UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

MATEUS DA COSTA KAWASAKI

**Modelo experimental de retalho pré-fabricado com vasos
gastroepiplóicos em arco e pele abdominal em coelho: análise
anatomopatológica e imunohistoquímica**

Ribeirão Preto

2006

MATEUS DA COSTA KAWASAKI

**Modelo experimental de retalho pré-fabricado com vasos
gastroepiplóicos em arco e pele abdominal em coelho:
análise anatomopatológica e imunohistoquímica**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
como requisito parcial para obtenção do título
de Mestre em Ciências Médicas.

Área de concentração: Patologia Experimental

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Britto Garcia

Ribeirão Preto

2006

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES
TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO,
PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Kawasaki, Mateus da Costa

Modelo Experimental de Retalho Pré-Fabricado com Vasos
Gastroepiplóicos em Arco e Pele Abdominal em Coelho: Análise
Anatomopatológica e Imunohistoquímica. Ribeirão Preto, 2006.

42 p.: il.; 30 cm

Tese de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto/USP - Área de concentração: Patologia
Experimental.

Orientador: Garcia, Sérgio Britto

1. Retalhos cirúrgicos – Retalhos pré-fabricados, vascularização
de retalhos, neovascularização, área viável. 2. Imunohistoquímica -
proliferação celular. 3. Coelhos

FOLHA DE APROVAÇÃO

Mateus da Costa Kawasaki
Modelo Experimental de Retalho Pré-
Fabricado com Vasos
Gastroepiplóicos em Arco e Pele
Abdominal em Coelho: Análise
Anatomopatológica e
Imunohistoquímica

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
como requisito parcial para obtenção do título
de Mestre.

Área de concentração: Patologia Experimental

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais;

À minha esposa e filhos;

Aos meus irmãos;

Aos grandes mestres;

Aos bons amigos e colegas;

E acima de tudo a Deus.

AGRADECIMENTOS

Ao ilustre Prof. Dr. Sérgio Britto Garcia, mente brilhante e irrequieta, professor incansável, que me apresentou ao método científico (e ao raciocínio lógico, criativo e intuitivo), desde os primeiros passos da graduação, e, acima de tudo, direcionou-me nos caminhos éticos que devem balizar o trabalho do médico e do cientista.

Ao Prof. Dr. Sérgio Zucoloto, que catalisou e influenciou positivamente toda minha vida científica dentro dessa Instituição.

Ao Prof. Dr. Norberto Cysne Coimbra, que também participou dos meus primeiros passos na metodologia científica, contribuindo de forma decisiva na caminhada até a realização dessa tese.

Ao Dr. José Marcos de Andrade Mélega, Cirurgião Plástico completo, que me acolheu em seu Serviço de Residência e me ensinou os fundamentos e a arte da especialidade. Auxiliou em diversos momentos a realização desta tese, com meios materiais (Laboratório Experimental e Biotério do Instituto de Cirurgia Plástica Santa Cruz) e incentivo moral.

Aos colegas Dr. Jason César Abranches Figueiredo, Dr. Henrique Lopes Arantes, Dr. Henrique Cardoso Tardelli e Dr. Renato Rodrigues Naufal, pela fundamental contribuição na elaboração do projeto e realização das cirurgias.

À Sra. Rosângela Orlandin Lopes pelo trabalho técnico no preparo do material para estudo histológico e imunohistoquímico no Laboratório de Oncopatologia e Homeostase de Tecidos.

À Lucyara T. Santana pela atenção e ajuda fundamentais nos momentos finais e decisivos dessa tese.

À Neide Terezinha Gonçalves, pela amizade, paciência e auxílio durante todo o período da pós-graduação.

À gloriosa Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP, pelo ambiente familiar e profícuo de incentivo ao estudo e à ação dentro da Medicina.

Ao grande amigo Sérgio, que, apesar de todos os inúmeros títulos que acumula incansavelmente ao longo de sua caminhada, tenho o privilégio de chamar simplesmente de professor desde o primeiro ano da Graduação. Orientador presente, sempre me fortaleceu e incentivou com sua amizade e palavras de apoio em todos os momentos críticos e fundamentais de minha vida pessoal e profissional. Verdadeiro Orientador, Professor no sentido completo das palavras e ações.

A Waynice e Maria, que compartilharam comigo muitas vezes o precioso tempo do meu Orientador. Generosidade imprescindível para a realização desse trabalho.

À minha família - Bia, Maria Luísa, João Paulo e José Henrique - que são a fonte de motivação para seguir adiante, superar limites e realizar.

Ao amor de meus pais, que nunca mediram esforços para facilitar meus caminhos. Todos os meus sucessos também são seus. Os fracassos apenas meus.

A Deus, sentido maior da minha existência e do meu trabalho.

“Com a sabedoria se constrói a casa, e com a prudência ela se firma. Pelo conhecimento, os quartos ficam cheios de bens preciosos e agradáveis”.

(Provérbios, 24, 3-4)

RESUMO

Kawasaki, M.C. Modelo Experimental de Retalho Pré-Fabricado com Vasos Gastroepiplóicos em Arco e Pele Abdominal em Coelho: Análise Anatomopatológica e Imunohistoquímica. 2006. 42 f. Tese (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP, 2006.

Os objetivos deste estudo foram desenvolver um modelo experimental e avaliar o período bem como a viabilidade de retalhos cutâneos pré-fabricados com área cutânea de 100cm² em parede abdominal lateral em coelhos. Os retalhos cutâneos foram confeccionados através da implantação direta de vasos gastroepiplóicos em arco com fluxo contínuo abaixo do subcutâneo da parede lateral em coelhos. Foram utilizados 18 animais da linhagem de coelhos New Zealand divididos em três Grupos: Grupo I (grupo controle), sem implantação de vasos gastroepiplóicos, e Grupo II e Grupo III, nos quais foram realizados os implantes de vasos gastroepiplóicos em arco no subcutâneo da parede abdominal lateral dos animais, os quais foram submetidos posteriormente a cirurgia para confecção de retalho axial, pediculado exclusivamente nos vasos gastroepiplóicos transpostos. O período entre a primeira cirurgia e a segunda foi de duas semanas no Grupo II e seis semanas no Grupo III. Quatorze dias após a segunda cirurgia os animais foram sacrificados e os retalhos avaliados. Nos animais do Grupo I, controle, foi observado 100% de área de necrose no tecido descolado, não preservando conexão vascular com o mesmo, e suturado novamente no leito original; nos animais do Grupo II foi observada área de necrose média de 56,83% e nos animais do Grupo III, ausência total de necrose nos retalhos. Amostras dos retalhos dos animais dos Grupos II e III foram avaliados

histologicamente através de protocolo padrão para coloração por hematoxilina-eosina e através de estudo imunohistoquímico para avaliação de viabilidade do tecido através da quantificação da atividade de divisão celular, considerando índice de células marcadas para o Antígeno Nuclear de Células em Proliferação (iPCNA) como parâmetro. Foi observado aumento significativo no iPCNA ($p < 0,01$, teste bicaudal de Mann-Whitney) entre os Grupos II e III, com índice mais alto no Grupo III; a avaliação da coloração por hematoxilina-eosina confirmam a maior viabilidade dos retalhos do Grupo III. O estudo demonstra a possibilidade de criar e transferir um pedículo vascular em arco para o subcutâneo e, depois de certo tempo, confeccionar e transpor um retalho com dimensões consideráveis cuja circulação seja exclusiva deste novo pedículo. Este estudo traz informações adicionais para elaboração de retalhos pré-fabricados microcirúrgicos ou em ilha para o reparo de defeitos complexos que precisam de grandes áreas de cobertura cutânea e pedículos longos, com mínima morbidade à área doadora.

Palavras-chave: Retalhos cirúrgicos. Retalhos Pré-fabricados. Vascularização de retalho. Neovascularização. Área viável. Imunohistoquímica – proliferação de células epiteliais. Coelhos.

ABSTRACT

Kawasaki, M.C. Experimental Model of Prefabricated Flap with Gastroepiploic Vessels in Arch and abdominal Skin in Rabbits: Anatomopathologic and Immunohistochemical Study. 2006. 42 p. Thesis (Mastering) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP, 2006.

The aim of this study was to develop an experimental model and to evaluate the period as well as the viability of prefabricated cutaneous flaps with a cutaneous area of 100cm² in lateral abdominal wall in rabbits. The cutaneous flaps were made through the direct implantation of gastroepiploic vessels in arch with flow-through below the subcutaneous of the lateral wall in rabbits. Eighteen animals of the New Zealand rabbits lineage were used divided in three Groups: Group I (control group), without implantation of gastroepiploic vessels, and Group II and Group III, which the implant of gastroepiploic vessels was accomplished in arch in the subcutaneous of the lateral abdominal wall of the animals. These animals were submitted to surgery later for making of axial flap, exclusively based in the transposed gastroepiploic vessels. The period between the first surgery and the second one was of two weeks in the Group II and six weeks in the Group III. Fourteen days after the second surgery the animals were sacrificed and the flaps evaluated. In Group I animals, control, it was observed 100% of necrosis area in the detached skin portion that was sutured again at the original bed, not preserving vascular connection with the local tissue; in the animals of the Group II an average necrotic area of 56,83% was observed and in the animals of the Group III, total absence of necrosis in the flaps. Samples of flaps tissue from the animals of the Groups II and III were evaluated through standard

histological hamatoxilin-eosin protocols and imunohistochemical protocol for evaluation of tissue viability through the activity of cellular division, considering the index of Proliferating cell nuclear antigen (iPCNA) marked cells. It was observed significant increase on the iPCNA ($p < 0,01$, two-tailed Mann-Whitney test) between the Groups II and III, with higher index in the Group III; the standard hamatoxilin-eosin evaluation confirm the better viability of the flaps from the Group III. The study demonstrates the possibility to create and transfer an arch vascular pedicle to subcutaneous and, after certain time, to make and to transpose a flap with considerable dimensions which circulation comes from this new pedicle. This study brings additional information for elaboration of prefabricated microsurgical or island flaps for repair of complex defects that need great areas of skin covering and long pedicles, with low morbidity to the donor area.

Keywords: Surgical flaps. Prefabricated flap. Flap vasculature. Neovascularization. Survival area. Imunohistochemical - epithelial cell proliferation. Rabbits.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Delineamento experimental e nomenclatura dos grupos.....	09
Figura 2 – Representação dos passos cirúrgicos (CC) realizados no Grupo I. Na imagem à esquerda área cutânea marcada antes da cirurgia. Na imagem à direita o segmento de pele totalmente desconectado do animal antes da sutura no leito doador.....	11
Figura 3 – Passos cirúrgicos da Cirurgia 1 (C1), com a identificação do arco com os vasos gastroepiplóicos e a área de descolamento para o posicionamento do pedículo vascular em arco.....	12
Figura 4 – Pós-operatório da Cirurgia 1, com a representação do arco com os vasos Gastroepiplóicos (em vermelho) e a área de descolamento delimitando a extensão do retalho a ser confeccionado durante a segunda cirurgia (C2).....	13
Figura 5 – Segunda Cirurgia (C2), com a confecção do retalho pediculado apenas nos vasos gastroepiplóicos, sem qualquer outra conexão vascular com os tecidos adjacentes.....	14
Figura 6 – Amostras dos retalhos de animais do Grupo 2 e Grupo 3 duas semanas após a segunda cirurgia (C2).....	19

Figura 7 – Imagens das lâminas com as características encontradas na pele Normal e o encontrado nos Grupos II e III, respectivamente.....22

Figura 8 – Fotografias de lâminas coradas para PCNA de animal do Grupo II e animal do Grupo III.....24

Figura 9 – Gráfico com comparação estatística entre os resultados dos Grupos II e III estudados em relação ao iPCNA médio por grupo, e respectivos desvios-padrões.....26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Médias da medição das áreas de necrose observadas nos retalhos no momento do sacrifício dos animais dos Grupos de I a III.....	21
Tabela 2 – Resultados da medição das áreas de necrose observadas nos retalhos no momento do sacrifício dos animais dos Grupos de I a III.....	i (Anexos)
Tabela 3 – Valores obtidos na contagem do iPCNA: Média das Células marcadas positivamente para PCNA em relação à média do número total de células encontradas na contagem de 3 campos por animal (PCNA+/Total) para cada animal dos Grupos II e III. (Ampliação 200X).....	ii (Anexos)
Tabela 4 - Valores obtidos na contagem do iPCNA: índices de células positivamente marcadas pelo PCNA (iPCNA) para cada animal dos Grupos II e III. (Ampliação 200X).....	25
Tabela 5 - Índices de células positivamente marcadas pelo PCNA (iPCNA), e o respectivo desvio-padrão (SD), dos Grupos II e III.....	26

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

CC – Cirurgia Controle

C1 – Primeira Cirurgia dos Grupos II e III

C2 – Segunda Cirurgia dos Grupos II e III

PCNA – *Proliferating cell nuclear antigen*

iPCNA – Índice de *Proliferating cell nuclear antigen*

SD – Desvio-padrão

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	01
1.1 – Definição do termo retalho pré-fabricado	01
2 – REVISÃO DA LITERATURA	33
2.1 – O retalho pré-fabricado	03
2.1.1 – Aspectos gerais	03
2.2. – Modelos de estudo de retalho pré-fabricado	04
2.2.1 – Modelos experimentais	04
2.2.2 – Modelos clínicos	05
2.3 – Marcadores biológicos (biomarcadores)	05
2.3.1 – A proliferação celular epitelial	05
2.4. – Hipóteses	05
3 – OBJETIVOS DO ESTUDO	07
4 – MATERIAL E MÉTODOS	08
4.1 – Animais	08
4.2 – Delineamento Experimental	08
4.3 – Descrição das cirurgias	09
4.3.1 – Cirurgia Controle (CC) do Grupo I	10
4.3.2 – Primeira Cirurgia (C1) dos Grupos II e III	11
4.3.3 – Segunda Cirurgia (C2) dos Grupos II e III	13
4.4 – Coleta e processamento de amostras dos retalhos	15
4.5 – Avaliação da proliferação celular epitelial	15
4.5.1 - Proliferação celular epitelial	15
4.6 – Avaliação da área de necrose	17

4.7 – Análise estatística	17
5 – RESULTADOS	19
5.1 – Avaliação macroscópica dos retalhos	19
5.2 – Quantificação das áreas de necrose dos retalhos	20
5.3 – Avaliação microscópica dos retalhos	21
5.3.1 – Microscopia de luz convencional	21
5.3.2 – Estudo imunohistoquímico. Índice de PCNA (iPCNA)	22
6 – DISCUSSÃO	27
7 – CONCLUSÕES	34
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
ANEXOS	i

1- INTRODUÇÃO

1.1 – Definição do termo retalho pré-fabricado

O termo retalho pré-fabricado apresenta algumas controvérsias a respeito de sua definição. Alguns autores consideram como retalho pré-fabricado qualquer tecido que tenha sido manipulado previamente antes de ser utilizado de maneira definitiva, como, por exemplo, nos casos de tecidos que são preparados e pré-moldados antes de serem levados na forma de retalhos para reconstruções de maior complexidade. Um exemplo conhecido é o enxerto de cartilagem utilizado no retalho frontal no preparo de retalho composto para reconstrução nasal (1, 2, 3).

Outros autores entendem a definição de retalho pré-fabricado como tecidos que tenham a sua vascularização feita por vasos que não pertençam anatomicamente àquela região. Nestes casos, os vasos são preparados e transportados de seu local original para uma área que apresente excelente potencial como área doadora de tecido, porém, sem um pedículo vascular suficiente para tal. Partindo deste princípio, o antigo retalho em tubos descrito por Gillies pode ser considerado retalho pré-fabricado com vascularização ao acaso (1, 2, 3).

A idéia de ser possível criar um retalho especial, trazendo um pedículo favorável e colocá-lo em determinado local do corpo, permitindo ao cirurgião escolher a área doadora adequada, e que apresente as melhores propriedades para a reconstrução, principalmente no que se refere à

espessura do retalho e maleabilidade, sem necessidade de incluir estruturas muitas vezes desnecessárias como o músculo, passa a ser um objeto de busca e estudo dos cirurgiões (4).

Reconstruir uma estrutura anatômica com características como cor, textura e flexibilidade que se assemelhem à estrutura original, particularmente na face, onde função e estética são importantes, a obtenção de resultados satisfatórios com menor número de cirurgias e menor morbidade às áreas doadoras continua sendo alvo de incessante pesquisas (5, 6, 7, 8, 9).

Este trabalho se insere na linha de pesquisa que busca maiores elucidações sobre a relação retalhos pré-fabricados, neovascularização e viabilidade considerando os parâmetros de tempo e atividade celular, além de desenvolver um novo modelo para estudo, através de um ensaio experimental de vasos gastroepiplóicos em arco no subcutâneo de pele da parede abdominal lateral em coelhos.

2 – REVISÃO DA LITERATURA

2.1 – O retalho pré-fabricado

2.1.1 – Aspectos gerais

A busca de técnicas cirúrgicas mais elaboradas, como a utilização de retalhos pré-fabricados tem seu início ainda na década de 60 com os primeiros relatos de tentativas de revascularização de tecidos com pedículos originários de outra região anatômica, com o trabalho de Diller et al em 1966 (10), cuja proposta era fixar um segmento de jejuno ao miocárdio para provocar a revascularização do mesmo. Anos depois, em 1971, Washio (11) publicou o trabalho em que foi capaz de desenvolver um retalho cutâneo pré-fabricado em cães, utilizando um segmento de jejuno como pedículo para a neovascularização. Ainda no mesmo ano, Orticochea (12) publicou o primeiro caso clínico, com reconstrução de nariz utilizando retalhos pré-fabricados de pele retro-auricular bilateral.

Estas publicações estimularam as pesquisas para se determinar o processo de neovascularização, bem como a evolução temporal do processo no que se refere ao tempo necessário para uma neovascularização eficaz, ou seja, o tempo mínimo necessário a ser aguardado antes de se levantar o retalho com segurança considerando exclusivamente o vaso transposto como elemento de vascularização do retalho (13, 14, 15, 16).

Ao longo do tempo, muitos métodos para estudar e aumentar a neovascularização foram estudados. Alguns autores estudaram os diversos tipos de tecidos como músculo, fáscia, omento, enxerto venoso como doadores de vasos para o novo retalho. Técnicas de autonomização do retalho, para potencializar a neovascularização, além de expansores teciduais também foram pesquisados (7, 9, 10, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29).

Outros autores preferiram estudar o comportamento de diferentes tecidos como pele, osso e cartilagem ou mesmo materiais aloplásticos como estruturas alvos do estudo (5, 15, 17, 30, 31, 32, 33, 34).

Casos clínicos também já foram relatados, partindo sempre de soluções arrojadas e criativas para reconstruções complexas (12, 28, 34, 8, 35).

Portanto, os retalhos pré-fabricados passaram a ser considerados como opção possível e salvadora, apesar de os mecanismos de neovascularização serem pouco conhecidos e necessitarem de maiores investigações.

2.2. – Modelos de Estudo de Retalhos Pré-Fabricados

2.2.1 – Modelos Experimentais

Os modelos experimentais são importantes para o estudo do retalho pré-fabricado. São descritos vários modelos experimentais na literatura ao

longo dos anos utilizando ratos e coelhos (7, 9, 10, 17, 18, 19, 21, 22, 23, 24, 27, 28, 29).

2.2.2 – Modelos Clínicos

Na literatura encontramos trabalhos clínicos relatando retalhos pré-fabricados utilizados com sucesso em diversas situações desafiadoras para reconstrução como reconstruções na face (orelha, nariz, pálpebras) e de áreas difíceis como a planta dos pés (12, 36, 28, 34, 8, 35).

2.3 – Marcadores biológicos (biomarcadores)

2.3.1 – A proliferação celular epitelial

Embora ainda permaneçam desconhecidos muitos dos eventos que acontecem entre neovascularização e a viabilidade do tecido, a avaliação da proliferação celular epitelial é um parâmetro para determinação da viabilidade metabólica do tecido. Desta forma, o estudo da resposta proliferativa epitelial poderia fornecer importantes subsídios para a compreensão dos mecanismos envolvidos nessa relação (37).

2.4. – Hipóteses

As hipóteses para esse estudo são: 1) A utilização de vasos gastroepiplóicos em arco permite a criação de retalho pré-fabricado seguro e viável, 2) A disposição do pedículo em arco com fluxo contínuo dos vasos gastroepiplóicos permitem pedículos longos, com dupla opção de extremidades para anastomose, 3) A disposição em arco possibilita ainda maior área de vascularização possibilitando retalhos amplos, equilibrados em suas dimensões e mantendo o padrão axial, 4) Mínima morbidade das áreas doadoras, 5) Estudos em grupos com períodos de evolução diferentes para a confecção do retalho pediculado exclusivamente no vaso transposto possibilita determinar o período ideal necessário para uma neovascularização suficiente para garantir viabilidade do retalho mantida exclusivamente pelos vasos gastroepiplóicos.

3 – OBJETIVOS DO ESTUDO

Através de um modelo experimental de retalho pré-fabricado com vasos gastroepiplóicos em arco em pele de abdome lateral de coelho:

3.1. Estabelecer um modelo experimental para o estudo da neovascularização de retalho pré-fabricado em coelhos

3.2. Verificar a possibilidade de confecção de retalho axial com vasos em arco com fluxo contínuo

3.3. Determinar o período de tempo ideal para se aguardar a neovascularização para se obter um retalho pré-fabricado viável com vascularização exclusiva através do pedículo transposto

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - Animais

Foram utilizados dezoito coelhos da raça New Zealand, machos, de aproximadamente 2500g a 3000g ao início do experimento. Os animais eram provenientes da empresa Criex, sediada em Cotia - SP, e mantidos no Biotério do Instituto de Cirurgia Plástica Santa Cruz, São Paulo, em condições de temperatura ambiente constante e ciclo noite-dia de doze horas. Foram alimentados com dieta padrão para coelhos (Purina®) e água de torneira *ad libitum*. Os animais foram acomodados em número de dois por gaiola e posteriormente em número de um para prevenção de acidentes após a segunda cirurgia. Os animais foram mantidos segundo as normas da Comissão de Ética em Experimentação Animal da FMRP-USP e o projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Santa Cruz, São Paulo (Protocolo CEP-086/2003).

4.2 - Delineamento Experimental

Os animais foram separados em três grupos de seis animais, após um período de adaptação. Os animais do Grupo I foram submetidos à cirurgia controle. Os animais dos Grupos II e III foram submetidos a duas cirurgias, sendo a primeira cirurgia o posicionamento dos vasos gastroepiplóico abaixo

do subcutâneo da parede abdominal lateral dos coelhos. A segunda cirurgia, para a confecção do retalho pediculado exclusivamente nos vasos gastroepiplóicos foi realizada duas semanas após a primeira nos animais do Grupo II e seis semanas após a primeira nos animais do Grupo III.

FIGURA 1. Delineamento experimental e nomenclatura dos grupos.

4.3 – Descrição das Cirurgias

Os animais foram submetidos a anestesia geral com uma combinação solução aquosa a 2% de Cloridrato de 2-(2,6-xilidino) 5,6-diidro-4H-1,3-tiazina 1M (*Rompum*, **Bayer**) e Cloridrato de Ketamina (*Ketalar*, **Parke-Davis**) 1M.

Todas as cirurgias foram realizadas com instrumental cirúrgico apropriados e em condições de assepsia e anti-sepsia, com material estéril descartável e instrumental cirúrgico esterilizado em autoclave. A tricotomia foi realizada imediatamente antes da cirurgia, após a anestesia do animal e a antissepsia com solução tópica de polivinil pirrolidona (PVPI) a 10%.

Foram realizadas profilaxia de infecção com antibiótico Cefalotina via intramuscular no pré-operatório e controle da dor no pós-operatório com paracetamol via oral.

4.3.1 – Cirurgia Controle (CC) do Grupo I

A cirurgia controle (CC) constituía de incisão de área medindo 10cm por 10cm (100cm²) em região do abdome lateral do animal, sendo então a pele e subcutâneo totalmente dissecados do leito original, removendo qualquer tipo de pedículo vascular ou conexão para a nutrição do segmento de pele removido. Após a total desconexão do fragmento de pele, o mesmo era suturado à sua área de origem com pontos de mononylon 4-0. Após duas semanas de evolução, a viabilidade do tecido operado era investigada visualmente e fotografado sendo então os animais sacrificados com cloreto de potássio intravenoso. Amostras do tecido e de pele normal contra-lateral foram coletadas após o sacrifício de maneira adequada para avaliação histológica. Este grupo foi considerado o controle.

FIGURA 2. Representação dos passos cirúrgicos (CC) realizados no Grupo I. Na imagem à esquerda área cutânea marcada antes da cirurgia. Na imagem a direita o segmento de pele totalmente desconectado do animal antes da sutura no leito doador.

4.3.2 – Primeira Cirurgia (C1) dos Grupos II e III

A primeira cirurgia (C1) constituía de incisão abdominal mediana de aproximadamente 5cm, seguida de laparotomia, sendo então identificado o grande omento e a artéria e veia gastroepiplóicos. O pedículo então foi dissecado, preservando-se um pequeno segmento de grande omento em volta dos vasos para facilitar o manuseio. Obtinha-se então um arco vascular formado pelos vasos gastroepiplóicos direito e esquerdo, o qual era exteriorizado e mantido fora da cavidade abdominal. A aponeurose era fechada com pontos de mononylon 4-0, preservando pequena comunicação pérvia, no local da passagem dos vasos, localizada na extremidade proximal da incisão. O plano abaixo do subcutâneo da região lateral direita do abdome foi dissecado o suficiente para introdução do pedículo por uma extensão de aproximadamente 10cm. Pontos de mononylon 5-0 entre o omento deixado

junto com o pedículo e subcutâneo (face posterior do futuro retalho) foram utilizados para fixar o pedículo no local adequado.

**Vasos gastroepiplóicos
em arco**

**Área de descolamento subcutâneo
onde serão posicionados os vasos
gastroepiplóicos**

FIGURA 3. Passos cirúrgicos da Cirurgia 1 (C1), com a identificação do arco com os vasos gastroepiplóicos e a área de descolamento para o posicionamento do pedículo vascular em arco.

FIGURA 4. Pós-operatório da Cirurgia 1, com a representação do arco com os vasos gastroepiplóicos (em vermelho) e a área de descolamento delimitando a extensão do retalho a ser confeccionado durante a segunda cirurgia (C2)

4.3.3 - A Segunda Cirurgia (C2) dos Grupos II e III

Na segunda cirurgia (C2), um retalho de pele e subcutâneo de 10cm por 10cm foi dissecado e mantido pediculado apenas nos vasos gastroepiplóicos. O retalho era então suturado novamente ao seu local de origem e reavaliado após duas semanas. No Grupo II o intervalo entre a primeira cirurgia C1 e a segunda cirurgia C2 foi de duas semanas e de seis

semanas no Grupo III. Após o período de duas semanas de evolução da segunda cirurgia (C2), a viabilidade do tecido operado era investigada visualmente e fotografada, sendo então os animais sacrificados com cloreto de potássio intravenoso. As fotografias foram obtidas pelo mesmo observador, com câmera Cânon® EOS 500, com lente convencional 35-80mm, foco automático, e mantida distância fixa de 80cm do animal. Após reveladas as fotografias, foram transferidas para o computador através de um scanner Hewlett-Packard®, modelo Scanjet 2200c, padrão 150dpi, tamanho real da imagem.

Amostras padronizadas do retalho foram coletadas após o sacrifício para avaliação histológica, seguindo a técnica descrita no item 4.4 - Coleta e processamento da pele.

FIGURA 5. Segunda Cirurgia (C2), com a confecção do retalho pediculado exclusivamente nos vasos gastroepiplócos, sem qualquer outra conexão vascular com os tecidos adjacentes.

4.4 - Coleta e processamento da pele

Após o sacrifício dos animais com cloreto de potássio amostras de tecido foram colhidas. No Grupo I foram colhidas amostras da pele normal contra-lateral ao retalho necrosado. Nos grupos II e III o fragmento colhido interessava sempre toda a espessura total do retalho, cortado sempre em linha reta que unia os pontos médios da lateral do retalho e, conseqüentemente, aproximadamente perpendicular ao eixo do pedículo, com largura de 1cm. As peças colhidas foram acondicionadas em frascos contendo formalina tamponada a 10%. Após 48 horas a peça foi transferida para frascos contendo álcool 70%. Desta maneira os fragmentos eram conservados de maneira adequada para estudo anatomopatológico convencional através de coloração por hematoxilina-eosina, bem como para estudos de imunohistoquímica.

4.5 – Avaliação da proliferação celular epitelial

A avaliação da proliferação celular foi realizada em todos os animais dos Grupos II e III. O avaliador dos parâmetros estudados era cego quanto à origem dos grupos, quando na análise e quantificação.

4.5.1 - Proliferação celular epitelial

A avaliação da proliferação celular foi feita através de imunomarcação do antígeno PCNA (do inglês *Proliferating cell nuclear antigen*), que identifica células em proliferação (37).

Este estudo foi realizado por coloração imunohistoquímica em amostras do tecido cutâneo em corte transversal, fixadas em formalina e incluídas em parafina. Cortes de 4µm montados em lâmina com camadas de poli-lisina foram deparafinizados, reidratados em uma série crescente de alcoóis, colocados em PBS, e tratados com hidrogênio 3% e metanol por 30 Minutos, a fim de bloquear a atividade da peroxidase endógena. Os cortes foram então submetidos à digestão enzimática com tripsina 0.1% em PBS por 20 minutos a 37° C. Ligantes protéicos não específicos foram bloqueados pela incubação do material com solução protéica a 3% (Leite Molico® desnatado em PBS) por 30 minutos. Os cortes foram então incubados primariamente com anticorpo monoclonal de ratos anti-PCNA, na diluição de 1:200 em PBS/BSA, e deixados por uma noite à temperatura de 37° C. Num segundo passo, os cortes foram incubados com imunoglobulina de coelhos anti-ratos, como segundo anticorpo. O produto da reação foi detectado com o complexo avidina-biotina-peroxidase e a cor da reação foi obtida com 3,3'-diaminobenzina com intensificação por níquel. Os cortes foram contra corados com azul de metileno. Os cortes controles foram incubados com PBS, no lugar do primeiro anticorpo. Células foram consideradas PCNA positivas apenas quando se identificaram manchas marrom-avermelhadas

nos núcleos (fortemente marcadas). Em seguida foi feita a quantificação de células positivamente e negativamente marcadas, para estabelecimento da proporção entre elas, estabelecendo-se o índice de células positivamente marcadas pelo PCNA (iPCNA), o qual é um parâmetro objetivo da proliferação celular.

4.6 – Avaliação da área de necrose

As áreas que apresentavam necrose tinham como características macroscópicas aspecto escurecido, tendendo ao preto, endurecida, seca, com rarefação dos pelos e retraída, distorcendo o retalho confeccionado durante a segunda cirurgia (C2). Eram nitidamente contrastantes e bem delimitadas quando comparadas às áreas de tecido viável e normal.

A mensuração da área de necrose dos retalhos obtidos dos animais do Grupo II foi realizada através do programa “Auto Cad R 14” com verificação do percentil da área necrosada do retalho em relação à área total do retalho observado.

4.7 - Análise estatística

Os resultados das médias dos índices de células positivamente marcadas pelo PCNA (iPCNA) por retalho foram comparados entre os dois

Grupos (II e III), através do teste bicaudal de Mann-Whitney. A diferença foi considerada estatisticamente significante quando $p < 0,05$.

5 - RESULTADOS

5.1 – Avaliação macroscópica dos retalhos

No Grupo I foi observada, em todos os animais, necrose total do segmento de pele e subcutâneo que foram separados e ressuturados ao leito doador.

No Grupo II, com duas semanas de intervalo entre a primeira e a segunda cirurgia, observou-se necrose parcial dos retalhos pediculados nos vasos gatroepiplóicos.

No Grupo III, com seis semanas de intervalo entre a primeira e a segunda cirurgia, não se observou área de necrose nos retalhos.

Grupo II

Grupo III

FIGURA 6. Amostras dos retalhos de animais do Grupo 2 e Grupo 3 duas semanas após a segunda cirurgia (C2).

5.2 - Quantificação da área de necrose nos retalhos

Nos animais do Grupo I observou-se necrose total dos segmentos de pele retirados e ressuturados no leito doador.

Foi observada necrose parcial em diferentes magnitudes nos retalhos dos seis animais do Grupo II. A extensão das áreas de necrose foi quantificada em porcentagem do total da área final do retalho no momento do sacrifício. Optou-se por este parâmetro devido ao fato de os retalhos apresentarem grande retração de sua área original, não sendo considerada a extensão da área final apresentada como representativa em relação à área inicial. Considerou-se o percentil da área com necrose em relação à área total final como um valor mais representativo das alterações reais ocorridas no retalho. Por este motivo também não foi necessário o uso de molde padrão para obtenção de fator de escala nas fotografias.

Os valores obtidos da área final e da área com necrose de cada animal foi medida três vezes pelo mesmo observador e o resultado final foi obtido através da média aritmética dos valores, seguindo a fórmula:

$$\text{Pan} = \text{An}/\text{At}$$

Onde: Pan significa percentil de área com necrose, obtido através da divisão da média obtida da mensuração da Área com necrose (An) pela média da Área total do retalho (At) em cada animal do Grupo II.

Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 1 abaixo (médias dos grupos) e na Tabela 2 os valores para cada animal (Anexo i). A média das áreas de necrose no Grupo II foi de 56,83% (SD15,56171). Não houve nenhum animal do Grupo II que apresentou necrose total ou ausência de necrose no retalho.

Nos animais do Grupo III foi observada ausência total de necrose nos retalhos.

TABELA 1. Médias da medição das áreas de necrose observadas nos retalhos no momento do sacrifício dos animais dos Grupos de I a III.

Área de necrose (%)			
	Grupo I	Grupo II	Grupo III
Média	100%	56,83%	0%
SD	0	15,56171	0

5.3 – Avaliação Microscópica dos Retalhos

5.3.1 – Microscopia de luz convencional com coloração por Hematoxilina-Eosina

O estudo microscópico das lâminas coradas com hematoxilina-eosina revelou no Grupo II atrofia da epiderme, provavelmente secundária à isquemia, com exceção da região próxima ao pedículo, onde características semelhantes à pele normal foram observadas. Havia ainda focos esparsos de necrose no tecido conjuntivo do subcutâneo e derme, com moderado infiltrado inflamatório mononuclear e pequena quantidade de fibroblastos. No Grupo III, as características da pele do retalho foram semelhantes à pele normal, exceto pela rede de vasos neoformados e pelo fato de apresentar grande quantidade de fibroblastos na derme e subcutâneo, além de raros focos de necrose.

FIGURA 7. Imagens das lâminas com as características encontradas na pele Normal e o encontrado nos Grupos II e III, respectivamente.

5.3.2 – Estudo Imunohistoquímico. Índice de PCNA (iPCNA)

Foram considerados para análise três campos por animal. Esta forma de avaliação é consonante com a metodologia mais recente, descrita na literatura internacional (37).

Em cada campo, contou-se o número total de células e o número de células marcadas fortemente pelo PCNA. Foram consideradas apenas as células fortemente marcadas, procedimento que torna mais fidedigna a contagem para se estimar a proliferação celular do epitélio.

Após a contagem dos três campos, calculou-se a média do número de células marcadas para PCNA e a média do total de células observadas por campo para cada animal. Os resultados estão expressos na Tabela 2 (Anexo ii).

A média dos iPCNA dos animais do Grupo II foi de 0,0359 e a média para os animais do Grupo III foi de 0,5512.

Estes valores foram submetidos à análise estatística através do teste *bicaudal de Mann-Whitney*, sendo considerado o resultado significativo devido o $p < 0,01$.

FIGURA 8. Fotografias de lâminas coradas para PCNA de animal do Grupo II e animal do Grupo III. (Imunomarcacão do antígeno PCNA, Ampliação 200X)

A partir destes valores foi possível calcular o índice médio de células positivamente marcadas pelo PCNA (iPCNA) por campo por animal, através da fórmula:

$$\boxed{iPCNA = Ncm/Ntc}$$

Onde: Ncm significa o número médio de células marcadas para o PCNA por campo por animal, e Ntc representa a média do número total de células observadas por campo por animal. (TABELA 3 – Anexo ii)

Os resultados do iPCNA para cada animal estão apresentados na TABELA 4 abaixo.

Resultados

	Grupo I	Grupo II	Grupo III
Animal 1	-	0,0606	0,4545
Animal 2	-	0	0,48
Animal 3	-	0,1071	0,4737
Animal 4	-	0	0,55
Animal 5	-	0	0,5714
Animal 6	-	0,0476	0,7778

Teste bicaudal de Mann-Whitney ($p < 0,01$)

TABELA 4. Valores obtidos na contagem do iPCNA: índices de células positivamente marcadas pelo PCNA (iPCNA) para cada animal dos Grupos II e III. (Ampliação 200X)

Finalmente, calculou-se o iPCNA por grupo experimental para realizar teste estatístico para avaliação das diferença dos resultados entre os Grupos II e III.

Optou-se pela apresentação dos dados na forma observada na literatura científica mais recente (37), que analisa os resultados dos estudos com PCNA através do iPCNA.

A comparação estatística entre os resultados dos dois grupos estudados está apresentada na TABELA 5 e ilustrada na FIGURA 9. Os dados dos animais não apresentaram distribuição normal, assim o teste bicaudal de Mann-Whitney se mostrou adequado para análise estatística dos resultados.

Resultados

	iPCNA±SD
Grupo II	0,0359±0,044006
Grupo III	0,5512±0,120153

TABELA 5. Índices de células positivamente marcadas pelo PCNA (iPCNA), e os respectivos desvios-padrões (SD), nos Grupos II e III.

Houve diferença estatisticamente significativa em relação à proliferação celular entre os Grupos II e III ($U_c=0$, ou seja, $p<0,01$), demonstrando maior viabilidade celular do tecido do retalho do Grupo III quando comparado ao Grupo II. Estes dados são evidenciados através do iPCNA que expressa diretamente a atividade de divisão celular, portanto tecido viável em proliferação.

Teste bicaudal de Mann-Whitney ($p<0,01$)

FIGURA 9 – Gráfico com comparação estatística entre os resultados dos Grupos II e III estudados em relação ao iPCNA médio por grupo, e respectivos desvios-padrões.

Discussão

6 - DISCUSSÃO

Vários estudos experimentais e casos clínicos atestaram que os retalhos pré-fabricados são factíveis, mesmo não havendo estudos detalhados sobre os mecanismos de neovascularização.

Em 1966, Diller et al (10) relataram neovascularização do miocárdio em cães a partir de um segmento de jejuno aberto longitudinalmente na borda anti-mesentérica, tendo sua mucosa removida. Um mês após, a artéria coronária descendente anterior era ligada. Oito meses depois, a injeção de contraste na mesentérica superior demonstrou comunicação com o sistema coronariano. Ainda no mesmo trabalho, relataram a criação de retalho pré-fabricado com pele de abdome com segmento de jejuno, em um grupo de 10 cães.

Anos mais tarde, Washio (11) repetiu o experimento utilizando segmento de jejuno para criar um retalho abdominal. Em seis animais, transferiu como retalho livre e, após três semanas de evolução, dois retalhos sobreviveram.

Em 1976, Erol et al (17) demonstraram em ratos a transformação de um enxerto em retalho; a técnica consistia em transpor a artéria e veia femoral para a superfície de uma área cruenta na coxa, cobrindo com enxerto de pele. Ao fim de períodos determinados, a saber - 14, 21 e 30 dias - a pele enxertada era dissecada e mantida apenas pelos vasos femorais.

Discussão

Neste trabalho foram utilizados os vasos gastroepiplóicos como pedículo em arco, envoltos apenas por pequena porção de omento para facilitar a sutura no retalho receptor. Optou-se por não interromper o

pedículo, dispondo-o em arco. Desta forma, eliminou-se o risco de trombose, permitindo, numa hipotética transferência como retalho livre, dois pedículos para anastomose. Esta disposição tem paralelo à publicação de Morrison et al (8) que usaram os vasos femorais sem interrupção de fluxo, interpondo um enxerto de veia.

A literatura relata uma grande diversidade de pedículos utilizados no preparo dos retalhos pré-fabricados, tanto em arco, como com vasos ligados distalmente. Através de angiografia, Yao (13) demonstra em cadáveres humanos uma delicada rede de vasos que se anastomosam entre artérias e suas veias correspondentes. Isto explicaria a não ocorrência de trombose nos vasos ligados distalmente.

Morrison et al (8) compararam várias disposições do pedículo em coelho: artéria e veia femorais ligados distalmente, artéria e veia safena, artéria femoral com fluxo mantido através de enxerto de veia interposto e fístula artério-venosa entre os vasos femorais (“loop”). Todas as alternativas obtiveram resultados favoráveis de viabilidade do retalho, sendo os piores índices encontrados nos casos de fístula artério-venosa. No entanto, Nakayama et al (31) e Voukidis (14) conseguiram, em ratos, manter retalhos baseados em arterialização do sistema venoso através de fístulas artério-venosas.

Discussão

Outra maneira de avaliar e projetar o retalho pré-fabricado é considerar a área final obtida. A opção da disposição em arco permite obter

uma área de retalho pré-fabricado maior e com dimensões equilibradas, quando comparado a uma disposição axial dos vasos transpostos.

Há trabalhos na Literatura que, para ampliar a área de superfície do pedículo e até facilitar a técnica cirúrgica, estudaram diversas opções de tecidos carreadores. Shintomi et al (18) descreveram o uso de fragmento de latíissimus dorsi para pré-fabricar retalho braquial baseado na toracodorsal e utilizá-lo como retalho livre ou em reconstrução de cabeça e pescoço. Khouri et al (23) propuseram o uso de fásia e salientaram suas vantagens: facilidade de obtenção, pouca morbidade na área doadora, superfície plana e maleável. Neste trabalho, em oito ratos, transferiram fásia abdominal pediculada pelos vasos epigástricos inferiores para envolver articulação do joelho que era totalmente separada e ortopedicamente fixada. Após 36 horas, o osso mostrava evidente maior captação radioativa do que o grupo controle. Khouri et al (23) conseguiram reconstruir a articulação interfalangeana proximal de um paciente de 12 anos, utilizando retalho pré-fabricado com fásia temporal, utilizando a falange proximal do segundo pododáctilo, transferindo por técnica microcirúrgica. Em outro trabalho, Khouri et al (28) apresentaram três casos clínicos de reconstrução de face, utilizando retalho expandido supraclavicular pré-fabricado pelos vasos de fásia temporais e destacavam ainda duas situações que melhorariam a viabilidade do retalho: a expansão e isquemia. De fato, a pseudocápsula ao redor do expansor possui grande quantidade de vasos; portanto, é obvio supor que contribuiria para um

Discussão

maior aporte sanguíneo do retalho. Homma et al (27) relataram maior área viável em retalhos pré-fabricados expandidos comparados aos não

expandidos (96,2% a 59,5%). Itoh (15) estudou em ratos retalhos pré-fabricados e randomizados sob os quais eram colocadas lâminas de silicone. Retalhos descolados após duas ou três semanas mostraram-se mais viáveis que após períodos mais longos, provavelmente, devido ao decréscimo da reação inflamatória ao corpo estranho.

No entanto, nenhum deles considerou a disposição dos vasos tranpostos em arco com a finalidade específica de ampliar a área do retalho pré-fabricado.

Diversas manobras para facilitar o segundo tempo podem ser tomadas. Erol et al (30) usaram lâminas de silicone envolvendo o pedículo; já Duffy et al (33) elaboraram um tubo de pele em volta do mesmo, deixando apenas uma pequena porção exposta, como um fio desencapado, que era introduzida na pele alvo. No entanto, estas manobras foram descartadas durante a fase inicial do desenvolvimento do modelo cirúrgico por não se mostrarem convenientes por aumentar os índices de complicações como infecção e reação a corpo estranho. No modelo cirúrgico definitivo deste trabalho foi utilizado apenas parte do omento que envolve os vasos gastroepiplóicos, com a finalidade de facilitar o manuseio e a fixação dos vasos no local adequado do leito receptor. Devido à sistematização da cirurgia o pedículo era facilmente identificado no momento da confecção do retalho (C2), sem necessidade de manobras complementares para tal.

Discussão

De grande interesse no trabalho, foi determinar o melhor momento para levantar o retalho. A sobrevivência do retalho apenas pela circulação

dos vasos gastramentais foi demonstrada comparando-se os resultados dos Grupos II e III com o Grupo I (Controle). O aumento da área viável foi estatisticamente significativa entre os grupos II e III, logo, o tempo ideal de espera situa-se entre 2 e 6 semanas.

Segundo os trabalhos encontrados na literatura, o processo de neovascularização já é perceptível dois dias depois da transferência do pedículo. Notam-se três tipos de vasos: os vasos originários do retalho, os vasos do pedículo transferido e neovasos que fazem a conexão dos dois sistemas. Os fenômenos observados são a dilatação dos vasos já existentes que serpenteiam e se anastomosam. Os neovasos aumentam progressivamente de tamanho e coalescem numa rede cada vez mais intensa. Provavelmente, há um ápice, quando os vasos estão hipertrofiados, dilatados e o fluxo chegando ao máximo. Logo após este ápice, ocorre redução deste fenômeno, seguido de remodelamento e estabilização do padrão circulatório. Alguns autores relataram três a quatro semanas ou duas a três semanas como período ideal de espera. Manobras aqui já descritas e substâncias angiogênicas poderiam abreviar este intervalo.

Além desses fatores, a isquemia no tecido alvo parece potencializar o processo de pré-fabricação. McFarlane et al (38) sugeriram ainda que haveria uma maior resistência a hipoxia em retalhos previamente autonomizados; por conseguinte levar um pedículo vascular a uma área de pele isquêmica - com

Discussão

irrigação mínima, apenas o suficiente para não ocorrer necrose – seria favorável à plena neovascularização (38, 39, 40, 41).

Quando comparamos os retalhos pré-fabricados com os retalhos convencionais, Ono et al (16) demonstraram que o retalho pré-fabricado após oito semanas de integração apresenta fluxo sanguíneo superior ao retalho com padrão de irrigação ao acaso e fluxo inferior aos retalhos com padrão axial de irrigação. E, investigando mais detalhadamente através de estudos microangiográficos, observou-se que a neovascularização começa a partir da região distal do pedículo.

Estudos histológicos demonstram a integração dos vasos do pedículo com vasos locais do retalho. A presença de atrofia e focos necróticos no Grupo II contrasta com a recuperação e aspecto eutrófico do Grupo III, mostrando que, período de espera de seis semanas para se confeccionar o retalho pediculado apenas nos vasos transpostos (C2) proporciona maior viabilidade do tecido quando comparado ao Grupo II em que se aguarda apenas duas semanas para realização de C2. Estes dados são evidenciados através do iPCNA que expressa diretamente a atividade de divisão celular, portanto tecido viável em proliferação.

Outro aspecto importante é confirmar o iPCNA como instrumento confiável para avaliação de atividade e conseqüentemente viabilidade tecidual, através da quantificação da atividade de divisão celular da camada basal da epiderme.

Os achados de imunohistoquímica onde foram encontrados valores significativamente diferentes entre o Grupo II e Grupo III na contagem do

Discussão

iPCNA corroboram com os achados da microscopia de luz e macroscopia em que podemos entender estes achados como resultado da integração do pedículo vascular dos vasos gastroepiplóicos ao retalho após o período maior de permanência no subcutâneo antes da confecção do retalho pediculado exclusivamente neles.

Mecanismos de estímulo da neovascularização para diminuição do hiato cirúrgico como expansão tecidual, indução química ou hormonal, isquemia controlada ou oxigenoterapia hiperbárica podem contribuir para melhor e mais rápida integração do retalho pré-fabricado, porém ainda necessitam de maiores estudos (42).

7 - CONCLUSÕES

7.1. O trabalho apresenta modelo experimental detalhado e confiável para estudo de retalhos pré-fabricados em coelhos, tanto no que se refere a modelo cirúrgico como na avaliação da viabilidade do retalho por imunohistoquímica através do iPCNA.

7.2. O estudo experimental em coelhos comprova a possibilidade de transferir um pedículo vascular profundo - os vasos gastroepiplóicos em arco com fluxo contínuo - para o subcutâneo e, após tempo determinado, confeccionar um retalho de dimensões consideráveis (100cm², o que corresponde a aproximadamente um quarto da superfície abdominal do coelho), cuja circulação provenha exclusivamente deste pedículo.

7.3. O trabalho demonstra ainda que há um período de tempo mínimo crítico, sendo que após seis semanas da transposição há integração confiável do pedículo vascular antes da confecção do retalho pediculado exclusivamente nos vasos transpostos.

Estes resultados abrem novos horizontes para estudos de tratamentos de defeitos complexos que necessitem de grandes retalhos cutâneos com pedículos longos e calibrosos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. GILLIES, H.D. The tubed pedicle in plastic surgery. **New York J Med**, V. 111, p. 1, 1920.
2. BRAITHWAITE, F. Some observtions on the vascular channels in tubed pedicles. **Br J Plast Surg**, V. 4, p. 29, 1952.
3. VELANDER, E. Vascular changes in tubed pedicles. **Acta Chir Scand Suppl**, V. 5, p. 322, 1964.
4. KHOURI, R.K.; UPTON, J.; SHAW, W.W. Principles of flap prefabrication. **Clin Plast Surg**, V. 19, p. 763, 1992.
5. MORRISON, W.A. et al. Prefabrication of thin transferable axial-pattern skin flaps: an experimental study in rabbits. **Br J Plast Surg**, V. 43, p. 645-654, 1990.
6. PRIBRAZ, J.J.; MAITZ, P.K.M.; FINE, N.A. Flap prefabrication using the “vascular crane” principle: an experimental stdy and clinical application. **Br J Plast Surg**, V. 47, p. 250-256, 1994.
7. MAITZ, P.K.; PRIBAZ, J.J.; DUFFY, F.J.; HERGRUTER, C.A. The Value of the delay phenomenon in flap prefabrication: an experiment-

- tal study in rabbits. **Br J Plast Surg**, V. 47(3), p. 149-154, 1994.
8. MORRISON, A.W.; PENINGTON, A.J.; KUMTA, S.K.; CALLAN, P. Clinical application and technical limitations of prefabricated flaps. **Plast Reconstr Surg**, V. 99, p. 378-385, 1997.
9. SÁ, J.Z.; AGUIAR, J.L.A.; MORAIS, J.; COELHO, A.R.B.; LOPES, S.M.I.; MELO, C.B. Área viável e vascularização pós autonomização cirúrgica de reatalho pré-fabricado por implante vascular em ratos. **Acta Cir Bras**, V. 17(1), p. 39-42, 2001.
10. DILLER, J.G.; HARTWELL JR, S.W.; ANDERSON, R.R. The mesenteric vascular pedicle. **Cleveland Clinic Quarterly**, V. 33, p. 163-169, 1966.
11. WASHIO, H. An intestinal conduit for free tansplantation of other tissues. **Plast Reconstr Surg**, V. 48(1), p. 48-51, 1971.
12. ORTICOCHEA, M. A new method for total reconstruction of the nose: the ears as donor areas. **Br J Plast Surg**, V.24, p. 225-232, 1971.
13. YAO, S.T. Vascular implantation into skin flap: experimental study and clinical application: a preliminary report. **Plast Reconstr Surg**, V. 63(3), p. 404-410, 1981.

-
14. VOUKIDIS, T. An axial-pattern flap based on the arterialized venous network: an experimental study in rats. **Br J Plast Surg**, V. 35, p. 524-529, 1982.
 15. ITOH, Y. An experimental study of prefabricated flaps using silicone sheets. With reference to the vascular patternization process. **Annals Plast Surg**, V. 28(2), p. 140-146, 1992.
 16. ONO, H. et al. Blood flow through prefabricated flaps – an experimental study in rabbits. **Br J Plast Surg**, V. 46, p. 449-455, 1993.
 17. EROL, O.Ö. The transformation of a free skin graft into a vascularized pedicled flap. **Past Reconstr Surg**, V. 58(4), p. 470-477, 1976.
 18. SHINTOMI, Y.; OHURA, T. The use of muscle vascularized pedicles flaps. **Plast Reconstr Surg**, V. 70(6), p. 725-735, 1982.
 19. STAL, S.; PARSA, D.; SPIRA, M. Secondary island composite flap: an experimental study in ear reconstruction. **Annals Plast Surg**, V. 11(4), p. 321-327, 1983.

20. DURATE, A.; VALAURI, F.A.; BUNCKLE, H.J. Creating a free muscle flap by neovascularization: An experimental investigation. **J Reconstr Microsurg**, V. 4, p. 15, 1987
21. EROL, O.Ö.; SPIRA, M. Reconstructing the breast mound employing a secondary island omental skin flap. **Plast Reconstr Surg**, V. 86(3), p. 510-518, 1990.
22. TARK, K.C.; KHOURI, R.K.; SHIN, K.S.; SHAW, W.W. The fasciovascular pedicle for revascularization of other tissues. **Ann Plast Surg**, V. 26, p. 149-155, 1991.
23. KHOURI, R.K.; UPTON, J.; SHAW, W.W. Prefabrication of composite free flaps through staged microvascular transfer: an experimental and clinical study. **Plast Reconstr Surg**, V. 87(1), p. 108-115, 1991.
24. TAKATO, T.; ZUKER, R.M.; TURLEY, C.B. Prefabrication of skin flaps using vein grafts: an experimental study in rabbits. **Br J Plast Surg**, V. 44(8), p. 593-598, 1991.
25. ZHANG, L.; TUCHLER, R.E.; CHANG, B.; BAKSHAN, N.; SHAW, W.W.; SIEBERT, J.W. Prefabrication of free flaps using the omentum in rats. **Microsurgery**, V. 13, p. 214, 1992.

26. TAKATO, T.; KOMURO, Y.; YONEHARA, H.; ZUKER, R.M. Prefabricated venous flaps: an experimental study in rabbits. **Br J Plast Surg**, V. 46(2), p. 122-126, 1993.
27. HOMMA, K.; OHURA, T.; SUGIHARA, T.; YOSHIDA, T.; HASEGAWA, T. Prefabricated flaps using tissue expanders: an experimental study in rats. **Plast Reconstr Surg** V. 91(6), p. 1098-1109, 1993.
28. KHOURI, R.K.; OZBEK, M.R.; HRUZA, G.J.; YOUNG, V.L. Facial reconstruction with prefabricated induced expanded (PIE) supraclavicular skin flaps. **Plast Reconstr Surg**, V. 95(6), p. 1007-1016, 1995.
29. CEDERNA, P.S.; CHANG, P.; PITTET-CUENOD, B.M.; RAZABONI, R.M.; CRAM, A.E. The effect of delay phenomenon on the vascularity of rabbit abdominal cutaneous island flaps. **Plast Reconstr Surg**, V. 99(1), p. 183-193, 1997.
30. EROL, O.Ö.; SPIRA, M. Development and utilization of a composite island flap employing omentum: experimental investigation. **Plast Reconstr Surg**, V. 65(4), p. 405-418, 1980.

31. NAKAYAMA, Y.; SOEDA, S.; KASAI, Y. Flaps nourished by arterial inflow through the venous system: an experimental investigation. **Plast Reconstr Surg**, V. 67(3), p. 328-334, 1981.
32. ERK, Y.; ROSE, F.A.; SPIRA, M. Vascular augmentation of skin and musculocutaneous flaps. **Annals Plast Surg**, V. 10(5), p. 341-348, 1983.
33. DUFFY, F.J.; PRIBAZ, J.J.; HERGRUETER, C.A.; MAITZ, P.K.M. Flap prefabrication using an exteriorized vascular pedicle in rabbit ear model. **Br J Plast Surg**, V. 46, p. 279-284, 1993.
34. VINZENZ, K.G.; HOLLE, J., WÜRINGER; KULLEMKAMPFF, K.J. Prefabrication of combined scapula flaps for microsurgical reconstruction in oro-maxillofacial defect: a new method. **Journal Cranio-maxillofacial surgery**, V.24, p. 214-223, 1996.
35. WANG, J.L.; WANG, C.Q.; FU, X.M. Application of pre-fabricated free-flap in reconstruction and repair of skin defect of foot in weight-bearing area. **Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi**, V.16(3), p. 177-178, 2002.

36. HYAKUSOKU, H.; OKUBO, M.; UMEDA, T.; FUMIIRI, M. A prefabricated hair-bearing island flap for lid reconstruction. **Br J Plast Surg**, V. 86, p. 510, 1990.
37. PETRATOS, P.B.; CHEN, J.; SOSLOW, R.A.; BLEUSTEIN, C.B.; FELSEN, D.; POPPAS, D.P. Full-thickness human foreskin transplantation onto nude rats as an in vivo model of acute human wound healing. **Plast Reconstr Surg**, V. 111(6), p. 1988-1997, 2003.
38. 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 Reconstr Surg**, V. 35(2), p. 245-261, 1965.
39. SANGER, J.R.; MATLOUB, H.S.; GOSAIN, A.K.; YOUSIF, N.J. Scalp reconstruction with a prefabricated abdominal flap carried by the radial artery. **Plast Reconstr Surg**, V. 89(2), p. 315-319, 1990.
40. REINISCH, J.F. The pathophysiology of skin flap circulation. The delay phenomenon. **Plast Reconstr Surg**, V. 54(5), p. 585-598, 1974.
41. BYUN, J.S.; CONSTANTINESCU, M.A.; LEE, W.P.; MAY, J.W. Effects of delay procedures on vasculature and survival of arterialized

venous flaps: an experimental study in rabbits. **Plast Reconstr Surg**, V. 96(7), p. 1650-1659, 1995.

42. IWASAWA, M. Accelerated maturation in prefabricated flaps by transforming growth factor- β . An experimental study in the rabbit. **Ann Plast Surg**, V. 31, p. 72, 1993.

43. ABBASE, E.A.; SHENAG, S.M.; SPIRA, M.; EL-FALAKY, M.H. Prefabricated flaps: experimental and clinical review. **Plast Reconstr Surg**, V. 96(5), p. 1218-1225, 1995.

* De acordo com:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Sistema Integrado de Bibliotecas. Grupo DiTeses. Diretrizes para apresentação de Teses e Dissertações da USP. Funaro, Vânia M. B. O. coord. [et al.]. São Paulo, SIBI/USP, 2003.

ANEXOS

TABELA 2. Resultados da medição das áreas de necrose observadas nos retalhos no momento do sacrifício dos animais dos Grupos de I a III.

Área de necrose (%)			
	Grupo I	Grupo II	Grupo III
Animal 1	100	73	0
Animal 2	100	54	0
Animal 3	100	67	0
Animal 4	100	32	0
Animal 5	100	47	0
Animal 6	100	68	0
Média	100%	56,83%	0%
SD	0	15,56171	0

TABELA 3. Valores obtidos na contagem do iPCNA: Média das Células marcadas positivamente para PCNA em relação à média do número total de células encontradas na contagem de 3 campos por animal (PCNA+/Total) para cada animal dos Grupos II e III. (Ampliação 200X)

	Grupo I	Grupo II	Grupo III
Animal 1	-	2/33	10 / 22
Animal 2	-	0/30	12 / 25
Animal 3	-	3/28	09 / 19
Animal 4	-	0/36	11 / 20
Animal 5	-	0/19	12 / 21
Animal 6	-	1/21	14 / 18

Teste bicaudal de *Mann-Whitney* ($p < 0,01$)