JASON CÉSAR ABRANTES DE FIGUEIREDO

**Retalho pré-fabricado composto por pele e
vasos gastromentais terminais: estudo
experimental em coelhos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Clínica Cirúrgica

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Bueno Pereira

São Paulo
2008

Dedico esta tese à minha esposa, Adriana;

às minhas filhas, Luíza e Marina;

aos meus pais, Vicente e Mundica;

aos meus irmãos, Giovannini, Jorge e Fabrícia

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Paulo Roberto Bueno Pereira pela orientação em todas as etapas da tese.

Ao Prof. Dr. Luís Marcelo Inaco Cirino pelas sugestões sempre pertinentes.

Ao Prof. Dr. Victor Arias pela consultoria na análise microscópica dos retalhos.

Ao Prof. Dr. Arnaldo Zanotto por ajudar-me na análise estatística dos dados.

Ao Dr. José Marcos Mélega por ensinar-me os segredos da Cirurgia Plástica.

Ao Dr. Renato Rodrigues Naufal pelo incentivo inicial.

À Dra. Junko Takano Ozaka pela colaboração durante a fase de coleta de dados.

Ao Sr. Elias Aparecido Marcelino pelos cuidados com os coelhos durante o pré, trans e pós-operatório.

À Sra. Maria de Fátima Diniz (in memoriam) pelas orientações do funcionamento da pós-graduação.

À Sra. Eliane Falconi Monico Gazzetto que esteve sempre atenta ao andamento da minha pós-graduação.

À Sra. Sandra Maria da Silva Oliveira pela dedicação no preparo das lâminas para estudo histológico.

À Sra. Izabel Cristina Amaral Pereira pela formatação final da tese.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que em algum momento prestaram valiosa colaboração:

Dr. Alexandre Barreto do Amaral

Sr. Alexandre Januário Rodrigues Ribeiro

Dr. André Bezerra de Menezes Reiff

Dr. Antônio Gustavo Zampar

Dr. Antônio Marcos Piva

Dr. Carlos Henrique Fröner Souza Góes

Sr. Cláudio Antônio Vidotti

Dr. Fábio Pierucci de Freitas

Dr. Félix Dong Ike Lee

Dr. Francisco Claro de Oliveira Júnior

Profa. Dra. Linda Ferreira Maximiniano

Dr. Marcelo Sodré Baldi

Profa. Dra. Maria Luiza de Sousa Salvestro

Dra. Marina Junqueira Ferreira Rosique

Sra. Marina Takeda Milani

Dr. Mauro Henrique de Sá Milman

Prof. Dr. Murilo Alexandre Carmona

Sr. Ourisval Santana Santos

Dr. Rodrigo Gouveia Rosique

Sr. Sérgio Murilo de Melo Borges

Profa. Sueli Blames

Prof. Dr. Valdir Zamboni

Dr. Wagner da Silva Leal

Esta tese está de acordo com as seguintes normas em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Sousa Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

LISTA DE ABREVIATURAS	
LISTA DE SÍMBOLOS	
LISTA DE TABELAS	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE GRÁFICOS	
RESUMO	
SUMMARY	
1. INTRODUÇÃO	
1.1 EVOLUÇÃO DOS RETALHOS PRÉ-FABRICADOS	2
1.2 RETALHOS PRÉ-FABRICADOS E ANGIOGÊNESE	4
1.3 O OMENTO COMO TECIDO CARREADOR.....	7
1.4 QUANTIFICAÇÃO DA ANGIOGÊNESE ATRAVÉS DE IMUNO-HISTOQUÍMICA	8
2. OBJETIVO.....	12
3. REVISÃO DA LITERATURA	
3.1 EXPERIMENTOS COM ANIMAIS	14
3.2 APLICAÇÕES CLÍNICAS.....	23
4. MÉTODOS	
4.1 MODELO EXPERIMENTAL	29
4.1.1 ANESTESIA E PREPARO PRÉ-OPERATÓRIO	29
4.1.2 PRIMEIRO TEMPO OPERATÓRIO.....	29
4.1.3 SEGUNDO TEMPO OPERATÓRIO	30
4.1.4 TERCEIRO TEMPO	31
4.1.5 SACRIFÍCIO E DESTINO DOS ANIMAIS	31
4.2 DIVISÃO DE GRUPOS	32
4.3 ANÁLISE DOS RETALHOS.....	32
4.3.1 MACROSCOPIA	32
4.3.2 MICROSCOPIA	33
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	35

5. RESULTADOS

5.1 ÁREAS, RELAÇÕES E DENSIDADE MICROVASCULAR	44
5.2 HISTOLOGIA PELO H/E	57

6. DISCUSSÃO

6.1 O MODELO EXPERIMENTAL	62
6.2 ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	64
6.3 PERSPECTIVA DOS RETALHOS PRÉ-FABRICADOS NA CIRURGIA RECONSTRUTORA.....	71

7. CONCLUSÕES.74

8. ANEXOS.....76

9. REFERÊNCIAS.....85

LISTA DE ABREVIATURAS

AN	área de necrose
ang-1	angiotastina 1
ang-2	angiotastina 2
antiCD	designação de agrupamento de anticorpo
AP	área do pedículo
ATF	área total final
ATO	área total original
AV	área viável
bFGF	fator de crescimento fibroblástico básico
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DMV	densidade microvascular
DNAc	ácido desoxirribonucleico cíclico
EGF	fator de crescimento epidérmico
et al.	e outros
fig.	figura
H/E	hematoxilina/eosina
IC	índice de contração
MCA	músculo cutâneo abdominal
PCR	reação da polimerase em cadeia
PECAM	molécula de adesão das células endoteliais e plaquetárias
PPF	potencial de pré-fabricação
RNA	ácido ribonucleico
TGF- α	fator de crescimento transformador alfa
TGF- β	fator de crescimento transformador beta
TSP-1	trombospondina 1
VEGF	fator de crescimento vascular endotelial
VPF	fator de permeabilidade vascular

LISTA DE SÍMBOLOS

cm	centímetro
g	grama
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
kg	quilograma
mg	miligrama
mm	milímetro
mM	milimolar
PBS	solução salina tamponada
pH	potencial de hidrogênio
®	marca registrada
v/mm ²	vasos por milímetro quadrado
W	watts
X	vezes
μm	micrômetro
°C	graus Celsius
%	por cento

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Áreas, razões entre áreas e média da densidade microvascular por retalho nos grupos A e B.....	46
TABELA 2 - Áreas, razões entre áreas e média da densidade microvascular por retalho nos grupos C e D	47
TABELA 3 - Densidade microvascular por região do retalho	49
TABELA 4 - Número de vasos por mm ² por área do retalho e área-controle contralateral	50
TABELA 5 - Peso em grama dos coelhos operados	76
TABELA 6 - Complicações pós-operatórias nos coelhos	77
TABELA 7 - Estatística descritiva. Grupo A.....	79
TABELA 8 - Estatística descritiva. Grupo B.....	80
TABELA 9 - Estatística descritiva. Grupo C	81
TABELA 10 - Estatística descritiva. Grupo D	82

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Os vários estágios da angiogênese. 1-Broto celular. 2-Núcleo invadindo o broto. 3-Alongamento do broto. 4-Vaso em fundo-de-saco. 5-Neovaso	5
FIGURA 2 - Marcação do primeiro tempo cirúrgico.....	37
FIGURA 3 - Pedículo omental transposto através de incisão na linha alba da parede abdominal	37
FIGURA 4 - Pedículo gastromental dissecado	38
FIGURA 5 -Transposição do pedículo para o plano supra-aponeurótico. a) incisão na linha alba já suturada. b) lâmina de silicone sob o músculo cutâneo abdominal suturada à aponeurose	38
FIGURA 6 - Pedículo suturado no músculo cutâneo abdominal	39
FIGURA 7 - Introdução da lâmina de silicone	39
FIGURA 8 - Aspecto final do primeiro procedimento.....	40
FIGURA 9 - Segundo procedimento. Retirada da lâmina de silicone.....	40
FIGURA 10 - Segundo procedimento. Retalho descolado	41
FIGURA 11 - Segundo procedimento. Po = pedículo omental	41
FIGURA 12 - Aspecto final do segundo procedimento.....	42
FIGURA 13 - Esquema de cortes no retalho	42
FIGURA 14 - Aspecto final. Coelho A4.....	51
FIGURA 15 - Desenho esquemático de áreas. Azul: área necrosada. Verde: área original do retalho.....	51
FIGURA 16 - Aspecto final. Coelho B10.....	52
FIGURA 17 - Desenho esquemático de áreas. Vermelho: área viável (0,64 cm²). Azul: área necrosada. Verde: área original do retalho.....	52
FIGURA 18 - Aspecto final. Coelho C4	53
FIGURA 19 - Desenho esquemático de áreas. Vermelho: área viável (21,23 cm²). Azul: área necrosada. Verde: área original do retalho.....	53
FIGURA 20 - Aspecto final. Coelho D2	54

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 21 - Desenho esquemático de áreas. Vermelho: área viável (93,37 cm²). Azul: área necrosada. Verde: área original do retalho.....	54
FIGURA 22 - Corte imunocorado com anti-CD31. Grupo B	55
FIGURA 23 - Corte imunocorado com anti-CD31. Grupo C	55
FIGURA 24 - Corte imunocorado com anti-CD31. Grupo D	56
FIGURA 25 - Corte imunocorado com anti-CD31. Grupo D, área controle.....	56
FIGURA 26 - Microscopia da área controle. H/E, aumento de 150X	58
FIGURA 27 - Microscopia do retalho do grupo B. H/E, aumento de 150X.....	58
FIGURA 28 - Microscopia do retalho do grupo C. H/E, aumento de 150X.....	59
FIGURA 29 - Microscopia do retalho do grupo D. H/E, aumento de 150X.....	59
FIGURA 30 - Artérias dos pedículos (a). 1- grupo B, 2- grupo C, 3- grupo D (H/E, aumento de 150X).....	60

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - Gráfico de dispersão das áreas viáveis em função do tempo de espera (regressão linear e de quadrados mínimos.....	48
GRÁFICO 2 - Médias de área viável nos grupos.....	48
GRÁFICO 3 - Médias de densidade microvascular dos grupos	49
GRÁFICO 4 - Médias de densidade microvascular das áreas do retalho e controle.....	50
GRÁFICO 5 - Área total final nos grupos.....	78
GRÁFICO 6 - Grau de viabilidade relativa nos grupos	78
GRÁFICO 7 - Grau de viabilidade absoluta nos grupos	78
GRÁFICO 8 - Índice de contração nos grupos.....	78

Figueiredo JCA. *R Retalho pré-fabricado composto por pele e vasos gastromentais terminais: Estudo experimental em coelhos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008. 96p.

INTRODUÇÃO: A propriedade de induzir angiogênese torna o omento um promissor pedículo para pré-fabricar retalhos. **OBJETIVO:** Estabelecer a área abdominal a ser pré-fabricada por um pedículo omental e analisar o potencial de pré-fabricação (PPF) conforme o tempo de espera entre a introdução do pedículo e a elevação do retalho. **MÉTODOS:** Foram utilizados 44 coelhos divididos em quatro grupos (A, B, C e D). No grupo A, um fragmento de pele, tecido subcutâneo e músculo cutâneo abdominal foi totalmente separado e ressuturado. Nos demais grupos, um pedículo omental, contendo os vasos gastromentais ligados distalmente, com área equivalente a 9 cm² foi transposto e suturado ao músculo cutâneo abdominal. Um segundo procedimento de incisão e elevação de um retalho contendo pele, subcutâneo e músculo cutâneo abdominal pediculado apenas pelo omento transposto, foi realizado, variando apenas o período de espera entre os dois procedimentos de 7, 21 e 56 dias para os grupos B, C e D respectivamente. Após 15 dias do último procedimento, os retalhos foram visualizados e as áreas viáveis foram calculadas através do programa de computador Image Tool®. Cortes de áreas viáveis foram imunocoradas pelo anti-CD31 para cálculo da densidade microvascular (DMV). **RESULTADOS:** Os valores médio e máximo das áreas viáveis no grupo D foram respectivamente 45,29 cm² e 99,37 cm² (PPF mediano = 5,03 e PPF máximo = 11,04). Não houve diferença significativa entre as áreas viáveis do grupo D e C. As médias da DMV dos grupos B, C e D foram respectivamente 24,54 vasos/mm², 33,20 vasos/mm² e 27,03 vasos/mm² e maiores do que as médias da DMV das áreas controles de 14,63 vasos/mm², 17,33 vasos/mm² e 18,12 vasos/mm². No grupo A, houve necrose total em todos os retalhos. **CONCLUSÃO:** O PPF mediano do pedículo omental foi de 5,03 vezes sua área e o tempo de espera para o segundo procedimento foi de, no mínimo, 21 dias.

Descritores: retalhos cirúrgicos; omento; neovascularização fisiológica.

Figueiredo JCA. *Prefabricated flap composed of skin and terminal gastromental vessels: Experimental study in rabbits* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2008. 96p.

INTRODUCTION: The angiogenic induction property of the omentum makes it a promising pedicle to prefabricate flaps. **OBJECTIVE:** To establish the abdominal area to be prefabricated by the omental pedicle and to analyze the prefabricate potential according to the time delay between the pedicle introduction and the flap release. **METHODS:** 44 rabbits were divided into four groups (A, B, C and D). In group A, a piece of skin, subcutaneous tissue and abdominal cutaneous muscle has been fully released and sutured again in its place. In other groups, a 9 cm² omental pedicle containing the gastromental vessels distally tied has been transposed and sutured to abdominal cutaneous muscle. A second procedure, an incision and release of the flap that contained skin, subcutaneous and cutaneous abdominal muscle pediculated only by the omentum, has been carried out. The only variation was the time delay between the two procedures: 7, 21 and 56 days for groups B, C and D, respectively. The flaps have been inspected 15 days after the last procedure, and the viable areas have been estimated using the software Image Tool®. The pieces of viable area have been immunostained using anti-CD31 allowing the estimation of the microvascular density. **RESULTS:** The mean and maximum viable areas in group D were 45.29 cm² and 99.37 cm² respectively (average prefabricate potential = 5.03 and maximum prefabricate potential = 11.04). There was no significant difference between the viable areas in groups C and D. The mean microvascular densities of groups B, C and D were 24.54 vessels/mm², 33.20 vessels/mm² and 27.03 vessels/mm² respectively. This was higher than the mean microvascular densities of the control areas, which were 14.63 vessels/mm², 17.33 vessels/mm² and 18.12 vessels/mm². In group A, there were total necrosis in all flaps. **CONCLUSION:** The prefabricate potential of the omentum was found to be 5.03 times its area and the delay time for the second procedure was, at least, 21 days.

Descriptors: surgical flaps; omentum; physiologic neovascularization.

1. INTRODUÇÃO

1.1. EVOLUÇÃO DOS RETALHOS PRÉ-FABRICADOS

A reconstrução ideal de uma deformidade deve restaurar por completo função e forma, por isso, atualmente, existe um grande número de retalhos com diversas variações que se logram adequar à complexidade do defeito. Ainda assim, muitas lesões resultantes de cirurgias oncológicas, reoperações ou comprometimento de certas unidades anátomo-funcionais representam um desafio para o cirurgião. As opções de retalhos disponíveis são os cutâneos, musculocutâneos, fasciocutâneos e até compostos por vários tecidos (osso, fáscia, músculo) que são transferidos para uma região onde seus arcos de rotação alcancem ou como retalhos livres através de microanastomose vascular.

Taylor e Palmer¹ (1987) definiram angiossoma como uma unidade tecidual composta irrigada por um único tronco vascular. Este conceito evoluiu a partir de estudos de toda vasculatura do corpo humano especialmente do tratado publicado por Manchot * na Alemanha em 1889 apud Taylor e Palmer (1987) - “As artérias cutâneas do corpo”. Com o surgimento da radiografia, Salmon* (1936) apud Taylor e Palmer (1987) conseguiu mapear 80 territórios cutâneos e definir áreas hiper ou hipovasculares.

O mapeamento dos angiossomas cutâneos permitiu a elaboração de diversos retalhos em todos os segmentos do corpo humano, às vezes, com refinamentos que os talhavam para deformidades específicas. A

* Manchot C. Die Hautarterien des Menschlichen Körpers. Leipzig, F. C. W. Vogel, 1889.

* Salmon M. Aetères de la peau. Paris, Masson et Cie, 1936.

transferência de um pedículo vascular para uma outra área anatômica, criando, desta forma, um novo angiossoma, originou uma nova classe de retalhos que foram denominados de retalhos pré-fabricados (RPF).

Diller et al.² (1966) conseguiram isolar um retalho cutâneo cuja irrigação foi provida por um segmento de íleo aberto por incisão longitudinal na borda antimesentérica e suturado, após a retirada da mucosa, ao subcutâneo. No mesmo estudo, obtiveram revascularização do miocárdio com o mesmo retalho de íleo, demonstrada através de angiografia pela artéria dos vasos mesentéricos do pedículo. Em 1971, Orticochea³ publicou um caso clínico de reconstrução total de nariz com retalho condrocutâneo bilateral de orelha pediculado pelos vasos temporais. Erol⁴ (1976) transformou enxerto em retalho axial ao enxertar pele diretamente sobre os vasos femorais em ratos e juntamente com Spira⁵ (1980) realizaram um estudo utilizando omento para pré-fabricar retalhos compostos.

Os trabalhos subseqüentes observaram diferentes formas de manipular o pedículo vascular. Shen⁶ (1981) foi o primeiro a utilizar um pedículo terminal, transferi-lo para outra região e pré-fabricar um retalho axial. Hirase et al.⁷ (1987) e Morrison et al.⁸ (1990) compararam os modelos de pedículos com e sem ligadura terminal, e fístula artério-venosa.

Shintomi e Ohura⁹ (1982) descreveram o uso do pedículo dos vasos toracodorsais em cuja extremidade conservaram um fragmento de músculo grande dorsal. O tecido carreador poderia evitar a trombose precoce do pedículo, bem como acelerar a neovascularização por conferir uma maior área de contato.

O estudo de tecidos carreadores levaram a conjecturas acerca das diferenças no poder angiogênico consoante as propriedades intrínsecas do pedículo. Sucederam-se estudos que utilizaram diversos tecidos carreadores como músculo, fáscia e omento. Kwan et al.¹⁰ (1991) realizaram em ratos o primeiro estudo de RPF com pedículo fascial e, em 1996¹¹, compararam os pedículos vasculares, fasciais e musculares. Yap-Legaspi et al.¹² (1996) descreveram a influência dos tecidos perivasculares no processo de pré-fabricação. Como na maioria dos modelos experimentais foram usadas lâminas de silicone para separar os tecidos subjacentes do pedículo, Itoh¹³ (1992) estudou o efeito da pseudocápsula gerada pela lâmina na neovascularização que ocorre entre a inclusão do pedículo e elevação do retalho. Mecanismos para aumentar e acelerar o estímulo angiogênico foram descritos como oxigenioterapia hiperbárica¹⁴, fatores de crescimento^{14,15,16}, expansão¹⁷ e autonomização prévia¹⁸.

1.2. RETALHOS PRÉ-FABRICADOS E ANGIOGÊNESE

As células endoteliais e pericitos contêm informação genética para formação de toda rede capilar sangüínea. O desenvolvimento de novos capilares obedece uma seqüência de eventos que são a digestão enzimática da membrana basal do vaso, migração, proliferação e maturação de células endoteliais, e organização em túbulos¹⁹. Ono e Shina²⁰ (2000) avaliaram a angiogênese em aspirado de endométrio e conseguiram identificar os neovasos nos vários estágios evolutivos. Primeiro acontece uma evaginação

do endotélio chamado broto celular; logo após o núcleo endotelial invade o broto que se alonga gradualmente até formar um fundo-de-saco que se anastomosa com outro vaso (figura 1).

FIGURA 1 - OS VÁRIOS ESTÁGIOS DA ANGIOGÊNESE.

1. BROTO CELULAR
2. NÚCLEO INVADINDO O BROTO.
3. ALONGAMEMNT0 DO BROTO
4. VASO EM FUNDO-DE-SACO.
5. NEOVASO.

A inclusão de um pedículo vascular produz um estímulo angiogênico que provavelmente está relacionado à liberação de fatores de crescimento endotelial. O fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF) foi a primeira citocina identificada. Ele estimula a proliferação endotelial in vitro e angiogênese in vivo. O fator de crescimento vículo-endotelial / fator de permeabilidade vascular (VEGF/VPF) foi isolado pela primeira vez em 1983 por Senger como um fator de regulação da permeabilidade vascular. Ferrara e Henzel (1989) isolaram um fator de proliferação endotelial que depois se

descobriu tratar da mesma proteína. O gene do VEGF já foi isolado de vários animais: homem, rato, boi e porco. Além de estimular a proliferação das células endoteliais e aumentar a permeabilidade vascular, VEGF incrementa os níveis de collagenase intersticial, age no processo de coagulação através da liberação do fator de von Willebrand e estimula as células endoteliais coronarianas a secretar óxido nítrico que resulta em dilatação dos vasos. Além da ação em células endoteliais, VEGF em raros casos estimula a migração dos monócitos e induz a diferenciação em cultura de osteoblastos que é indicativa de participação na remodelação óssea. O efeito mitogênico é mediado por dois receptores de alta afinidade, flt-1 e KDR, que são proteínas transmembranosas pertencentes à superfamília tirosinoquinase e expressadas predominantemente por células endoteliais. Outro grupo de fatores angiogênicos são os ligantes para os receptores específicos das células endoteliais tirosinoquinases tié-1 e tié-2 (tek) como a angiopoetina. Existem outros fatores de crescimento envolvidos com a angiogênese como o fator de crescimento epidérmico (EGF) e o fator de crescimento transformador alfa (TGF- α). Os agentes inibidores da angiogênese foram encontrados a partir de dois modelos: em tecidos sem vasos sangüíneos e antagonistas dos estimuladores. Há os inibidores inespecíficos como inibidores da síntese de prostaglandinas, protamina e outros. Um plasminogênio denominado angiostatina, que é produzido por células tumorais, tem ação inibitória direta nas células endoteliais. Um inibidor específico encontrado em tecidos normais é a trombospondina (TSP-1)^{21,22,23,24}.

1.3. O OMENTO COMO TECIDO CARREADOR

O omento é uma estrutura bastante maleável cuja abundante vasculatura permite retalhos baseados tanto na artéria gastromental esquerda como na direita. Sua anatomia faz com que facilmente seja alongado e sua retirada não ocasiona seqüelas significantes. Das²⁵ (1976) estudou em 200 cadáveres o arco de rotação do retalho omental e, em todos os casos, sua ponta atingiu a abóbada craniana e abaixo do terço médio da perna. O omento, longe de ser um tecido inerte, possui áreas de tecido linfóide que participam ativamente em processos imunológicos e inflamatórios intra-abdominais, é sítio de funções importantes como metabolismo de ácidos graxos e síntese de lipotripsinas, e possui propriedades angiogênicas^{26,27}; por isso tem sido utilizado para promover neovascularização e cicatrização de tecidos isquêmicos, incluindo miocárdio e anastomoses intestinais^{28,29,30,31,32,33,34}. Muitos autores descreveram o uso do omento para diversas finalidades: como enxerto para aliviar edema linfático crônico^{35,36}; para proteger prótese vascular após excisão inguinal radical³⁷; na revascularização de extremidades²⁹; como retalho livre³⁸ e reconstrução de parede torácica³⁹. O poder de estimular a neovascularização está evidente nos relatos de tratamento de osteomielite crônica⁴⁰, lesões actínicas³⁴ e prevenção de recorrência de fístulas³³.

Num estudo em ratos, Zhang et al.²⁷ (1997), através de testes imunoenzimáticos e “Western blot” de vários órgãos e tecidos, encontraram no omento a maior concentração de VEGF. A sua quase totalidade foi produzida pelos adipócitos e não por células do estroma vascular, sugerindo

um proeminente papel dos adipócitos na angiogênese. Anticorpos contra VEGF abolem quase totalmente a atividade mitogênica endotelial do omento, a despeito de restar atividade mitogênica residual por proteínas ligantes da heparina devido a outros fatores como bFGF.

O potencial de área de um retalho pré-fabricado pelo pedículo omental não está bem determinado. O estudo pioneiro de Erol e Spira⁵ só avaliou a irradiação da angiogênese na espessura dos tecidos, já que o omento estava em contato com toda superfície do tecido-alvo. Nos estudos subsequentes^{41,42,43}, as áreas dos retalhos propostos foram insuficientes para determinar o potencial de pré-fabricação.

1.4. QUANTIFICAÇÃO DA ANGIOGÊNESE ATRAVÉS DE IMUNO-HISTOQUÍMICA

A angiogênese está relacionada com fenômenos fisiológicos como a formação do corpo lúteo e em condições patológicas como inflamação, cicatrização, doenças endócrinas e crescimento de tumores. Uma melhor compreensão do mecanismo de metástase das neoplasias malignas colocou a angiogênese como um dos principais fatores de prognósticos e influenciou o advento de marcadores imuno-histoquímicos específicos do endotélio. Weidner et al.⁴⁴ (1991) utilizaram fator VIII para marcar endotélio e constataram uma correlação entre o grau de angiogênese e metástase no carcinoma de mama. Vários autores seguiram este modelo em estudo de angiogênese e metástase de tumores, algumas vezes associado com o grau de expressão de fatores de crescimento^{45,46}.

Arias¹⁹ usou modelo semelhante na avaliação da densidade microvascular (DMV) em linfomas não-Hodgkin; definiu os vasos como agrupamentos de células endoteliais, independentemente da presença de luz ou de hemácias e, após a identificação das três áreas mais vascularizadas (“angiogenic hot spots”), contou-os em campos de aumento de 200X. Koster et al.⁴⁷ (2001) correlacionaram a evolução favorável de linfoma folicular com o aumento da DMV usando o anti-CD34. Guo et al.⁴⁸ (2001) estudaram a angiogênese de câncer de pulmão inoculado em subcutâneo de ratos, comparando a contagem manual com o escaneador microscópico a laser. Kyras et al.⁴⁹ (2004) fizeram um estudo retrospectivo com anti-CD34 no carcinoma de lábio, quantificando a DMV com células que apresentassem imunoreatividade positiva para VEGF. Zi-Ping et al.⁵⁰ (2005) associaram a tomografia computadorizada dinâmica e o anti-CD34 para quantificar a angiogênese no carcinoma colo-retal. Ascani et al.⁵¹ (2006) e Amar et al.⁵² (2002) correlacionaram angiogênese e agressividade dos carcinomas espinocelulares de boca, usando o anti-CD34. Foi descrito o uso de marcadores específicos para endotélio em outras entidades não neoplásicas. Koike et al.⁵³ (2003) estudaram a angiogênese da cartilagem de discos vertebrais herniados, usando anti-CD34 para vasos, anti-CD38+ para macrófagos e o anti-VEGF. Hera et al.⁵⁴ (2005) estudaram pacientes com degeneração macular e neovascularização coroidal. A contagem dos vasos foi realizada através de anti-CD31 / PECAM, e as expressões de VEGF e angiopoetinas se deram através da purificação do RNA reversamente transcrito em DNAc e amplificado em PCR. Ray et al.⁵⁵ (2000) observaram o

aumento de VEGF e ang-1 e ang- 2 em miocárdio de ratos submetidos à hipóxia e mediram a DMV através do anti-CD31. Kawasaki⁵⁶ (2006) utilizou o antígeno nuclear de células em proliferação (PCNA) para medir a atividade de divisão celular em retalhos pré-fabricados.

Nesta tese, o autor utilizou o anti-CD31/PECAM que expressa uma glicoproteína que está concentrada nas junções entre as células endoteliais e está presente sobre o endotélio contínuo de todos os tecidos.

2. OBJETIVO

O objetivo desta tese é quantificar o potencial de pré-fabricação do omento e vasos gastromentais para retalhos cutâneos e a influência do tempo de espera entre a inclusão do pedículo e a liberação do retalho.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. EXPERIMENTOS COM ANIMAIS

A idéia de estimular neovascularização em retalho é antiga e esteve subentendida em manobras como as de liberação de pedículo em retalhos interpolados, ou nos caducos tubos de Filatov⁵⁷ que migravam para áreas distantes através de eventos cirúrgicos intermediários. O primeiro retalho pré-fabricado foi descrito por Diller et al.² (1966). Em 18 cães um segmento de íleo foi isolado, aberto longitudinalmente em sua borda antimesentérica e teve toda a camada mucosa e submucosa retirada. O retalho foi suturado na área cruenta criada na região subcutânea abdominal. Após três semanas, o retalho composto de pele, subcutâneo e íleo foi totalmente isolado e manteve-se irrigado apenas pelos vasos mesentéricos. O exame histológico demonstrou aspecto de pele normal com anexos e a angiografia demonstrou perfusão através da artéria mesentérica para pele. Em três cães, o retalho cutâneo foi transferido para o abdome contralateral sem haver necrose. Em sete cães, Diller et al. retiraram um fragmento de epicárdio, suturaram o retalho de íleo na área cruenta e, um mês depois, ligaram a artéria coronariana descendente. Uma angiografia demonstrou perfusão do sistema coronariano a partir da artéria mesentérica.

Washio⁵⁸(1970) reproduziu este experimento e, em dois cães, seccionou e reanastomosou o pedículo com sucesso. Em quatro animais, transferiu o conjunto como retalho livre para a região cervical. Em dois retalhos, houve sofrimento antes de 24 horas e completa necrose em 48 horas por trombose na anastomose. Nos outros dois retalhos, apareceram sinais de comprometimento de perfusão no terceiro dia e completa necrose

no quarto. Nenhum apresentou trombose do pedículo, aparentando haver comprometimento ao nível dos capilares.

Erol⁴ (1976) conseguiu transformar um enxerto de pele em retalho axial em cães. Com uma incisão inguinal, foram dissecados os vasos femorais e transferidos para um plano superficial à fáscia muscular. Um enxerto de pele foi colocado sobre os vasos e, depois, a pele inguinal foi suturada sobre o enxerto. Os vasos femorais foram ligados distalmente e todo enxerto foi separado dos tecidos, permanecendo pediculado apenas pelos vasos. A região inguinal foi suturada, deixando o retalho dependurado. Uma rede de neovascularização surgiu ao redor da artéria femoral na arteriografia.

Erol e Spira⁵ foram os primeiros a utilizar o omento como tecido carreador em 1980. O estudo foi realizado em porcos divididos em vários grupos: omento com enxerto de pele, omento com retalho cutâneo, omento entre retalho cutâneo e músculo, transferência de osso (costela, tibia e ilíaco) envolto por retalho de omento e introduzido em retalhos cutâneos tubulares. A vascularização e integração óssea foram demonstradas pelos achados histológicos, marcação com tetraciclina (a tetraciclina segue o cálcio ionizado e marca o osso recém-formado) e captação de radioisótopos com ^{99m}Tc-pirofosfato.

Nakayama et al.⁵⁹ (1981) demonstraram em ratos a possibilidade de criar retalhos irrigados por anastomose artério-venosa da artéria femoral com a veia epigástrica. Uma veia de drenagem foi deixada no lado oposto do

“shunt” nos dois primeiros grupos e anastomose das veias epigástrica e femoral contralateral no último grupo.

Voukidis⁶⁰ (1982) realizou em ratos anastomose término-lateral da veia epigástrica superficial à artéria femoral. Após 20 a 25 dias, um retalho de toda metade do abdome foi levantado mantendo-se pediculado apenas pela veia epigástrica arterializada e a veia torácica lateral.

Shen⁶ (1981) propôs um modelo de pré-fabricação que seria o mais difundido. Ele utilizou os vasos femorais ligados distalmente e transpostos para o subcutâneo do abdome em coelhos. Houve viabilidade em todos os retalhos e necrose no grupo controle. Para explicar por que não se estabelecia trombose nos vasos, realizou microangiografia de pedículos em cadáveres humanos frescos (radial, ulnar, tibial anterior, fibular, facial e temporal superficial) e encontrou uma rede microvascular de conexão entre artéria e veia.

Erk et al.⁶¹ (1982) foram os primeiros a usar músculo como tecido carreador de pedículo. Em cães, transpuseram o músculo sartório junto com os vasos femorais para o subcutâneo da região inguinal e, após quatro semanas, levantaram um retalho musculocutâneo.

Hirase et al.⁷ (1987) estudaram em ratos e em coelhos diferentes pedículos em diversos tipos de retalhos. O primeiro modelo estudado foi um retalho do músculo oblíquo externo tubulizado em volta do pedículo com as seguintes variações: sem interrupção do fluxo, com interrupção do fluxo, só artéria, só veia e fístula artério-venosa. Os grupos de fluxo contínuo

apresentaram melhores índices de neovascularização e os grupos com pedículos venosos apresentaram inviabilidade dos retalhos. Hirase et al. descreveram também pré-fabricação de osso ilíaco e de fragmentos de osso esponjoso envolvidos por um cone de silicone; de um retalho de tecido adiposo tubulizado e envolto por uma lâmina de silicone; de retalho condrocútâneo e de retalho osteomusculocútâneo com sensibilidade ao incluir no pedículo o ramo cutâneo do nervo femoral.

Morrison et al.⁸ (1990) estudaram em coelhos quatro variações do pedículo femoral: transposição de veias e artérias ligadas distalmente, transposição só de artéria colocada ao lado de veia superficial local, arco arterial confeccionado com enxerto venoso e fístula artério-venosa. Apenas os modelos com fístula artério-venosa apresentaram maiores áreas de necrose. Observaram que a causa mais comum de obstrução da artéria foi um longo trombo organizado com vários graus de revascularização, muito embora, aparentemente, esta oclusão não esteve correlacionada ao grau de neovascularização ou à viabilidade dos retalhos. Em algumas cobaias, a completa obstrução da artéria esteve associada à extensa neovascularização e completa viabilidade.

Khoury et al.⁶² (1991) realizaram o primeiro experimento usando fáscia como tecido carreador em ratos. Um retalho de fáscia abdominal irrigada pela artéria epigástrica inferior superficial foi rodado e suturado em torno da articulação do joelho que fora previamente dissecada e liberada dos músculos. Após três dias, o osso envolvido por fáscia mostrou maior captação de radionuclídeos do que no grupo controle.

Kwan et al.¹⁰ (1991) realizaram um estudo em 64 ratos de RPF com pedículo fascial baseado na artéria epigástrica superficial. Os retalhos foram elevados e suturados de volta em 0, 2, 3, 4, 5, 7 e 14 dias. No quinto dia, 93% dos retalhos foram adequadamente perfundidos pelo pedículo. A quantificação de perfusão da pele chegou a 88% da pele normal após duas semanas. Diminuindo o tamanho do pedículo, ocorreu também uma menor sobrevivência do retalho (71%) e grau de perfusão de pele (55%). A pele e o músculo cutâneo abdominal (MCA) mostraram evidência histológica de vascularização com pequenos vasos do retalho cutâneo e pedículo fasciovascular os quais foram preenchidos com corante da Índia. O espaço entre a fáscia e o retalho foi preenchido com tecido de granulação.

Itoh¹³ (1992) estudou em ratos o efeito da pseudocápsula formada por lâmina de silicone em RPF. O estudo comparou dois grupos: no primeiro, uma lâmina de silicone foi colocada inferiormente ao pedículo de vasos femorais transpostos abaixo do MCA e, no segundo, apenas uma lâmina de silicone foi colocada abaixo do MCA. A proliferação de neovasos ficou evidente no terceiro dia. Em duas semanas, ocorreram dilatação e aumento de densidade dos vasos ao redor do pedículo. No grupo com pedículo, a dilatação dos vasos progrediu até a periferia. No outro grupo, ocorreu uma rápida constrição da vasculatura. Em ambos os grupos, os vasos sinuosos desapareceram quase que completamente após três meses, resultando numa densidade igual à pele normal ou hipovascularidade.

Zhang et al.⁴¹ (1992) pesquisaram pré-fabricar retalhos cutâneos abdominais com pedículo omental e alcançaram 100% de viabilidade após

14 dias de espera para o segundo procedimento. Dois anos depois, Zhang et al.⁴² utilizaram o mesmo modelo, porém com uma área cutânea maior, para avaliar as limitações de neovascularização do omento e obtiveram uma média de 22,8 cm² de área viável, usando 10 cm² de área de omento.

Inasawa¹⁶ (1993) pesquisou o efeito do TGFβ como acelerador da maturação de RPF em coelhos. Foram feitos retalhos pré-fabricados introduzindo os vasos auriculares na pele cervical com período de maturação de 3, 5 e 8 dias. No primeiro procedimento, antes de fechar a pele, foi instilado colágeno com ou sem fator-beta. Os resultados mostraram diferença nos períodos de maturação de três e cinco dias, sugerindo que o fator-beta acelera a maturação.

Homma et al.¹⁷ (1993) compararam em ratos três modelos de retalho pré-fabricado com pedículo de vasos safenos com fragmento de músculo grácil transposto para região abdominal: com expansor inflado em sua capacidade máxima, com expansor desinflado e com lâmina de silicone. Foi encontrada maior percentagem de área viável no grupo com expansor inflado.

Duffy et al.⁶³ (1993) propuseram um modelo de retalho pré-fabricado em coelhos com pedículo interpolado em retalho tubulizado. Elevaram um retalho de 1,5 cm de largura por 6 cm de comprimento em cujo eixo longitudinal estavam a artéria e veia centrais do dorso da orelha. Na sua extremidade distal, os vasos foram deixados expostos 1 cm junto com um fragmento de cartilagem posterior. O retalho foi tubulizado e o conjunto cartilagem e vasos foram transpostos e embutidos na região cervical

posterior. No intervalo de 2, 4 e 6 semanas, retalhos de 1x2, 1x4 e 1x6 cm foram elevados e suturados em uma área cruenta das mesmas dimensões criadas na orelha contralateral. Houve maior viabilidade à medida que o intervalo entre os procedimentos aumentava e, na angiografia, houve um acréscimo no número de vasos e alongamento no sentido longitudinal. Uma contagem de vasos num corte transversal logo acima do pedículo, mas sem incluí-lo, também mostrou aumento do número de vasos longitudinais.

Ono et al.⁶⁴ (1993) compararam em 112 ratos a intensidade de fluxo sangüíneo entre retalho randomizado, pré-fabricado e axial. O fluxo foi medido através do uso de microesferas coloridas e comparado com os fluxos renal e da pele normal. Encontraram maior fluxo de sangue no retalho axial seguido pelo pré-fabricado e depois pelo randomizado.

Mutaf et al.⁶⁵ (1994) pretenderam elucidar se há vantagens de colocar uma lâmina de silicone no processo de pré-fabricação. Foram usados ratos divididos em três grupos: sem separação com silicone, separação parcial e total separação. O pedículo foi fascial baseado nos vasos epigástricos superficiais introduzidos sob um retalho bipediculado. O tempo de espera para posterior elevação foi de 3, 7 e 14 dias. Os autores concluíram que isolar o leito receptor não encurta o tempo de neovascularização nem melhora a sobrevida dos retalhos.

Yap-Legaspi et al.¹² (1995) observaram a angiogênese em RPF em 48 ratos divididos em três grupos: no primeiro foi mantido o tecido areolar em volta do pedículo; no segundo o tecido peri-areolar foi retirado, mas preservado o tecido peri-adventicial; e no terceiro, os vasos foram

totalmente esqueletizados. A quantidade de tecido perivascular não contribuiu estatisticamente para o grau de neovascularização do pedículo.

Kwan et al.¹¹ (1996) compararam os pedículos muscular, fascial e vascular através de cálculo de área, medidas de perfusão com fluorometria e estudos histológicos com tintura da Índia. A melhor perfusão foi conseguida com retalho de pedículo muscular, seguido pelo fascial; e as áreas viáveis dos pedículos fascial e muscular foram marcadamente maiores do que o pedículo vascular.

Maitz et al.⁶⁶ (1996) pesquisaram o impacto no uso da expansão de retalho pré-fabricado em coelhos, utilizando um modelo descrito por Duffy et al.⁶³ e comparando um grupo sem expansor com outros três com expansores de volumes diferentes. Houve maior área viável no grupo com expansor de maior volume.

Kostakoglu et al.⁶⁷ (1997) realizaram pré-fabricação de retalho abdominal de 3x2 cm em ratos com segundo tempo cirúrgico realizado após 2, 4, 6, 8 e 12 semanas. A avaliação de área viável foi realizada através de coloração com azul de Evans sem esperar a delimitação macroscópica da necrose. Foram realizadas microangiografia e quantificação de vasos da derme, MCA e subcutâneo com hematoxilina/eosina (H/E).

Bayati et al.¹⁴ (1998) estudaram o efeito da infusão de bFGF e oxigênio hiperbárico em RPF com pedículo de músculo semimembranoso e vasos safenos transpostos para o abdome em ratos. Foram avaliadas a área viável, perfusão através de Doppler a laser e quantificação de vasos corados

pelo H/E. Houve melhores resultados no grupo com associação (oxigênio hiperbárico e infusão de bFGF), depois nos grupos de oxigenioterapia hiperbárica e bFGF usados isoladamente e, depois, no grupo controle.

Hickey et al.¹⁵ (1998), em estudo com coelhos, introduziram um implante com liberação lenta de bFGF próximo ao pedículo. O uso de bFGF ocasionou em uma semana considerável diferença na angiogênese. Porém em duas e quatro semanas essa diferença não mais acontecia. Uma liberação autógena dos outros grupos sem bFGF poderia explicar tal fato.

Safak et al.⁶⁸ (1999) usaram um retalho de osso escapular para pré-fabricar um retalho de região dorsal de coelho.

Sá et al.¹⁸ (2001) obtiveram em ratos um expressivo aumento da área viável ao realizarem autonomização da região abdominal junto com a transposição de pedículo femoral no primeiro tempo cirúrgico.

Tezel et al.⁶⁹ (2001) criaram em ratos um retalho de tecido adiposo abdominal ao transferirem um pedículo fascial mantido pelos vasos epigástricos inferiores superficiais.

Rocha et al.⁷⁰ (2002) demonstraram em ratos a viabilidade de um segmento de jejuno, inclusive com preservação de peristaltismo, pediculado pelo omento suturado no plano submucoso através de incisão na borda anti-mesentérica.

Figueiredo et al.⁴³ (2006) utilizaram o pedículo omental em arco, ou seja, sem a ligadura terminal dos vasos gastromentais para pré-fabricar um retalho cutâneo abdominal de 100 cm² e obtiveram viabilidade total dos

retalhos no grupo de 60 dias de espera. Kawasaki (2006), no mesmo modelo experimental, quantificou a atividade de divisão celular dos retalhos através de imuno-histoquímica com PCNA (antígeno nuclear de células em proliferação) e observou maior atividade nos grupos com maior tempo de espera.

3.2. APLICAÇÕES CLÍNICAS

A primeira aplicação clínica dos RPF foi relatada por Orticochea³ (1971). Em dois pacientes, ele realizou reconstrução total nasal com retalhos bilaterais, condrocutâneos e retroauriculares pré-fabricados por pedículo dos vasos temporais superficiais.

Erol⁴ (1976) descreveu dois tipos de retalhos usados em oito pacientes. Em sete deles, através de uma incisão em “agá” na região temporal, expôs os vasos temporais superficiais e suturou a ponta dos dois retalhos laterais à incisão mediana em suas próprias bases, tubulizando-os e criando uma área cruenta em cuja superfície foi colocado um enxerto de pele parcial. Num paciente, foi feito procedimento semelhante, todavia localizado na região mediana frontal. Após 21 dias, os enxertos foram elevados como retalhos pediculados e usados para reconstrução das regiões infra-orbitárias, zigomáticas, bucal, nasal e de orelha.

Shen⁶ (1981) transpôs o pedículo temporal superficial dentro de um retalho tubulizado cervical para reconstruir a hélice de orelha em cinco pacientes. Ele também relatou o uso do mesmo pedículo para pré-fabricar

retalho de pele cervical de 7,0 X 3,5 cm e utilizá-lo para reconstruir microstomia. Em dois pacientes com queimadura elétrica de mão, Shen implantou a artéria dígito-palmar para pré-fabricar retalho abdominal e usou a artéria ulnar distalmente lesada para pré-fabricar pele de antebraço e utilizá-lo para reconstrução da mão, interpondo um enxerto de veia. Neste último caso, houve necrose do retalho por trombose na anastomose vascular.

Shintomi e Ohura⁹ (1982) foram os primeiros a descreverem o uso de tecido carreador junto com o pedículo vascular ao aproveitarem parte de um retalho musculocutâneo do grande dorsal, usado para reconstrução de nariz, fronte e terço médio da face, que necrosara. O pedículo toracodorsal junto com uma porção do músculo que se mantinham viáveis foram transpostos para o subcutâneo do braço direito. Após duas cirurgias intermediárias de autonomização, o retalho braquial foi rodado para face. Shintomi e Ohura relataram mais dois casos de reconstrução oncológica da face e outro de reconstrução do dorso do pé.

Erol e Spira⁷¹ (1990) relataram reconstrução total de mama em 21 pacientes com retalho abdominal inferior pré-fabricado por pedículo de grande omento. O pedículo era baseado nas gastromentais direitas ou esquerdas, dependendo do lado da mama a ser reconstruída, e passado pela parede abdominal através de incisão transmuscular perto do rebordo costal. O período de espera entre a inclusão do omento e a transposição do retalho para o tórax foi de 30 dias.

Sanger et al.⁷² (1992) relataram um caso de reconstrução de couro cabeludo com retalho abdominal transferido como retalho livre pré-fabricado pela artéria radial.

Khoury et al.⁷³ (1995) descreveram três casos utilizando a área supraclavicular como região doadora e expansão cutânea. No primeiro caso, usaram a fáscia radial e anastomosaram os vasos radiais com os vasos cervicais. Após a expansão, levaram o tecido supraclavicular como retalho livre para reconstrução da região frontal com anastomose nos vasos temporais. No segundo caso, para eliminar duas microanastomoses e a dissecação tediosa dos vasos após o primeiro evento, anastomosaram os vasos radiais direto no pedículo temporal transposto à região cervical. Isto originou um grande pedículo que permitiu transferir o retalho supraclavicular expandido para reconstrução nasal. No terceiro caso, buscaram eliminar a microanastomose. Por isso levaram a fáscia têmporo-parietal junto com os vasos temporais superficiais dissecados até na sua porção intraparotídea e os transpuseram para a região supraclavicular.

Morrison et al.⁷⁴ (1997) descreveram três casos: o primeiro caso foi uma reconstrução de joelho com retalho inguinal e os outros dois , reconstrução de frente com retalho supraclavicular pré-fabricado por pedículo temporal. Dificuldades com retorno venoso e com a dissecação do pedículo envolto por pseudocápsula reativa ao silicone foram relatadas.

Safak et al.⁶⁸ (1999) relataram reconstrução de mandíbula e mão com retalho cutâneo inguinal pré-fabricado por pedículo de osso ilíaco.

Furukawa et al.⁷⁵ (1998) empregaram retalho pré-fabricado expandido de tórax com pedículo muscular do grande dorsal para reconstruir a unidade estética do terço médio de uma face queimada.

Pribaz et al.⁷⁶ (1999) relataram a experiência de 10 anos de 15 retalhos pré-fabricados em 12 pacientes dos quais nove foram seqüelas cicatriciais após queimaduras. Em cinco pacientes, foi pré-fabricada uma área distante para posterior transferência como retalho livre. Nestes casos, os pedículos escolhidos foram os ramos descendentes dos vasos femorais laterais circunflexos junto com algum tecido muscular e fascial. Em sete pacientes, foi pré-fabricada uma área próxima à região a ser reconstruída com o objetivo de obter pele com características semelhantes. Nestes casos, foi usado o pedículo dos vasos temporais superficiais e, caso não houvesse disponibilidade dos mesmos, o pedículo dos ramos descendentes dos vasos femorais laterais circunflexos que foram transpostos como um mini-retalho livre. Em dois casos de grande gravidade, usaram o mini-retalho livre para pré-fabricar mais de uma área cutânea alternadamente (grua vascular). Pribaz et al. usaram expansão cutânea com Doppler ultra-sônico para controlar o fluxo sanguíneo pelo pedículo em todos os casos e Gore-Tex® para separar o pedículo e facilitar o segundo procedimento.

Teot et al.⁷⁷ (2000) publicaram sete casos operados de reconstrução total de face queimada com retalho pré-fabricado e expandido supraclavicular. O pedículo utilizado foi a fáscia antebraqueal com a artéria radial previamente transferida à região cervical e anastomosada à artéria facial.

Margulis et al.⁷⁸ (2007) transferiram o pedículo dos vasos toracoacromiais para o subcutâneo e pré-fabricaram um retalho expandido de tórax para corrigir uma sinéquia cicatricial cervical pós-queimadura.

4. MÉTODOS

4.1. MODELO EXPERIMENTAL

4.1.1 ANESTESIA E PREPARO PRÉ-OPERATÓRIO

Foram utilizados 44 coelhos machos albinos da raça Nova Zelândia fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da USP, mantidos em gaiolas individuais com ração e água ad-libitum no biotério do Laboratório da Disciplina de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (LIM 26) e tratados de acordo com as normas recomendadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). As cirurgias foram realizadas com instrumental específico em condições de assepsia e anti-sepsia. Os animais foram submetidos à anestesia geral com injeção intramuscular de 5 mg/kg de cloridrato de tiazina e 35 mg/kg de cloridrato de cetamina por coelho. A seguir, foram colocados em mesa operatória em decúbito dorsal com os membros mantidos em abdução. Foram realizadas tricotomia e anti-sepsia com iodopovidona tópica de toda região abdominal anterior e colocado campo estéril com fenestração retangular de 18x13 cm.

4.1.2. PRIMEIRO TEMPO OPERATÓRIO

Em cada coelho, foi realizada uma incisão abdominal mediana do apêndice xifóide até 10 cm inferiormente. Ao lado esquerdo da linha alba, foi incisado o músculo cutâneo abdominal (MCA) até a aponeurose. Este plano

na parede abdominal esquerda foi descolado com tesoura em direção lateral e inferior de forma que fosse criado um espaço de 10 cm de largura por 15 cm de comprimento. Logo após, foi feita uma celiotomia com incisão de 5 cm na linha alba a partir do apêndice xifóide, e foram localizados o grande omento e a artéria e veia gastromentais. O pedículo foi dissecado, restando 1 cm de omento em volta dos vasos. Todo conjunto foi ligado com mononylon 4-0 e seccionado - tornando-se um pedículo terminal – e transposto para fora da cavidade abdominal. A incisão da celiotomia foi fechada com mononylon 3-0 em sutura contínua, deixando 1,5 cm aberto superiormente para passagem do pedículo de omento. O pedículo foi disposto no plano supra-aponeurótico seguindo em direção diagonal ao ponto central do futuro retalho. A fixação do pedículo no retalho foi realizada com suturas de mononylon 5-0 entre o MCA e o omento carreado de forma que a extremidade do pedículo ficasse 5 cm lateral à linha mediana e 7,5 cm inferior a uma reta horizontal tangente ao apêndice xifóide. Os pontos laterais deixavam o pedículo com 1 cm de largura confirmada com compasso. Uma lâmina de silicone de 7x7 cm por 1 mm de espessura foi suturada na aponeurose com mononylon 4-0, separando-a do pedículo. A pele foi suturada com pontos separados de mononylon 3-0 (Figuras 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8).

4.1.3. SEGUNDO TEMPO OPERATÓRIO

Um retalho retangular de pele, subcutâneo e MCA de 10 cm de largura por 15 cm de comprimento cujo vértice súpero-medial era o apêndice

xifóide, foi elevado pediculado apenas no omento que continha a artéria e a veia gastromentais. A lâmina de silicone foi retirada. O retalho foi suturado então de volta com sutura contínua de mononylon 3-0 (Figuras 9, 10, 11 e 12).

Em oito coelhos (grupo A), foi feito apenas um tempo cirúrgico de excisão de um fragmento de tecido com as mesmas dimensões e composição do retalho, exceto pela ausência do pedículo omental, e sutura local.

4.1.4. TERCEIRO TEMPO

Após 15 dias do segundo tempo cirúrgico, os retalhos foram visualizados. Suas formas finais, incluindo a área viável e necrótica, foram desenhadas em um molde de papel vegetal. Os retalhos foram devidamente preparados para estudo histopatológico com H/E e imuno-histoquímica.

4.1.5. SACRIFÍCIO E DESTINO DOS ANIMAIS

O sacrifício foi realizado com o coelho anestesiado como já previamente descrito e injeção parenteral de 10 ml de KCL a 19,1%. Os animais foram descartados através do programa de coleta de resíduos sólidos dos serviços de saúde da prefeitura de São Paulo.

4.2. DIVISÃO DE GRUPOS

Grupo A- Realizado apenas o segundo procedimento sem introdução do pedículo omental.

Grupo B – Intervalo entre o primeiro e o segundo tempos cirúrgicos de 7 dias.

Grupo C – Intervalo entre o primeiro e o segundo tempos cirúrgicos de 21 dias.

Grupo D – Intervalo entre o primeiro e o segundo tempos cirúrgicos de 56 dias.

4.3. ANÁLISE DOS RETALHOS

4.3.1. MACROSCOPIA

Os desenhos dos retalhos foram copiados por scanner e redesenhados no programa Corel Draw®. Foram definidas três áreas: área total original (ATO) (verde), área viável (AV) (vermelho) e área de necrose (AN) (azul). As imagens foram transferidas para o programa Image Tool® onde foram calculadas as dimensões em centímetros quadrados de cada área. A soma das áreas viável e de necrose foi considerada área total final (ATF). A área do omento em contato com o retalho foi chamada de área do pedículo (AP) e considerada com valor constante de 9 cm². O potencial de pré-fabricação (PPF) foi calculado pela razão entre AV e AP. O índice de contração do retalho (IC) foi dado pela fórmula $ATO - ATF / ATO$. A

porcentagem de AV foi calculada como absoluta, em relação à ATO, e relativa, em relação à ATF.

4.3.2. MICROSCOPIA

Os retalhos foram divididos em quatro segmentos através de dois cortes perpendiculares que se cruzavam ao nível da extremidade do pedículo, denominados I (súpero-medial), II (súpero-lateral), III (ífero-medial) e IV (ífero-lateral). O segmento I era o único que continha o pedículo. Cada segmento foi subdividido em fragmentos denominados “a, b, c, d, e, f, g, h” através de cortes paralelos e distantes 4 mm entre si e perpendiculares ao eixo do pedículo. Áreas necróticas não foram amostradas para microscopia. O corte exclusivamente do pedículo foi chamado de “p” (fig. 13). Um fragmento de pele, tecido subcutâneo e MCA com as mesmas dimensões na região contralateral do abdome foi retirado e submetido aos mesmos cortes do retalho em cada coelho.

Cortes transversais perpendiculares ao pedículo foram analisados microscopicamente. Cortes histológicos de 4 μ m foram montados em lâminas previamente silanizadas (organosilano, marca Sigma) e corados por hematoxilina/eosina (H/E) e por imuno-histoquímica com o marcador específico de antígeno de membrana endotelial anti-CD31 (clone JC70, código N1596) da marca DAKO® e o kit de amplificação estreptoavidina-biotina-peroxidase Novostain Universal Detection Kit™ da marca Novocastra® (código NCL-RTU-DT). Após desparafinização e reidratação, o

bloqueio da peroxidase endógena foi alcançado lavando-se as lâminas com água oxigenada a 3% e, em seguida, a recuperação antigênica por calor úmido em forno de micro-ondas, por dois ciclos de 9 minutos em tampão citrato 10mM, pH 6,0 na potência máxima (1400W). As lâminas foram resfriadas à temperatura ambiente por 20 minutos e rapidamente lavadas em água corrente. O bloqueio da reação inespecífica de fundo foi feito utilizando-se leite em pó desnatado (Molico®, Nestlé). O anticorpo primário anti-CD31 (pré-diluído) foi incubado por pelo menos 12 horas a uma temperatura que variou de 4 a 8°C. A revelação da reação foi feita de acordo com as instruções do fabricante do Kit *Novostain Universal Detection Kit™*. Após lavar as lâminas em solução salina tamponada (PBS), os cortes foram incubados com anticorpo biotinilado por 10 minutos. Em seguida, após um banho de 5 minutos em PBS, os cortes foram incubados por 10 minutos com complexo estreptoavidina-biotina-peroxidase. Finalmente, após novo banho por 5 minutos em PBS, os cortes foram tratados com solução cromógena contendo 3,3' tetrahydroclorato de diaminobenzidina (marca Sigma, código D5637) e H₂O₂ a 0,036% em PBS, pH 7,5 e a seguir contracolorados com hematoxilina de Harris. Para controle positivo foram utilizados cortes histológicos de amígdalas palatinas. Os controles negativos foram obtidos substituindo-se o anticorpo primário por solução salina tamponada.

Os vasos foram definidos como agrupamentos de células endoteliais que apresentassem luz detectável e foram contados em imagens digitalizadas captadas por uma câmera de vídeo acoplada a um microscópio óptico convencional, considerando a técnica original padronizada por

Weidner et al. (1991) e modificada por Arias (1995). A densidade microvascular foi avaliada em aumento de 250X utilizando-se cortes imunocorados com anticorpo anti-CD31. Quatro áreas adjacentes de 0,41 mm² cada com maior densidade microvascular (“angiogenic hot spots”) foram selecionadas e as imagens captadas em cada corte histológico. O somatório do número de vasos dos quatro cortes de cada região foi dividido por 1,64 para se obter o número de vasos por milímetro quadrado (v/mm²). Sete fragmentos da área controle obtidos no mesmo animal na região contralateral também foram submetidos à contagem de vasos. Lâminas que não apresentaram uma reação satisfatória por contaminação do fundo ou ausência de coloração foram eliminadas.

4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados deste trabalho foram analisados mediante um nível de significância adotado de 5% ($\alpha = 0,05$), de acordo com o padrão geral comum na área médica e biológica. Desta forma, os valores calculados da probabilidade de erro (**p**) quando $\leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes (*****) e quando $> 0,05$ foram tomados como não significantes (ns).

De modo geral, para as variáveis numéricas, com número suficiente de casos, ou então de forma combinada, foram utilizados os cálculos paramétricos, e para as variáveis de menor número de casos, os não paramétricos.

Os modelos estatísticos escolhidos são relacionados a seguir:

- 1- Média aritmética, desvio padrão, mediana, valor mínimo e valor máximo dos dados.
- 2- Cálculo de percentuais.
- 3- Correlação paramétrica de Pearson, coeficiente de correlação e sua significância. Equação da reta.
- 4- Análise de variância (Anova), sob fatores.
- 5- Intervalo de confiança da média (95%)
- 6- Teste não paramétrico, pareado, de Wilcoxon.
- 7- Anova não paramétrica de Kruskal-Wallis
- 8- Teste “post-hoc”, de comparação múltipla, aos pares.
- 9- Gráfico em curva, de quadrados mínimos.
- 10- Gráficos em linha.

Os programas estatísticos mais utilizados foram: Microsoft Excel 2003; Statistica for Windows (StatSoft Inc.) release 7.0, 2004; Minitab (Minitab Inc.) release 14.2, 2005; SPSS for Windows (SPSS Inc.) release 13.0, 2004; NCSS release 2000.

FIGURA 2 - MARCAÇÃO DO PRIMEIRO TEMPO CIRÚRGICO.

FIGURA 3 - PEDÍCULO OMENTAL TRANSPOSTO ATRAVÉS DE INCISÃO NA LINHA ALBA DA PAREDE ABDOMINAL.

FIGURA 4 - PEDÍCULO GASTROMENTAL DISSECADO.

FIGURA 5 - TRANSPOSIÇÃO DO PEDÍCULO PARA O PLANO SUPRA-APONEURÓTICO. A- INCISÃO NA LINHA ALBA JÁ SUTURADA . B- LÂMINA DE SILICONE SOB O PANÍCULO CARNOZO SUTURADA À APONEUROSE.

FIGURA 6 - PEDÍCULO SUTURADO NO MÚSCULO CUTÂNEO ABDOMINAL.

FIGURA 7 - INTRODUÇÃO DA LÂMINA DE SILICONE.

FIGURA 8 - ASPECTO FINAL DO PRIMEIRO PROCEDIMENTO.

FIGURA 9 - SEGUNDO PROCEDIMENTO. RETIRADA DA LÂMINA DE SILICONE.

FIGURA 10 - SEGUNDO PROCEDIMENTO. RETALHO DESCOLADO.

FIGURA 11 - SEGUNDO PROCEDIMENTO. PO= PEDÍCULO OMENTAL.

FIGURA 12- ASPECTO FINAL DO SEGUNDO PROCEDIMENTO.

FIGURA 13 - ESQUEMA DE CORTES NO RETALHO.

5. RESULTADOS

5.1. ÁREAS, RELAÇÕES E DENSIDADE MICROVASCULAR

O peso médio dos coelhos antes da primeira intervenção cirúrgica foi de $3022,73 \pm 411,39\text{g}$ com mínimo de 2500g e máximo de 4000g. O peso médio antes da segunda intervenção cirúrgica foi de $3102,86 \pm 558,09\text{g}$ e antes do sacrifício, de $2932,56 \pm 428,42\text{g}$ (anexo A).

As complicações decorrentes do procedimento foram abscesso, exposição parcial da lâmina de silicone, soroma e deiscência (anexo B). Os quinze dias de espera após a última cirurgia acarretaram a contração da ferida operatória que foram maiores nas áreas necróticas. No grupo C, houve morte do coelho 9 no terceiro dia de pós-operatório por pneumonia.

As tabelas 1 e 2 mostram os valores obtidos para as áreas, relações entre áreas, o IC e média de vasos por coelho. A tabela 3 mostra as médias de vasos por mm^2 por área. A tabela 4 mostra o número de vasos por mm^2 pareado com as respectivas áreas-controle.

Apresentaram necrose total oito retalhos no grupo A (todos), seis retalhos no grupo B, dois retalhos no grupo C e nenhum retalho no grupo D. As médias das AV dos grupos A, B, C e D foram respectivamente $0,00\text{ cm}^2$, $2,89\text{ cm}^2$, $21,94\text{ cm}^2$ e $45,29\text{ cm}^2$. Os PPF médios ($\text{AV médio}/9$) dos grupos B, C e D foram respectivamente 0,32; 2,44 e 5,03. O IC médio dos grupos A, B, C e D foram respectivamente 0,32; 2,44 e 5,03. O IC médio dos grupos A, B, C e D foram respectivamente 0,66; 0,65; 0,54 e 0,42 (fig. 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 e 21). Os gráficos das médias de AV, ATF, AV/ATF, AV/ATO em função dos dias de espera mostraram comportamentos semelhantes. Já o gráfico do IC apresentou padrão inversamente proporcional aos dias de

espera. Ao se fazer uma regressão de quadrados mínimos nas médias das áreas viáveis, obteve-se como resultado uma curva que tende a se estabilizar por volta dos 56 dias (gráficos 1 e 2) (anexo C). A média de vasos por mm² em função dos dias de espera não apresentou uma tendência a crescimento progressivo. Quando colocado em um mesmo gráfico as médias das DMV das áreas do retalho pareadas com as áreas-controle, o resultado é um padrão semelhante. No entanto, os valores das áreas do retalho são maiores (gráficos 3 e 4).

Ao se aplicar o teste de Kruskal-Wallis entre todos os grupos sobre os valores médios de AV, ATF, IC, AV/ATF, AV/ATO, ATF/ATO e DMV, apenas este último não apresentou significância estatística ($p=0,2589$). Os testes por postos entre pares dos mesmos parâmetros não mostraram significância estatística em nenhum valor entre os grupos A e B, B e C, e C e D. Entre os grupos A e C houve significância no AV/ATF ($p=0,013204$) e AV/ATO ($p=0,011284$). Entre os grupos A e D houve significância em todos os itens e entre os grupos B e D apenas a DMV não mostrou significância (anexo G). Aplicando-se o teste de ANOVA da DMV entre as áreas do retalho pareadas às áreas-controle, foi obtida significância estatística ($p=0,009$) que se mantém quando os valores são analisados conjuntamente, sem divisão de grupos, pelo teste de Wilcoxon ($p=0,034633$) (fig. 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25) (anexos D, E, F, G, H) .

TABELA 1 - ÁREAS, RAZÕES ENTRE ÁREAS E DENSIDADE MICROVASCULAR POR RETALHO DOS GRUPOS A E B

Retalho	AV ¹ (cm ²)	ATF ² (cm ²)	ATO ³ (cm ²)	Δ ⁴	IC ⁵	AV/ATF (%)	AV/ATO (%)	ATF/ATO (%)	v/mm ²
A1	0	39,62	150	110,38	0,74	0	0	0,26	-
A2	0	62,64	150	87,36	0,58	0	0	0,42	-
A3	0	40,26	150	109,74	0,73	0	0	0,27	-
A4	0	65,61	150	84,39	0,56	0	0	0,44	-
A5	0	51,39	150	98,61	0,66	0	0	0,34	-
A6	0	56,22	150	93,78	0,63	0	0	0,37	-
A7	0	46,09	150	103,91	0,69	0	0	0,31	-
A8	0	49,37	150	100,63	0,67	0	0	0,33	-
B1	0	39,74	150	110,26	0,74	0	0	0,26	-
B2	0	56,06	150	93,94	0,63	0	0	0,37	-
B3	0	59,36	150	90,64	0,6	0	0	0,4	-
B4	5,4	82,4	150	67,6	0,45	0,07	0,04	0,55	24,08
B5	5,1	30,2	150	119,8	0,8	0,7	0,03	0,2	7,31
B6	0	40,85	150	109,15	0,72	0	0	0,27	-
B7	0	43,91	150	106,09	0,7	0	0	0,29	-
B8	17,39	47,25	150	102,75	0,68	0,7	0,12	0,3	12,65
B9	0,53	62,33	150	87,67	0,58	0,01	0	0,41	-
B10	0,64	53,15	150	96,85	0,65	0,01	0	0,35	26,83
B11	0	57,43	150	92,57	0,61	0	0	0,38	-
B12	5,6	56,74	150	93,26	0,62	0,1	0,04	0,38	51,83

¹Área viável²Área total final³Área total original⁴ATO-ATF⁵Índice de contração Δ /ATO

TABELA 2 - ÁREAS, RAZÕES ENTRE ÁREAS E DENSIDADE MICROVASCULAR POR RETALHO DOS GRUPOS C E D

Retalho	AV¹ (cm²)	ATF² (cm²)	ATO³ (cm²)	Δ⁴	IC⁵	AV/ATF (%)	AV/ATO (%)	ATF/ATO (%)	v/mm²
C1	0	46,66	150	103,34	0,69	0	0	0,31	-
C2	16,97	64,95	150	85,05	0,57	0,26	0,11	0,43	32,32
C3	9,55	61,75	150	88,25	0,59	0,15	0,06	0,41	45,12
C4	21,23	72,92	150	77,08	0,51	0,3	0,14	0,49	32,93
C5	16,09	75,49	150	74,51	0,5	0,21	0,11	0,5	60,37
C6	92,75	117,39	150	32,61	0,2	0,79	0,62	0,78	23,78
C7	40,48	64,05	150	85,95	0,57	0,63	0,27	0,43	25
C8	24,74	82,81	150	67,19	0,45	0,3	0,16	0,55	31,7
C10	0	45,99	150	104,01	0,69	0	0	0,3	-
C11	11,33	64,73	150	85,27	0,59	0,18	0,08	0,43	30,49
C12	8,21	54,38	150	95,62	0,64	0,15	0,05	0,36	17,07
D1	99,37	101,78	150	48,22	0,32	0,98	0,66	0,68	19,51
D2	93,37	107,85	150	42,15	0,29	0,87	0,62	0,72	57,93
D3	25,47	84,41	150	65,59	0,44	0,3	0,17	0,56	-
D4	8,25	75,43	150	74,57	0,5	0,11	0,06	0,5	-
D5	9,29	51,58	150	98,42	0,66	0,18	0,06	0,34	22,56
D6	91,63	117,02	150	32,98	0,22	0,78	0,61	0,78	36,58
D7	33,1	77,78	150	72,22	0,48	0,43	0,22	0,52	-
D8	68,55	98,85	150	51,15	0,34	0,69	0,46	0,66	25,97
D9	63,38	99,29	150	50,71	0,34	0,64	0,42	0,66	20,32
D10	9,66	66,15	150	83,85	0,56	0,15	0,06	0,44	21,34
D11	14,66	81,95	150	68,05	0,45	0,18	0,1	0,55	18,9
D12	26,72	84,09	150	65,91	0,44	0,32	0,18	0,56	20,12

¹Área viável²Área total final³Área total original⁴ATO-ATF⁵Índice de contração Δ /ATO

GRÁFICO 1- GRÁFICO DE DISPERSÃO DAS ÁREAS VIÁVEIS EM FUNÇÃO DO TEMPO DE ESPERA (REGRESSÃO LINEAR E DE QUADRADOS MÍNIMOS)

Linha vermelha: regressão linear

Linha verde: regressão de quadrados mínimos

GRÁFICO 2 – MÉDIAS DE ÁREA VIÁVEL NOS GRUPOS

TABELA 3 - DENSIDADE MICROVASCULAR POR REGIÃO DO RETALHO

Área	Vasos por mm ²	Área	Vasos por mm ²	Área	Vasos por mm ²
B4Ia	35,36	C2Ib	32,32	D1IIc	9,15
B4Id	12,8	C3Ic	45,12	D1IIIh	20,12
B5Ie	7,31	C4Ic	32,93	D1IVf	29,27
B8IIa	14,02	C5Id	60,37	D2Ic	67,69
B8IIId	10,97	C6If	18,9	D2IIh	45,12
B8IIIa	17,07	C6IIb	37,8	D2IVd	60,98
B8IVb	8,53	C6IIIc	14,63	D5Ia	22,56
B10Ia	26,83	C7Ie	7,93	D6Ia	23,17
B12Ia	51,83	C7IIe	43,29	D6Ic	31,1
-	-	C7IIIe	23,78	D6IIe	40,85
-	-	C8Ic	11,58	D6IVc	51,22
-	-	C8IIc	51,82	D8Ic	38,41
-	-	C11Ie	30,49	D8IIc	17,68
-	-	C12Ie	17,07	D8IIe	21,95
-	-	-	-	D8IIIc	29,88
-	-	-	-	D8IVc	21,95
-	-	-	-	D9Ie	21,95
-	-	-	-	D9IIc	17,68
-	-	-	-	D9IVc	21,34
-	-	-	-	D10Ie	21,34
-	-	-	-	D11Ic	18,9
-	-	-	-	D12Ie	14,63
-	-	-	-	D12IIc	25,61

GRÁFICO 3 – MÉDIAS DE DENSIDADE MICROVASCULAR

TABELA 4 - NÚMERO DE VASOS POR MM² POR ÁREA DO RETALHO E ÁREA-CONTROLE CONTRALATERAL

Área	NV ¹	Controle	NV	Área	NV	Controle	NV	Área	NV	Controle	NV
B4Ia	35,36	B4Iac	5,49	C3Ic	45,12	C3Icc	29,27	D1IIIh	20,12	D1IIIcc	21,34
B5Ie	7,31	B5Iec	11,58	C4Ic	32,93	C4IIac	21,34	D2Ic	67,69	D2Icc	8,54
B8IIa	14,02	B8IIcc	19,51	C5Id	60,37	C5Idc	18,9	D5Ia	22,56	D5Iac	26,22
B10Ia	26,83	B10Iac	31,71	C6IIIc	14,63	C6IIIcc	17,07	D6Ic	31,1	D6Icc	16,46
B12Ia	51,83	B12Iac	4,88	C7IIe	43,29	C7IIac	9,15	D8IIe	21,95	D8IIec	14,02
-	-	-	-	C8Ic	11,58	C8Iac	9,76	D9Ie	21,95	D9Iec	6,1
-	-	-	-	C12Ie	17,07	C12Iec	15,85	D10Ie	21,34	D10Iec	34,15

¹Número de vasos

ANOVA (fatores): Entre grupos (B, C, D) F=0,23 p= 0,796
 Estudo x Controle F= 7,64 p= 0,0

Total agrupado (n= 19)

NV área x Controle (Wilcoxon): Z= 2,11 p= 0,034633

GRÁFICO 4 - MÉDIAS DE DENSIDADE MICROVASCULAR DAS ÁREAS DO RETALHO E CONTROLE

FIGURA 14 - ASPECTO FINAL. COELHO A4.

FIGURA 15 - DESENHO ESQUEMÁTICO DE ÁREAS.
AZUL: ÁREA NECROSADA. VERDE: ÁREA ORIGINAL DO RETALHO

FIGURA 16- ASPECTO FINAL. COELHO B10.

FIGURA 17- DESENHO ESQUEMÁTICO DE ÁREAS.
VERMELHO: ÁREA VIÁVEL (0,64 cm²) AZUL: ÁREA NECROSADA
VERDE: ÁREA ORIGINAL DO RETALHO

FIGURA 18- ASPECTO FINAL. COELHO C4.

FIGURA 19- DESENHO ESQUEMÁTICO DE ÁREAS.
VERMELHO: ÁREA VIÁVEL (21,23 cm²) AZUL: ÁREA NECROSADA
VERDE: ÁREA ORIGINAL DO RETALHO.

FIGURA 20- ASPECTO FINAL. COELHO D2.

FIGURA 21- DESENHO ESQUEMÁTICO DE ÁREAS.
VERMELHO: ÁREA VIÁVEL (93,37 cm²) AZUL: ÁREA NECROSADA.
VERDE: ÁREA ORIGINAL DO RETALHO

FIGURA 22- CORTE IMUNOCORADO COM ANTI-CD31. GRUPO B (AUMENTO DE 150X).

FIGURA 23- CORTE IMUNOCORADO COM ANTI-CD31. GRUPO C (AUMENTO DE 150X).

FIGURA 24- CORTE IMUNOCORADO COM ANTI-CD31. GRUPO D (AUMENTO DE 150X).

FIGURA 25- CORTE IMUNOCORADO COM ANTI-CD31. GRUPO D, ÁREA-CONTROLE (AUMENTO DE 150X).

5.2. HISTOLOGIA PELO H/E

Das amostras recebidas, todas apresentaram maior ou menor grau de inflamação e reparação. O tecido necrótico não foi considerado para avaliação. De maneira geral, evidenciou-se que os planos superficiais da pele estavam preservados com discretos sinais reacionais da epiderme e dos anexos cutâneos. Em relação à tela subcutânea e ao plano fáscio-muscular, pode-se dividi-los em dois grupos.

No primeiro, com maior atividade inflamatória, foram observados vasos dilatados em quantidade aumentada que apresentavam depósitos de fibrina intraluminal mergulhados em estroma conjuntivo frouxo pouco colagenizado com moderado a acentuado grau de edema e permeação por elementos celulares, polimorfonucleares, histiócitos, linfócitos e plasmócitos. Foram notadas, também, células estromais abundantes com morfologia alongada ou globosa e núcleos densos, por vezes estrelados, com cromatina grumosa e carioteca irregular.

Nos retalhos mais antigos, a atividade reparadora estava evidente predominantemente nos planos mais profundos. Foi evidenciada a substituição gradual dos tecidos funcionais por deposição de fibras colágenas espessadas e rarefação do número de vasos capilares. Estes, freqüentemente mostravam luzes colapsadas ou de diâmetro diminuído, trajetos tortuosos e irregulares. O tecido conjuntivo, além das fibras colágenas espessadas, mostrava pouco ou nenhum grau de edema e celularidade rarefeita, caracterizada por células alongadas eventuais ou raras com núcleo alongado cuja cromatina estava bem distribuída e a carioteca, regular. Quando observadas, o número de células inflamatórias nestas áreas estava bastante diminuído, havendo somente raros elementos isolados, não se identificando um tipo celular predominante (Figuras 26, 27, 28, 29). Os vasos dos pedículos omentais mostraram-se permeáveis sem sinais de trombose (Figuras 30, 31, 32).

FIGURA 26 - MICROSCOPIA DA ÁREA CONTROLE (H/E, AUMENTO DE 150X).

FIGURA 27 - MICROSCOPIA DO RETALHO DO GRUPO B (H/E, AUMENTO DE 150X).

FIGURA 28 - MICROSCOPIA DE RETALHO DO GRUPO C (H/E, AUMENTO DE 150X).

FIGURA 29 - MICROSCOPIA DO RETALHO DO GRUPO D (H/E, AUMENTO DE 150X).

FIGURA 30 - ARTÉRIAS DOS PEDÍCULOS (A). 1- GRUPO B, 2- GRUPO C, 3- GRUPO D (H/E, AUMENTO DE 150X).

6. DISCUSSÃO

6.1. O MODELO EXPERIMENTAL

O modelo experimental escolhido mostrou-se adequado; o coelho possui tamanho suficiente para facilmente permitir a dissecação do fragmento do omento e identificação dos vasos gastromentais. O comportamento do animal foi ideal para acomodá-lo em gaiola apropriada enquanto transcorriam as etapas do experimento. O animal também demonstrou excelente recuperação das cirurgias e apenas um morreu no sexto dia de pós-operatório de complicações pulmonares.

O método de cálculo de área utilizando programa de computador, que também foi utilizado por Sá et al.¹⁸ (2001), pareceu mais exato do que os métodos visuais. Zhang et al.^{41, 42} (1992,1994) transferiram o desenho da área viável para um papel com a área original do retalho dividida em duzentas subunidades iguais e multiplicaram o valor da área conhecida da subunidade pela quantidade contida no traçado da área viável. Vários trabalhos usaram o método de Misholy et al.⁷⁹ (1982) de tatuar previamente a área do retalho, demarcando quadriláteros de áreas iguais. Duffy et al.⁶³ (1993) usaram um molde de Smark cortado no formato da área a ser calculada e posteriormente pesada e comparada ao peso do molde da área total do retalho.

Durante a espera de 15 dias para delimitação da área necrótica, acontecia a contração e deformação das bordas da ferida. As diferenças de valores das médias do IC apresentaram significância estatística e variaram de 0,66 no grupo A até 0,42 no grupo D. A área necrótica apresentou

contração mais expressiva do que a área viável, por isso os prazos pré-estabelecidos foram seguidos rigorosamente para manter condições idênticas em todos os coelhos. A área viável foi escolhida como parâmetro mais importante de comparação entre os grupos e sempre relacionada à área total original que era constante e eliminava o viés da contração desigual. Vale salientar que permanece um viés de que a área viável real é superior à encontrada nos resultados, contudo, de todo modo, sua deformidade é menor do que a área necrótica.

A presença de lâmina de silicone tem como objetivo separar o pedículo da aponeurose, direcionar o estímulo angiogênico apenas para as camadas do retalho e facilitar o segundo procedimento. A pseudocápsula que se forma e envolve a lâmina de silicone é rica em neovasos. A comparação com outros estudos que usaram omento não está prejudicada porque a maioria dos modelos utilizaram a lâmina, como também os casos clínicos descritos. É interessante notar que não se pode afirmar com certeza que os resultados obtidos por Mutaftaş et al.⁶⁵ (1994) seriam reprodutíveis nos humanos. Eles compararam um grupo de ratos com retalhos pré-fabricados com lâmina de silicone com outro grupo sem lâmina, realizaram a elevação do retalho num máximo de 14 dias e concluíram não haver diferença devido ao grupo sem lâmina permitir fácil dissecação. O resultado deste trabalho é falho porque 14 dias é por demais cedo para avaliação e os animais com MCA possuem um frouxo tecido conectivo que permite um grande deslizamento com a fáscia aponeurótica. Esta anatomia não existe nos

humanos e, portanto, uma aderência do retalho com os tecidos subjacentes deve acontecer.

Para avaliar o potencial de pré-fabricação, foi escolhida uma dimensão de área a ser incisada e elevada que fosse bem maior do que a área do pedículo. A proporção retalho / pedículo foi de 16,67. Deste modo, seriam evitadas AV que atingissem as bordas do retalho ou até mesmo AV de 100 %. Este viés está presente em todos os retalhos que utilizaram o omento como pedículo. A escolha foi de um retalho com dimensões 10 x 15 cm porque eram as dimensões aproximadas do hemi-abdome anterior do coelho. Retalhos maiores tornariam muito desconfortável o pós-operatório com maiores possibilidades de deiscências e infecções.

6.2. ANÁLISE DOS RESULTADOS

Nos experimentos com ratos, foram encontrados amiúde retalhos de 3 x 4, 2 x 3 ou 4 x 5 cm (Morrison et al.⁸, Hickey et al.¹⁵). Kwan et al.¹⁰(1991) utilizaram fásia de 2,5 x 4 cm como pedículo para uma área de 8 x 2,5 cm. Ao serem analisados os experimentos que utilizaram coelhos, foram encontradas as dimensões 2,5 x 6 cm (Zhang et al.^{41, 42}), 1 x 6 cm (Duffy et al.⁶³), 2 x 8 cm (Inasawa¹⁶), 6 x 4 cm (Ono et al.⁶⁴), 5 x 14 cm (Matz et al.⁶⁶), 4 x 3 cm (Hickey et al.¹⁵), 8 x 8 cm (Safak et al.⁶⁸). Nos modelos experimentais que usaram omento como pedículo, foram encontradas relações de retalho/pedículo de um em Erol e Spira⁵ (1982) e aproximadamente quatro no trabalho publicado por Figueiredo et al.⁴³

(2006). Neste último, os autores utilizaram o omento em arco sem ligadura terminal que abrangia praticamente todo o quadrante súpero-medial de um retalho com dimensões de 10X10 cm e obtiveram 100% de AV. Zhang et al.⁴² (1994) pretenderam avaliar o PPF do omento, com uma relação retalho/pedículo de quatro ($40 \text{ cm}^2/10 \text{ cm}^2$), e obtiveram média de AV, após sete dias de espera, de $22,82 \text{ cm}^2$, logo o PPF foi 2,28. Zhang et al., ao usarem apenas sete dias de espera, estiveram em desacordo com os trabalhos que colocaram em 56 dias o tempo ideal. O grupo B desta tese, que teve sete dias de espera, apresentou média de $2,89 \text{ cm}^2$. O PPF foi de 0,32. A freqüência de 50% dos coelhos com necrose total do retalho no grupo B reforça o argumento de ser inadequado sete dias de espera para determinar o PPF. É mais lógico determiná-lo a partir da AV do grupo com maior tempo de espera que, nesta tese, foi de 56 dias (grupo D). Foram encontrados então PPF médio de 5,03 e máximo de 11,04. O valor do PPF máximo é importante porque provavelmente reflete um valor possível que foi conseguido talvez nas melhores condições favoráveis do animal – ausência de infecção, deiscência e de mobilização inadequada sobre o retalho.

A escolha de três grupos com variação do hiato cirúrgico visou a comparar se haveria diferença significativa nos tempos intermediários em relação ao de 56 dias que a maioria dos trabalhos anteriores determinaram como período máximo de pré-fabricação. O primeiro retalho pré-fabricado foi realizado em cães com hiato de 21 dias entre o primeiro e o segundo procedimentos². Em ratos, foram usados hiatos de 7 (Kwan et al.¹⁰, Bayati et al.¹⁴, Zhang et al.⁴²) e 21 dias (Sá et al.¹⁸, Homma et al.¹⁷); Erol et al.⁴

(1976) compararam grupos de 14, 21 e 30 dias; Zhang et al.⁴¹ (1992) além do grupo controle compararam grupos de 3, 5, 7 e 14 dias; Kostakoglu et al.⁶⁷ (1997) compararam grupos de 14, 28, 42, 56 e 84 dias. Nos estudos com coelhos, Duffy et al.⁶³ (1993) compararam grupos de 14, 28 e 42 dias; Ono et al.⁶⁴ (1993), 7, 14, 28, 42, 56 e 84 dias; Morrison et al.⁸ (1990), 14, 28, 56 e 84 dias. Os três últimos obtiveram 56 dias como tempo ideal de espera, pois grupos com tempos maiores não mostraram aumento de viabilidade e sim uma tendência à regressão de número de vasos como descrito por Itoh¹³ (1992). Nesta tese, o grupo D apresentou maiores mediana e média de AV, além de não apresentar nenhum retalho com necrose total. As médias das AV dos grupos D, C, B e A foram respectivamente 45,29 cm², 21,94 cm², 2,89 cm² e 0,00 cm². Contudo não houve significância estatística entre os grupos C e D.

Nos casos clínicos relatados, é interessante observar um aumento de tempo de espera, talvez justificado pela prudência frente a um novo procedimento. Tal fato ficou evidente nos três relatos de casos publicados por Morrison et al.⁷⁴ (1996). No primeiro caso, reconstruíram a região de joelho com retalho pré-fabricado inguinal pediculado pelos vasos epigástricos inferiores após 90 dias de espera. No segundo, reconstruíram a região frontal com retalho supraclavicular pediculado na toracodorsal com 70 dias de espera. No último, reconstruíram a região frontal com retalho supraclavicular pediculado nos vasos temporais com 28 dias de espera. Mesmo comportamento foi encontrado nos casos descritos por Khoury et

al.⁷³ (1995) (reconstrução de frente e duas reconstruções nasais) cujos tempos de espera respectivamente foram 90, 70 e 63 dias.

Os métodos de avaliação usados nos experimentos com retalhos pré-fabricados foram histológicos, angiográficos e medidas de fluxo. Nos estudos histológicos, predomina o uso de H/E para análise qualitativa e contagem de vasos. Na análise qualitativa, foram observados uma atrofia de anexos da pele e mesmo da derme em retalhos dissecados precocemente e um retorno gradativo ao aspecto do tecido normal. Entre o pedículo implantado e o tecido receptor forma-se um tecido de granulação. A associação de corante intravascular e histologia ajudaram a identificar a presença de trombose dos vasos principais. Morrison et al.⁸ (1990) utilizaram tintura da Índia com gelatina a 10 %, fizeram cortes de 1mm perpendiculares ao pedículo principal e observaram em alguns retalhos trombose da artéria. Mutaf et al.⁶⁵ (1994) observaram que em três dias o pedículo vascular mantém-se afastado por área relativamente avascular e frouxa que é preenchida por tecido de granulação no sétimo e décimo-quarto dias. A presença de lâmina de silicone provoca o aumento de células inflamatórias e a presença de fina neovascularização em áreas distantes do pedículo proveniente da pseudocápsula. Nesta tese, o uso de tecido carreador (omento) resultou em ausência de trombose nos vasos dos pedículos corados pelo H/E.

A quantificação de vasos através do H/E foi descrita por Sá et al.¹⁸ (2001) em campo de 313,0 x 234,4 µm e obteve média de 4,5 e 4,8 vasos por campo em dois grupos. Bayati et al.¹⁴ (1998) compararam quatro

grupos de retalhos pré-fabricados em campo com aumento de 400X e obtiveram 16, 25, 41 e 54 vasos por campo por grupo respectivamente. Kostakoglu et al.⁶⁷ (1997) quantificaram vasos através do H/E sob aumento de 250X com 1 cm² de campo, separando grupos consoante o tempo de espera para o segundo procedimento e, como nesta tese, fizeram grupo controle. Foram feitos dois cortes paralelos um proximal e outro na porção mais distal e viável do retalho sem obter diferenças entre eles. Os valores obtidos para os grupos controle, 14 dias, 28 dias, 42 dias, 56 dias e 84 dias foram aproximadamente 99, 200, 240, 200, 390 e 250 vasos por campo. Nota-se o aumento gradativo de vasos até 56 dias com redução no grupo de 84 dias. Foi comparado o número de vasos por tecido no mesmo retalho (derme, subcutâneo, MCA, peripedicular) e foi observado um aumento progressivo em todos os tecidos, principalmente subcutâneo e peripedículo, atingindo um pico em 56 dias com curva descendente após, exceto no MCA que apresentou aumento de vasos no grupo de 84 dias.

O uso de imuno-histoquímica para contagem de vasos está descrito para avaliar angiogênese nas neoplasias como linfoma, adenocarcinoma, carcinoma epidermóide e mioma; em processo inflamatório de discos intervertebrais herniados e na degeneração macular. Phongkitkarus et al.⁸⁰ (2004) estudaram angiogênese injetando um modelo de matrigel, que é uma complexa mistura de proteínas de membrana basal que pode induzir células endoteliais a formar interconexões e tubos no dorso de ratos. Os parâmetros histológicos analisados com antiCD-31 foram densidade microvascular (número de células positivas para o anti CD-31 por

campo), número de vasos (número de vasos cujas células endoteliais formam um lúmen completo), área vascular (área luminal total dos vasos por campo) e perímetro vascular (comprimento total dos limites de lúmen dos vasos por campo). Anderson et al.⁸¹ (2004) utilizaram o antiCD-31 para identificar a célula endotelial-guia e estudar a influência da matriz extracelular na angiogênese. Weidner et al.⁴⁴ (1991) constataram uma correlação entre o grau de angiogênese e metástase no carcinoma de mama. A quantificação dos vasos foi feita através de reação com fator VIII. As áreas de maior neovascularização foram achadas através de baixo aumento (40X e 100X) e subjetivamente graduadas numa escala de um a quatro cruzes. Microvasos individuais foram contados em aumento de 200X e 400X (0,7386 e 0,1885 mm² por campo). Qualquer célula endotelial ou grupo de células endoteliais corados que estivessem claramente separados de microvasos adjacentes, células tumorais e outros elementos conectivos foi considerado um simples e contável microvaso. Lumens de vasos com ou sem hemácias, embora usualmente presentes, não eram necessários para uma estrutura ser definida como microvaso. Nesta tese, as DMV médias foram semelhantes entre os grupos B, C e D (24,54 v/mm², 33,20 v/mm² e 27,03 v/mm²) e mais altas do que das áreas controles (14,63 v/mm², 17,33 v/mm² e 18,12 v/mm²). Tais números sugerem que após sete dias a DMV permanece constante e os vasos apenas irradiam-se para as regiões mais distantes do pedículo.

O uso de microangiografia busca elucidar o padrão de crescimento dos neovasos e o que acontece com os vasos da área

receptora do pedículo. Itoh¹³ (1992) usou sulfato de bário e destacou que os neovasos provinham tanto dos vasos do pedículo quanto de vasos originais da região. O momento de anastomose destes vasos marca a viabilidade do retalho pré-fabricado. No início, são observados vasos que serpenteiam e, numa fase tardia, em torno de 56 dias, ocorre uma maturação do padrão circulatório, caracterizada por uma menor sinuosidade e densidade de neovasos. Morrison et al.⁷⁴ (1997) implantaram um pedículo de vasos femorais em subcutâneo de abdome em coelho e realizaram técnica de dupla injeção: pelo pedículo (artéria femoral) usaram Azul Monastral e pela aorta tintura da Índia. Os vasos preenchidos pelo corante azul foram facilmente distinguidos com os preenchidos pela tintura da Índia. Cinco dias depois, vasos dérmicos apresentaram corante injetado pelo pedículo indicando conexão deste com os vasos pré-existentes do retalho. Brotos em fundo-cego já puderam ser vistos tanto do pedículo quanto de pequenos vasos dérmicos em outras áreas do retalho a partir do terceiro dia. A viabilidade de início parece depender de conexões vasculares críticas entre vasos neoformados do pedículo e pré-existentes do retalho. Com o passar do tempo, aumenta a probabilidade das conexões e sua estabilidade, fazendo a viabilidade mais previsível. Um mecanismo diferente que pode acontecer com menos frequência é o desenvolvimento de anastomose quase direta com um grande vaso pré-existente, através de um neovaso curto e com pouca sinuosidade, ocasionando uma viabilidade de grande área em curto espaço de tempo. Talvez este mecanismo explique 17,39 cm²

de área viável no décimo segundo coelho do grupo B e 92,75 cm² no grupo C.

6.3. PERSPECTIVA DOS RETALHOS PRÉ-FABRICADOS NA CIRURGIA RECONSTRUTORA

O uso clínico dos RPF com omento está ainda limitado a uma série de casos de reconstrução de mama relatada por Erol e Spira⁷¹ (1990). Contudo o pedículo omental pode ser facilmente obtido e alongado através de videoendoscopia, e transposto para inúmeras áreas-alvos do corpo até como um pedículo-grua, como descrito por Pribaz et al.⁷⁶ (1999), e ser usado várias vezes. A região abdominal que virtualmente é a área de primeira escolha a ser pré-fabricada permitiria a transferência de grandes quantidades de tecido cutâneo com ou sem expansão prévia e com fechamento primário.

A melhor utilidade dos RPF na cirurgia reconstrutora ainda não está bem estabelecida. Os RPF podem ser úteis na reconstrução de defeitos em áreas carentes de vasos receptores principalmente em reoperações ou quando os vasos receptores situarem-se distantes, evitando-se o uso de enxertos venosos. Os retalhos livres que representaram um grande progresso nas cirurgias reconstrutoras dependem de uso de aparelhagem específica e longo treinamento. Os RPF talvez simplificassem a reconstrução de lesões pequenas de áreas críticas como terço inferior da perna, pé e calcâneo. A pré-fabricação de outras estruturas como osso,

cartilagem e até materiais aloplásticos, permitirão a engenharia de retalhos com formas complexas e difíceis de serem atingidas nas técnicas atuais como nas reconstruções nasal e de orelha.

A chave para incrementar o potencial dos RPF é compreender por que a inclusão de um pedículo induz germinações vasculares e a formação de neovasos. A compreensão cada vez maior da ação dos fatores de crescimento como VEGF e seus receptores de membrana, e o uso de condições que aumentem suas ações por meios indiretos, como isquemia, ou diretamente, adicionando-os juntos ao pedículo, reduzirão o tempo entre as duas cirurgias consideravelmente. Além dos fatores de crescimento, os componentes estruturais da matriz extracelular parecem também atuar na angiogênese. Anderson et al.⁸¹ (2004) demonstraram em ratos que as células endoteliais produzem filópodos que se alinham às fibras elásticas. As próprias células endoteliais-guias produzem vários componentes da matriz extracelular como laminina, colágeno tipo IV, proteoglicanos e fibronectina que formam uma membrana basal provisória. A compreensão destes mecanismos bioquímicos e moleculares aliada ao uso de células-tronco permitirão uma verdadeira engenharia tissular e serão promissores no futuro da cirurgia reconstrutora.

7. CONCLUSÕES

O potencial de pré-fabricação do pedículo omental foi de 5,03 vezes a sua área.

O potencial máximo de pré-fabricação do pedículo omental foi de 11,04 vezes a sua área.

O tempo de espera ideal para realizar o segundo procedimento no processo de pré-fabricar um retalho com o omento foi de pelo menos 21 dias.

A densidade microvascular dos retalhos pré-fabricados com pedículo omental aumentou nos primeiros sete dias e permaneceu constante até 56 dias.

8. ANEXOS

Anexo A

TABELA 5 - PESO EM GRAMAS DOS COELHOS OPERADOS

Coelho	1ª cirurgia	2ª cirurgia	Eutanásia	Coelho	1ª cirurgia	2ª cirurgia	Eutanásia
A1	3200	-	3200	C3	3200	2800	2700
A2	2700	-	2500	C4	2900	2900	2600
A3	3100	-	2900	C5	2600	2500	2200
A4	2500	-	3200	C6	2900	2900	2700
A5	2500	-	2500	C7	2900	3200	2800
A6	3000	-	2800	C8	2800	3400	3200
A7	2900	-	2800	C9	2800	-	-
A8	3500	-	3200	C10	2800	2900	2900
B1	3000	2400	2500	C11	2500	2700	2800
B2	3500	3000	2800	C12	3600	3800	3700
B3	3400	2400	2400	D1	3000	3300	3100
B4	3000	3000	2900	D2	2900	3100	3000
B5	3000	3000	2700	D3	2500	3200	3000
B6	2500	2100	1800	D4	3000	3100	3600
B7	2700	2700	2600	D5	4000	4200	3700
B8	2500	2500	2500	D6	3500	3700	3200
B9	2600	2500	2500	D7	3300	4000	3700
B10	3100	2700	2700	D8	4000	4200	4100
B11	3500	3100	3100	D9	4000	4000	3600
B12	3200	3000	2900	D10	3000	3000	2400
C1	3000	2900	2800	D11	2500	3600	3300
C2	2700	2600	2500	D12	3200	4200	4000

Médias

1ª cirurgia - 3022,73g

2ª cirurgia - 3102,86g

Eutanásia - 2932,56g

Anexo B

TABELA 6 - COMPLICAÇÕES PÓS-OPERATÓRIAS NOS COELHOS

Coelho	Deiscência	Abscesso	Soroma	Óbito	Coelho	Deiscência	Abscesso	Soroma	Óbito
A1	-	-	+	-	C3	+	-	+	-
A2	-	-	+	-	C4	-	-	+	-
A3	-	-	+	-	C5	+	-	+	-
A4	-	-	+	-	C6	-	-	+	-
A5	+	-	+	-	C7	-	-	+	-
A6	-	-	+	-	C8	-	-	+	-
A7	-	-	+	-	C9	-	-	+	+
A8	-	-	+	-	C10	-	-	+	-
B1	+	-	+	-	C11	-	-	+	-
B2	-	-	+	-	C12	+	-	+	-
B3	+	-	+	-	D1	-	+	+	-
B4	-	-	+	-	D2	-	-	+	-
B5	-	-	+	-	D3	-	-	+	-
B6	-	-	+	-	D4	+	-	+	-
B7	+	-	+	-	D5	-	-	+	-
B8	-	-	+	-	D6	+	-	+	-
B9	-	-	+	-	D7	+	-	+	-
B10	-	-	+	-	D8	-	-	+	-
B11	-	-	+	-	D9	+	-	+	-
B12	-	-	+	-	D10	-	-	+	-
C1	+	+	+	-	D11	+	-	+	-
C2	+	-	+	-	D12	-	-	+	-

Anexo C

GRÁFICO 5 - ÁREA TOTAL FINAL

GRÁFICO 6 - GRAU DE VIABILIDADE RELATIVA

GRÁFICO 7- GRAU DE VIABILIDADE ABSOLUTA

GRÁFICO 8- ÍNDICE DE CONTRAÇÃO

Anexo D

TABELA 7 - ESTATÍSTICA DESCRITIVA: GRUPO A.

Variáveis	n válido	média	mediana	máximo	mínimo	desvio padrão
AV ¹ (cm ²)	8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
ATF ² (cm ²)	8	51,40	50,38	65,61	39,62	9,61
ATO ³ (cm ²)	8	150,00	150,00	150,00	150,00	0,00
Δ ⁴	8	98,60	99,62	110,38	84,39	9,61
IC ⁵	8	0,66	0,66	0,74	0,56	0,06
AV/ATF	8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
AV/ATO	8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
ATF/ATO	8	34,27	33,59	43,74	26,41	6,41
vasos/mm ²	0	-	-	-	-	-

¹Área viável

²Área total final

³Área total original

⁴ATO-ATF

⁵Índice de contração = Δ /ATO

Anexo E

TABELA 8 - ESTATÍSTICA DESCRITIVA: GRUPO B

Variáveis	n válido	média	mediana	máximo	mínimo	desvio padrão
AV ¹ (cm ²)	12	2,89	0,27	17,39	0,00	5,13
ATF ² (cm ²)	12	52,45	54,61	82,40	30,20	13,45
ATO ³ (cm ²)	12	150,00	150,00	150,00	150,00	0,00
Δ ⁴	12	97,55	95,40	119,80	67,60	13,45
IC ⁵	12	0,65	0,64	0,80	0,45	0,09
AV/ATF	12	6,01	0,43	36,80	0,00	11,07
AV/ATO	12	1,93	0,18	11,59	0,00	3,42
ATF/ATO	12	34,97	36,40	54,93	20,13	8,97
vasos/mm ²	5	24,54	24,08	51,83	7,31	17,24

¹Área viável

²Área total final

³Área total original

⁴ATO-ATF

⁵Índice de contração = Δ /ATO

Anexo F

TABELA 9 - ESTATÍSTICA DESCRITIVA: GRUPO C.

Variáveis	n válido	média	mediana	máximo	mínimo	desvio padrão
AV ¹ (cm ²)	11	21,94	16,09	92,75	0,00	26,16
ATF ² (cm ²)	11	68,28	64,73	117,39	45,99	19,84
ATO ³ (cm ²)	11	150,00	150,00	150,00	150,00	0,00
Δ ⁴	11	81,72	85,27	104,01	32,61	19,84
IC ⁵	11	0,54	0,57	0,69	0,22	0,13
AV/ATF	11	26,97	21,31	79,01	0,00	24,26
AV/ATO	11	14,63	10,73	61,83	0,00	17,44
ATF/ATO	11	45,52	43,15	78,26	30,66	13,23
vasos/mm ²	9	33,20	31,70	60,37	17,07	12,78

¹Área viável

²Área total final

³Área total original

⁴ATO-ATF

⁵Índice de contração = Δ /ATO

Anexo G

TABELA 10 - ESTATÍSTICA DESCRITIVA: GRUPO D

Variáveis	n válido	média	mediana	máximo	mínimo	desvio
						padrão
AV ¹ (cm ²)	12	45,29	29,91	99,37	8,25	35,69
ATF ² (cm ²)	12	87,18	84,25	117,02	51,58	18,57
ATO ³ (cm ²)	12	150,00	150,00	150,00	150,00	0,00
Δ ⁴	12	62,82	65,75	98,42	32,98	18,57
IC ⁵	12	0,42	0,44	0,66	0,22	0,12
AV/ATF	12	46,80	37,17	97,63	10,94	30,84
AV/ATO	12	30,19	19,94	66,25	5,50	23,80
ATF/ATO	12	58,12	56,17	78,01	34,39	12,38
vasos/mm ²	9	27,03	21,34	57,93	18,90	12,82

¹Área viável

²Área total final

³Área total original

⁴ATO-ATF

⁵Índice de contração = Δ /ATO

Anexo H

Teste de Kruskal-Wallis

VARIÁVEL	"ANOVA" ENTRE TODOS OS TEMPOS							
	KRUSKAL-WALLIS		TESTE "POST-HOC", DE COMPARAÇÃO MÚLTIPLA, ENTRE PARES DE TEMPOS (p =)					
	H =	p =	0 x 7	0 x 21	0 x 56	7 x 21	7 x 56	21 x 56
AV	27.10	0,00001 *	1,000000 ns	0,011284 *	0,000052 *	0,140053 ns	0,001039 *	0,960306 ns
ATF	20.40	0,00010 *	1,000000 ns	0,343882 ns	0,001407 *	0,325201 ns	0,000536 *	0,339556 ns
ÍNDICE	20.40	0,00010 *	1,000000 ns	0,343882 ns	0,001407 *	0,325201 ns	0,000536 *	0,339556 ns
AV / ATF	25.39	0,00001 *	1,000000 ns	0,013204 *	0,000072 *	0,220484 ns	0,002366 *	1,000000 ns
AV / ATO	27.10	0,00001 *	1,000000 ns	0,011284 *	0,000052 *	0,140053 ns	0,001039 *	0,960306 ns
ATF / ATO	20.40	0,00010 *	1,000000 ns	0,343882 ns	0,001407 *	0,325201 ns	0,000536 *	0,339556 ns
N VASOS	2.70	0,2589 ns				0,535684 ns	1,000000 ns	0,462603 ns

9. REFERÊNCIAS

-
1. Taylor GI, Palmer JH. The vascular territories (angiosomes) of the body: experimental study and clinical applications. *Br J Plast Surg.* 1979;32:170-9.
 2. Diller JG, Hartwell SW, Anderson R. The mesenteric vascular pedicle. *Clev Clin Quart.* 1966;33:163-9.
 3. Orticochea M. A new method for total reconstruction of the nose: the ears as donor áreas. *Br j Plast Surg.* 1971;225-33.
 4. Erol O O. The transformation of a free skin graft into a vascularized pedicled flap. *Plast reconstr surg.* 1976;58(4):470-7.
 5. Erol OO, Spira M. Development and utilization of a composite island flap employing omentum: experimental investigation. *Plast Reconstruct Surg.* 1980;65(4):405-18.
 6. Shen TY. Vascular implantation into skin flap: experimental study and clinical application: a preliminary report. *Plast Reconstr Surg.* 1981;68(3):404-9.
 7. Hirase Y, Valauri FA, Buncke HJ, Newlin LY. Customized prefabricated neovascularized free flaps. *Microsurgery.* 1987;8:218-24.
 8. Morrison WA, Dvir E, Dóí K, Hurley JV, Hickey MG, O'Brien BM. Prefabrication of thin transferable axial-pattern skin flaps: an experimental study in rabbits. *Brit J Plast Surg.* 1990;43:645-54.

-
9. Shintomi Y, Ohura T. The use of muscle vascularized pedicle flaps. *Plast Reconstr Surg*. 1982;70(6):725-34.
 10. Kwan CT, Khoury RK, Keuk SS, Shaw WW. The fasciovascular pedicle for revascularization of other tissues. *Ann Plast Surg*. 1991;26:149-55.
 11. Kwan CT, Tuchler RE, Shaw WW. Flap prefabrication: effectiveness of different vascular carriers. *Ann Plast Surg*. 1996;37(3):298-304.
 12. Yap-Legaspi EC, Nozaki M, Takeuchi M. The contribution of perivascular tissue to the neovascularization of full thickness skin grafts (prefabricated flaps): an experimental study. *Br J Plast Surg*. 1995;48:89-92.
 13. Itoh Y. An experimental study of prefabricated flaps using silicone sheets, with reference to the vascular patternization process. *Ann Plast Surg*. 1992;28(2):140-6.
 14. Bayati S, Russell RC, Roth AC. Stimulation of angiogenesis to improve the viability of prefabricated flaps. *Plast Reconstr Surg*. 1998;101(5):1290-5.
 15. Hickey MJ, Yvonne W, Hurley JV, Morrison WA. Mode of vascularization of control and basic fibroblast growth factor-stimulated prefabricated skin flaps. *Plast Reconstr Surg*. 1998;101(5):1296-304.

-
16. Inasawa M. Accelerated maturation in prefabricated flaps by transforming growth factor- β : an experimental study in the rabbit. *Ann Plast Surg.* 1993;31:72-5.
 17. Homma K, Ohura T, Sugihara T, Yoshida T, Hasegawa T. Prefabricated flaps using tissue expanders: an experimental study in rats. *Plast Reconstr Surg.* 1993; 91(6):1098-107.
 18. Sá JZ, Morais J, Coelho ARB, Lopes SML, Melo CB. Área viável e vascularização, pós autonomização cirúrgica, de retalho pré-fabricado por implante vascular em ratos. *Acta Cir Brás.* 2001;17(1):39-42.
 19. Arias VEA. *Correlação entre densidade vascular (angiogênese tumoral) e a classificação histopatológica dos linfomas não-Hodgkin em cortes histológicos de linfonodos* [dissertação]. Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 1995.
 20. Ono M, Shiina Y. Cytological evaluation of angiogenesis in endometrial aspirates. *Cytopathology.* 2001;12:37-43.
 21. De Vries C, Escobedo JÁ, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science.* 1992; 255 (5047):989-91.
 22. Shibuya M. Role of VEGF-flt receptor system in normal and tumor angiogenesis. *Adv Canc Res.* 1995;67:281-315.

-
23. Iruela-Arispe ML, Dvorak HF. Angiogenesis: a dynamic balance of stimulators and inhibitors. *Thromb Haemost.* 1997;78(1):672-7.
 24. Ferrara N, G HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* 2003;9(6):669-76.
 25. Das SK. The size of the human omentum and methods of lengthening it for transplantation. *Br J Plast Surg.* 1976;29:170-4.
 26. Beelejn RHJ. The greater omentum: physiology and immunological concepts. *Neth J Surg.* 1991;43(5):145-9.
 27. Zhang QX, Magovern CJ, Mack CA, Budenbender KT, Ko W, Rosengart TK. Vascular endothelial growth factor is the major angiogenic factor in omentum: mechanism of the omentum-mediated angiogenesis. *J Surg Res.* 1997;67:147-54.
 28. Vineberg A, Syed AK, Pirozynski WJ. Rapid development in dogs of intramyocardial vascular pathways after implantation of bloodless omental strips in the right and left ventricular myocardium. *Can J Surg.* 1968;11:219-28.
 29. Goldsmith HS, Chen WF, Duckett SW. Brain vascularization by intact omentum. *Arch Surg.* 1973;106:695-9.
 30. Goldsmith HS, Duckett S, Chen WF. Prevention of cerebral infarction in the dog by intact omentum. *Am J Surg.* 1975;130:317-20.

-
31. Liebermann DMI, Kaufmann M. Utilization of the greater omentum in surgery: a historical review. *Neth J Surg.* 1991;43(5):136-45.
 32. Van Geel AN, Wiggers TH. The pedicled omentoplasty: technical aspects in reconstructive and protective surgery. *Neth J Surg.* 1991;43(5):150-4.
 33. Liebermann-Meffert DMI, Siewert JR. The role of the greter omentum in intrathoracic transposition. *Neth J Surg.* 1991;43(5):154-9.
 34. Williams RJLL, White H. Transposition of the greater omentum in the prevention and treatment of radiation injury. *Neth J Surg.* 1991;43(5):161-9.
 35. Goldsmith HS. Omental transposition for the treatment of chronic lymphedema. *Rev Surg.* 1966;23:303.
 36. Roberts B. Relief of chronic lymphedema by omental by omental transposition. *Ann Surg.* 1967;166:583-6.
 37. Goldsmith HS, Beattie EJJ. Protection of vascular prosthesis following radical inguinal excision. *Surg Clin North Am.* 1969;49:413-9.
 38. Harii K, Ohmori S. Use of the gastroepiploic vessels as recipient or donor vessels in the free transfer of composite flaps by microvascular anastomoses. *Plast Reconstr Surg.* 1973;52(5):541-8.
 39. Dupont C, Menard Y. Transposition of the greater omentum for recnstruction of the chest wall. *Plast Reconstr Surg.* 1972;49(3):263-7.

-
40. Serafin D. *Atlas of microsurgical composite tissue transplantation*. 1ª ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 1996. p.705-16.
41. Zhang L, Chang B, Shaw WW. Prefabrication of free flaps using the omentum in rats. *Microsurgery*. 1992;13:214-9.
42. Zhang L, Bakshanden N, Siebert JW. Prefabricated flap size limitations utilizing na omental carrier. *Microsurgery*. 1994;15:568-70.
43. Figueiredo JCA, Kawasaki MC, Arantes HL, Tardelli HC, Naufal RR. Estudo de retalho pré-fabricado composto de pele abdominal e vasos gastromentais em arco em coelho. *Rev Soc Bras Cir Plast*. 2006; 21(3):145-8.
44. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis – correlation in invasive breast carcinoma. *N Eng J Med*. 1991; 324(1):1-8.
45. Bettencourt MC, Bauer JJ, Sesterhenn IA, Connely RR, Moul JW. CD34 immunohistochemical assessment of angiogenesis as a prognostic marker for prostate cancer recurrence after radical prostatectomy. *J Urol*. 1998;160:459-65.
46. Carbognani P, Tincani G, Crafa P, Sansebastiano G, Pazzini L, Zoni R, Bobbio A, Rusca M. Biological markers in non-small cell lung cancer. *J Cardiovasc Surg*. 2002;43:545-8.

-
47. Koster A, Van Krieken JHJM, MacKenzie MA, Schraders M, Borm GF, Van der Laak JAWM, Leenders W, Hebeda K, Raemaekers JMM. Increased vascularization predicts favorable outcome in follicular lymphoma. *Cli Can Res*. 2005;11:154-61.
48. Guo L, Burke P, Su-Hao L, Gandour-Edwards R, Lau D. Quantitative analysis of angiogenesis using confocal laser scanning microscopy. *Angiogenesis*. 2001;4:187-91.
49. Kyzaz PA, Stefanou D, Agnantis NJ. Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor correlates with positive surgical margins and recurrence in T1 and T2 squamous cell carcinoma (SCC) of the lower lip. *Or Oncol*. 2004;40:941-7.
50. Zi-Ping L, Quan-Fei M, Can-Hui S, Da-Sheng X, Miao F, Xu-Feng Y, Dong-Ying C. Tumor angiogenesis and dynamic CT in colorectal carcinoma: radiologic-pathologic correlation. *W J Gastroent*. 2005;11(9):1287-91.
51. Ascani G, Balercia P, Messi M, Lupi L, Goteri G, Filosa A, Stramazzotti D, Pieramici T, Rubini C. Angiogenesis in oral squamous cell carcinoma. *Act Otorhinol*. 2005;25:13-7.
52. Amar A, Giovanini AF, Rosa MP, Yamassaki HO, Carvalho MB, Rapoport A. Densidade microvascular no carcinoma de língua. *Rev Assoc Med Bras*. 2002;48(3):204-8.

-
53. Koike Y, Uzuki M, Kokubun S, Sawai T. Angiogenesis and inflammatory cell infiltration in lumbar disc herniation. *Spine*. 2003; 28 (17):1928-33.
54. Hera R, Keramidas M, Peoc'h M, Mouillon M, Romanet JP, Feige JJ. Expression of VEGF and angiopoietins in subfoveal membranes from patients with age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol*. 2005; 139(4):589-96.
- 55 .Ray OS, Estrada-Hernandez T, Sazaki H, Li Z, Maulik N. Early effects of hypoxia/reoxygenation on VEGF, Ang-1, Ang-2 and their receptors in the rat myocardium: implications for myocardial angiogenesis. *Mol Cel Biochem*. 200;213:145-53.
56. Kawasaki MC. *Modelo experimental de retalho pré-fabricado com vasos gastroepiplóicos em arco e pele abdominal em coelho: análise anatomopatológica e imunohistoquímica* [dissertação]. Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2006.
- 57 .Gillies HD. The tubed pedicle in plastic surgery. *N York J Med*. 1920; 111:1.
58. Washio H. An intestinal conduit for free transplantation of others tissue. *Plast Reconstr Surg*. 1971;48(1):48-51.
59. Nakayama Y, Soeda S, Kasai Y. Flaps nourished by arterial inflow through the venous system: an experimental investigation. *Plast Reconstr Surg*. 1981;67(3):328-34.

-
60. Voukidis T. An axial-pattern flap base don arterialized venous network: na experimental study in rats. *Br J Plast Surg*. 1982;35:524 -9.
61. Erk Y, Rose FA, Spira M. Vascular augmentation of skin and musculocutaneous flaps. *Ann Plast Surg*. 1983;10(5):341-8.
62. Khoury RK, Upton J, Shaw WW. Prefabrication of composite free flaps through staged microvascular transfer: an experimental and clinical study. *Plast Reconstr Surg*. 1991;87(1):108-15.
63. Duffy FJ, Pribaz JJ, Hergrueter CA, Maitz PKM. Flap prefabrication using an exteriorized vascular pedicle in a rabbit ear model. *Br J Plast Surg*. 1993;46:279 -84.
- 64 .Ono H, Tamai S, Yajima H, Fukui A, Inada Y, Mizumoto S. Blood flow through prefabricated flaps – na experimental study in rabbits. *Br J Plast Surg*. 1993;46:449-55.
65. Mutaf M, Tasaki Y, Fujii T. Is bed isolation necessary during flan prefabrication? An experimental study in rats. *Ann Plast Surg*. 1994;33(4):392-400.
66. Maitz PKM, Pribaz JJ, Hergreater CA. Impact of tissue expansion of flap prefabrication: an experimental study in rabbits. *Microsurgery*. 1996;17:35-40.

-
67. Kostakoglu N, Manek S, Green CJ. The development of neovascularisation in flap prefabrication with vascular implantation: an experimental study. *Br J Plast Surg*. 1997;50:428-34.
68. Safak T, Akyürek M, Özcan G, Kecik A, Aydın M. Osteocutaneous flap prefabrication based on the principle of vascular induction: an experimental and clinical study. *Plast Reconstr Surg*. 2000;105(4):1304-14.
69. Tezel E, Numanoglu A, Bayramiçli M, Sav A. Fat prefabrication using a fascial flap in the rat model. *Br J Plast Surg*. 2000;53:155-60.
70. Rocha MMB, Martins JL, Tubino P, Bischoff A. Viability of a jejunal segment after neovascularization by omentoenteropexy. *Act Cirur Bras*. 2002;17(6):377-80.
71. Erol OO, Spira M. Reconstructing the breast mound employing a secondary island omental flap. *Plast Reconstr Surg*. 1990;86(3):510-8.
72. Sanger JR, Matloub H, Gosain AK, Yousif NJ. Scalp reconstruction with a prefabricated abdominal flap carried by the radial artery. *Plast Reconstr Surg*. 1992;89(2):315-9.
- 73 .Khoury RK, Ozbek MR, Hruza GJ, Young VL. Facial reconstruction with prefabricated induced expanded (PIE) supraclavicular skin flaps. *Plast Reconstr Surg*. 1995;95 (6):108-17.

-
74. Morrison WA, Penigton AJ, Kunta SK, Callan P. Clinical applications and technical limitations of prefabricated flaps. *Plast Reconstr Surg.* 1997;99(2):378-85.
75. Furukawa H, Yamamoto Y, Kimura C, Igawa HH, Sugihara T. Clinical application of expanded free flaps based on primary or secondary vascularization. *Plast Reconstr Surg.* 1998;102(5):1532-6.
76. Pribaz JJ, Fine N, Orgill DP. Flap prefabrication in the head and neck: a 10-year experience. *Plast Reconstr Surg.* 1999;103(3):808-20.
77. Teot L, Cherenfant E, Otman S, Giovannini UM. Prefabricated vascularised supraclavicular flaps for face resurfacing after postburns scarring. *Lancet.* 2000; 355:1695-6.
78. Margulis A, Agam K, Icekson M, Dotan L, Yanko-Arzi R, Neuman R. The expanded supraclavicular flap, prefabricated with toracoacromial vessels, for reconstruction of postburn anterior cervical contractures. *Plast Reconstr Surg.* 2007;119 (7):2072-9.
79. Misholy H, Jacobs G, Reinisch J, Puckett C. A grid method for evaluating flap survival in rats. *Plast Reconstr Surg.* 1982;69:881-2.
80. Phongkitcarun S, Kobayashi S, Kan Z, Ting-Yim L, Charnsangavej. Quantification of angiogenesis by functional computed tomography in a matrigel model in rats. *Acad Radiol.* 2004;11 (5):573-82.

-
- 81.** Anderson CR, Ponce AM, Price RJ. Immunohistochemical identification of an extracellular matrix scaffold that microguides capillary sprouting in vivo. *J Histochem Cytochem.* 2004;52 (8):1063-72.