanto BEKERECIOGIU, TERCAN e OZYAZGAN (1998) observaram o retalho por 10 dias. A partir do décimo quarto dia, os vasos neoformados do leito receptor são suficientes para prover a irrigação sanguínea do retalho, tornando-se dispensável o pedículo. Neste período, a área de viabilidade e necrose estão completamente delimitadas (COLLINS, COTRAN e KUMAR, 2000; HAMMOND, BROOKSHER, MANN e BEERNINK, 1993). Neste estudo, foi utilizado um tempo maior de observação, no caso 14 dias, justamente para tornar os resultados mais fidedignos com a delimitação exata entre as áreas de viabilidade e necrose do retalho, respeitando a influência do pedículo e, posteriormente do leito receptor sobre a viabilidade do retalho.

HAYDEN, PANIELLO, YEUNG, BELLO e DAWSON (1987) demonstraram que a vitamina C e a vitamina E aumentaram a viabilidade aguda de retalhos cutâneos axiais em ratos, com viabilidade média do retalho de 84% a 89% ( $p < 0,0005$ ) quando comparados ao grupo controle que apresentou viabilidade média de 67%, assim como ZACCARIA, WEINZWEIG, YOSHITAKE, MATSUDA e COHEN (1994) que demonstraram que a porcentagem de viabilidade do retalho cutâneo no grupo que recebeu a vitamina C foi de 25,5% comparado a 7,5% do grupo controle ( $p < 0,025$ ). No presente estudo, pode-se verificar que o uso de substâncias antioxidantes aumentou a área de viabilidade dos retalhos quando comparados ao grupo controle

pois a média de viabilidade do grupo controle foi 65,93%, enquanto o grupo Vitamina C foi 78,05% e  $p = 0,0039$ , grupo Vitamina E foi 75,08% e  $p = 0,0161$  e grupo *Gingko biloba* foi 72,16% e  $p = 0,0245$  demonstrando que em todos os grupos onde foram administradas as substâncias antioxidantes houve um aumento significativo da área de viabilidade do retalho quando comparados ao grupo controle, sendo que o grupo Vitamina C foi superior a todos eles.

BEKERECIOGIU, TERCAN e OZYAZGAN (1998) demonstraram que as áreas médias de necrose do retalho no grupo controle foi  $8,76 \pm 2,12 \text{ cm}^2$ , no grupo da vitamina C foi  $6,07 \pm 2,26 \text{ cm}^2$  ( $p < 0,005$ ) e no grupo do extrato de *Gingko biloba* foi  $2,99 \pm 2,25 \text{ cm}^2$  ( $p < 0,001$ ). A área média de necrose do grupo da Vitamina E foi  $7,23 \pm 2,97 \text{ cm}^2$  ( $p = 0,20$ ). BEKERECIOGIU, TERCAN e OZYAZGAN (1998) não encontraram no grupo da Vitamina E nenhuma diferença em relação ao grupo controle, e concluíram que a Vitamina E apresentou tal resultado por ter sido utilizada em intervalos prolongados e por IM, ao contrário do encontrado no presente estudo, no qual o grupo Vitamina E apresentou área de necrose menor ( $7,03 \pm 2,10 \text{ cm}^2$   $p = 0,0161$ ) ao do grupo controle ( $9,43 \pm 0,22 \text{ cm}^2$ ) e foi administrada por via IP com intervalos de 12 h. BEKERECIOGIU, TERCAN e OZYAZGAN (1998) evidenciaram que o *Gingko biloba* apresentou menor área de necrose menor ( $2,99 \pm 2,25 \text{ cm}^2$   $p < 0,001$ ) em relação à Vitamina C ( $6,07 \pm 2,26 \text{ cm}^2$   $p < 0,005$ ) e à Vitamina E ( $7,23 \pm 2,97 \text{ cm}^2$   $p = 0,20$ ). No presente estudo, o *Gingko biloba* apresentou área média de necrose menor ( $7,79 \pm 1,60 \text{ cm}^2$   $p = 0,0245$ ) em relação ao grupo controle ( $9,43 \pm 0,22 \text{ cm}^2$ ) mas superior ao grupo da Vitamina C ( $6,13 \pm 1,52 \text{ cm}^2$   $p = 0,0039$ ) e ao grupo da Vitamina E ( $7,03 \pm 2,10 \text{ cm}^2$   $p = 0,0161$ ). Todavia, o uso de *Gingko biloba* neste estudo associou-se a menor área de necrose e, conseqüentemente, maior área de viabilidade no retalho, quando comparado ao grupo controle. Estudos como o de FILHO, LEAL, SBALCHIERO e MARQUES (2002) também encontraram resultados estatisticamente significantes em relação à administração de *Gingko biloba*. Estes autores encontraram a média de viabilidade do retalho no grupo tratado com *Gingko biloba* de  $5,490 \pm 0,283 \text{ cm}^2$ , com valor de  $p = 0,001$  e no grupo controle de  $2,702 \pm$

0,195 cm<sup>2</sup>. No presente estudo, o grupo *Gingko biloba* apresentou área média de viabilidade de  $19,89 \pm 1,61$  cm<sup>2</sup> e  $p = 0,0245$ , com resultados também significantes estatisticamente, porém inferiores aos resultados encontrados no grupo da Vitamina C ( $21,77 \pm 1,48$  cm<sup>2</sup> e  $p = 0,0039$ ) e no grupo da Vitamina E ( $21,23 \pm 2,43$  cm<sup>2</sup> e  $p = 0,0161$ ).

O IVR foi obtido mediante divisão da área viável do retalho pela área não viável (área de necrose) do retalho e proporcionou uma comparação objetiva da viabilidade entre os grupos estudados. Os grupos Vitamina C, Vitamina E e *Gingko biloba* apresentaram um IRV maior que o IVR do grupo controle demonstrando maior viabilidade dos retalhos.

## 5.4 HISTOLOGIA E MORFOMETRIA

### 5.4.1 Método utilizado

A técnica utilizada neste estudo foi a morfometria, um método simples de contagem de vasos realizada através da técnica de varredura. Apresenta custo baixo, pois não necessita de programa de computador para a sua execução. O método morfométrico pela técnica da varredura é capaz de contabilizar vasos pequenos e de tamanhos diferentes, enquanto a morfometria realizada através de programa de computador não reconhece tais estruturas pois o reconhecimento ocorre através de parâmetros como cor e tamanho. Por exemplo, toda estrutura que for redonda e apresentar orifício branco será contabilizada como vaso sanguíneo. Portanto, esta maneira torna-se confusa e errônea, pois na lâmina histológica podem existir fendas ou artefatos que não correspondem a vasos sanguíneos, causando erro durante a contagem. Observou-se neste trabalho que na leitura das lâminas não há diferenças identificáveis somente pelas características histológicas da neovascularização. As diferenças numéricas são sutis e somente a morfometria com a contagem de vasos poderia identificá-las. A morfometria utiliza corantes que identificam claramente as

estruturas como vasos, fibras elásticas, derme, folículos pilosos, facilitando a contagem dos vasos. Torna-se eficiente por não perder campos do corte histológico.

O sistema arterial cutâneo é formado por artérias e veias, as quais constituem a macrocirculação, e por arteríolas, capilares, comunicações arteriovenosas e vênulas, os quais constituem a microcirculação. Em nosso estudo, foram contabilizados o número de arteríolas e vênulas. Os capilares não foram contabilizados pela dificuldade em identificá-los pois se apresentam como enovelados, muitas vezes confundem-se com fendas por apresentarem uma única célula endotelial em sua parede e não apresentarem hemácias em seu interior. O único método de distinguí-los seria através da imunohistoquímica, o qual não foi utilizado neste trabalho por não haver necessidade de comprovação maior, pois o método de varredura foi suficiente para a contagem dos vasos.

#### 5.4.2 Resultados obtidos

Os trabalhos encontrados na literatura que abordaram os efeitos da vitamina C, vitamina E e *Ginkgo biloba* sobre a viabilidade dos retalhos cutâneos como os de BEKERECIOGIU, TERCAN e OZYAZGAN (1998); HAYDEN, PANIELLO, YEUNG, BELLO e DAWSON (1987); ZACCARIA, WEINZWEIG, YOSHITAKE, MATSUDA e COHEN (1994) e FILHO, LEAL, SBALCHIERO e MARQUES (2002) não estudaram histologicamente o aumento do número de vasos conseqüente ao efeito de neovascularização destas substâncias. Neste estudo, a análise histológica da área viável do retalho após 14 dias do experimento evidenciou proliferação vascular no retalho em todos os grupos. No dia 14, os retalhos dos 6 animais do grupo controle, que sofreram processo de autonomização, apresentaram número médio de vasos de  $17,33 \pm 3,88$ , enquanto a área normal não descolada adjacente ao retalho apresentou número médio de vasos de  $8,0 \pm 1,41$ . O aumento do número de vasos no retalho do grupo controle pode ser explicado pela autonomização do retalho, processo que estimula a neovascularização mediante a privação do contato do retalho com o leito receptor, região abaixo do retalho que é descolada para elevação do mesmo e de onde provém parte da irrigação do retalho. Estes resultados são similares ao descrito por RIPPEL,

2002, que avaliou a neovascularização em retalhos após a sua autonomização e demonstrou aumento do número de vasos no retalho após a sua autonomização.

Durante a confecção de um retalho, o procedimento cirúrgico suscita processo inflamatório que pode retardar a angiogênese e aumentar demasiadamente o consumo de oxigênio, o qual já possui seu suprimento inadequado pela vascularização pobre da área afetada comprometendo assim a irrigação da área do retalho (COLLINS, COTRAN e KUMAR, 2000). Em contrapartida, alguns agentes podem estimular e acelerar o processo de angiogênese, favorecendo a vascularização do retalho e evitando certo grau de isquemia, como é o caso das substâncias antioxidantes estudadas neste trabalho. As substâncias antioxidantes agiriam acelerando a formação de novos vasos e aumentando também o número de vasos no leito receptor, confirmado pelos resultados obtidos nos grupos Vitamina C, Vitamina E e *Gingko biloba* que apresentaram um número de vasos maior tanto na área não descolada adjacente ao retalho quanto na área do retalho.

Segundo autores como BEKERECIOGIU, TERCAN e OZYAZGAN (1998); FILHO, LEAL, SBALCHIERO e MARQUES (2002); GALLAGHER, COHEN e LANGE (2002) e DRIEU (2001) o extrato de *Gingko biloba* atua diretamente no fluxo e no calibre dos vasos, por apresentar propriedades de vasodilatação. O *Gingko biloba* poderia atuar na fase inicial da angiogênese quando a irrigação do retalho depende somente dos vasos do pedículo, promovendo vasodilatação dos vasos do pedículo e favorecendo melhor vascularização do retalho como pôde ser evidenciado no estudo de FILHO, LEAL, SBALCHIERO e MARQUES (2002) onde o retalho dependia somente do pedículo e o grupo que recebeu *Gingko biloba* apresentou área média de viabilidade ( $2,702 \pm 0,195 \text{ cm}^2$ ) maior que o grupo controle ( $5,490 \pm 0,283 \text{ cm}^2$ ). A partir do sétimo dia, os vasos neoformados no leito receptor passam a proporcionar a vascularização ao retalho. A partir do décimo quarto dia, os vasos neoformados do leito receptor são suficientes para provir a irrigação sanguínea do retalho, tornando-se dispensável o pedículo (COLLINS, COTRAN e KUMAR, 2000; HAMMOND, BROOKSHER, MANN e BEERNINK, 1993). No presente estudo, contrário ao estudo de FILHO, LEAL, SBALCHIERO e MARQUES (2002) onde o retalho dependia



somente do pedículo, a vascularização dependia do pedículo e também dos vasos neoformados no leito receptor. Também foi demonstrado que a área média de viabilidade do retalho no grupo do *Gingko biloba* ( $19,89 \pm 1,61 \text{ cm}^2$  e  $p < 0,0245$ ) foi superior ao encontrado no do grupo controle ( $17,82 \pm 0,73 \text{ cm}^2$ ).

Autores com BAR-OR (2001) e MURRAY (1989) acreditam que a vitamina C atua no número de vasos por possuir propriedades de diminuir os radicais livres no tecido e, conseqüentemente, a inflamação, a qual levaria à ativação de fatores desencadeantes da vasoconstrição e ativação de fibroblastos, causando diminuição do fluxo sanguíneo e fibrose dos vasos. De fato, neste estudo a porcentagem maior da viabilidade do retalho foi maior no grupo da Vitamina C ( $21,77 \pm 1,48 \text{ cm}^2$  e  $p < 0,0039$ ) quando comparado ao grupo controle ( $17,82 \pm 0,73 \text{ cm}^2$ ).

Segundo autores como DONI (1984) e FREEDMAN e KEANEY (2001) a vitamina E atua diretamente no número de vasos por estimular a angiogênese e no fluxo e no calibre dos vasos mediante atividade antiplaquetária, como pôde ser evidenciado no presente estudo, pela porcentagem maior da viabilidade do retalho no grupo da Vitamina E ( $21,23 \pm 2,43 \text{ cm}^2$  e  $p < 0,0161$ ) quando comparado ao grupo controle ( $17,82 \pm 0,73 \text{ cm}^2$ ). Foi possível observar neste estudo que os grupos que receberam substâncias antioxidantes apresentaram número maior de vasos na área do retalho devido ao estímulo da neovascularização promovidos por estas substâncias.

As perspectivas de continuação nesta mesma linha de pesquisa incluiriam a avaliação do uso combinado dessas substâncias antioxidantes e avaliação do número de capilares através da técnica de imunohistoquímica.



## **6 CONCLUSÕES**

Com base nos resultados obtidos neste estudo pode-se concluir que:

1. A viabilidade do retalho cutâneo dorsal em ratos é maior nos grupos que receberam substâncias antioxidantes.
2. A neovascularização do retalho, evidenciada pelo aumento do número de vasos, está aumentada em todos os grupos porém é mais pronunciada nos grupos que receberam as substâncias antioxidantes.

## **REFERÊNCIAS**

## REFERÊNCIAS

ADAMSON, J.E.; HORTON, C.E.; CRAWFORD, H.H.; AYERS, W.T. Studies on the action of dimethyl sulfoxide on the experimental pedicle flap. **Plast. Reconstr.Surg.**, v. 39, n.2, p. 142-146, Feb. 1967.

AKER, J.S.; MANCOLL, J.; LEWIS, B.; COLEN, L.B. The effect of pentoxifylline on random-pattern skin-flap necrosis induced by nicotine treatment in the rat. **Plast. Reconstr. Surg.**, v. 39, n. 2, p. 142-146, Feb. 1997.

ANGEL, M.F.; RAMASASTRY, S.S.; NARAYANAN, K.; ZERBE, A.; SWARTZ, W.M.; FUTREL, J.W. Studies on the nature of the flap/bed interaction in rodents- Part II: Morphological and fluorescein kinect data. **Ann. Plast. Surg.**, v. 17, n. 5, p. 434-439, Nov. 1986.

ANGEL, M.F.; RAMASASTRY, S.S.; SWARTZ, W.M.; BASFORD, R.E.; FUTRELL, J.W. Deferoxamine increases skin flap survival: additional evidence of free radical involvement in ischemic flap surgery. **Br.J.Plast.Surg.**, v. 69, p. 469-472, Feb. 1986.

ANGEL, M.F.; RAMASASTRY, S.S.; SWARTZ, W.M.; BASFORD, R.E.; FUTRELL, J.W. Free radicals: basic concepts concerning the chemistry, pathophysiology and relevance to plastic surgery. **Plast. Reconstr.Surg.**, v. 39, n.2, p. 879-990, Feb. 1987.

- ANGEL, M.F.; RAMASASTRY, S.S.; SWARTZ, W.M.; NARAYANAN, K.; KUHN, D.B.; BASFORD, R.E.; FUTRELL, J.W. The critical relationship between free radicals and degrees of ischemia: evidence for tissue intolerance of marginal perfusion. **Plast. Reconstr. Surg.**, v. 81, n. 2, p. 233-239, Feb. 1988.
- BANCROFT, J. D.; STEVENS, A. **Theory and practice of histological techniques.** London : C. Livingstone, 1982.
- BAR-OR, D. The two faces of vitamin C. **Science.** v. 14, n. 293, p. 1993-1995, Sep, 2001.
- BEKERECIOGIU, M.; TERCAN, M.; OZYAZGAN, I. The effect of *Gingko biloba* Extract (Egb 761) as a free radical scavenger on the survival of skin flaps in rats. **Scand. J. Plast. Reconstr. Hand Surg.**, v.32, p.135-9, 1998.
- BRICKLIN, M. Herbs that turn back the clock. **Prevention.** v. 47, n. 7, p. 19-23, July, 1995.
- BULKLEY, G.B. Free radicals and others reactive oxygen metabolites: clinical relevance and the therapeutic efficacy of antioxidant therapy. **Surgery**, v.113, n. 5, p.479-483, May 1993.
- CARPENTER, R.J.; ANGEL, M.F.; MORGAN, R.F. Dimethyl sulfoxide increases the survival of primarily ischemic island skin flaps. **Otolaryngol Head Neck Surg.**, v.110, n. 2, p.228-231, Feb. 1994.
- CHEN, X.; TOUYZ, R.M.; PARK, J.B.; SCHIFFRIN, E. L. Antioxidant effects of vitamins C and E are associated with altered activation of vascular NADPH oxidase and superoxide dismutase in stroke-prone SHR. **Hypertension**, v. 38, n. 3, p. 606-611, Sep. 2001.
- COHEN, B.E.; HARMON, C.S.; PHIZACKERLEY, P.J.R. Glucose metabolism in experimental skin flaps. **Plast. Reconstr. Surg.**, v. 71, n. 1, p. 79-85, Jan. 1983.
- COLLINS, T.; COTRAN, R.S.; KUMAR, V. Inflamação aguda e crônica. In: **Patologia estrutural e funcional.**, p.44-78, 6. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
- COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. **Robbins patologia estrutural e funcional.** 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

DAVIS, R.E.; COHEN, J.I.; ROBINSON, J.E.; URBEN, S.L.; COOK, T.A. Ketorolac (Toradol) and acute random-pattern skin flap survival in rat. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg.**, v.121, p.673-677, 1995.

DAVIS, R. E.; WACHHOLZ, J. H.; JASSIR, D.; PERLYN, C. A.; AGRAMA, M. H. Comparison of topical anti-ischemic agents in the salvage of failing random-pattern skin flaps in rats. **Arch. Facial Plast. Surg.**, v. 1, n. 1, p. 27-32, Jan. 1999.

DONI, M.G.; FALANGA, A.; DELAINI, F.; VICENZI, E.; TOMASIAK, M.; DONATI, M.B. The effect of vitamin E or selenium on the oxidant-antioxidant balance in rats. **Br. J. Exp. Pathol.**, v. 65, n. 1, p. 75-80, Feb. 1984.

FILHO, M. V. P. S.; LEAL, P. R. A.; SBALCHIERO, J. C.; MARQUES, M. J. M. Efeito do extrato de *Gingko biloba* na viabilidade de retalhos cutâneos em ratos. **Rev. Soc. Bras. Cir. Plast.**, v. 17, n. 2, p. 45-56, Maio, 2002.

FREEDMAN, J. E.; KEANEY, J. Vitamin E inhibition of platelet aggregation is independent of antioxidant activity. **J. Nutr.**, v. 131, p. 374S-377S, 2001.

GALLAGHER, B.; COHEN, L.; LANGE, G.M. Effects of long-term exposure to *Gingko biloba* extracts on the heart and testes in aged, male rats. **Michigan Academician.**, v. 34, n. 1, p. 108-112, 2002.

GARNER, W. L. Epidermal regulation of dermal fibroblast. **Plast. Reconstr. Surg.**, Baltimore, v.102, n.1, p.135-139, Jul. 1998.

HAMMOND, D.C.; BROOKSHER, R.D.; MANN, R.J.; BEERNINK, J.H. The dorsal skin-flap model in the rat: Factors influencing survival. **Plast. Reconstr. Surg.**, v.91, n.2, p.316-321, Feb. 1993.

HAYDEN, R.E.; SNYDER, B.J. Pharmacologic manipulation of random skin flaps with pentoxifylline. **Laryngoscope**, v. 103, n. 2, p. 185-188, Feb. 1993.

HAYDEN, R.E.; PANIELLO, R.C.; YEUNG, C. S.; BELLO, S.L.; DAWSON, S.M. The effect of glutathione and vitamins A, C and E on acute skin flap survival. **Laryngoscope**, v. 97, n. 10, p. 1176-1179, Oct. 1987.

HUANG, L.; PRIVALLE, C. T.; SERAFIN, D.; KLITZMAN, B. Increased survival of skin flap by scavengers of superoxide radical. **Faseb J.**, v.69, p.469, 1987.

IHARA, Y.; YAMADA, Y.; TOYOKUNI, S.; BAN, N.; KUROE, A.; SEINO, Y. Antioxidant  $\alpha$ -tocopherol improves glycemic control of GK rats, a model of type 2 diabetes. **Diabetes**. v. 42, n. 8, p. 179-188, Aug. 1993.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON VETERINARY CROSS ANATOMICAL NOMENCLATURE. **Nomina anatomica veterinaria**. Ithaca : World Association of Veterinary Anatomists, 1983. 216p.

JANSSENS, D.; MICHIELS, C.; DELAIVE, E.; ELIAERS, F.; DRIEU, K.; REMACLE, J. Protection of hypoxia-induced ATP decreased in endothelial cells by *Gingko biloba* extract and bilobalide. **Biochem. Pharmacol.**, v. 50, n. 7, p. 991-999, 1995.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Pele e anexos. In: **Histologia básica**, p.303-314, 9. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

KARACAOGLAN, N.; AKBAS, H. Effect of parenteral pentoxifyline and topical nitroglycerin on skin flap survival. **Otolaryngol. Head Neck Surg.**, v. 120, n. 2, p. 272-274, Feb. 1999.

KAUFMAN, T.; ANGEL, M.F.; EICHENLAUB, E.H.; LEVIN M.; HURWITZ, D.J.; FUTREL, J.W. The salutary effects of the bed on the survival of experimental flaps. **Ann. Plast. Surg.**, v. 14, n. 1, p. 64-73, Jan. 1985.

KERRIGAN, C.L. Skin-flap failure: Pathophysiology. **Plast. Reconstr. Surg.**, v. 72, n. 6, p. 766-777, Dec.1983.

KHOURI, R.K.; ANGEL, M.F.; EDSTROM, L.E. Standardizing the dorsal rat flap. **Surg. Forum**, v. 37, p. 590-591, 1986.

KHOURI, R.K.; EDSTROM, L.E.; ANGEL, M.F. The dorsal rat flap: An appraisal of the model. **Surg. Forum**, v. 38, p. 598-599, 1987.



- KIM, Y. S.; IM, M. J.; HOOPEES, J. The effect of a free radical scavenger, N-2 mercaptopropionylglycine on the survival of skin flaps. **Ann. Plast. Surg.**, v. 25, p. 15, Jan. 1990.
- KOUL, A.; MISHIRA, A.; NEHRU, B. Modulation of oxidative stress by ascorbic acid and/or  $\alpha$ -tocopherol. **J. Nutric. Environm. Med.**, v. 10, p. 233-238, 2000.
- KOMOROWSKA-TIMEK, E.; CHEN, S. G.; ZHANG, F.; DOGAN, T.; LINEAWEAVER, W. C.; BUNCKE, H. J. Prolonged perivascular use of verapamil or lidocaine decreases skin flap necrosis. **Ann. Plast. Surg.**, v. 43, n. 3, p. 283-288, Sep. 1999.
- KRYGER, Z.; ZHANG, F.; DOGEN, T.; LINEAWEAVER, W.C.; BINCKE, H.J. The effects of VEGF on survival of a random flap in the rat: examination of various routes of administration. **Br. J. Plast. Surg.**, v.53, n.3, p.234-239, 2000.
- LANDECKER, A.; KATAYAMA, M.L.S.; MAMMANA, A.K.; LEITÃO, R.M.C.; SACHETTA, T.; GEMPERLI, R.; NEVES, R.I. Effects of Retinoic and Glycolic Acids on Neoangiogenesis and Necrosis of Axial Dorsal Skin Flaps in Rats. **Aesth. Plast. Surg.**, v.25, p.134-139, 2001.
- LANGER, B. Radicais livres, isquemia e inflamação. **Rev. Paul. Med.**, v. 104, n. 6, p. 305-310, Nov. 1986.
- LAWRENCE, W.T.; MURPHY, M.C.; ROBSON, M.C.; HEGGERS, J.P. The detrimental effect of cigarette smoking on flap survival: an experimental study in the rat. **Br. J. Plast. Surg.**, v. 37, p. 216-219, 1984.
- MANSON, P.N.; ANTHENELLI, R.M.; IM, M. J.; BULKLEY, G. B.; HOOPEES, J. E. The role of oxygen-free radicals in ischemic tissue injury in island skin flaps. **Ann. Plast. Surg.**, v. 14, n. 1, p. 64-73, Jan. 1983.
- MATSUMURA, H.; YOSHIZAWA, N.; VEDDER, N.B.; WATANABE, K. Preconditioning of the distal portion of a rat random-pattern skin flap. **Br. J. Plast. Surg.**, v.54, n.1, p.58-61, 2001.

McCALEB, R. How much do you know about ginkgo biloba. **Better Nutrition**. v. 56, n. 5, p. 60-63, May, 1994.

McFARLANE, R.M.; DeYOUNG, G.; HENRY, R.A. The design of a pedicle flap in the rat to study necrosis and its prevention. **Plast. Reconst. Surg.**, v. 35, n.2, p.177-182, Feb. 1965.

McFARLANE, R.M.; HEAGY, F.C.; RADIN, S.; AUST, J.C.; WERMUTH, R.E. A study of the delay phenomenon in experimental pedicle flaps. **Plast. Reconst. Surg.**, v. 35, n. 3, p.245-262, Mar. 1965.

McFARLANE, R.M.; WERMUTH, R.E. The use of hyperbaric oxygen to prevent necrosis in experimental pedicle flaps and composite skin grafts. **Plast. Reconst. Surg.**, v. 37, n. 5, p.422-430, May. 1966.

MIKI, M.; TAMAI, H.; MINO, M.; YAMAMOTO, Y.; NIKI, E. Free-radical chain oxidation of rat red blood cells by molecular oxygen and its inhibition by alpha-tocopherol. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 258, n. 2, p. 373-380, Nov. 1987.

MONTEIRO, D.T.; SANTAMORE, W.P.; NEMIR, P. The influence of pentoxifylline on skin-flap survival. . **Plast. Reconst. Surg.**, v. 77, n. 2, p. 277-281, Feb. 1986.

MOST, D.; HOYT, J.; SIBLEY, R.K.; PRESS, B.H.J. Parenchymal cytokine expression precedes clinically observed ischemia in dorsal flaps in the rat. **Plast. Reconst. Surg.**, v. 98, n. 5, p. 856-861, Oct. 1996.

MURRAY, F. Vitamin C exhibits remarkable antioxidant powers. **Better Nutrition**. v. 51, n. 12, p. 10-12, Dec, 1989.

NARAYANA, K.; IM, M. J.; BULKLEY, G. B.; HOOPES, J. E. Mechanism and prevention of ischemia/reperfusion injury in island skin flap. **Surg Forum**, v. 36, p.593, May. 1985.

NOLAN, J. JENKINS, R.A.; KURHARA, K.; SCHULTZ, R.C. The acute effects of cigarette smoke exposure on experimental skin flaps. **Plast. Reconst. Surg.**, v. 75, n. 4, p. 544-549, Apr. 1985.

- OLIVEIRA, M. C. Tipos de retalho cutâneo e seus desenhos. In: Mélega, J. M.; Zanini, S.A.; Psillakis, J. M. **Cirurgia plástica reparadora e estética.**, p. 81-90, 2 ed., Rio de Janeiro, Medsi, 1992.
- QUIRINIA, A.; GOTTRUP, F.; VIIDIK, A. Failure of buflomedil to improve wound healing in ischaemic skin flap. **Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. Hand Surg.**, v. 30, n. 2, p. 81-87, Jun.1996.
- REINISCH, J.F. The pathophysiology of skin flap circulation. The delay phenomenon. **Plast. Reconst. Surg.**, v. 54, n. 5, p. 585-598, Nov. 1974.
- RIPPEL, R. **Efeitos do laser de erbium:yttrium aluminum garnet sobre a viabilidade e angiogênese de retalho cutâneo dorsal em ratos.** Curitiba, 2002. Dissertação (Mestrado em Princípios da Cirurgia). Faculdade Evangélica de Medicina do Paraná. Hospital Universitário Evangélico de Curitiba.
- RITCH, R. How *Gingko biloba* extract has value in medicinal use. **Ophthalmic. Time.**, v. 25, i. 8, pl. 14, April, 2000.
- ROCK, C. L.; JACOB, R. A.; BOWEN, P. E. Update on the biological characteristics of the antioxidant micronutrients: vitamin C, vitamin E, and the carotenoids. **J. American Dietetic Association.** v. 96, n. 7, p. 693-702, July, 1996.
- ROTSTEIN, O.D. Oxidants and antioxidant therapy. **Crit. Care Clin.**, v. 17, n. 1, p. 239-247, Jan. 2001.
- SBAZO, M.E.; DROY-LEFAIX, M.T.; DOLY, M.; BRAQUET, P. Free radical-mediated effects in reperfusion injury: a histologic study with superoxide dismutase and EGB 761 in rat retina. **Ophthalmic. Res.**, v. 23, n. 4, p. 225-234, 1991.
- SCHWEIZER, M.P.; SYLVESTER, J.; CHICK, L.R.; TANG, P.P.Z. In vivo P-NMR studies of age and energy metabolism in an animal flap model. **Plast. Reconstr. Surg.**, v. 96, n. 2, p. 429-435, Aug.1995.

SEIF-EL-NASR, M.; EL-FATTAH, A.A. Lipid peroxide, phospholipids, glutathione levels and superoxide dismutase activity in rat brain after ischaemia: effect of ginkgo biloba extract. **Pharmacol. Res.**, v. 32, n. 5, p. 273-278, Nov. 1995.

SENEL, O.; CETINKALE, O.; OZBAY, G.; AHCIOGLU, F.; BULAN, R. Oxygen free radicals impair wound healing in ischemic rat skin. **Ann. Plast. Surg.**, v. 39, n. 5, p. 516-523, Nov. 1997.

SIEGEL, S. **Nonparametric statistics**. New York : McGraw-Hill, 1956.

SINGER, A. J. ; CLARK, R. A. F. Cutaneous wound healing. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.341, n.10, p. 738-746, Sep. 1999.

SUAREZ, N. C.; SUAREZ G. M. J.; BARTHE G. P. A comparative study on the effect of various pharmacological agents on the survival of skin flaps in the rat. **Br. J. Plast. Surg.**, v.45, N. 2, p.113-116, Fev. 1992.

UMEGAKI, K.; SHINOZUKA, K.; WATARAI, K.; TAKENAKA, H.; YOSHIMURA, M.; DAOHUA, P.; ESASHI, T. Ginkgo biloba extract attenuates the development of hypertension in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 27, p. 277-282, 2000.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. Biblioteca Central. **Normas para apresentação de documentos científicos**. Curitiba : Ed. da UFPR, 2000. 10v.

VAN den BRANDEN, C.; DEMAN, A.; CEYSSENS, B.; PAUWELS, M.; EMPSEN, C.; VERBEELEN, D. Vitamin E protects renal antioxidant enzymes and attenuates glomerulosclerosis in Adriamycin-treated rats. **Nephron**. V. 91, p. 129-133, 2002.

ZACCARIA, A.; WEINZWEIG, N.; YOSHITAKE, M.; MATSUDA, T.; COHEN, M. Vitamin C reduces ischemia-reperfusion injury in a rat epigastric island skin flap model. **Ann. Plast. Surg.**, v. 33, n. 6, p. 620-623, Dec. 1994.

**ANEXOS**

## TABELAS

TABELA 4 – DOSES DAS SUBSTÂNCIAS ANTIOXIDANTES DE ACORDO COM O PESO DE CADA ANIMAL EM TODOS OS GRUPOS

GRUPO	RATO	PESO	DOSE
Vitamina C	1	214g	70 mg
Vitamina C	2	400g	136 mg
Vitamina C	3	280g	95 mg
Vitamina C	4	280g	95 mg
Vitamina C	5	400g	136 mg
Vitamina C	6	500g	170 mg
Vitamina E	1	288g	6 mg
Vitamina E	2	365g	7 mg
Vitamina E	3	320g	6 mg
Vitamina E	4	250g	5 mg
Vitamina E	5	310g	6 mg
Vitamina E	6	380g	8 mg
<i>Gingko biloba</i>	1	400g	40 mg
<i>Gingko biloba</i>	2	300g	30 mg
<i>Gingko biloba</i>	3	300g	30 mg
<i>Gingko biloba</i>	4	340g	35 mg
<i>Gingko biloba</i>	5	300g	30 mg
<i>Gingko biloba</i>	6	300g	30 mg

TABELA 5 – ÁREAS TOTAL, DE VIABILIDADE E NECROSE DOS RETALHOS NO GRUPO CONTROLE

VARIÁVEL	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão
ÁREA RETALHO	27,03	27,03	26,39	27,66	0,65
ÁREA NECROSE	9,34	9,27	9,08	9,7	0,22
ÁREA VIABILIDADE	17,82	18,06	16,84	18,46	0,73
% VIABILIDADE	65,93	66,59	63,45	67,09	1,49
% NECROSE	34,58	34,42	33,41	36,55	1,2
IVR	1,91	1,95	1,74	1,99	0,1

TABELA 6 – ÁREAS TOTAL, DE VIABILIDADE E NECROSE DOS RETALHOS NO GRUPO VITAMINA C

VARIÁVEL	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão
ÁREA RETALHO	27,91	28,06	26,73	28,72	0,77
ÁREA NECROSE	6,13	6,54	3,89	7,81	1,52
ÁREA VIABILIDADE	21,77	21,78	19,5	23,76	1,48
% VIABILIDADE	78,05	76,93	71,4	85,44	5,38
% NECROSE	21,95	23,07	14,56	28,6	5,38
IVR	3,82	3,35	2,5	5,87	1,32

TABELA 7 – ÁREAS TOTAL, DE VIABILIDADE E NECROSE DOS RETALHOS NO GRUPO VITAMINA E

VARIÁVEL	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão
ÁREA RETALHO	28,26	28,64	26,31	28,73	0,96
ÁREA NECROSE	7,03	7,17	4,8	10,31	2,1
ÁREA VIABILIDADE	21,23	21,39	18,38	23,84	2,43
% VIABILIDADE	75,08	74,71	64,06	83,22	7,54
% NECROSE	24,92	25,29	16,78	35,94	7,54
IVR	3,34	2,98	1,78	4,96	1,35

TABELA 8 – ÁREAS TOTAL, DE VIABILIDADE E NECROSE DOS RETALHOS NO GRUPO GINGKO BILOBA

VARIÁVEL	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão
ÁREA RETALHO	27,56	27,62	26,72	28,25	0,67
ÁREA NECROSE	7,79	7,87	5,75	10,14	1,6
ÁREA VIABILIDADE	19,89	20,47	17,22	21,16	1,61
% VIABILIDADE	72,16	72,97	62,93	78,62	5,4
% NECROSE	28,39	28,96	21,38	37,07	5,85
IVR	2,64	2,45	1,7	3,68	0,74

TABELA 9 – VALORES DE P NOS GRUPOS SOB COMPARAÇÃO

Grupos sob comparação	Valor de <i>p</i>
Controle x Vitamina C	0,0039
Controle x Vitamina E	0,0161
Controle x Gingko Biloba	0,0245
Vitamina C x Vitamina E	0,8728
Vitamina C x Gingko Biloba	0,0777
Vitamina E x Gingko Biloba	0,4225

TABELA 10 – VALORES PERCENTUAIS DA ÁREA DE VIABILIDADE EM TODOS OS GRUPOS

GRUPO	Média	Mediana	Valor mínimo	Valor máximo	Desvio Padrão
Controle	65,93	66,59	63,45	67,09	1,49
Vitamina C	78,05	76,93	71,4	85,44	5,38
Vitamina E	75,08	74,71	64,06	83,22	7,54
Gingko Biloba	72,16	72,97	62,93	78,62	5,4

TABELA 11 – VALORES DE *P* EM RELAÇÃO AO ÍNDICE DE VIABILIDADE DO RETALHO NOS GRUPOS SOB COMPARAÇÃO

Grupos sob comparação	Valor de p
Controle x Vitamina C	0,0038
Controle x Vitamina E	0,0364
Controle x Gingko Biloba	0,0988
Vitamina C x Vitamina E	0,4201
Vitamina C x Gingko Biloba	0,1003
Vitamina E x Gingko Biloba	0,3602

TABELA 12 –VALORES DO ÍNDICE DE VIABILIDADE DO RETALHO EM TODOS OS GRUPOS

GRUPO	Média	Mediana	Valor mínimo	Valor máximo	Desvio Padrão
Controle	1,91	1,95	1,74	1,99	0,1
Vitamina C	3,82	3,35	2,5	5,87	1,32
Vitamina E	3,34	2,98	1,78	4,96	1,35
Gingko Biloba	2,64	2,45	1,7	3,68	0,74

TABELA 13 –NÚMERO DE VASOS NA ÁREA NÃO DESCOLADA ADJACENTE AO RETALHO E NA ÁREA DO RETALHO NO GRUPO CONTROLE

VARIÁVEL	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão
ÁREA NÃO DESCOLADA	8	8	6	10	1,4142
ÁREA RETALHO	17,33	15,5	14	24	3,8816



TABELA 14 – NÚMERO DE VASOS NA ÁREA NÃO DESCOLADA ADJACENTE AO RETALHO E NA ÁREA DO RETALHO NO GRUPO VITAMINA C

VARIÁVEL	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão
ÁREA NÃO DESCOLADA	13,67	12,5	10	20	3,8297
ÁREA RETALHO	37,33	37	32	44	4,0825

TABELA 15 – NÚMERO DE VASOS NA ÁREA NÃO DESCOLADA ADJACENTE AO RETALHO E NA ÁREA DO RETALHO NO GRUPO VITAMINA E

VARIÁVEL	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão
ÁREA NÃO DESCOLADA	11,5	11,5	10	13	1,3784
ÁREA RETALHO	27,17	26,5	24	32	3,2506

TABELA 16 – NÚMERO DE VASOS NA ÁREA NÃO DESCOLADA ADJACENTE AO RETALHO E NA ÁREA DO RETALHO NO GRUPO GINGKO BILOBA

VARIÁVEL	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão
ÁREA NÃO DESCOLADA	11,17	11,5	9	13	1,472
ÁREA RETALHO	37,17	33	30	55	9,3897

TABELA 17 – VALORES DE P EM RELAÇÃO AO NÚMERO DE VASOS NOS RETALHOS NOS GRUPOS SOB COMPARAÇÃO

Grupos sob comparação	Valor de p
Controle x Vitamina C	0,0039
Controle x Vitamina E	0,0060
Controle x Gingko Biloba	0,0038
Vitamina C x Vitamina E	0,0049
Vitamina C x Gingko Biloba	0,4201
Vitamina E x Gingko Biloba	0,0121