

**ANDRÉ LUIZ PIRES DE FREITAS**

**FATOR DE CRESCIMENTO DO ENDOTÉLIO  
VASCULAR NA VIABILIDADE DO RETALHO  
MUSCULOFASCIOCUTÂNEO ABDOMINAL  
TRANSVERSO DO MÚSCULO RETO DO  
ABDOME, APÓS ABDOMINOPLASTIA, EM  
RATOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de São  
Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências

**SÃO PAULO**

**2009**

**ANDRÉ LUIZ PIRES DE FREITAS**

**FATOR DE CRESCIMENTO DO ENDOTÉLIO  
VASCULAR NA VIABILIDADE DO RETALHO  
MUSCULOFASCIOCUTÂNEO ABDOMINAL  
TRANSVERSO DO MÚSCULO RETO DO  
ABDOME, APÓS ABDOMINOPLASTIA, EM  
RATOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de São  
Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências

**ORIENTADOR: Prof<sup>ª</sup>. Dra. LYDIA MASA KO FERREIRA**

**CO-ORIENTADORES: Prof. HEITOR CARVALHO GOMES**

**Prof. Dr. SANG WON HAN**

**SÃO PAULO**

**2009**

Freitas, André Luiz Pires de

**Fator de crescimento do endotélio vascular na viabilidade do retalho musculofasciocutâneo abdominal transverso do músculo reto do abdome, após abdominoplastia, em ratos.**/ André Luiz Pires de Freitas. -- São Paulo, 2009.

xiv, 114f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo. Programa de Pós-graduação em Cirurgia Plástica.

Título em inglês: Vascular endothelial growth factor on the transverse rectus abdominis myocutaneous flap viability after abdominoplasty in rats.

1. Fusão Gênica Artificial. 2. Fator de Crescimento do Endotélio Vascular. 3. Retalhos Cirúrgicos. 4. Reto do Abdome. 5. Necrose. 6. Eletroporação. 7. Ratos.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIRURGIA PLÁSTICA**

**COORDENADORA: Profa. Dra. LYDIA MASAKO FERREIRA**

*Aos meus pais, Vasco e Amélia, pessoas iluminadas,  
que possibilitaram e facilitaram minha caminhada.*

*Aos meus irmãos Junior, Flávio, Alessandra  
e Sandra, irmãos maravilhosos em todos os  
momentos.*

*À minha mulher Ana Paula, carinhosa e  
paciente nos momentos difíceis. Forte e  
decisiva nos momentos importantes.*

## **AGRADECIMENTOS**

À **PROF<sup>a</sup>. DRA. LYDIA MASAKO FERREIRA**, Professora Titular da Disciplina de Cirurgia Plástica do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal de São Paulo, Chefe do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal de São Paulo, por iniciar meu aprendizado como pesquisador, pela orientação, estímulo, exemplo de retidão e dinamismo profissional.

Ao **PROF. HEITOR CARVALHO GOMES**, Professor Colaborador Doutor da Disciplina de Cirurgia Plástica do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal de São Paulo, pela orientação, amizade, dedicação e boa vontade em compartilhar seu conhecimento.

Ao **PROF. DR. SANG WON HAN**, Professor Titular do Centro de Terapia Gênica (CINTERGEN) da Universidade Federal de São Paulo, pela orientação, disponibilidade, estímulo e boa vontade em compartilhar sua valiosa experiência.

À **BIANCA CRISTINA GARCIA LISBOA**, Bióloga e Mestre pelo Centro Interdisciplinar de Terapia Gênica (CINTERGEN) da Universidade Federal de São Paulo, pela amizade, disponibilidade e ajuda nos procedimentos de terapia gênica.

Ao **PROF. VICTOR ARIAS**, Médico Assistente do Departamento de Patologia da Universidade Federal de São Paulo, por seu apoio e ajuda preciosa na imuno-histoquímica e análise das lâminas histológicas.

À **PROF<sup>a</sup> GIANNI MARA SILVA DOS SANTOS**, Professora do Setor de Estatística Aplicada da Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo, pelos ensinamentos, disponibilidade, orientação e auxílio na realização da análise estatística.

À **VANINA MONIQUE TUCCI VIEGAS**, Bióloga e pós-graduanda do programa de pós-graduação em Cirurgia Plástica da Universidade Federal de São Paulo, pela atenção, paciência e ajuda na revisão bibliográfica.

Aos **DOUTORES ELITA CRUZ SILVA, PRISCILLA DOMENE VACCARO SILVA e LUIZ FELIPE CONTI**, Médicos Cirurgiões Plásticos e amigos, pelo precioso auxílio nos procedimentos cirúrgicos.

À **PROF<sup>a</sup>. ANDREA PUCHNICK**, Coordenadora Pedagógica e de Pesquisa do Departamento de Diagnóstico por Imagem da Universidade Federal de São Paulo, pela revisão geral e formatação do texto e imensa boa vontade e disponibilidade para esclarecer as dúvidas.

Ao aluno **VICTOR LEMOS** do Curso de Designer Gráfico da Faculdade UNIBAN, pela elaboração das ilustrações deste trabalho.

*“Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino.”*

*“Uma vez tendo experimentado voar, caminharás para sempre sobre a Terra de olhos postos no Céu, pois é para lá que tencionas voltar.”*

***Leonardo Da Vinci***

***1501***



# SUMÁRIO

<b>DEDICATÓRIA</b> .....	iii
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	iv
<b>LISTAS</b> .....	viii
<b>RESUMO</b> .....	xiv
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 OBJETIVO</b> .....	7
<b>3 LITERATURA</b> .....	9
<b>4 MÉTODOS</b> .....	27
<b>5 RESULTADOS</b> .....	51
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	72
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	87
<b>8 REFERÊNCIAS</b> .....	89
<b>NORMAS ADOTADAS</b> .....	99
<b>ABSTRACT</b> .....	100
<b>APÊNDICE</b> .....	101
<b>ANEXOS</b> .....	108
<b>FONTES CONSULTADAS</b> .....	114

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Demarcação dos limites da abdominoplastia e do descolamento .....	32
Figura 2	Incisão e descolamento da área demarcada na abdominoplastia.....	32
Figura 3	Ressecção das faixas de aponeurose do músculo reto do abdome durante a abdominoplastia.....	33
Figura 4	Ressecção do segmento de pele simulando uma abdominoplastia.....	34
Figura 5	Aplicação da solução com seringa no músculo reto do abdome durante a abdominoplastia.....	35
Figura 6	Eletroporação após a aplicação da solução na abdominoplastia.....	36
Figura 7	Sutura contínua da pele na abdominoplastia.....	36
Figura 8	Demarcação do retalho musculofasciocutâneo abdominal transversal do músculo reto do abdome.....	37
Figura 9	Incisão do retalho em toda a área pré-marcada.....	38
Figura 10	Descolamento do segmento contralateral do retalho até a linha média.....	38
Figura 11	Descolamento da porção ipsilateral do retalho até a margem do músculo reto do abdome direito.....	39
Figura 12	Incisão na linha média, com separação dos músculos retos do abdome .....	40
Figura 13	Liberação do retalho, com incisão do músculo reto do abdome direito cranialmente .....	40

Figura 14	Retalho TRAM monopediculado nos vasos epigástricos caudais direitos.....	41
Figura 15	Colocação de barreira de silicone sob o retalho.....	42
Figura 16	Distribuição e fixação do retalho TRAM.....	42
Figura 17	Sutura do retalho TRAM com sutura contínua.....	43
Figura 18	Zonas do retalho TRAM e as áreas de biópsias.....	45
Figura 19	<i>Boxplot</i> da percentagem total de necrose.....	53
Figura 20	<i>Boxplot</i> da área total de necrose.....	55
Figura 21	Diagrama de dispersão da contagem média de vasos entre os avaliadores 1 e 2.....	58
Figura 22	Diagrama de dispersão entre a diferença e a média das medidas obtidas pelos dois avaliadores (gráfico de Bland-Altman).....	59
Figura 23	<i>Boxplot</i> da contagem média de vasos da soma das zonas.....	61
Figura 24	<i>Boxplot</i> da contagem média de vasos sanguíneos na zona I do retalho TRAM nos grupos.....	63
Figura 25	<i>Boxplot</i> da contagem média de vasos sanguíneos na zona II do retalho TRAM nos grupos.....	64
Figura 26	<i>Boxplot</i> da contagem média de vasos sanguíneos na zona III do retalho TRAM nos grupos.....	66
Figura 27	<i>Boxplot</i> da contagem média de vasos sanguíneos na zona IV do retalho TRAM nos grupos.....	67
Figura 28	Diagrama de dispersão entre percentagem de necrose e contagem média de vasos na zona I, II, III e IV.....	69
Figura 29	Diagrama de dispersão entre percentagem de necrose e contagem média de vasos na soma das zonas.....	70
Figura 30	Marcador HHF-35 com aumento.....	107

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Porcentagem total de necrose do retalho TRAM .....	52
Tabela 2	Comparações da porcentagem total de necrose do retalho entre os grupos.....	54
Tabela 3	Área total de necrose em centímetros quadrados (cm <sup>2</sup> ) .....	55
Tabela 4	Comparações da área total de necrose entre os grupos.....	56
Tabela 5	Valores de média e desvio-padrão (dp) da porcentagem total de necrose e contagem média de vasos nas zonas I, II, III, IV e na soma das zonas .....	60
Tabela 6	Comparações do número de vasos do retalho TRAM entre os grupos .....	62
Tabela 7	Comparações do número de vasos da zona II do retalho TRAM entre os grupos .....	65
Tabela 8	Comparações do número de vasos da zona III do retalho TRAM entre os grupos .....	66
Tabela 9	Coeficientes de correlação linear de Pearson e de postos de Spearman entre a porcentagem de necrose e a contagem média de vasos nas zonas I, II, III, IV e na soma das zonas...	71
Tabela 10	Comparações do número de vasos da zona I do retalho TRAM entre os grupos .....	101
Tabela 11	Comparações do número de vasos da zona IV do retalho TRAM entre os grupos .....	101
Tabela 12	Necrose do retalho no grupo TRAM.....	101
Tabela 13	Necrose do retalho no grupo Abdominoplastia.....	102
Tabela 14	Necrose do retalho no grupo Plasmídeo.....	102
Tabela 15	Necrose do retalho no grupo VEGF.....	102

Tabela 16	Contagem de vasos do grupo TRAM.....	103
Tabela 17	Contagem de vasos do grupo Abdominoplastia.....	103
Tabela 18	Contagem de vasos do grupo Plasmídeo.....	103
Tabela 19	Contagem de vasos do grupo VEGF .....	104
Tabela 20	Resultados dos testes de normalidade (Kolmogorov- Smirnov) e de igualdade de variâncias (Levene) .....	104

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

°C	Grau Celsius
µg	Micrograma
µm	Micrômetro
ADN	Ácido desoxirribonucleico ( <i>Deoxyribonucleic acid</i> )
BSA	Soro albumina bovina ( <i>Bovine Serum Albumin</i> )
cm	Centímetro
cm <sup>2</sup>	Centímetro quadrado
DAB	<i>Diaminobenzidine tetrahydrochloride</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto ( <i>Fibroblast growth factor</i> )
HHF-35	Anticorpo para o fator cardíaco humano ( <i>Human Heart Factor</i> )
kg	Quilograma
mg	Miligrama
min	Minuto
mm	Milímetro
mM	Milimolar
ms	Milissegundo
NaN <sub>3</sub>	Azida sódica
ng	Nanograma
PBS	Solução salina tamponada com fosfato ( <i>Phosphate buffered saline solution</i> )
pH	Potencial hidrogeniônico

s	Segundo
TRAM	Retalho musculofasciocutâneo abdominal transversal do músculo reto do abdome ( <i>Transverse rectus abdominus myocutaneous</i> )
up VEGF	Plasmídeo com o gene para produção do VEGF
V	Volt
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular ( <i>Vascular endothelial growth factor</i> )

## RESUMO

**Introdução:** O retalho musculofasciocutâneo abdominal transversal do músculo reto do abdome (TRAM) pode apresentar necrose, sobretudo em pacientes com fatores de risco. A abdominoplastia representa um fator de risco devido à lesão de vasos perfurantes durante a sua execução. A perspectiva para a utilização de terapia gênica com o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) com vetor plasmidial, estimulando a neovascularização do retalho TRAM após abdominoplastia, originou este estudo. **Objetivo:** Determinar o efeito do VEGF plasmidial na viabilidade do retalho TRAM, após a Abdominoplastia, em ratos. **Métodos:** Trinta e dois ratos da linhagem Wistar-EPM foram distribuídos em quatro grupos (n = 8). O retalho TRAM de pedículo caudal direito foi realizado em todos os animais e foi o único procedimento realizado no grupo I (TRAM). Nos grupos II (Abdominoplastia) e III (Plasmídeo), o procedimento de abdominoplastia foi realizado com injeção intramuscular de solução salina e vetor plasmidial sem o gene que codifica o VEGF, respectivamente. No grupo IV (VEGF), 100 microgramas de vetor plasmidial com o gene foram injetados no músculo reto do abdome. O retalho TRAM foi realizado após trinta dias da abdominoplastia. **Resultados:** Os grupos TRAM, Abdominoplastia, Plasmídeo e VEGF mostraram uma média de porcentagem de necrose de 24,65%, 62,49%, 57,80% e 18,33%, respectivamente (p = 0,001). A imuno-histoquímica do retalho TRAM com o anticorpo HHF-35 mostrou um aumento significativo do número de vasos no grupo IV. **Conclusão:** O VEGF plasmidial aumentou a viabilidade e o número de vasos no retalho TRAM após a abdominoplastia em ratos.



## **1. INTRODUÇÃO**

## 1. Introdução

A reconstrução mamária pós-mastectomia constitui uma área de estudo em cirurgia plástica que, atualmente, dispõe de várias técnicas para a reconstrução do relevo mamário. O retalho musculofasciocutâneo abdominal transversal do músculo reto do abdome (TRAM) é a opção preferencial para reconstrução mamária em vários centros (HARTRAMPF, SCHEFLAN, BLACK, 1982; HARTRAMPF & BENNET, 1987; HUDSON, 1996; KROLL *et al.*, 1998). O uso de tecido autógeno, propiciando naturalidade e a melhora do contorno abdominal são as principais vantagens desta técnica (HARTRAMPF & BENNET, 1987; HARTRAMPF, 1988; KROLL *et al.*, 1998). Contudo, a vascularização do TRAM pode ser insuficiente, levando a complicações como necrose de pele e tecido adiposo (SCHEFLAN & DINNER, 1983; HARTRAMPF, 1988; HUDSON, 1996; KROLL *et al.*, 1998).

Vários estudos e modificações técnicas buscaram aumentar a vascularização desse retalho, para minimizar suas complicações (ISHII *et al.*, 1985; SEMPLE, 1994; CODNER & BOSTWICK, 1998). O aumento da vascularização e conseqüente aumento da viabilidade do retalho TRAM têm importância em pacientes com fatores de risco, como hipertensão arterial sistêmica, diabetes melitus, obesidade, doenças vasculares, doenças do colágeno, radioterapia prévia, tabagismo e cirurgias abdominais prévias, especialmente a abdominoplastia (HARTRAMPF, 1988; SEMPLE, 1994; HUDSON, 1996; HALLOCK & RICE, 1998).

A abdominoplastia é um procedimento muito realizado em nosso meio. Durante a abdominoplastia, a maioria dos vasos perfurantes musculocutâneos é seccionada. Assim, a vascularização se torna inadequada para uma eventual futura realização do TRAM (HARTRAMPF & BENNET, 1987; HALLOCK & RICE, 1998; SEIFY, BILKAY, JONES,

2003a). Contudo, há relatos de sucesso na realização do retalho TRAM em pacientes com abdominoplastia prévia, contrariando princípios básicos (SOZER *et al.*, 1995). Outros estudos mostraram que a realização do TRAM após abdominoplastia em ratos evoluiu com menor viabilidade do retalho mesmo após um grande intervalo de tempo entre os procedimentos (HALLOCK & RICE, 1998; SEIFY, BILKAY, JONES, 2003a; ÖZKAN *et al.*, 2005). O aumento da viabilidade do retalho do TRAM após a abdominoplastia em ratos ocorreu somente nos grupos submetidos à autonomização cirúrgica com grande intervalo de tempo entre os procedimentos (ÖZKAN *et al.*, 2005).

A autonomização cirúrgica consiste na execução e transferência do retalho em dois tempos operatórios. No primeiro tempo o retalho é submetido a um procedimento operatório para causar isquemia parcial e após um período que pode variar de dias a semanas, é transferido (HALLOCK & RICE, 1995a). Esse procedimento causa uma reorganização vascular, simpatectomia e angiogênese, com captura de novos angiossomas, tornando o retalho mais vascularizado (HAYWARD *et al.*, 1991; HUDSON, 1996).

Vários autores buscaram alternativas para substituir a autonomização cirúrgica por uma autonomização química. CLUGSTON *et al.* (1995) obtiveram aumento da viabilidade do retalho TRAM em ratos com o uso de alopurinol. KARACAOGLU *et al.* (2002) utilizaram microesferas contendo epinefrina no retalho TRAM e mostraram viabilidade semelhante à autonomização cirúrgica.

Há duas décadas, um grupo de polipeptídios com ação angiogênica foi identificado, trazendo novas perspectivas terapêuticas. Denominados fatores de crescimento, esses polipeptídios foram objeto de vários estudos

com a finalidade de aumentar a viabilidade de retalhos cutâneos e musculares em modelos animais (HAYWARD *et al.*, 1991; KHOURI *et al.*, 1991; UHL *et al.*, 1994).

O fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) é um poderoso fator angiogênico identificado. Atua causando vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, proliferação de células endoteliais e ativação de metaloproteinases, que lisam a matriz extracelular para crescimento de um novo vaso (FERRARA & DAVIS-SMYTH, 1997).

A possibilidade da indução de angiogênese em tecidos não isquêmicos para aumentar sua vascularização, diminuindo as complicações isquêmicas pós-operatórias, vem sendo estudada (TAKESHITA *et al.*, 1994a; TAKESHITA *et al.*, 1994b; PADUBIDRI & BROWNE, 1996; LANTIERI *et al.*, 1998; TAUB *et al.*, 1998).

SEIFY, BILKAY, JONES (2003a) utilizaram o VEGF na sua forma recombinante para aumentar a viabilidade do TRAM em ratos previamente submetidos à abdominoplastia, obtendo melhora no grupo tratado. A aplicação de fatores de crescimento recombinantes vem sendo estudada como uma forma de alterar os níveis desses fatores. Esse método utiliza a proteína recombinante já produzida, mostrando bons resultados em modelos experimentais, que raramente são reprodutíveis e efetivos em estudos com primatas e clínicos. O limitado sucesso poderia ser causado pela meia vida curta e inativação enzimática dessa proteína (TEPPER & MEHRARA, 2002). Além disso, o fator de crescimento recombinante tem um alto custo de preparação.

As limitações do uso dos fatores de crescimento recombinantes podem ser transpostas pelo uso da terapia gênica, que apresenta potencial

para um efeito localizado e mais duradouro, estimulando a célula para a produção do fator de crescimento (TEPPER & MEHRARA, 2002).

A terapia gênica introduz, suplementa ou manipula os genes, restaurando funções perdidas ou corrigindo funções aberrantes. A tecnologia atualmente desenvolvida pode auxiliar o processo de cicatrização e angiogênese, transfectando genes que codificam proteínas, como o VEGF, em tecidos isquêmicos (TAUB, SILVER, WEINBERG, 2000).

Um método de terapia gênica é a injeção direta do ácido desoxirribonucleico (ADN, em português, ou DNA, em inglês: *deoxyribonucleic acid*), através de um vetor plasmidial, nos tecidos e nas células. Plasmídeos são fragmentos de ADN presentes em bactérias, que conferem resistência a antibióticos. Através de engenharia genética, esses plasmídeos podem ser tratados, incorporando genes para a produção de fatores de crescimento. Uma vez incorporado às células alvo, esse gene atuaria estimulando a produção celular do fator de crescimento.

A injeção de DNA mostrou-se efetiva, em humanos, no tratamento de membros isquêmicos (ISNER *et al.*, 1996) e na isquemia miocárdica (LOSORDO *et al.*, 1998).

Vantagens da injeção direta do ADN, através de plasmídeos, incluem simplicidade na técnica e preparação, transferência direta para o órgão ou tecido alvo e possibilidade de atuação em células que não estão em divisão (TEPPER & MEHRARA, 2002).

A ausência de resultados conclusivos na literatura e a possibilidade de avaliar uma técnica de terapia gênica com potencial efeito localizado e duradouro estimularam a elaboração deste estudo, para determinar os

## 1. Introdução

efeitos do vetor plasmidial do VEGF na viabilidade do retalho TRAM, após abdominoplastia, em ratos.

## **2. OBJETIVO**

## **2. Objetivo**

Determinar o efeito do fator de crescimento do endotélio vascular na viabilidade do retalho musculofasciocutâneo abdominal transversal do músculo reto do abdome, após abdominoplastia, em ratos.



### **3. LITERATURA**

### **3.1. RECONSTRUÇÃO MAMÁRIA COM O RETALHO TRAM**

ROBBINS (1979) descreveu a técnica original de reconstrução mamária para pacientes mastectomizadas, usando um retalho miocutâneo em ilha do músculo reto do abdome com disposição vertical. O autor utilizou a técnica em quatro pacientes, obtendo boa forma e volume, sem a necessidade de implantes.

HARTRAMPF, SCHEFLAN, BLACK (1982) descreveram a técnica original de reconstrução mamária com o retalho musculofasciocutâneo abdominal transversal de músculo reto do abdome (TRAM). Descreveram o estudo anatômico dos vasos epigástricos em cadáveres e propuseram uma orientação horizontal para a ilha de pele do retalho abdominal descrito anteriormente em posição vertical por ROBBINS (1979). Apresentaram considerações anatômicas, cirúrgicas e resultados clínicos da utilização do retalho em 16 pacientes.

GANDOLFO (1982) publicou técnica semelhante à descrita por HARTRAMPF, SCHEFLAN, BLACK (1982), utilizando o retalho musculofasciocutâneo do abdome inferior em posição transversal, com pedículo único nos vasos epigástricos superiores. Utilizou a técnica em cinco pacientes, com bons resultados.

SCHEFLAN & DINNER (1983) descreveram sua experiência de reconstrução mamária com 65 retalhos TRAM monopediculados em 60 pacientes consecutivas. Discutiram a anatomia cirúrgica, as indicações, contraindicações e complicações da técnica e salientaram as vantagens em relação à reconstrução mamária com retalho do músculo grande dorsal.

HARTRAMPF & BENNETT (1987) relataram a experiência com 300 pacientes submetidas à reconstrução mamária ou tórax com o retalho TRAM entre 1980 e 1986. Os autores obtiveram os dados por meio da análise de prontuários e questionários aplicados às pacientes. Os resultados mostraram complicações em 16% dos casos. A complicação mais freqüente foi a necrose parcial do retalho em dezenove pacientes (6,3%) e a complicação mais grave foi a embolia pulmonar, que ocorreu em duas pacientes (0,6%). O questionário foi respondido por 97,6% das pacientes e a aprovação do procedimento ocorreu em 98% dos casos. Os autores concluíram que a reconstrução mamária com TRAM, realizada por cirurgião experiente, é um procedimento seguro, com bons resultados.

HARTRAMPF (1988) apresentou uma revisão crítica de sete anos de experiência com o retalho TRAM, enfatizando refinamentos da técnica operatória e qualificando as indicações e contraindicações para esse procedimento. O autor atribuiu notas de um a dez aos diferentes fatores de risco para complicações pós-operatórias, classificando em quatro grupos. O grupo I incluiu pacientes sem fatores de risco ou com nota zero, boas candidatas para a reconstrução com o TRAM. Ao grupo II pertenceram as

pacientes com um fator de risco e nota igual ou inferior a dois. Estas pacientes são boas candidatas, porém o cirurgião deve minimizar os riscos. As pacientes com nota menor que cinco ou dois fatores de risco se encontram no grupo III, que representa uma situação intermediária na qual a cirurgia poderá ser indicada. As pacientes com nota entre cinco e dez ou três ou mais fatores de risco não devem ser submetidas à reconstrução mamária com o retalho TRAM. Alguns fatores de risco apresentam isoladamente nota entre cinco e dez, contraindicando a cirurgia. O autor coloca nessa situação as pacientes portadoras de obesidade severa, tabagistas, portadoras de doenças autoimunes, diabéticas, pacientes com dependência química, doença pulmonar crônica, doença cardiovascular grave, hipertensão não controlada e pacientes com cirurgias abdominais em que houve secção dos vasos perfurantes (abdominoplastia) ou dos vasos epigástricos.

KROLL *et al.* (1998) compararam a incidência de necrose gordurosa nas reconstruções realizadas com o retalho TRAM microcirúrgico e o retalho TRAM pediculado em 110 pacientes com 116 reconstruções mamárias. Quarenta e nove pacientes realizaram reconstrução com o TRAM microcirúrgico e apresentaram oito por cento de necrose gordurosa, evidenciada clinicamente, e dois por cento pela mamografia. As 67 pacientes submetidas à reconstrução com o retalho convencional ou pediculado apresentaram necrose gordurosa, detectada clinicamente em 26,9% e detectada na mamografia em 14,4%. Os autores encontraram diferença significativa na incidência de necrose gordurosa entre os grupos, nas duas formas de avaliação.

### 3.2. MODELOS EXPERIMENTAIS DO RETALHO TRAM

DUNN & MANCOLL (1992) descreveram as diferenças na vascularização da pele de animais e do homem. Realizaram uma revisão de todos os retalhos descritos em ratos e sua aplicabilidade. O retalho randômico dorsal descrito por MCFARLANE *et al.* (1965), o retalho ventral toracoabdominal utilizado por NORTHON *et al.* (1984), o retalho dorsal com pedículo caudal ou cranial descrito por KHOURI *et al.* (1986) e os retalhos epigástricos descritos por STRAUCH & MURRAY (1967). Propuseram o estudo da vascularização do abdome para desenvolvimento do modelo do retalho musculofasciocutâneo abdominal transversal de músculo reto do abdome.

DUNN, HUFF, MANCOLL (1993) descreveram o modelo experimental do retalho TRAM em ratos. Realizaram estudo anatômico, estudo com tinta da Índia para avaliar a distribuição dos vasos epigástricos craniais e caudais e aplicaram o modelo em quatro grupos de animais. Um grupo controle, um grupo com pedículo cranial, um grupo com pedículo caudal e um grupo com retalho bipediculado caudal. Mostraram em seu estudo que a pele do abdome do rato apresenta artérias musculocutâneas e não somente artérias cutâneas diretas, como outros pesquisadores acreditavam. Neste caso, esse modelo poderia simular a irrigação do abdome no humano. A fisiologia mostrou-se semelhante à do humano, apresentando *choke vessels* similares aos descritos por TAYLOR &

MINABE (1992). Os animais submetidos ao retalho monopediculado cranial e bipediculado caudal apresentaram 97% de viabilidade. O grupo com pedículo monopediculado caudal apresentou 77% de viabilidade.

OZGENTAS, SHENAQ, SPIRA (1994) estudaram a dominância vascular dos pedículos do retalho TRAM em ratos. O objetivo do estudo foi desenvolver um modelo animal do retalho que mimetizasse o retalho no humano, particularmente sob o aspecto do seu desenho anatômico. O retalho em humanos é usualmente localizado no abdome inferior, tendo a artéria epigástrica superior como pedículo, e o alto índice de necrose parcial do retalho é atribuído ao uso desse pedículo não dominante. Os autores observaram que, no modelo do rato, o pedículo vascular da artéria epigástrica cranial é mais calibroso e contribui mais para a vascularização do retalho do que o sistema caudal; conseqüentemente, os retalhos baseados no sistema epigástrico cranial têm áreas de retalhos viáveis maiores do que aqueles baseados no sistema epigástrico caudal. Os autores concluíram que o modelo do retalho TRAM no rato assemelha-se ao retalho convencional em humanos e constitui uma alternativa confiável e de baixo custo para o estudo do retalho.

HALLOCK & RICE (1995b) realizaram estudo anatômico e fisiológico dos pedículos do retalho TRAM em ratos. O estudo anatômico foi realizado em 13 ratos e observou um maior calibre dos vasos que emergem superiormente no músculo reto do abdome (vasos epigástricos profundos craniais) em continuação à artéria torácica interna (mamária). Os

vasos epigástricos profundos caudais frequentemente eram vestigiais. Nesse estudo, observaram uma média de 4,7 vasos perfurantes (2 a 7) dos vasos epigástricos do processo xifoide até o púbis. Estes vasos frequentemente emergem dos vasos epigástricos profundos craniais e fazem inúmeras anastomoses com os vasos perfurantes contralaterais. O estudo fisiológico através de laser Doppler mostrou um fluxo sanguíneo maior no retalho baseado no pedículo cranial. O grupo com o retalho de pedículo cranial apresentou maior viabilidade estatisticamente significativa em relação ao grupo em que o TRAM tinha um pedículo caudal.

ELY & FERREIRA (2003) descreveram o modelo experimental do retalho TRAM em ratos. Estudaram o retalho com extensão de cinco centímetros transversalmente por três centímetros no sentido longitudinal, monopediculado nos vasos epigástricos caudais direitos, e descreveram de forma pormenorizada os passos para sua execução. Os autores concluíram que o modelo experimental do retalho musculofasciocutâneo transversal do músculo reto do abdome (TRAM) é aplicável e efetivo como um modelo experimental em rato. Há perspectiva do uso desse modelo experimental no estudo de diferentes utilizações de tamanho do retalho, estudo do efeito de drogas e sua influência na perfusão e viabilidade do retalho.

GARCIA *et al.* (2004) descreveram o modelo experimental do retalho TRAM em ratos. Os autores descreveram o retalho de pedículo cranial direito medindo cinco centímetros no sentido transversal, tomando-se a linha média como parâmetro, e três centímetros no sentido

longitudinal, distando um centímetro do processo xifoide. Os autores classificaram o modelo como simples, reprodutível e de baixo custo, possibilitando o melhor entendimento da fisiopatologia e a aplicação de novos tratamentos para prevenir a necrose parcial ou total do retalho TRAM.

### **3.3. VASCULARIZAÇÃO DO TRAM**

BOYD, TAYLOR, CORLETT (1984) realizaram o estudo anatômico dos territórios de vascularização dos vasos epigástricos profundos superiores e inferiores. Utilizando 65 cadáveres, os autores dividiram seu estudo em dissecação, injeção de corante e estudo radiográfico contrastado. O estudo com corantes foi realizado com injeção de tinta da Índia nos vasos epigástricos profundos superiores e inferiores, separadamente. A injeção dos vasos inferiores mostrou que os vasos epigástricos profundos inferiores contribuem mais para a vascularização da pele e parede abdominal. O estudo anatômico mostrou a disposição dos vasos e a discrepância em relação ao diâmetro dos vasos inferiores (média de 3,4 mm) e superiores (média de 1,6 mm). Muitos vasos perfurantes emergem da bainha anterior do músculo reto do abdome, mas a concentração ocorre na região periumbilical. O estudo contrastado confirmou os achados e possibilitou correlacionar os achados da dissecação com os achados do estudo com corante.



CLUGSTON *et al.* (1995) estudaram a viabilidade do retalho TRAM em ratos tratados com alopurinol e pentoxifilina. Utilizaram o retalho TRAM com pedículo cranial direito em 30 animais distribuídos em 3 grupos. Os animais receberam, no pós-operatório, água com alopurinol via oral na dose de 20 mg/kg por dia e pentoxifilina via oral na dose de 100 mg/kg por dia. Após 48 horas, a área de viabilidade do retalho foi gabaritada em molde de papel e digitalizada para a mensuração em programa computadorizado. Os resultados mostraram um aumento significativo da viabilidade do TRAM no grupo tratado com alopurinol em relação ao grupo controle ( $p = 0,018$ ).

HALLOCK & RICE (1995a) estudaram a autonomização do retalho TRAM em ratos. Utilizaram o modelo descrito por DUNN, HUFF, MANCOLL (1993) com pedículo caudal direito. No grupo controle, os animais foram submetidos apenas ao retalho TRAM. Nos grupos experimentais (5 animais), houve variações no período de autonomização (14 e 28 dias) e no tipo do procedimento de autonomização (ligadura unilateral ou bilateral dos pedículos). Os autores não encontraram diferença significativa na viabilidade do retalho TRAM no grupo de 14 dias de autonomização, em relação ao grupo controle. O grupo com 28 dias de autonomização e ligadura ipsilateral apresentou maior viabilidade do retalho.

HUDSON (1996) realizou estudo clínico em sete pacientes de risco (três pacientes obesas, três pacientes tabagistas) utilizando a autonomização cirúrgica antes da realização da reconstrução com o retalho TRAM monopediculado. Nenhuma paciente apresentou necrose do retalho. Os resultados sugerem que a autonomização do TRAM pode ser uma alternativa à realização da reconstrução com retalho bipediculado ou microcirúrgico.

KARACAOGLU *et al.* (2002) propuseram a autonomização química como uma alternativa à autonomização cirúrgica para aumento da viabilidade do TRAM em ratos. Utilizaram um sistema de microesferas de polímero biodegradável contendo drogas em seu interior que eram liberadas lentamente com a sua degradação. Os animais foram distribuídos em três grupos de dez animais. No grupo I os animais foram submetidos à autonomização cirúrgica, no grupo II foram tratados com o sistema de microesferas contendo solução salina e no grupo III os animais foram tratados com o sistema de microesferas contendo epinefrina. Após sete dias, todos os animais foram submetidos ao retalho TRAM. A viabilidade foi medida por meio de fotografias digitais e programa computadorizado após sete dias. Os resultados mostraram que não houve diferença significativa entre as duas formas de autonomização.

#### **3.4. TRAM E ABDOMINOPLASTIA**

SOZER *et al.* (1995) relataram dois casos de reconstrução mamária com o retalho TRAM bipediculado após abdominoplastia. Nos dois casos, as pacientes apresentavam um intervalo de 8 e 14 anos entre os procedimentos. Os dois casos evoluíram sem complicações, com total viabilidade dos retalhos. Os autores concluíram que a utilização do retalho TRAM em pacientes submetidos previamente à abdominoplastia deve ser indicada com critério e que a abdominoplastia não deveria ser considerada uma contraindicação absoluta.

HALLOCK & RICE (1998) estudaram a realização do retalho TRAM após abdominoplastia no rato. Descreveram o procedimento de abdominoplastia no rato com descolamento suprafascial no sentido cranial e ressecção de segmento caudal de pele semelhante ao segmento de pele ressecada em uma abdominoplastia no humano. Utilizaram o retalho TRAM com pedículo cranial após um mês da abdominoplastia, no primeiro grupo e após dez meses no segundo grupo. Os autores observaram um aumento significativo da viabilidade do TRAM realizado após dez meses em relação ao grupo realizado após um mês. Os dois grupos apresentaram altas porcentagens de necrose do retalho (98,8% e 86,3%) em relação ao grupo controle (27,2%) em que foi realizado apenas o retalho TRAM.

RIBUFFO, MARCELLINO, BARNETT (2001) estudaram a revascularização dos vasos perfurantes após a abdominoplastia clássica. Utilizaram o aparelho de duplex colorido e Doppler em dez pacientes no

pré-operatório e no pós-operatório de uma semana, três meses e seis meses de uma abdominoplastia. Relataram ainda um estudo em cadáver de uma paciente do gênero feminino submetida à abdominoplastia há dez anos. O estudo dos vasos revelou que houve revascularização a partir de três meses dos vasos perfurantes em todos os casos, porém em nenhum caso os vasos apresentavam um diâmetro maior que 40% do diâmetro pré-operatório. O estudo em cadáver mostrou vasos perfurantes com disposição assimétrica e calibre reduzido sempre menor que um milímetro.

ÖZKAN *et al.* (2005) estudaram o efeito da autonomização cirúrgica na viabilidade do retalho TRAM após a abdominoplastia em ratos. Os autores estudaram dois intervalos (um mês e seis meses) entre a abdominoplastia e o retalho TRAM. Realizaram a abdominoplastia como descrito por HALLOCK & RICE (1998) e o retalho de TRAM com pedículo cranial. Observaram melhora na viabilidade dos grupos autonomizados em relação aos grupos convencionais. O grupo com abdominoplastia, autonomização e realização do retalho TRAM após seis meses apresentou porcentagem de necrose semelhante, sem diferença significativa em relação ao grupo controle submetido apenas ao retalho TRAM.

### **3.5. FATOR DE CRESCIMENTO DO ENDOTÉLIO VASCULAR E TERAPIA GÊNICA**

TAKESHITA *et al.* (1994a) estudaram o efeito do VEGF recombinante 165 no modelo de isquemia de membros em coelhos. Os animais foram submetidos à ligadura distal da artéria ilíaca externa e secção completa da artéria femoral. Utilizaram um grupo controle tratado com solução salina e três grupos tratados com injeção intramuscular de 200 microgramas ( $\mu\text{g}$ ), 500 microgramas ( $\mu\text{g}$ ) e 1000 microgramas ( $\mu\text{g}$ ) de VEGF por 10 dias. Encontraram um efeito dose dependente do VEGF, com aumento significativo dos vasos colaterais e densidade capilar. A melhora clínica foi evidente, com diminuição da atrofia muscular e da necrose de extremidades (85,7% no grupo controle e 0% no grupo tratado com 1000  $\mu\text{g}$ ).

TAKESHITA *et al.* (1994b) investigaram o efeito terapêutico da aplicação intra-arterial do VEGF recombinante, isoforma 165, no modelo de membro isquêmico, em coelhos. Promoveram a secção da artéria femoral e a injeção na artéria ilíaca interna de 500  $\mu\text{g}$  em um grupo e 1000  $\mu\text{g}$  em outro grupo. Encontraram aumento significativo dos vasos colaterais e do número de capilares nos grupos tratados. Exames de angiogramas revelaram reperfusão do leito distal do membro em sete dos nove animais tratados.

PADUBIDRI & BROWNE (1996) estudaram o efeito do VEGF recombinante no retalho abdominal em ratos. Utilizaram o retalho abdominal com tamanho de dez por dez centímetros pediculado nos vasos

epigástricos caudais superficiais. Avaliaram a porcentagem de necrose usando registro fotográfico e análise por programas computadorizados e o fluxo sanguíneo através de laser Doppler. O grupo experimento recebeu cinco microgramas de VEGF recombinante na artéria femoral após a elevação do retalho e apresentou média de 71,9% de viabilidade após sete dias. O grupo controle recebeu injeção intra-arterial de solução salina e apresentou média de viabilidade de 53,7%. O grupo experimento apresentou maior viabilidade do retalho e maior fluxo sanguíneo significativo em relação ao grupo controle.

TAUB *et al.* (1998) estudaram o efeito da administração local de VEGF na viabilidade de retalhos cutâneos isquêmicos. Realizaram terapia gênica com a isoforma 121 do VEGF e vetor plasmidial no retalho cutâneo ventral em ratas. O retalho media seis por três centímetros e era baseado nos vasos epigástricos superficiais. O VEGF foi administrado no intraoperatório por injeção intra-arterial de sete microgramas no grupo experimento (grupo I). Os grupos controle (II e III) receberam apenas o vetor e solução salina, respectivamente. A viabilidade dos retalhos foi avaliada após sete dias, medindo a porcentagem de necrose através de planigrafia. Todos os grupos foram avaliados por imuno-histoquímica, com o marcador para VEGF. Os resultados mostraram que o grupo tratado com VEGF apresentou, estatisticamente, maior viabilidade do retalho e maior depósito da proteína VEGF nos vasos, em relação aos grupos controle.

LANTIERI *et al.* (1998) investigaram a etiologia da angiogênese em tecidos expandidos. Pesquisaram a presença do VEGF em pele expandida de cinco pacientes com expansor para reconstrução. Coletaram três amostras de cada paciente. A primeira amostra foi retirada antes da expansão, a segunda foi retirada da área já expandida e a terceira, da área adjacente à área expandida. Utilizaram o anticorpo para VEGF e encontraram um aumento significativo dessa proteína na pele expandida.

TAUB, SILVER, WEINBERG (2000) apresentaram perspectivas da utilização do VEGF em cirurgia plástica através da terapia gênica. Descreveram a localização do gene que codifica a proteína e inúmeras funções, mecanismo de ação, receptores, mediadores e características do VEGF.

ZHANG *et al.* (2001) estudaram o efeito do VEGF recombinante na viabilidade do retalho TRAM em ratos. Utilizaram o retalho com extensão de três por oito centímetros e pedículo caudal direito. Administraram o VEGF no intraoperatório em dois grupos, com injeção endovenosa de 50 µg (sistêmico) e injeção intra-arterial de 50 µg. Nos dois grupos pré-operatórios, os animais foram tratados com VEGF subdérmico da dose de 100 µg e solução salina subdérmica, respectivamente. A necrose do retalho foi observada no quinto dia pós-operatório. Os autores encontraram maior viabilidade do retalho apenas no grupo tratado no pré-operatório com VEGF subdérmico.

O'TOOLE *et al.* (2002) utilizaram a terapia gênica com VEGF plasmidial para aumentar a viabilidade do retalho abdominal ventral em ratos. Os autores compararam os grupos com as isoformas VEGF A 165, VEGF B 167, VEGF B 186 e grupo controle. Os animais receberam a injeção subcutânea intraoperatória de 50 µg de VEGF no retalho abdominal ventral de oito por oito centímetros, baseado nos vasos epigástricos superficiais direitos. Os autores avaliaram após sete dias a porcentagem de necrose através de recursos de programa computadorizado (*IMAGE TOOL* da *University of Texas Health Science Center in San Antonio*) e disposição dos vasos através de angiografia. Os grupos tratados com o VEGF 165 e 167 apresentaram maior viabilidade significativa em relação ao grupo controle. Não houve diferença no número ou calibre dos vasos entre o grupo controle e os grupos tratados.

TEPPER & MEHRARA (2002) descreveram, em seu artigo de revisão, métodos de terapia gênica, suas vantagens e desvantagens e o seu desenvolvimento na área da cirurgia plástica. Os autores concluíram que há aplicabilidade da terapia gênica, melhorando a reparação de tecidos, a formação óssea e a regeneração nervosa.

SEIFY, BILKAY, JONES (2003a) utilizaram o VEGF para aumentar a viabilidade do retalho TRAM em ratos previamente submetidos à abdominoplastia. Utilizaram 24 animais distribuídos em quatro grupos. Dois grupos com intervalo de 20 dias entre os procedimentos do retalho



TRAM e abdominoplastia, e dois grupos com intervalo de 40 dias. Os animais receberam o VEGF recombinante por via intramuscular durante a abdominoplastia e seus grupos controles foram tratados com solução salina. O retalho TRAM apresentou medidas de quatro por dois centímetros e pedículo caudal direito. Os autores não observaram diferenças significantes entre os dois intervalos de tempo (20 e 40 dias). Houve diferença significativa entre os grupos tratados com VEGF e os grupos controle.

SEIFY, BILKAY, JONES (2003b) compararam o efeito do VEGF recombinante e da autonomização cirúrgica, na viabilidade do TRAM, em ratos tratados no pré-operatório de dez dias. Utilizaram o retalho TRAM com pedículo nos vasos epigástricos caudais. O VEGF recombinante foi administrado, por via intramuscular e intra-arterial, em dose única de 100 µg. Obtiveram melhora da viabilidade do retalho TRAM no grupo autonomizado, nos grupos tratados com o VEGF e nos grupos em que houve associação de ambos.

LINEAWEAVER *et al.* (2004) pesquisaram o fenômeno de autonomização cirúrgica e a importância do TGF- $\beta$ , do fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), do fator de crescimento de fibroblasto (FGF) e do VEGF no seu mecanismo. Dividiram seu estudo em três partes. Na primeira parte, compararam animais submetidos ao procedimento do retalho TRAM com pedículo caudal e animais submetidos à autonomização cirúrgica prévia. Encontraram aumento significativo da

viabilidade do retalho no grupo autonomizado. Na segunda parte do estudo, utilizaram trinta animais distribuídos em cinco grupos, de acordo com o tempo da realização da biópsia, para estudo da expressão gênica (sem a autonomização, 12, 24, 48 e 72 horas após a autonomização). Os níveis de TGF- $\beta$  e PDGF não apresentaram diferença significativa entre as zonas biopsiadas e nos diferentes tempos de biópsia. Os níveis de FGF e VEGF apresentaram aumento significativo com a autonomização cirúrgica, porém não apresentaram diferenças entre as quatro zonas do retalho.

ZHANG *et al.* (2005) estudaram o uso da terapia gênica com o VEGF plasmidial no retalho TRAM em ratos. Utilizaram o retalho TRAM com o pedículo caudal direito. Realizaram a aplicação pré-operatória (4 dias) e utilizaram a via subcutânea. Os animais do grupo experimento receberam 50  $\mu$ g de plasmídeo com o gene para a produção do VEGF, isoforma 165. Os animais dos dois grupos controle receberam o plasmídeo sem o gene e solução salina. Os autores encontraram um aumento de vasos neoformados e aumento da viabilidade do retalho TRAM, significativo, no grupo tratado com VEGF.

## **4. MÉTODOS**

#### 4.1 DESENHO DE PESQUISA

Este é um estudo primário, intervencional, experimental, longitudinal, prospectivo, analítico, controlado e aleatorizado. Obteve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP – CEP n° 0030/07 (Anexo 1) e Comissão Interna de Biossegurança (Anexo 2).

#### 4.2 AMOSTRA

Foram utilizados 32 ratos da linhagem Wistar-EPM (*Rattus norvegicus albinus*, Rodentia, Mamalia), machos, adultos, com peso variando entre 350 e 400 gramas (g) com idade de três meses, oriundos do Biotério Central da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Os animais foram distribuídos aleatoriamente por sorteio computadorizado utilizando o programa de randomização por urna (*Urn Randomization – University of Connecticut Health Center*), em quatro grupos de oito animais, sendo três grupos controle e um grupo de experimento. Os animais foram mantidos no biotério da Disciplina de Cirurgia Plástica da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, em gaiolas individuais de polipropileno, com ciclo claro/escuro, com controle de temperatura, ração própria comum e água *ad libitum*.

No grupo I (grupo TRAM) os animais foram submetidos ao procedimento do retalho TRAM.

Os animais do grupo II (grupo Abdominoplastia) foram submetidos ao procedimento de abdominoplastia, e injeção de solução salina. Após 30 dias, o TRAM foi realizado (HALLOCK & RICE, 1998; ÖZKAN *et al.*, 2005).

Nos animais do grupo III (grupo Plasmídeo), foram realizados os procedimentos de abdominoplastia e injeção do vetor plasmidial sem o VEGF, em dose única, intramuscular, de 100 microgramas ( $\mu\text{g}$ ), e após 30 dias, foi elevado o retalho TRAM.

Nos animais do grupo IV (grupo VEGF), foram realizados os procedimentos de abdominoplastia e injeção do vetor plasmidial com o VEGF, em dose única, intramuscular, de 100  $\mu\text{g}$ , e após 30 dias, elevação do retalho TRAM.

### **4.3 PROCEDIMENTOS**

#### **4.3.1 Obtenção do Vetor Plasmidial**

O vetor plasmidial up-VEGF 165 contendo o gene humano para produção do fator de crescimento isoforma 165 foi construído pelo Laboratório Interdisciplinar de Terapia Gênica (CINTERGEN) da UNIFESP. O vetor plasmidial up foi construído pela inserção de uma

sequência de ácido desoxirribonucleico (ADN) contendo o intron 1 do gene CMV (citomegalovírus), com sinal de *splicing* entre o promotor CMV e o sítio de policlonagem do vetor pVAX (*Invitrogen, Califórnia, USA*). O cDNA do gene VEGF 165 (*vascular endothelial grow factor 165*) foi inserido entre os sítios Eco RI e Eco RV do vetor uP. Para a clonagem foram utilizados 60 ng do vetor uP, 150 ng do cDNA e 1 unidade da enzima T4 DNA ligase (*Fermentas, Ontário, Canada*). Os produtos de ligação foram inseridos em bactérias *E. coli* DH5 $\alpha$ , que foram plaqueadas em meio *Lurian Broth* (LB, *Difco Laboratories, Detroit, USA*) contendo ágar 2,25%, 30  $\mu$ g/ml de kanamicina, 3,2 mg/ml de IPTG e 1,6 mg/ml de X-gal, e incubadas em estufa a 37°C por 16 horas.

Foram selecionadas as colônias positivas com a extração de ADN plasmidial em larga escala, purificação por cromatografia utilizando o kit de Megaprep (*Qiagen, Valência, Califórnia, USA*) e dissolução em tampão PBS (*phosphate buffered saline solution*). Terminada a preparação, a qualidade do vetor plasmidial em PBS foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1% e quantificada por espectrofotometria (*Nanodrop, Wilmington, USA*).

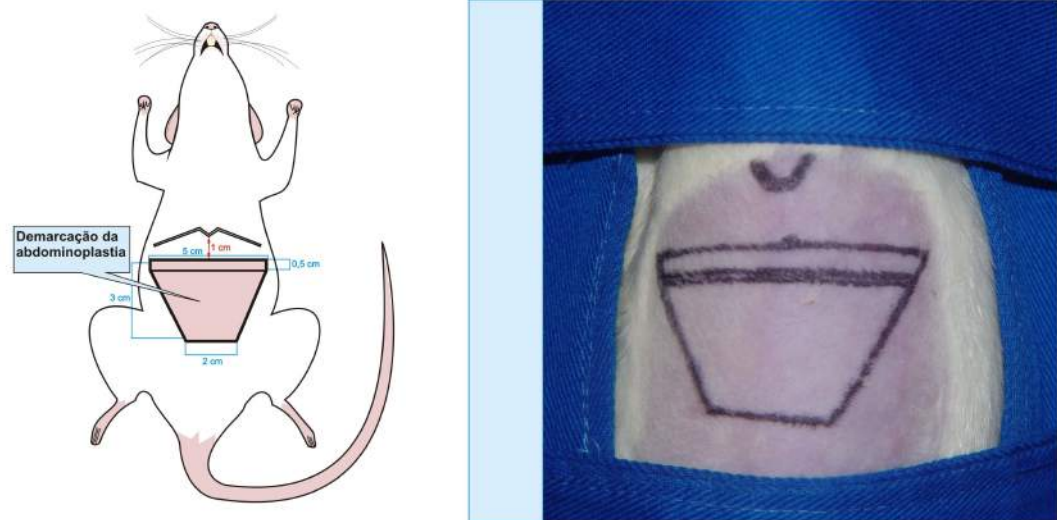
### **4.3.2 Alimentação, Anestesia e Preparo dos Animais para os Procedimentos**

Os animais foram alojados em gaiolas individuais, pesados e mantidos durante o estudo no biotério da Disciplina de Cirurgia Plástica da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP.

A anestesia foi realizada com a aplicação intraperitoneal de cloridrato de tiletamina e cloridrato de zolazepan na dose de 25 mg/kg (Anexo 3). Os animais foram imobilizados em prancha cirúrgica, em decúbito dorsal, e a tricotomia da região ventral foi realizada através de aparelho elétrico Oster 76274 (*Oster, Tennessee, USA*).

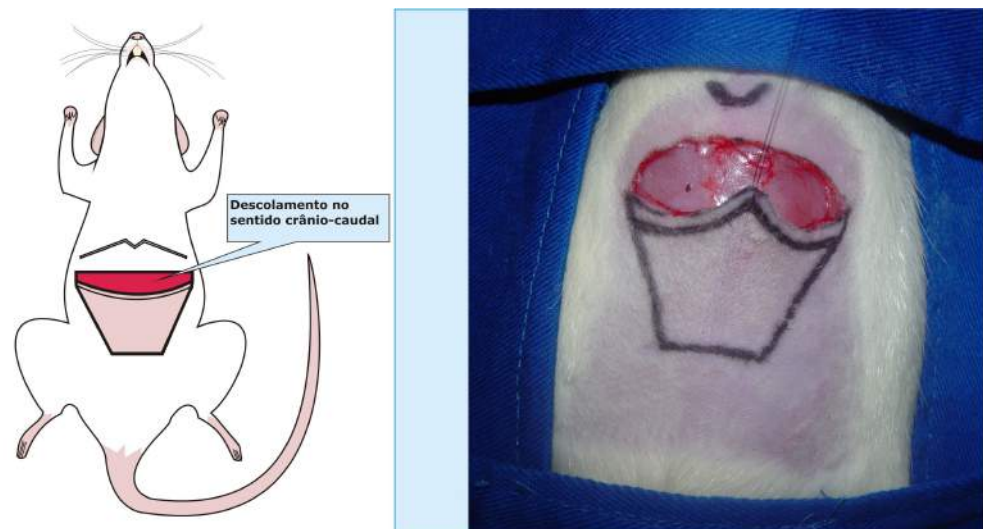
### **4.3.3 Abdominoplastia**

A abdominoplastia foi demarcada na forma de um trapézio com base cranial medindo cinco centímetros (cm) transversalmente, tomando-se a linha média como parâmetro, distando, caudalmente, um centímetro do *processus xiphoideus* (processo xifóide). A base inferior media dois centímetros e distava três centímetros da base cranial (Figura 1).



**Figura 1.** Demarcação dos limites da abdominoplastia e do descolamento.

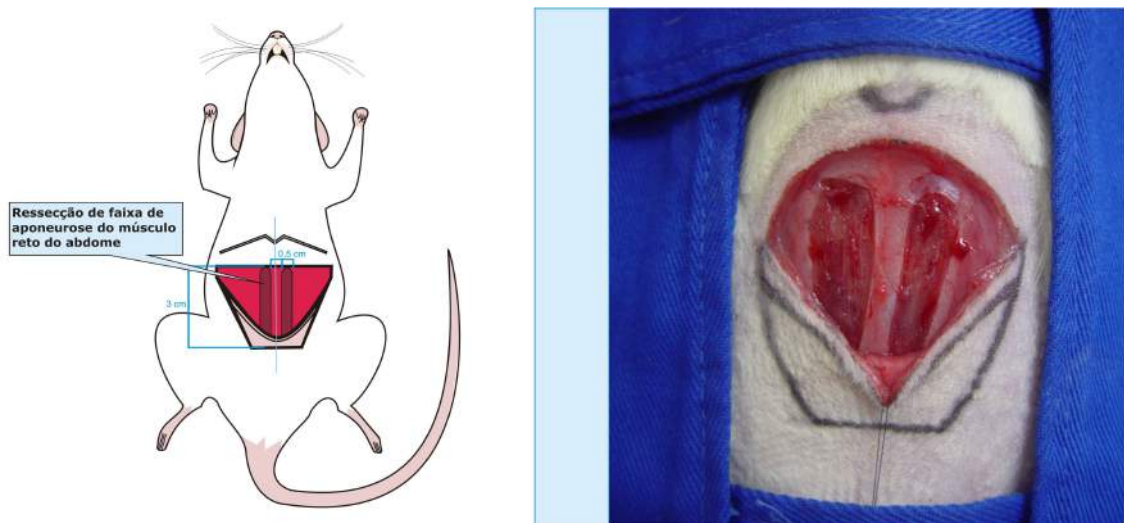
O retalho cutâneo foi incisado na porção cranial com bisturi lâmina 15 e descolado em toda a sua extensão, no sentido craniocaudal, no plano suprafascial, com secção dos vasos perfurantes (Figura 2).



**Figura 2.** Incisão e descolamento no sentido craniocaudal da área demarcada na abdominoplastia.

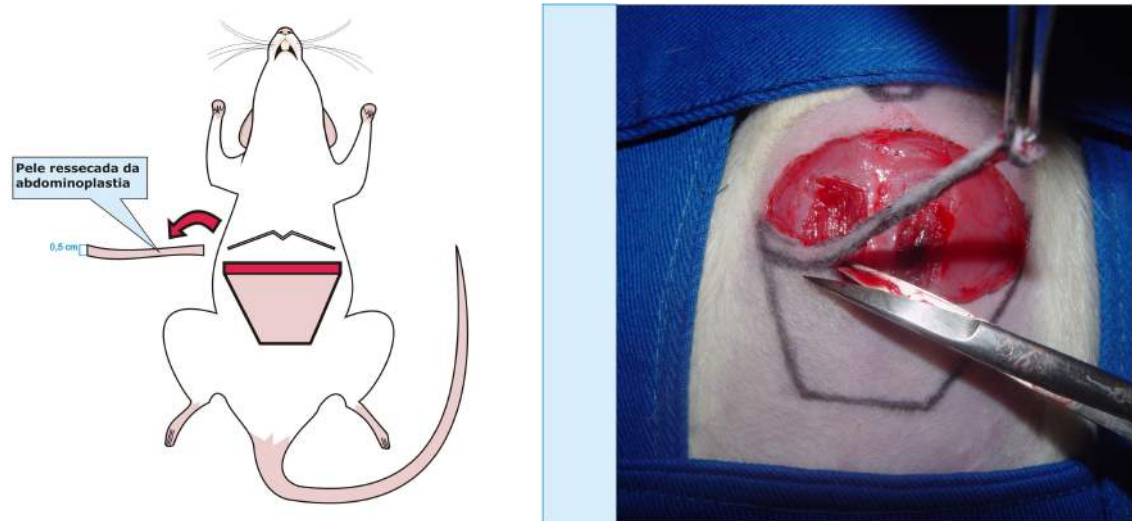


Duas faixas de aponeurose de meio centímetro por três centímetros, distando um quarto de centímetro da linha média, foram ressecadas no sentido longitudinal dos músculos retos do abdome, eliminando qualquer barreira à neovascularização (SEIFY, BILKAY, JONES, 2003a) (Figura 3).



**Figura 3.** Ressecção das faixas de aponeurose do músculo reto do abdome, durante a abdominoplastia.

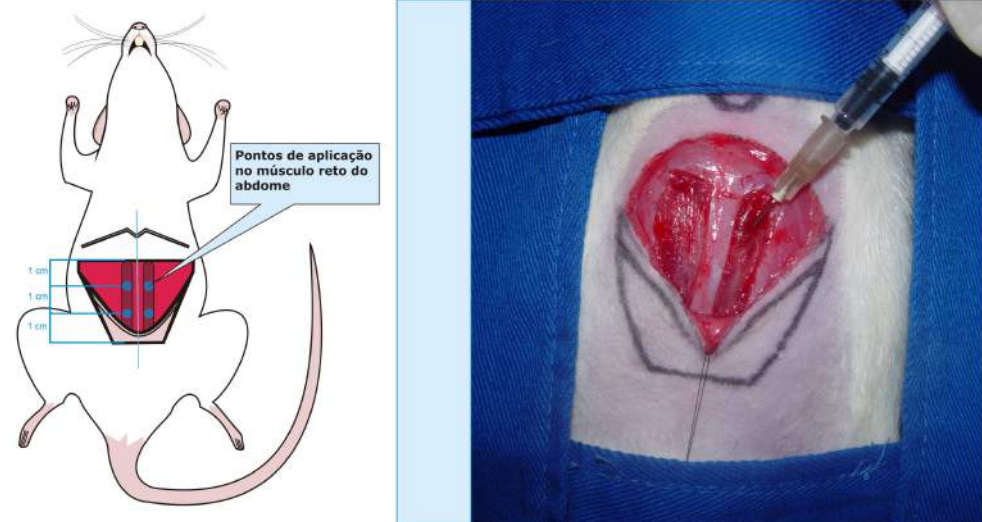
Uma faixa de pele de cinco centímetros de comprimento por meio centímetro de largura foi ressecada na base cranial e maior desse trapézio, simulando a ressecção de pele em uma abdominoplastia (HALLOCK & RICE, 1998; SEIFY, BILKAY, JONES, 2003a) (Figura 4).



**Figura 4.** Ressecção do segmento de pele simulando uma abdominoplastia.

#### 4.3.4 Aplicação do Vetor Plasmidial do VEGF e Eletroporação

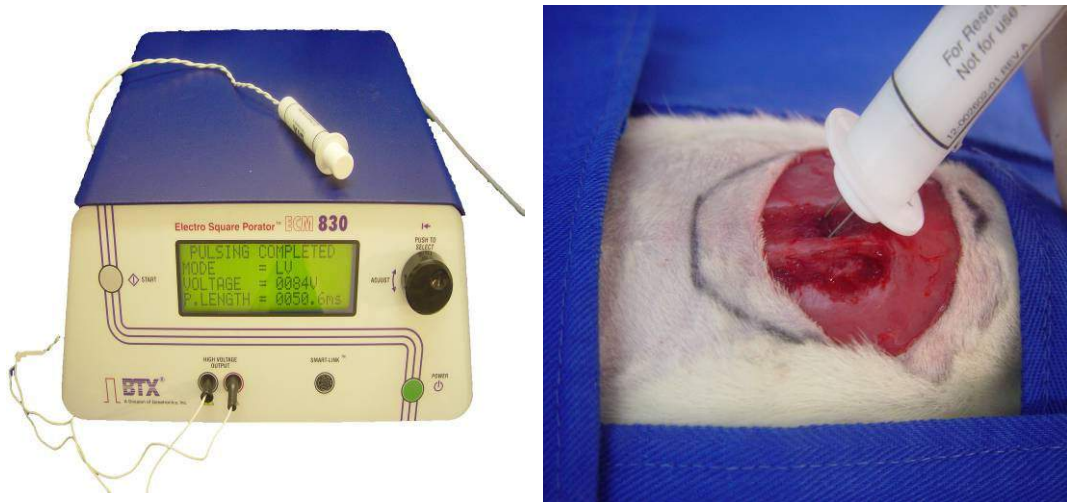
Durante a abdominoplastia foi aplicada a solução salina no grupo abdominoplastia, e no grupo plasmídeo, a solução com o vetor plasmidial sem o VEGF. No grupo VEGF foi aplicada uma dose total de 100  $\mu\text{g}$  de vetor plasmidial com o gene VEGF, em solução de PBS (*phosphate buffered saline solution*), via intramuscular, em dose única. Uma agulha 26 Gauge foi utilizada para a administração da solução em dois pontos em cada área onde ocorreu a ressecção da faixa de aponeurose. Os dois pontos de aplicação distavam um centímetro entre eles e um centímetro das extremidades. Cada ponto recebeu uma dose de 25  $\mu\text{g}$ , com tempo de aplicação de 5 segundos (Figura 5).



**Figura 5.** Aplicação da solução com seringa no músculo reto do abdome, durante a abdominoplastia.

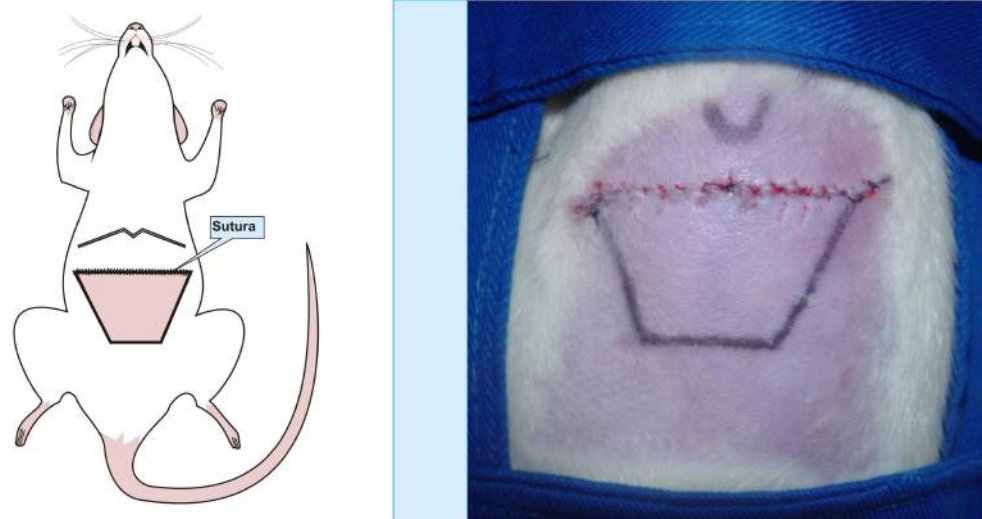
Trinta segundos após a aplicação (ANDRÉ *et al.*, 2008), em cada músculo reto do abdome, foi utilizada a eletroporação, com a introdução do eletrodo de agulha dupla no músculo, no centro da área de ressecção da fáscia. Utilizaram-se 3 pulsos de 80 volts (V), com duração de 50 milissegundos (ms) e intervalo de 1 segundo (s) entre os pulsos (MIR *et al.*, 2005). O equipamento utilizado foi o eletroporador ECM 830 (BTX, Holliston, Massachusetts, USA), com eletrodo de agulha dupla de meio centímetro. (Figura 6).

## 4. Métodos



**Figura 6.** Eletroporação após a aplicação da solução na abdominoplastia.

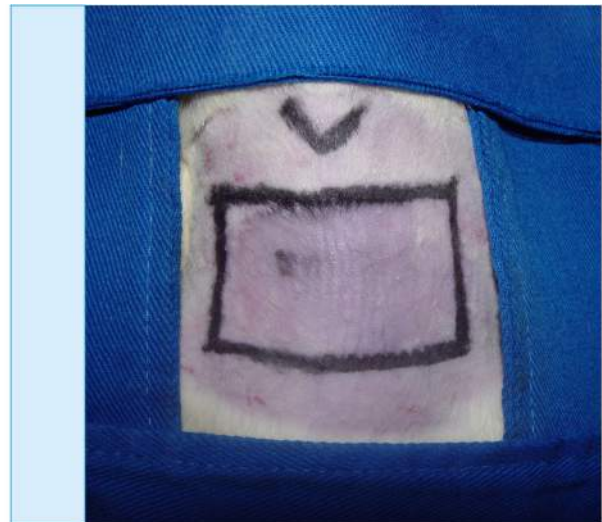
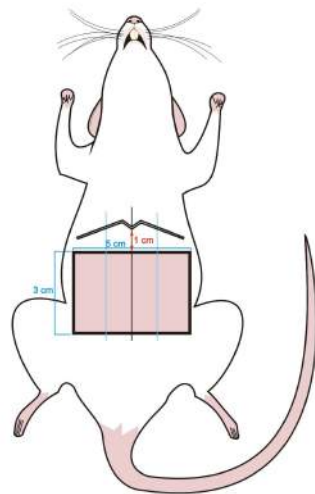
A síntese da pele foi realizada com sutura contínua de náilon monofilamentar 5-0 (Figura 7).



**Figura 7.** Sutura contínua da pele na abdominoplastia.

#### 4.3.5 Retalho Musculofasciocutâneo Abdominal Transverso do Músculo Reto do Abdome (DUNN & MALCOL, 1992; DUNN & MALCOL, 1993; HALLOCK & RICE, 1995; ELY, MILTERSTEINER, HOFF, 1997; ELY & FERREIRA, 2003)

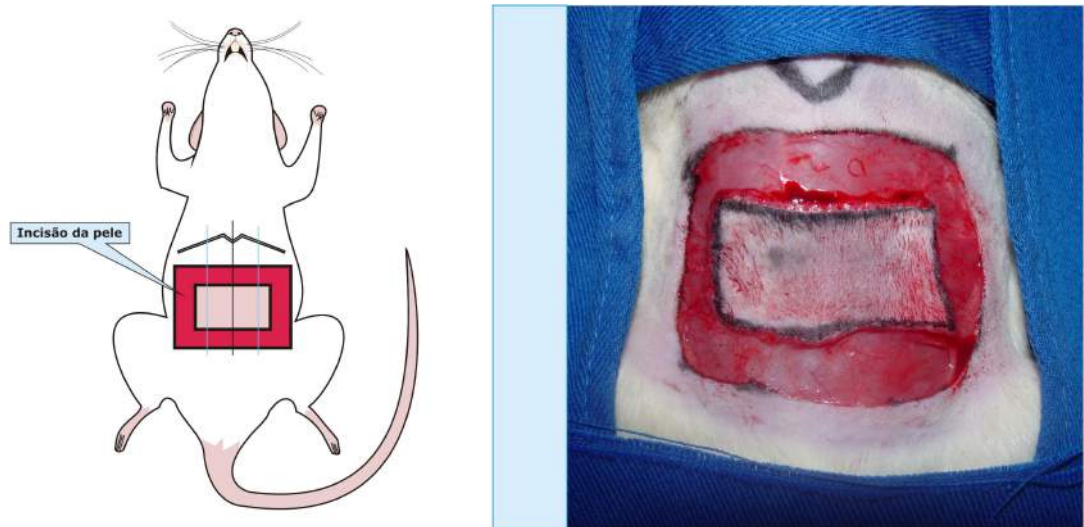
O retalho foi demarcado, na região ventral cranial, medindo cinco centímetros no sentido transversal, tomando-se a linha média como parâmetro e três centímetros no sentido longitudinal, distando um centímetro do *processus xiphoideus* (processo xifóide) (Figura 8).



**Figura 8.** Demarcação do retalho musculofasciocutâneo abdominal transverso do músculo reto do abdome.

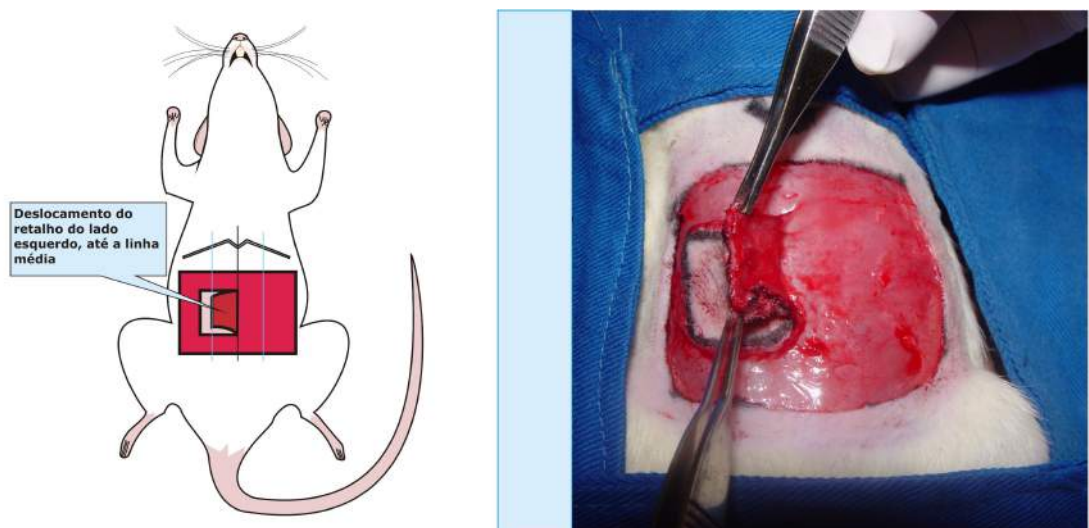
A incisão na pele foi realizada com bisturi lâmina 15, em toda a sua extensão, seguindo a demarcação prévia (Figura 9).





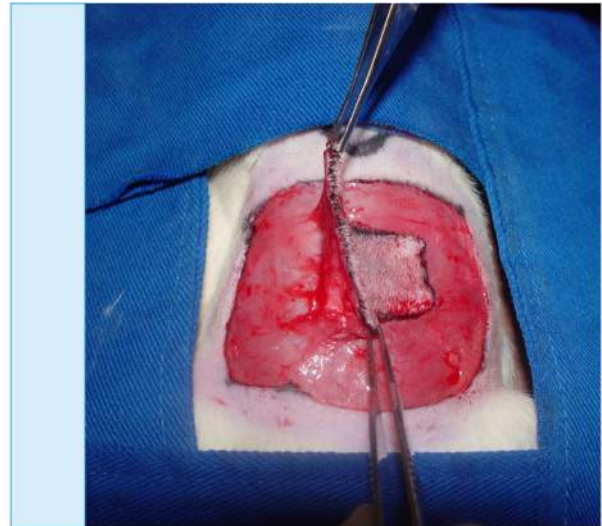
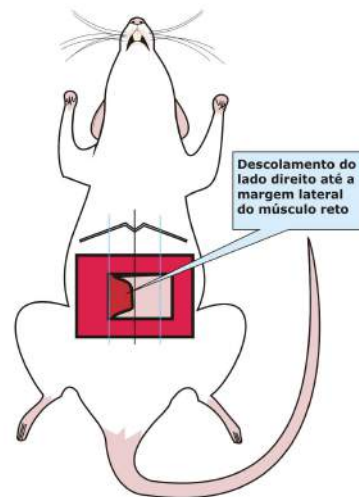
**Figura 9.** Incisão do retalho em toda a área pré-marcada.

O descolamento com tesoura foi feito no plano suprafascial. O segmento contralateral foi descolado até a linha média (Figura 10).



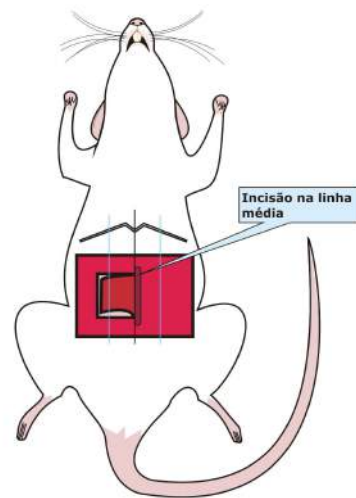
**Figura 10.** Descolamento do segmento contralateral do retalho até a linha média.

O segmento ipsilateral foi descolado da margem direita do retalho até a margem direita do músculo reto do abdome direito (Figura 11).

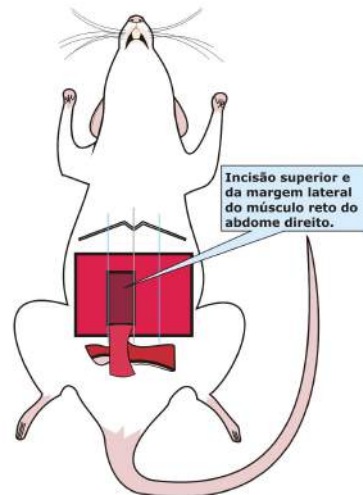


**Figura 11.** Descolamento da porção ipsilateral do retalho até a margem do músculo reto do abdome direito.

O retalho foi liberado com a incisão da linha média e separação dos músculos retos (Figura 12), incisão da porção cranial do músculo reto do abdome direito na mesma linha da incisão cutânea e incisão junto à margem direita do músculo reto do abdome direito (Figura 13).



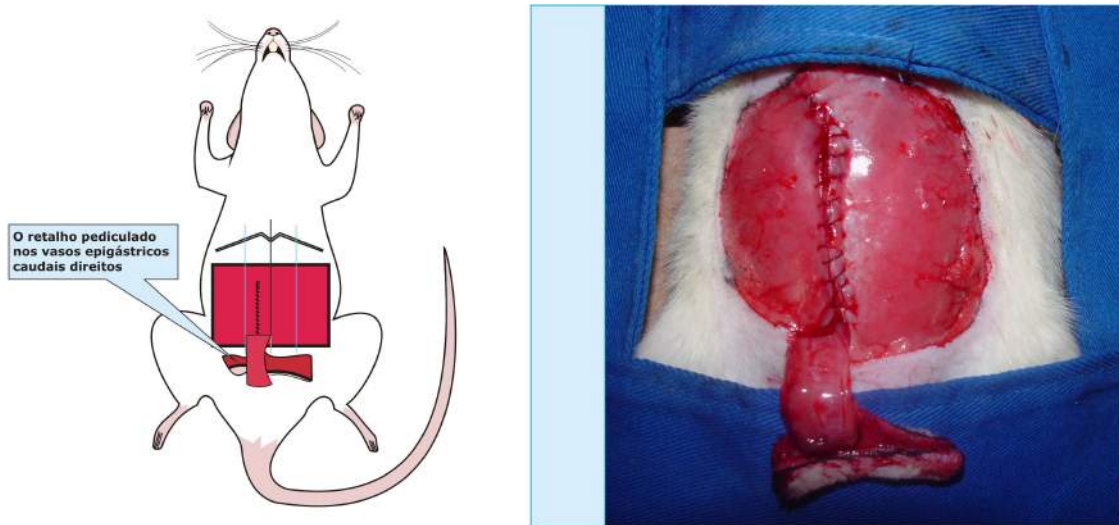
**Figura 12.** Incisão na linha média, com separação dos músculos retos do abdome.



**Figura 13.** Liberação do retalho, com incisão do músculo reto do abdome direito cranialmente.

Desta forma, o retalho foi rebatido caudalmente e permaneceu vascularizado apenas pelo pedículo caudal do músculo reto do abdome direito (Figura 14).

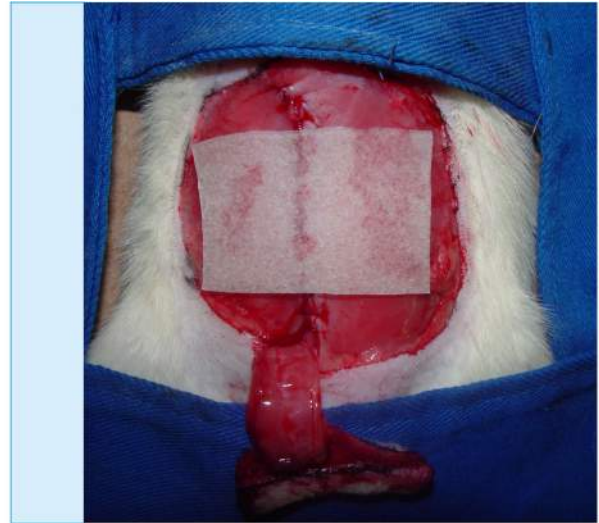
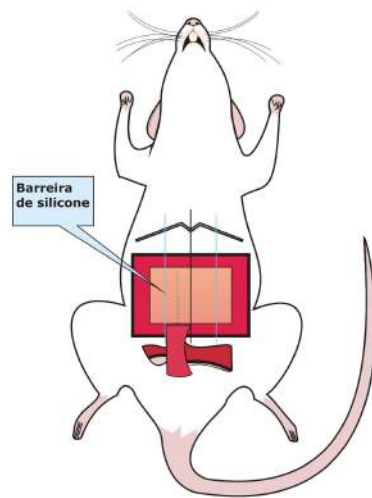




**Figura 14.** Retalho TRAM monopediculado nos vasos epigástricos caudais direitos.

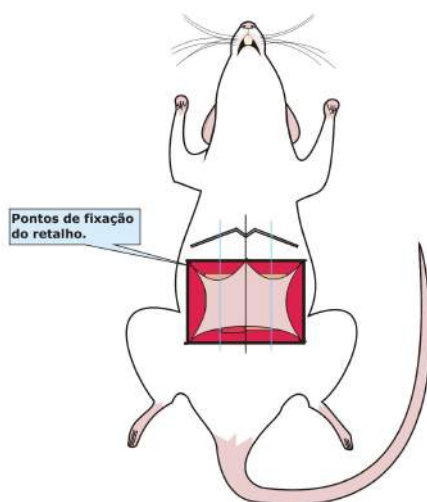
Procedimentos para a hemostasia não foram necessários e não foram realizados em nenhum animal.

Colocou-se uma lâmina de silicone de cinco centímetros de largura, três centímetros de comprimento e três milímetros de espessura, entre o retalho e a área doadora (HALLOCK & RICE, 1995a; HALLOCK & RICE, 1998) (Figura 15).



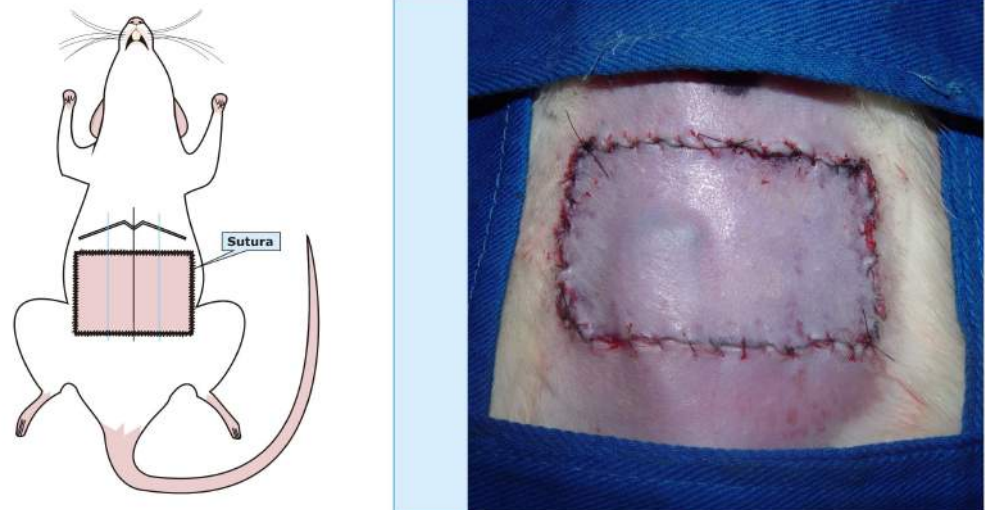
**Figura 15.** Colocação de barreira de silicone sob o retalho.

A síntese da parede abdominal foi realizada com sutura contínua de náilon monofilamentar 5-0. O retalho foi distribuído e fixado com pontos simples do mesmo fio nos quatro ângulos e no ponto médio cranial (Figura 16).



**Figura 16.** Distribuição e fixação do retalho TRAM.

A pele foi suturada de forma contínua, também com náilon monofilamentar 5-0 (Figura 17).



**Figura 17.** Sutura do retalho TRAM com sutura contínua.

Foi realizada a documentação fotográfica dos animais (*Sony Cybershot DSC F707; Sony, Japan*) com a máquina posicionada a 40 cm e etiqueta padronizada com o número do animal, medindo 2 cm (Apêndices). Realizou-se a colocação de um colar cervical de material plástico para evitar a autofagia do ferimento (ELY *et al.*, 1997). O colar foi fixado com quatro pontos de náilon 0, nas posições cranial, caudal, lateral direita e lateral esquerda. Os animais foram recolocados em gaiolas individuais, com ração (Anexo 4) e água à vontade.

#### 4.3.6 Avaliação da Área de Necrose

Em todos os grupos, após um período de cinco dias do procedimento do retalho TRAM (ZHANG *et al.*, 2001), os animais foram submetidos a anestesia, para avaliação da área de necrose do retalho.

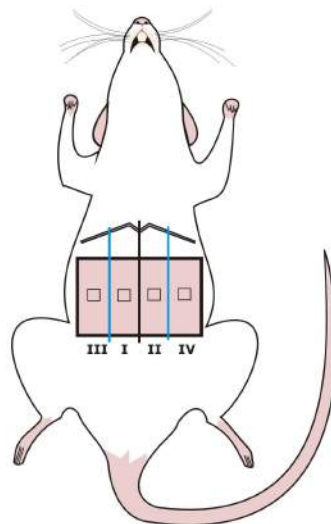
Os registros fotográficos dos retalhos foram transferidos para um computador. Utilizaram-se os recursos do programa *IMAGE TOOL* da *University of Texas Health Science Center in San Antonio* para obter a área total do retalho e a área de necrose do retalho, em centímetros quadrados (cm<sup>2</sup>). Calculou-se então, a porcentagem de necrose dos retalhos (ELY, GOLDENBERG, D'ACAMPORA, 1999; O'TOOLE *et al.*, 2002). Após o registro fotográfico, os animais foram submetidos a eutanásia, com superdosagem de anestésico.

#### 4.3.7 Avaliação Microscópica com HE e Imuno-histoquímica

Os retalhos TRAM foram divididos em quatro zonas distintas, e um fragmento de seis milímetros foi retirado do centro de cada zona. (LINEAWEAVER *et al.*, 2004). A zona chamada I compreende o segmento de pele entre a linha média e a margem lateral do músculo reto do abdome direito (pedículo). A zona II compreende o segmento entre a margem lateral do músculo reto do abdome esquerdo e a linha média. A

zona III compreende o segmento entre a margem lateral do músculo reto do abdome direito e a margem lateral direita do retalho, e a zona IV o segmento entre a margem lateral do músculo reto do abdome esquerdo e a margem esquerda do retalho (Figura 18).

Todos os tecidos foram avaliados, pela microscopia óptica, com coloração de hematoxilina eosina e imuno-histoquímica, com o uso do anticorpo HHF 35 (antiactina muscular específica, clone HHF 35 - *human heart factor*, *Dako Corporation, California, USA*), para avaliação da neovascularização.



**Figura 18.** Zonas do retalho TRAM e as áreas de biópsias.

#### 4.3.8 Preparação das Amostras para Imuno-histoquímica

Após a retirada das amostras do retalho, estas foram colocadas em formol tamponado a 10% até o momento do preparo das lâminas. O tecido clivado foi processado histologicamente utilizando-se banhos em gradiente de etanol e xilol e incluído em parafina. Os blocos resultantes foram microtomizados em cortes de 5  $\mu\text{m}$  e estes foram montados em lâminas histológicas previamente sinalizadas (*3-Aminopropyl-triethoxy-silane, Sigma A-3648, EUA*).

Após desparafinização e reidratação dos cortes, estes foram submetidos à reação imuno-histoquímica. Para a recuperação antigênica, as lâminas foram incubadas em solução de ácido cítrico dez milimolar (mM), potencial hidrogeniônico (pH) 6.0, em fervura na panela de pressão (Eterna, Nigro), por quatro minutos a partir da pressurização total. Logo após, a panela foi resfriada sob água corrente e as lâminas foram lavadas em água corrente e destilada. Foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com  $\text{H}_2\text{O}_2$  6%, com três trocas de dez minutos cada, e posteriormente as lâminas foram lavadas novamente em água corrente e destilada.

Após a fase de bloqueio da peroxidase, as lâminas foram lavadas com solução salina tamponada com fosfatos (*PBS-phosphate buffered saline*) dez mM, pH 7,4, por cinco minutos. Logo após, foram incubadas com o anticorpo antiactina muscular específica (HHF 35), diluído 1/200 em tampão PBS contendo soroalbumina bovina (BSA) 1% (*Sigma, A9647, USA*) e azida sódica ( $\text{NaN}_3$ ) 0,1%, durante 120 minutos, a 37°Celsius (°C).

**QUADRO 1** Anticorpo utilizado na imuno-histoquímica

Anticorpo	Clone	Diluições	Fabricantes/códigos
Actina (antimúsculo) clone HHF 35	Anticorpo monoclonal produzido em camundongo anti actina alfa e gama	1:200	Dako Corporation/M0635, California, EUA

As lâminas foram lavadas em tampão PBS com três trocas de três minutos cada, e a revelação da reação foi feita utilizando-se o método da estreptavidina-biotina-peroxidase (*kit LSAB+*, *Dako K0690, USA*).

As lâminas foram reveladas em solução substrato cromógeno: 3,3' *diaminobenzidine tetrahydrochloride* (DAB) 100 mg% (*Sigma, D-5637, USA*); 1 mL dimetilsulfóxido (DMSO); 1 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 6%; 100 mL PBS por 5 minutos a 37°C, ao abrigo da luz.

As lâminas controle foram observadas ao microscópio para o desenvolvimento de precipitado castanho alaranjado, com o produto final da reação. Depois, foram lavadas em água corrente e destiladas, contracoradas com hematoxilina de Harris por seis minutos e lavadas novamente em água corrente e destilada.

Logo após, foram imersas duas vezes em água amoniacal (solução de hidróxido de amônia 0,5%), sendo lavadas em seguida em água corrente e destilada. Para a desidratação das lâminas, foram imersas em etanol 50% por 30 segundos, etanol 80% por 30 segundos, etanol 95% por 30 segundos, etanol 80% por 30 segundos, etanol 95% por 30 segundos, etanol 100% por 30 segundos cada e xilol quatro vezes por 30 segundos cada.

Após esse procedimento, as lâminas foram montadas com Entellan Neu (*Merck, 1.07961, Germany*).

#### 4.3.9 Quantificação da Densidade Microvascular

A visualização dos cortes histológicos foi realizada utilizando-se microscópio óptico trinocular, marca Olympus, acoplado a máquina fotográfica digital marca Sony, para captação das imagens. Inicialmente, foi realizado um exame sob lente panorâmica a um aumento de 100 X para identificação das áreas de maior densidade microvascular (*hot spot*). Uma vez identificada essa área, procedeu-se à captação da imagem com uma lente ocular de 10 X e objetiva de 40 X, totalizando um aumento de 400 X. A imagem captada foi transferida para o programa *IMAGE TOOL* da *University of Texas Health Science Center in San Antonio* e submetida à análise morfométrica para contagem dos vasos. Para a leitura morfométrica, foram observadas cinco imagens que correspondiam a cinco campos em cada lâmina. O estudo quantitativo foi realizado por dois pesquisadores que não tinham conhecimento do grupo ao qual as lâminas pertenciam.

#### 4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística de todas as informações coletadas neste trabalho foi inicialmente feita de forma descritiva. Para a área de necrose, porcentagem de necrose e contagem média de vasos nas zonas I, II, III, IV



e na soma das zonas, foram calculadas algumas medidas-resumo, como média e desvio-padrão, além da confecção de gráficos do tipo *boxplot* e diagrama de dispersão.

As análises inferenciais empregadas com o intuito de confirmar ou refutar evidências encontradas na análise descritiva foram:

- Análise de variância (ANOVA), com um fator fixo na comparação da porcentagem de necrose do retalho, área de necrose e contagem média de vasos entre os grupos: TRAM, Abdominoplastia, Plasmídeo e VEGF.
- Comparações múltiplas pelo método de LSD quando a suposição de homocedasticidade (igualdade de variâncias) entre os níveis do fator fixo da ANOVA for satisfeita.
- Teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar se a contagem média de vasos nas zonas I, II, III, IV e na soma das zonas apresenta distribuição normal.
- Teste de Levene para verificar se a contagem média de vasos nas zonas I, II, III, IV e na soma das zonas apresentou a mesma variância entre os grupos: VEGF, Plasmídeo, Abdominoplastia e TRAM (homocedasticidade).
- Estimação do coeficiente de correlação intraclass e construção do gráfico de Bland-Altman com o objetivo de estudar e quantificar a concordância entre dois avaliadores quanto à contagem média de vasos (concordância interobservador).
- Estimação dos coeficientes de correlação linear de Pearson e de Spearman entre a porcentagem de necrose e a contagem média de vasos nas zonas I, II, III, IV e na soma das zonas, com o objetivo de

quantificar, respectivamente, a relação linear e tendência de crescimento entre essas variáveis.

Em todas as conclusões obtidas através das análises inferenciais, foi utilizado o nível de significância  $\alpha$  igual a 5%.

Os dados foram digitados em planilhas do programa *Excel 2003 for Windows* para o adequado armazenamento das informações. As análises estatísticas foram realizadas com o programa *Statistical Package for Social Sciences (SPSS) versão 11.0 for Windows*.

## **5. RESULTADOS**

Nenhum animal apresentou infecção de ferida operatória. Três animais, um do grupo TRAM, um do grupo Abdominoplastia e um do grupo VEGF, apresentaram óbito após o procedimento do retalho TRAM, sem causa definida na necrópsia.

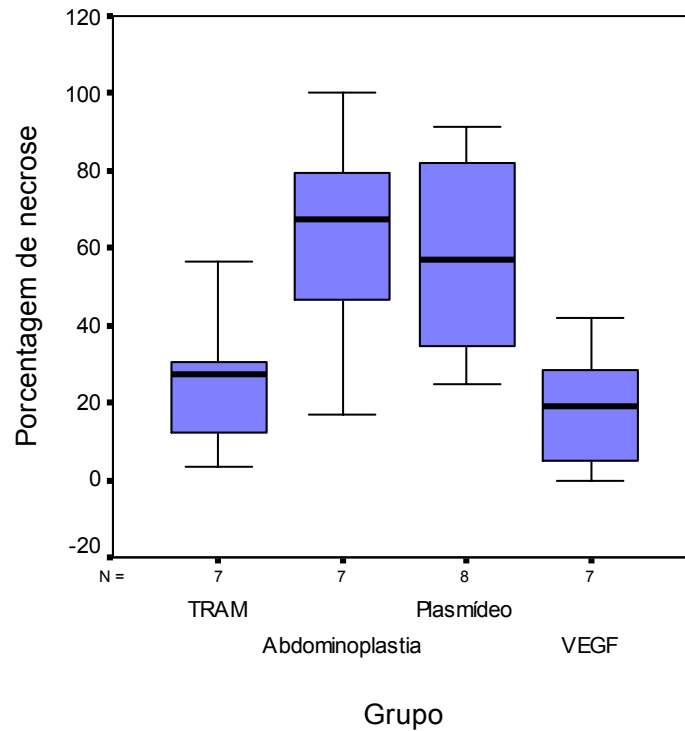
### 5.1. VIABILIDADE DOS RETALHOS

Para o estudo da viabilidade dos retalhos calculou-se a porcentagem de necrose do retalho (Tabela 1) a partir da mensuração da área total do retalho e da área de necrose do retalho.

**TABELA 1** - Porcentagem total de necrose do retalho TRAM

Grupo I TRAM	Grupo II Abdominoplastia	Grupo III Plasmídeo	Grupo IV VEGF
5,34	100,0	34,50	0
27,47	41,14	24,90	2,28
33,37	86,44	34,91	7,80
56,53	17,21	78,67	18,80
18,88	67,64	84,84	35,27
27,70	52,26	91,61	42,17
3,29	72,80	62,57	22,04
-	-	51,03	-
<b>Média</b> 24,65	62,49	57,80	18,33
<b>Mediana</b> 27,47	67,64	56,80	18,80

O gráfico *Boxplot* descreve o comportamento dessas informações em cada um dos grupos avaliados (Figura 19).



**Figura 19.** *Boxplot* da porcentagem total de necrose.

Com o intuito de verificar se os grupos apresentam valores médios estatisticamente iguais de porcentagem total de necrose, foi utilizado o teste ANOVA. Os resultados inferenciais revelaram que os grupos apresentam diferenças significantes entre os valores médios de porcentagem total de necrose ( $p = 0,001$ ). A Tabela 2 apresenta os resultados das comparações entre os grupos.

**TABELA 2** - Comparações da porcentagem total de necrose do retalho entre os grupos

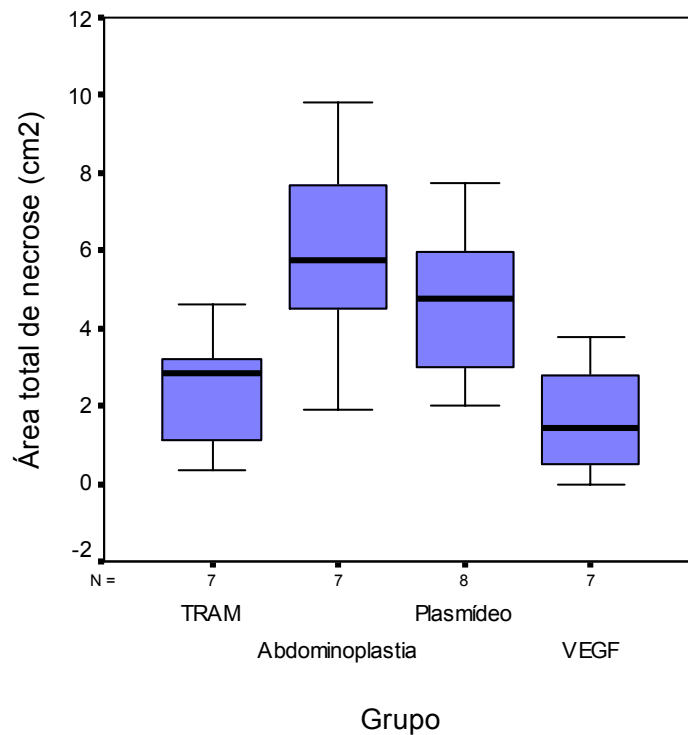
Grupos comparados		Conclusão	Nível descritivo (p)
TRAM	Abdominoplastia	TRAM < Abdominoplastia	<b>0,004</b>
TRAM	Plasmídeo	TRAM < Plasmídeo	<b>0,009</b>
TRAM	VEGF	TRAM = VEGF	0,606
Abdominoplastia	Plasmídeo	Abdominoplastia = Plasmídeo	0,697
Abdominoplastia	VEGF	Abdominoplastia > VEGF	<b>0,001</b>
Plasmídeo	VEGF	Plasmídeo > VEGF	<b>0,002</b>

De acordo com os resultados demonstrados, foram encontradas diferenças significantes entre o grupo I (TRAM) e os grupos II (Abdominoplastia) e III (Plasmídeo), que apresentaram maior porcentagem de necrose. O grupo IV apresentou menor porcentagem de necrose, significantemente menor em comparação com os grupos II (Abdominoplastia) e III (Plasmídeo). Não houve diferença significativa entre os grupos Abdominoplastia e Plasmídeo e entre os grupos TRAM e VEGF.

A mesma análise foi feita para a área total de necrose (Tabela 3). O gráfico *Boxplot* descreve o comportamento dessas informações em cada um dos grupos avaliados (Figura 20).

**TABELA 3** - Área total de necrose em centímetros quadrados (cm<sup>2</sup>)

Grupo I TRAM	Grupo II Abdominoplastia	Grupo III Plasmídeo	Grupo IV VEGF
0,59	9,81	3,30	0
2,86	3,46	2,03	0,23
2,98	7,65	2,72	0,77
4,63	1,88	7,71	1,42
1,69	5,75	5,99	3,63
3,46	5,54	4,81	3,77
0,33	7,71	5,92	1,92
-	-	4,69	-
<b>Média</b> 2,36	5,97	4,65	1,68
<b>Mediana</b> 2,86	5,75	4,75	1,42

**Figura 20.** Boxplot da área total de necrose.

Os resultados da ANOVA revelaram que os grupos apresentam diferenças significantes entre os valores médios de área total de necrose ( $p = 0,001$ ). A Tabela 4 apresenta os resultados das comparações entre os grupos.

**TABELA 4** - Comparações da área total de necrose entre os grupos

Grupos comparados		Conclusão	Nível descritivo (p)
TRAM	Abdominoplastia	TRAM < Abdominoplastia	<b>0,002</b>
TRAM	Plasmídeo	TRAM < Plasmídeo	<b>0,035</b>
TRAM	VEGF	TRAM = VEGF	0,523
Abdominoplastia	Plasmídeo	Abdominoplastia = Plasmídeo	0,207
Abdominoplastia	VEGF	Abdominoplastia > VEGF	<b>&lt; 0,001</b>
Plasmídeo	VEGF	Plasmídeo > VEGF	<b>0,008</b>

De acordo com os resultados demonstrados, foram encontradas diferenças significantes entre o grupo I (TRAM) e os grupos II (Abdominoplastia) e III (Plasmídeo), que apresentaram maior área de necrose. O grupo IV apresentou área de necrose significantemente menor em comparação com os grupos II (Abdominoplastia) e III (Plasmídeo). Entre os grupos Abdominoplastia e Plasmídeo e entre os grupos TRAM e VEGF não houve diferenças significantes.

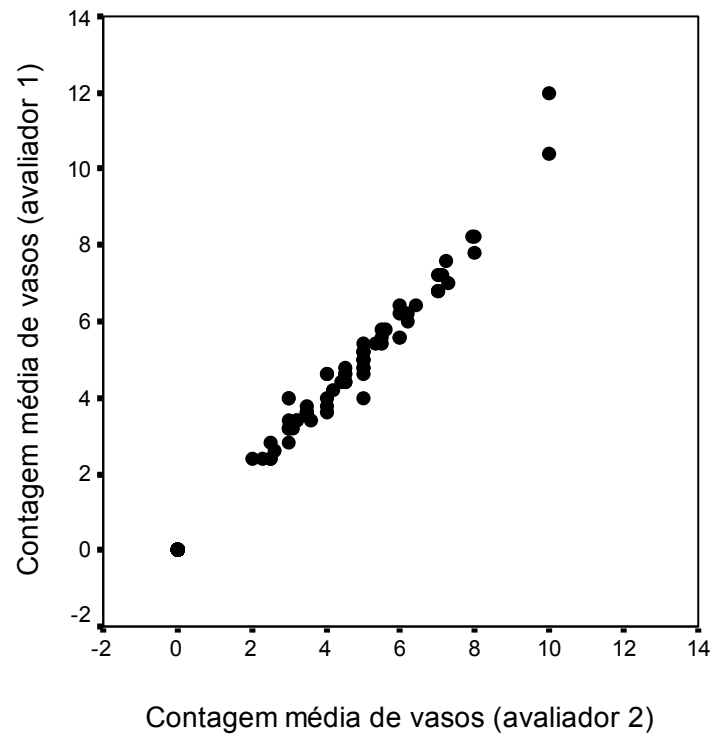


## 5.2 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA DOS VASOS

O estudo da concordância entre os dois avaliadores (avaliador 1 e avaliador 2) quanto à contagem média de vasos foi realizada inicialmente pela construção do diagrama de dispersão (Figura 21).

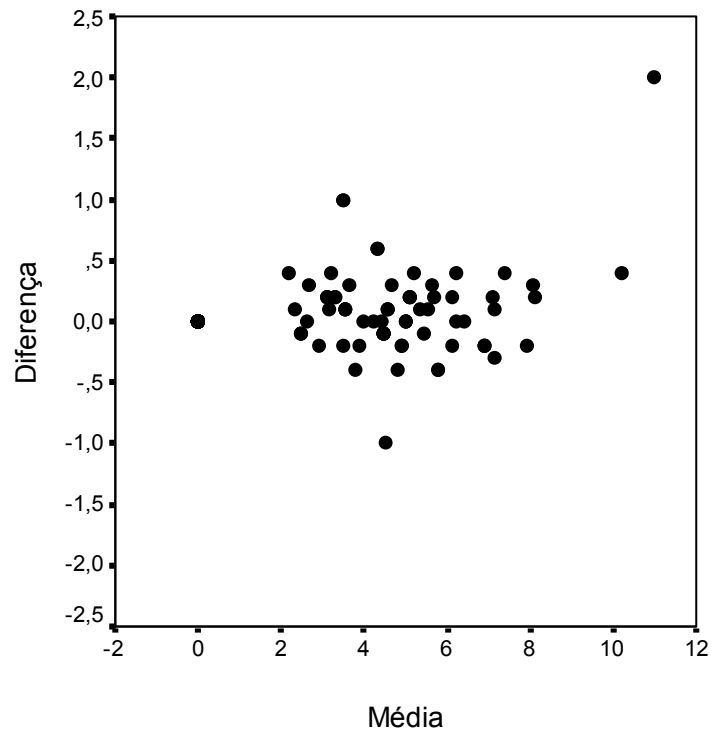
Nessa situação, foram selecionados 29 ratos, e nestes foram feitas leituras para quatro zonas (I, II, III e IV). A leitura de cada zona foi a média aritmética de cinco campos distintos. Desta forma, cada avaliador fez 116 leituras (4 medidas em 29 ratos).

O comportamento conjunto dos avaliadores para as 116 leituras, resumido na Figura 21, evidencia a forte concordância entre os avaliadores. O valor do coeficiente de correlação intraclasse corrobora essa evidência, pois foi de 0,994, com intervalo de confiança de 95%, dado por [0,991;0,996].



**Figura 21.** Diagrama de dispersão da contagem média de vasos entre os avaliadores 1 e 2.

O gráfico de Bland-Altman revela que as diferenças entre as medidas dos dois avaliadores se distribuem aleatoriamente ao redor do zero (Figura 22).



**Figura 22.** Diagrama de dispersão entre a diferença e a média das medidas obtidas pelos dois avaliadores (gráfico de Bland-Altman).

Dados os resultados obtidos anteriormente, que mostraram uma alta concordância entre as leituras dos avaliadores 1 e 2, utilizaram-se, nos resultados a seguir, as medidas obtidas pelo avaliador 1.

Algumas medidas-resumo da porcentagem de necrose e a contagem média de vasos nas zonas I, II, III, IV e na soma das zonas podem ser obtidas na Tabela 5.

**TABELA 5** - Valores de média e desvio-padrão (dp) da porcentagem total de necrose e contagem média de vasos nas zonas I, II, III, IV e na soma das zonas

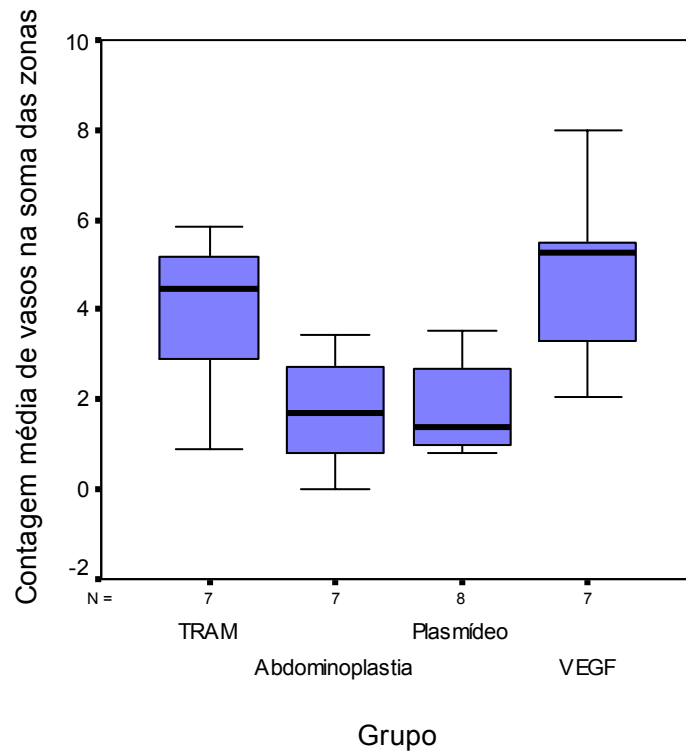
	TRAM (n = 7)		Abdominoplastia (n = 7)		Plasmídeo (n = 8)		VEGF (n = 7)	
	média	dp	média	dp	média	dp	média	dp
Porcentagem de necrose	24,65	18,13	62,50	28,06	57,88	25,43	18,34	16,20
Contagem* de vasos na zona I	4,37	1,47	3,63	2,09	4,08	2,29	5,80	2,90
Contagem* de vasos na zona II	3,74	2,74	1,37	1,82	1,68	2,46	5,26	1,77
Contagem* de vasos na zona III	5,40	2,91	2,03	2,55	1,48	2,16	4,71	3,23
Contagem* de vasos na zona IV	2,14	2,68	0,00	0,00	0,00	0,00	3,03	3,16
Contagem de vasos da soma das zonas**	3,91	1,80	1,76	1,28	1,81	1,06	4,70	1,99

\* Contagem média

\*\*Contagem média da soma das zonas I, II, III e IV

Com interesse em verificar a existência ou não de diferenças significantes entre o número de vasos encontrados nos quatro grupos, foi aplicada a análise de variância com um fator fixo (ANOVA) na comparação de médias de variáveis quantitativas de grupos independentes. O nível de significância foi estabelecido em 0,05. As suposições de normalidade da Contagem média de vasos e igualdade de variâncias entre os grupos exigidas para o adequado uso da ANOVA foram satisfeitas

(Apêndices). O gráfico *Boxplot* mostra o comportamento dessas informações em cada um dos grupos avaliados (Figura 23).



**Figura 23.** *Boxplot* da contagem média de vasos da soma das zonas.

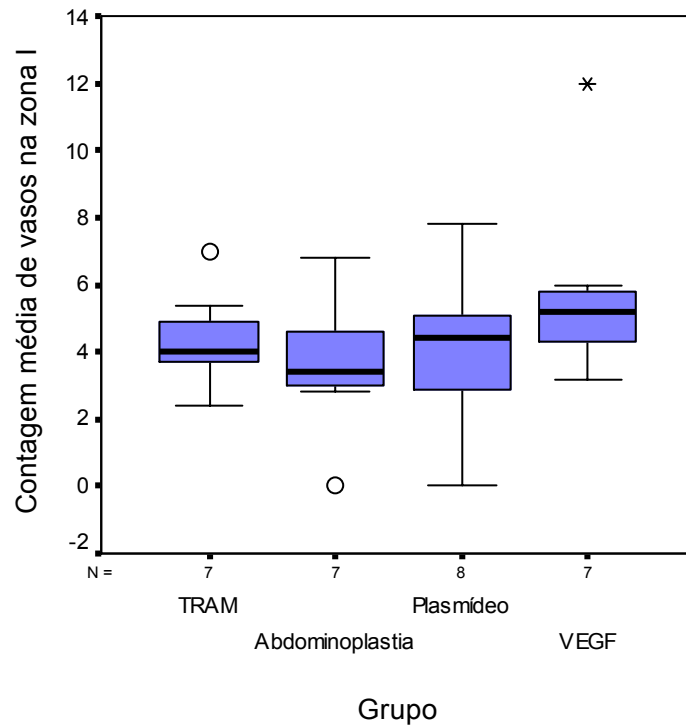
Os resultados revelaram que os grupos apresentam diferenças entre as médias de vasos encontrados no retalho TRAM. Foram encontradas diferenças significantes entre o grupo I (TRAM), que apresentou maior número de vasos, e os grupos II (Abdominoplastia) e III (Plasmídeo). O grupo IV apresentou número de vasos significantemente maior em comparação com os grupos II (Abdominoplastia) e III (Plasmídeo). Entre os grupos Abdominoplastia e Plasmídeo e entre os grupos TRAM e VEGF não houve diferenças significantes (Tabela 6).

**TABELA 6** - Comparações do número de vasos do retalho TRAM entre os grupos

Grupos comparados		Conclusão	Nível descritivo (p)
TRAM	Abdominoplastia	TRAM > Abdominoplastia	<b>0,016</b>
TRAM	Plasmídeo	TRAM > Plasmídeo	<b>0,015</b>
TRAM	VEGF	TRAM = VEGF	0,355
Abdominoplastia	Plasmídeo	Abdominoplastia = Plasmídeo	0,952
Abdominoplastia	VEGF	Abdominoplastia < VEGF	<b>0,002</b>
Plasmídeo	VEGF	Plasmídeo < VEGF	<b>0,001</b>

Com o objetivo de verificar a existência ou não de diferenças significantes entre as médias dos grupos referentes aos vasos sanguíneos nas zonas I do TRAM, foi aplicado o teste ANOVA. O gráfico *Boxplot* mostra o comportamento dessas informações em cada um dos grupos avaliados (Figura 24). O nível de significância foi estabelecido em 0,05.

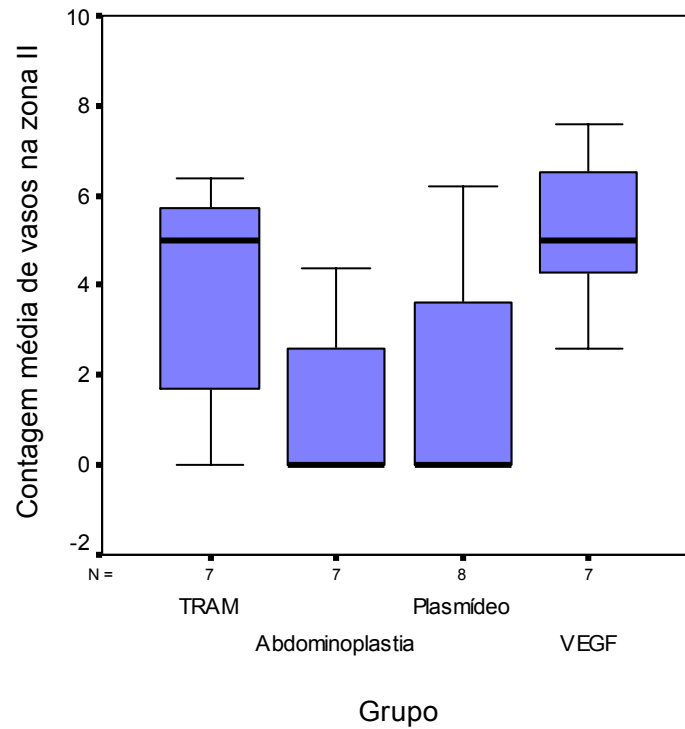
Os resultados revelaram que os grupos não apresentam diferenças entre as médias de vasos encontrados na zona I do retalho TRAM (Apêndices).



**Figura 24.** *Boxplot* da contagem média de vasos sanguíneos na zona I do retalho TRAM nos grupos.

O gráfico *Boxplot* mostra o comportamento dos grupos avaliados para a contagem de vasos da zona II do retalho TRAM (Figura 25). Com o intuito de avaliar possíveis diferenças ou não entre os grupos para o número de vasos encontrados na zona II, foi aplicado o teste ANOVA. Foi estabelecido o nível de significância  $\alpha$  igual a 5%.

## 5. Resultados



**Figura 25.** *Boxplot* da contagem média de vasos sanguíneos na zona II do retalho TRAM nos grupos.

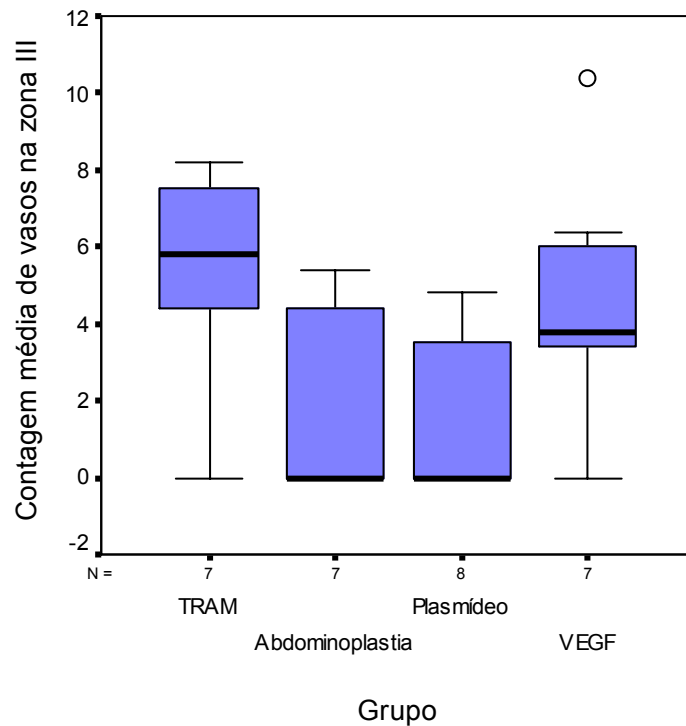
Os resultados encontrados mostraram diferença significativa no número de vasos encontrados na zona II do retalho TRAM, com um maior número de vasos no grupo VEGF, comparado com os grupos Abdominoplastia e Plasmídeo (Tabela 7).



**TABELA 7** - Comparações do número de vasos da zona II do retalho TRAM entre os grupos.

Grupos comparados		Conclusão	Nível descritivo (p)
TRAM	Abdominoplastia	TRAM = Abdominoplastia	0,059
TRAM	Plasmídeo	TRAM = Plasmídeo	0,087
TRAM	VEGF	TRAM = VEGF	0,218
Abdominoplastia	Plasmídeo	Abdominoplastia = Plasmídeo	0,796
Abdominoplastia	VEGF	Abdominoplastia < VEGF	<b>0,003</b>
Plasmídeo	VEGF	Plasmídeo < VEGF	<b>0,005</b>

Para determinar a existência ou não de diferenças significantes entre as médias dos grupos referentes aos vasos sanguíneos nas zonas III do retalho TRAM, foi aplicado o teste ANOVA, com nível de significância estabelecido em 0,05. O gráfico *Boxplot* descreve o comportamento da média de vasos encontrados na zona III (Figura 26).



**Figura 26.** *Boxplot* da contagem média de vasos sanguíneos na zona III do retalho TRAM nos grupos.

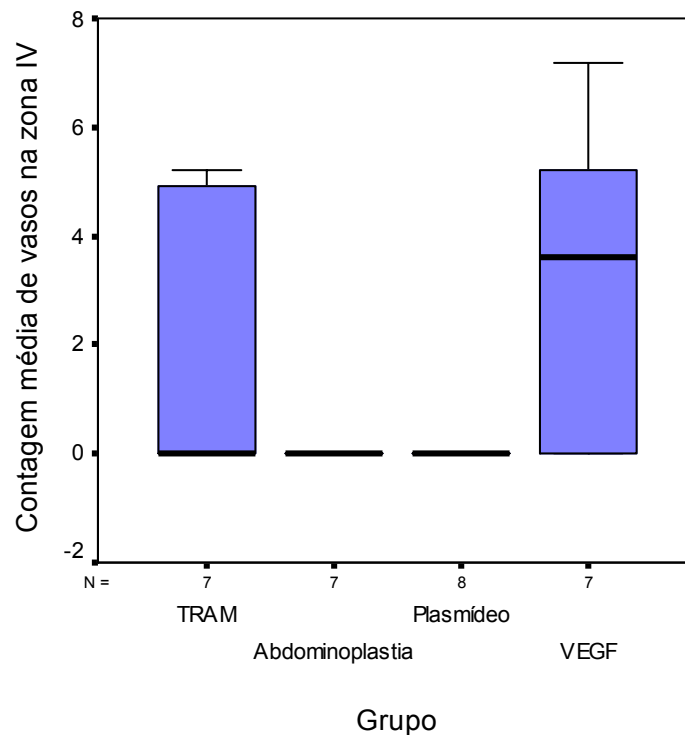
**TABELA 8** - Comparações do número de vasos da zona III do retalho TRAM entre os grupos.

Grupos comparados		Conclusão	Nível descritivo (p)
TRAM	Abdominoplastia	TRAM > Abdominoplastia	<b>0,029</b>
TRAM	Plasmídeo	TRAM > Plasmídeo	<b>0,010</b>
TRAM	VEGF	TRAM = VEGF	0,642
Abdominoplastia	Plasmídeo	Abdominoplastia = Plasmídeo	0,698
Abdominoplastia	VEGF	Abdominoplastia = VEGF	0,077
Plasmídeo	VEGF	Plasmídeo < VEGF	<b>0,030</b>

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 8, o grupo TRAM apresentou maior número de vasos na zona III quando comparado com os grupos Abdominoplastia e Plasmídeo.

O grupo VEGF apresentou um maior número de vasos quando comparado com o grupo Plasmídeo.

Para a zona IV do retalho TRAM, todos os grupos foram comparados para verificar a existência ou não de diferenças significantes entre as médias referentes ao número de vasos sanguíneos (Figura 27).



**Figura 27.** *Boxplot* da contagem média de vasos sanguíneos na zona IV do retalho TRAM nos grupos.

Utilizou-se o teste ANOVA, com nível de significância estabelecido em 0,05 (Apêndices). Os grupos Abdominoplastia e Plasmídeo não apresentaram nenhum vaso na zona IV do retalho TRAM e não foram incluídos no teste ANOVA.

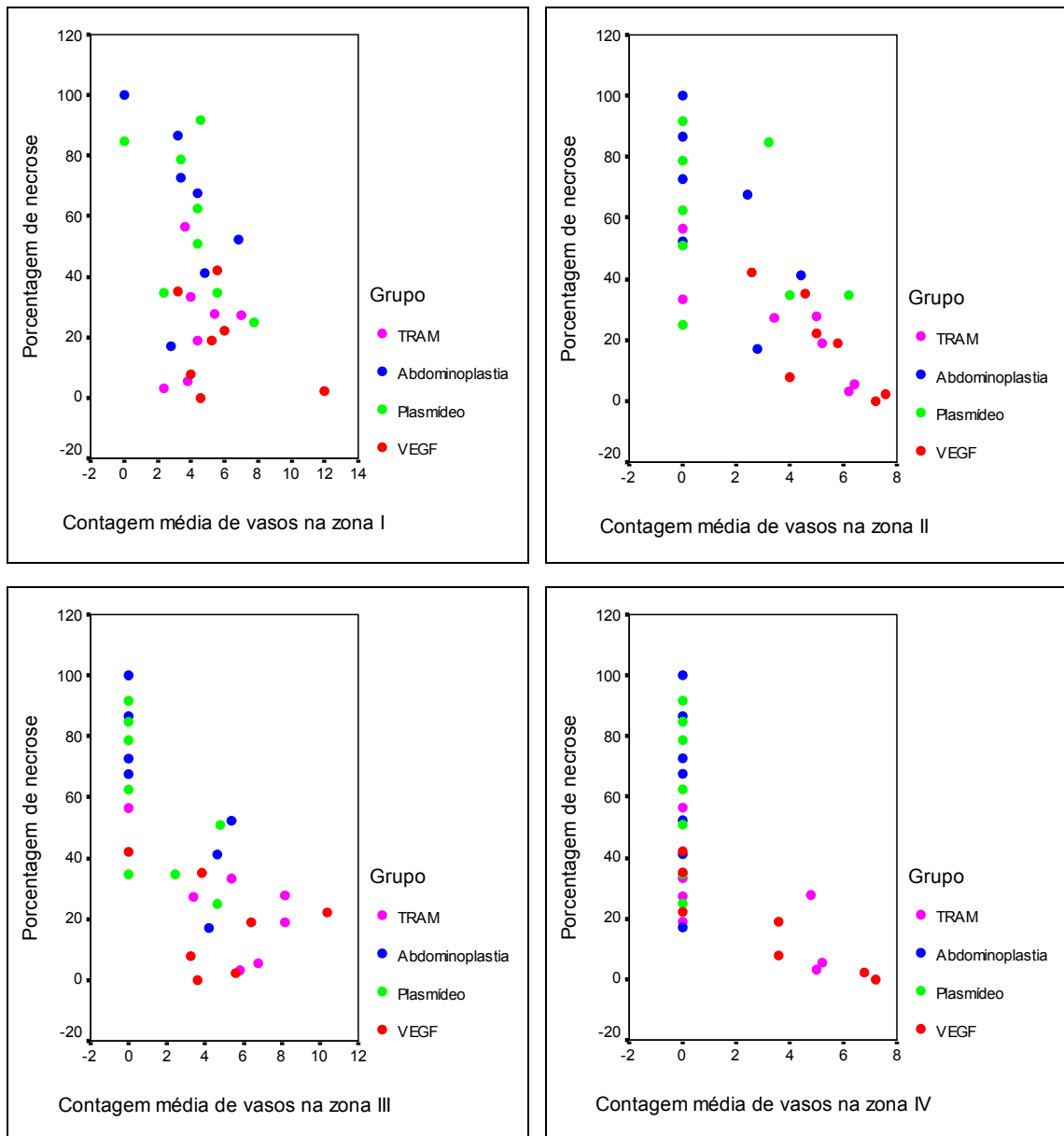
De acordo com os resultados apresentados na Tabela 11 (Apêndices), os grupos VEGF e TRAM não apresentaram diferenças estatisticamente significantes em relação ao número de vasos presentes na zona IV do retalho TRAM.

### **5.3 CORRELAÇÃO ENTRE NECROSE E CONTAGEM DE VASOS**

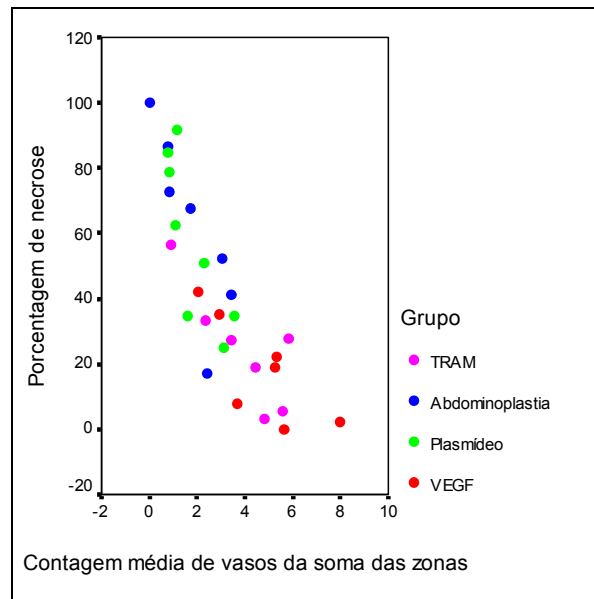
O estudo da correlação entre a porcentagem de necrose e a contagem média de vasos nas zonas I, II, III, IV e na soma das zonas também foi avaliada neste estudo.

Inicialmente, descreveram-se os comportamentos dessas informações através das Figuras 28 e 29.

## 5. Resultados



**Figura 28.** Diagrama de dispersão entre porcentagem de necrose e contagem média de vasos nas zonas I, II, III e IV.



**Figura 29.** Diagrama de dispersão entre porcentagem de necrose e contagem média de vasos na soma das zonas.

Os gráficos das Figuras 28 e 29 sugerem que a contagem média de vasos diminui quando aumenta a porcentagem de necrose. Este fato é confirmado através das estimativas dos coeficientes de correlação linear de Pearson e de postos de Spearman apresentados na Tabela 9, em que se evidenciou uma correlação decrescente e significativa entre a porcentagem de necrose e a contagem média de vasos nas zonas I, II, III, IV e na soma das zonas.

**TABELA 9** - Coeficientes de correlação linear de Pearson e de postos de Spearman entre a porcentagem de necrose e a contagem média de vasos nas zonas I, II, III, IV e na soma das zonas

		Pearson	Spearman
Porcentagem de necrose e contagem média de vasos na zona I	coeficiente	-0,454	-0,315
	p	0,013	0,096
	N	29	29
Porcentagem de necrose e contagem média de vasos na zona II	coeficiente	-0,748	-0,767
	p	< 0,001	< 0,001
	N	29	29
Porcentagem de necrose e contagem média de vasos na zona III	coeficiente	-0,710	-0,720
	p	< 0,001	< 0,001
	N	29	29
Porcentagem de necrose e contagem média de vasos na zona IV	coeficiente	-0,633	-0,696
	p	< 0,001	< 0,001
	N	29	29
Porcentagem de necrose e contagem média de vasos da soma das zonas	coeficiente	-0,849	-0,888
	p	< 0,001	< 0,001
	N	29	29

## **6. DISCUSSÃO**



A reconstrução mamária com o retalho musculofasciocutâneo abdominal transversal de músculo reto do abdome (TRAM) pode ser considerada a opção preferencial para a reconstrução mamária em vários centros. O uso de tecido autógeno e a melhora do contorno abdominal são as principais vantagens do uso dessa técnica. O uso do TRAM, contudo, apresenta riscos de complicações relacionadas às alterações da vascularização em pacientes com situações clínicas de risco. A abdominoplastia é considerada um fator de risco, pois durante a sua realização, vários vasos perfurantes musculocutâneos são lesados no descolamento. Desta forma, a realização do retalho TRAM após uma abdominoplastia é contraindicada, pois confere um risco adicional de necrose desse retalho (HARTRAMPF, 1988; HARTRAMPF & BECKENSTEIN, 1995).

A despeito do conhecimento exposto, SOUZER *et al.* (1995) obtiveram sucesso realizando a reconstrução mamária em pacientes já submetidos à abdominoplastia. Relataram dois casos de reconstrução mamária com o retalho TRAM após abdominoplastia, sem complicações. Em todos os casos, os autores relataram um intervalo próximo de dez anos entre os procedimentos, podendo explicar a revascularização do retalho. RIBUFFO, MARCELLINO, BARNETT (2001) estudaram a vascularização do abdome após uma abdominoplastia clássica, encontrando uma diminuição do diâmetro dos vasos perfurantes. Relatam ainda o estudo, em cadáver, da vascularização do abdome de uma paciente do gênero feminino, submetida a abdominoplastia há dez anos, com vasos perfurantes de diâmetros reduzidos.

No campo experimental, vários autores buscaram estudar a associação da abdominoplastia e a realização do retalho TRAM.

HALLOCK & RICE (1998) descreveram o modelo de abdominoplastia no rato e compararam grupos em que o TRAM foi realizado trinta dias após a abdominoplastia com outros em que o TRAM foi realizado após dez meses. Verificaram um alto índice de necrose do retalho realizado após um mês.

ÖZKAN *et al.* (2005) estudaram a autonomização do TRAM em ratos submetidos previamente a abdominoplastia, utilizando um grupo com intervalo de um mês e outro com intervalo de seis meses entre os procedimentos. Encontraram um alto índice de necrose nos dois grupos, semelhante aos grupos de HALLOCK & RICE (1998), e mostraram uma melhora significativa nos grupos em que utilizaram a autonomização.

SEIFY, BILKAY, JONES (2003a) estudaram o efeito do VEGF, na sua forma recombinante, na viabilidade do retalho TRAM após abdominoplastia, em dois momentos. Os grupos tratados com VEGF apresentaram maior viabilidade do retalho, mas os grupos estudados com intervalo de 20 e 40 dias entre os procedimentos de abdominoplastia e do retalho TRAM não apresentaram diferença significativa.

Diferentemente dos estudos de SEIFY, BILKAY, JONES (2003a) e ÖZKAN *et al.* (2005), no presente estudo avaliou-se a terapia gênica com o VEGF isoforma 165, como uma alternativa para alterar a vascularização do retalho TRAM após uma abdominoplastia. O VEGF é o mais poderoso fator angiogênico identificado. Foi primeiramente encontrado em células tumorais, incrementando a permeabilidade vascular a macromoléculas. Posteriormente, seu papel na angiogênese do embrião foi estudado. Sua atividade em humanos é mediada por receptores tirosinoquinase. A sua secreção e expressão são relacionadas à hipóxia tecidual, causando vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, proliferação de células

endoteliais e ativação de metaloproteinases, que lisam a matriz extracelular para crescimento de um novo vaso (FERRARA & DAVIS-SMYTH, 1997). Apresenta cinco isoformas, de acordo com o tamanho da molécula e o mecanismo de ação (VEGF A 121, 145, 165, 189 e 206) (ZACHARY, 1998).

No presente estudo, utilizou-se o método mais simples de terapia gênica, que é a injeção direta de ADN nos tecidos e células através de um vetor plasmidial (em inglês também conhecido por *naked DNA*). Plasmídeos são moléculas circulares de ADN presente nas bactérias, que conferem, por exemplo, resistência a antibióticos. Através de enzimas de restrição, é possível produzir cortes específicos no plasmídeo e inserir o gene para a produção de uma proteína específica. Uma vez incorporado pela célula alvo, o plasmídeo com o gene codifica a produção da proteína pela própria célula alvo (TEPPER & MEHRARA, 2002). O'TOOLE *et al.* (2002) obtiveram aumento da viabilidade do retalho abdominal ventral em ratos com a terapia gênica com VEGF plasmidial. Compararam várias isoformas, concluindo que as isoformas 165 e 176 eram as mais ativas. Utilizou-se então, neste experimento, o plasmídeo contendo o gene humano para produção do fator de crescimento do endotélio vascular isoforma 165, construído pelo Laboratório Interdisciplinar de Terapia Gênica (CINTERGEN) da UNIFESP. A isoforma 165 foi escolhida por ser a mais abundante e fisiologicamente mais ativa no organismo humano (TAUB, SILVER, WEINBERG, 2000; O'TOOLE *et al.*, 2002). O vetor plasmidial com o VEGF foi dissolvido em solução salina tamponada com fosfato (PBS) que aumenta a taxa de transfecção e a expressão gênica (CHESNOY & HUANG, 2002).

Utilizou-se a dose de 100 µg de plasmídeo, contendo o gene que codifica a produção de VEGF, com base nos trabalhos de SEIFY, BILKAY, JONES (2003). Os autores utilizaram a mesma dose total de 100 microgramas, com injeção intramuscular no músculo reto do abdome, mas usando a proteína recombinante. Na literatura encontraram-se doses variando entre 5 e 1000 µg, mas nenhum trabalho utilizou a terapia gênica, intramuscular, para aumentar a viabilidade do retalho TRAM.

Após o pioneirismo de WOLFF *et al.* (1990), a terapia gênica com a injeção de ADN através de plasmídeo foi desenvolvida e trouxe sucesso na revascularização de membros isquêmicos e miocárdio em modelos animais (TAKESHITA *et al.*, 1994) e em estudos clínicos (ISNER *et al.*, 1996; LOSORDO *et al.*, 1998). Em contrapartida, DULAK & JOZKOWICZ (2002) acreditam que a terapia gênica com a finalidade de produzir angiogênese apresenta riscos e deve ser introduzida na prática clínica após o total entendimento dos mecanismos de ação dos fatores angiogênicos.

As vantagens da injeção do ADN através do vetor plasmidial incluem a simplicidade na técnica de preparação, administração direta na célula ou órgão alvo e a possibilidade de atuar em células que não estão em divisão celular (DULAK & JOZKOWICZ, 2002; TEPPER & MEHRARA, 2002). As desvantagens são a impossibilidade de tratar tecidos de difícil acesso e a especificidade do vetor para determinadas células, resultando em baixa taxa de transfecção, requerendo tratamentos repetidos. O plasmídeo entra nas células principalmente via endocitose. Portanto, há uma perda muito grande de vetor (TEPPER & MEHRARA, 2002).

Para aumentar a taxa de transfecção, empregou-se a eletroporação, que é um método físico de transferência gênica em que pulsos elétricos criam poros na membrana plasmática da célula alvo, possibilitando a

entrada de moléculas (TEPPER & MEHRARA, 2002). A transferência de ADN para a célula alvo é um processo em que a célula é permeabilizada e, subsequentemente, o ADN é levado por forças eletroforéticas para o citosol da célula, durante os pulsos (MIR *et al.*, 2005), que devem ser empregados adequadamente para não haver dano celular permanente (HOJMAN *et al.*, 2008). RIZZUTO *et al.* (1999) demonstraram que a eletroporação, usada em conjunto com técnicas tradicionais de injeção de ADN intramuscular, aumentou a eficiência da transfecção.

O presente estudo utilizou o modelo do TRAM descrito por DUNN & MANCOLL (1992). Como outros autores (DUNN, HUFF, MANCOLL, 1993; HALLOCK & RICE, 1995; ELY, MILTERSTEINER, HOFF, 1997; ELY & FERREIRA, 2003), utilizou-se o pedículo vascular caudal direito, que no rato é o pedículo não dominante e representa melhor a realização do TRAM em humanos, nos quais se utiliza o pedículo superior, também não dominante (OZGENTAS, SHENAQ, SPIRA, 1994). HALLOCK & RICE (1998) utilizaram o retalho TRAM extenso desde uma linha transversa entre as espinhas ilíacas até o apêndice xifoide, pediculado no músculo reto do abdome cranial direito do rato. ÖZKAN *et al.* (2005) utilizaram o modelo do retalho TRAM com pedículo cranial e SEIFY, BILKAY, JONES (2003a) utilizaram o músculo reto do abdome caudal direito como pedículo para o retalho TRAM.

Durante a realização do TRAM optou-se por incluir uma lâmina de silicone entre o retalho e a área doadora (HALLOCK & RICE, 1995a; HALLOCK & RICE, 1998). Essa lâmina impediria a revascularização do retalho a partir da sua área doadora, como um enxerto cutâneo. Desta forma, o retalho seria nutrido apenas pelo pedículo vascular dos vasos epigástricos caudais direitos, facilitando a interpretação dos resultados. Em

estudo piloto, também se observou, durante a abdominoplastia, que alguns animais apresentavam herniações de conteúdo abdominal que, por vezes, estavam aderidas à parte interna do retalho, com uma visível revascularização deste a partir das vísceras. Desta forma, a inclusão da lâmina de silicone, também contribuiu para evitar essa intercorrência.

O modelo de abdominoplastia utilizado neste estudo foi o proposto por HALLOCK & RICE (1998) e utilizado por outros autores (SEIFY, BILKAY, JONES, 2003a; ÖZKAN *et al.*, 2005), com algumas modificações. Utilizou-se a retirada de pequena faixa de fáscia acima dos músculos retos, introduzida por SEIFY, BILKAY, JONES (2003a), que serviria como uma barreira à neovascularização. Com base em estudos da vascularização superficial e angiossomos do abdome em humanos e ratos realizados por TAYLOR & MINABE (1992), entendeu-se que o modelo de abdominoplastia poderia seguir a mesma lógica do modelo de retalho TRAM em ratos, com inversão em relação ao humano. Foi proposta, então, a realização da abdominoplastia reversa, com o descolamento no sentido craniocaudal diferentemente da forma proposta por HALLOCK & RICE (1998), na qual a incisão é caudal e o descolamento, no sentido cranial. Essa nova proposta causa a lesão de maior número de vasos perfurantes que, no rato, emergem dos vasos epigástricos profundos craniais dominantes. Além disso, a incisão na pele durante a abdominoplastia é distal ao pedículo do retalho TRAM, como ocorre no humano.

Em humanos, seis a oito calibrosos vasos perfurantes são encontrados em média, originando-se de cada músculo reto do abdome e localizando-se na região periumbilical (BOYD, TAYLOR, CORLETT, 1984). No rato, os vasos perfurantes encontram-se em intervalos equidistantes, são ramos dos vasos epigástricos profundos craniais e,

consequentemente, raramente são identificados próximo ao púbis (HALLOCK & RICE, 1995). Apresentam-se longos e tortuosos devido à mobilidade do panículo carnosos (CLUGSTON *et al.*, 1995).

Neste trabalho, a porcentagem média de necrose do retalho TRAM no grupo controle, com pedículo caudal, foi de 24,65%, semelhante à porcentagem encontrada por ÖZKAN *et al.* (2005) e HALLOCK & RICE (1998), embora estes autores utilizassem o modelo do TRAM com pedículo cranial. SEIFY, BILKAY, JONES (2003b) utilizaram o pedículo caudal direito e a porcentagem de necrose do retalho foi de 50%. Esta diferença pode ser explicada pela dimensão do retalho TRAM de quatro por dois centímetros e seu posicionamento no abdome caudal. No estudo de ELY, GOLDENBERG, D'ACAMPORA (1999), que utilizaram parâmetros idênticos aos do presente estudo, a porcentagem média de necrose foi de 22,95%.

A necrose do retalho TRAM nos animais submetidos ao procedimento de abdominoplastia foi de 62,49%. Nos trabalhos dos demais autores (HALLOCK & RICE, 1998; SEIFY, BILKAY, JONES, 2003a; ÖZKAN *et al.*, 2005) esta porcentagem variou entre 79% e 99%, porém, os resultados podem não ser comparáveis, devido à alteração de variáveis como pedículo utilizado no TRAM, dimensões ou posicionamento do retalho TRAM e intervalo de tempo entre a abdominoplastia e o retalho TRAM. HALLOCK & RICE (1998) encontraram porcentagem de necrose de 94% na associação do TRAM com abdominoplastia, porém, utilizaram o modelo de abdominoplastia com incisão transversa entre as espinhas ilíacas e extenso descolamento até o processo xifoide, diferentemente deste trabalho.

No presente estudo, a porcentagem média de necrose do retalho TRAM foi estatisticamente diferente entre os grupos. A maior necrose do retalho no grupo Abdominoplastia em relação ao grupo TRAM foi causada provavelmente pela lesão dos vasos perfurantes durante a abdominoplastia. Resultado semelhante foi encontrado por HALLOCK & RICE (1998), SEIFY, BILKAY, JONES (2003a) e ÖZKAN *et al.* (2005).

O grupo Plasmídeo apresentou necrose semelhante ao grupo Abdominoplastia. Este resultado mostrou que o plasmídeo em solução de PBS, inoculado no retalho, não trouxe uma maior viabilidade ao retalho quando comparado com a solução fisiológica injetada no grupo Abdominoplastia. Resultados semelhantes na literatura consultada não foram encontrados, pois no estudo de SEIFY, BILKAY, JONES (2003a), os autores não utilizaram a terapia gênica, e sim a injeção direta do VEGF na sua forma de proteína recombinante.

O grupo tratado com terapia gênica com o VEGF apresentou porcentagem de necrose do retalho TRAM semelhante ao grupo I (TRAM), mas significativamente menor em relação aos grupos Abdominoplastia e Plasmídeo. Embora o procedimento de abdominoplastia tenha sido realizado nesse grupo, com lesão dos vasos perfurantes, a terapia gênica com VEGF diminuiu a porcentagem de necrose, trazendo o grupo para uma situação semelhante à do grupo I, em que somente o retalho TRAM foi realizado. ÖZKAN *et al.* (2005) obtiveram resultado semelhante, comparando o grupo em que realizaram apenas o retalho TRAM com o grupo em que realizaram o retalho TRAM com autonomização prévia, após seis meses da abdominoplastia. SEIFY, BILKAY, JONES (2003a) descreveram em seu estudo a reperfusão de vasos perfurantes após a



abdominoplastia no grupo tratado com o VEGF, o que pode explicar a menor porcentagem de necrose.

Para as análises histológicas com contagem de vasos, foi necessário retirar amostras teciduais dos retalhos. ELY *et al.* (2004) retiraram três amostras, uma sobre o pedículo, outra da região distal (zona IV) e outra extrarretalho (tecido viável). PINFILDI *et al.* (2009) utilizaram fragmentos da zona I do TRAM e extrarretalho. Em outro estudo, realizado por LINEAWEAVER *et al.* (2004), os autores utilizaram amostras das quatro zonas do retalho TRAM, para avaliação de expressão gênica e histológica. As zonas do retalho TRAM no rato correspondem às zonas do retalho no humano descritas por HARTRAMPF (1988), determinando a zona de maior vascularização (I) até a de menor vascularização (IV).

Embora com a possibilidade de necrose das zonas do retalho, causando dificuldades na avaliação morfométrica e imuno-histoquímica, optou-se pela retirada de fragmentos das zonas de I a IV, de modo semelhante a LINEAWEAVER *et al.* (2004). Os fragmentos necrosados avaliados com coloração de hematoxilina-eosina não apresentavam vasos e a contagem foi considerada igual a zero.

Os retalhos dos animais que receberam o VEGF tiveram notadamente diferenças quando examinados a microscopia óptica. Quando examinados com hematoxilina e eosina, esses animais mostraram um aumento do número dos vasos, quando comparados com os outros grupos. ZHANG *et al.* (2001) utilizaram a análise de número de capilares através de coloração hematoxilina-eosina e encontraram uma média de quatro capilares por campo no grupo tratado com VEGF subcutâneo e um capilar no grupo controle. Utilizaram um aumento de 400 vezes, porém não relataram o método de contagem e a área estudada. TAUB *et al.* (1998) não

encontraram diferença significativa entre o número de vasos dos grupos. Encontraram um menor diâmetro dos vasos no grupo tratado com VEGF.

No presente estudo, utilizou-se imuno-histoquímica com o marcador HHF 35, que forma um complexo antígeno-anticorpo ao redor do vaso sanguíneo, possibilitando a contagem dos vasos. Em estudo piloto, o anticorpo anti-VEGF não possibilitou a marcação dos vasos sanguíneos e a contagem. O VEGF é uma proteína que tem sua produção estimulada pela hipóxia tecidual. Em situações normais, sua meia vida é de 30 a 45 minutos, mas em situações de hipóxia pode aumentar para 6 a 8 horas (TAUB, SILVER, WEINBERG, 2000). No modelo proposto, a terapia gênica poderia prolongar a sua ação, porém não suficientemente para serem encontrados níveis satisfatórios após um mês para o uso do anticorpo anti VEGF com sucesso. Utilizou-se então, o marcador HHF 35 (*human heart factor*) para a marcação de vasos sanguíneos, devido à sua maior sensibilidade, facilitando a análise morfométrica (Figura 30, Apêndices).

Neste estudo, utilizou-se a avaliação morfométrica de cinco campos consecutivos, com aumento de 400 x da mesma forma que PINFILDI *et al.* (2009).

A avaliação morfométrica dos vasos possibilitou comparar entre os grupos o número de vasos encontrados no retalho e estudar as diferenças entre os grupos quanto ao número de vasos encontrados nas zonas I a IV do TRAM.

De acordo com os resultados demonstrados, foram encontradas diferenças significantes entre o grupo I (TRAM) e os grupos II (Abdominoplastia) e III (Plasmídeo), que apresentaram menor número de vasos. Essa diferença pode ser explicada pela lesão dos vasos perfurantes durante a abdominoplastia. O grupo IV apresentou número de vasos

significativamente maior quando comparado com os grupos II (Abdominoplastia) e III (Plasmídeo). Os resultados também mostraram, assim como a porcentagem de necrose, que não houve diferenças significantes quanto ao número de vasos entre o grupo TRAM e o grupo VEGF.

No estudo de SEIFY, BILKAY, JONES (2003a), após a abdominoplastia, ocorreu reperfusão de vasos perfurantes, principalmente no grupo tratado com VEGF. Estudos experimentais indicam que a administração exógena de VEGF (Fator de crescimento do endotélio vascular) pode promover a indução da angiogênese local e favorecer a viabilidade dos retalhos cutâneos (PADUBIDRI & BROWNE, 1996; TAUB *et al.*, 1998; TAUB, SILVER, WEINBERG, 2000).

Estudos como o de SEIFY, BILKAY, JONES (2003a) e ZHANG *et al.* (2005) também corroboram com os achados deste trabalho quanto ao aumento da vascularização e da viabilidade do retalho musculofasciocutâneo, em especial o TRAM.

A avaliação em separado do número de vasos encontrados nas zonas do retalho TRAM mostrou diferenças estatisticamente significantes nas zonas II, III e IV entre os grupos TRAM, Abdominoplastia, Plasmídeo e VEGF.

A zona I não apresentou diferença significativa entre os grupos. Nesta zona, o retalho TRAM apresenta a maior vascularização, porque ele se encontra em contato com o músculo reto do abdome direito, que não sofre descolamento durante a execução. Desta forma, em geral, a zona I não apresenta problemas de vascularização e a igualdade em relação ao número de vasos entre os grupos pode ser esperada.

Os resultados encontrados na zona II do retalho TRAM mostraram um maior número de vasos no grupo VEGF em comparação com os grupos Abdominoplastia e Plasmídeo. Isto poderia ser explicado pela ação angiogênica do VEGF na zona II após a aplicação de 50 microgramas no músculo reto do abdome esquerdo, porém os dados não possibilitam confirmar essa hipótese. O grupo TRAM mostrou apenas uma tendência em apresentar um maior número de vasos em relação aos grupos Abdominoplastia e Plasmídeo.

A avaliação isolada da zona III mostra que o grupo VEGF apresentou um maior número de vasos quando comparado com o grupo Plasmídeo e uma tendência quando comparado com o grupo Abdominoplastia. O grupo TRAM apresentou maior número de vasos quando comparado aos grupos Abdominoplastia e Plasmídeo. Os resultados poderiam ser explicados pela lesão dos vasos perfurantes no descolamento da abdominoplastia e posteriormente no descolamento da porção ipsilateral do retalho (zona III) na confecção do retalho TRAM.

Na zona IV os vasos foram encontrados apenas nos animais do grupo I (TRAM) e do grupo IV (VEGF). Os animais do grupo II (Abdominoplastia) e do grupo III (Plasmídeo) não apresentaram vasos na zona IV do retalho TRAM e conseqüentemente, apresentaram necrose dessa área. A zona IV do retalho TRAM em humanos e em modelos experimentais é considerada uma área isquêmica mesmo quando não se associa um descolamento com lesão prévia de vasos, como no caso de uma abdominoplastia (HUDSON, 1996). No presente estudo, os animais do grupo VEGF apresentaram viabilidade da zona IV do retalho. O número de vasos encontrados foi estatisticamente semelhante, em relação ao grupo

TRAM, mostrando um crescimento de vasos nessa zona isquêmica do retalho.

Na literatura consultada não foi encontrado trabalho que correlaciona o aumento do número de vasos das zonas do retalho com a terapia gênica com VEGF.

Pode-se observar que as correlações entre as porcentagens de necrose e o número de vasos das zonas e do total das zonas mostraram uma correlação negativa, significativa. Isto indica que, à medida que o número de vasos diminui, a porcentagem de necrose aumenta. Resultado semelhante foi encontrado por PINFILDI *et al.* (2009).

Como perspectiva, novos estudos poderão responder aos questionamentos levantados neste estudo. Estudos posteriores podem correlacionar a necrose das zonas do retalho com o número de vasos encontrados em cada zona do retalho TRAM.

Estudos utilizando o modelo de abdominoplastia sem a retirada da fáscia de aponeurose proposta por SEIFY, BILKAY, JONES (2003a) podem ser realizados para avaliar a influência desta modificação técnica na reperfusão dos vasos perfurantes do retalho e, conseqüentemente, na porcentagem de necrose.

Estudos comparativos entre o modelo de abdominoplastia com descolamento no sentido cranial, descrito por HALLOCK & RICE (1998), e a modificação técnica realizada neste trabalho, segundo preceitos de TAYLOR & MINABE (1992), podem ser realizados.

Após o estudo de ZHANG *et al.* (2005), que avaliaram a terapia gênica com injeção subcutânea de VEGF no retalho TRAM em ratos, novo estudo acrescentando o procedimento de abdominoplastia pode ser realizado. Este modelo aproxima-se ainda mais da realidade clínica

encontrada na rotina dos grandes centros de reconstrução mamária, pela facilidade na administração em pacientes.

A comparação da autonomização do TRAM, que é um método cirúrgico de aumento de vascularização, com a terapia gênica do retalho pode ser estudada. ZHANG *et al.* (2003) realizaram este estudo, porém utilizando o VEGF na forma recombinante. Posteriormente, realizaram outro estudo (ZHANG *et al.*, 2005), em que utilizaram a terapia gênica no TRAM, mas não a compararam com a autonomização.

As observações apresentadas no presente estudo foram realizadas em modelo experimental e não devem ser sempre transpostas para a realidade clínica das reconstruções mamárias. Este estudo apenas sugere importantes correlações, com novas perspectivas para a problemática das complicações pós-operatórias.

## **7. CONCLUSÃO**

## **7. CONCLUSÃO**

O fator de crescimento do endotélio vascular aumenta a viabilidade e o número de vasos do retalho musculofasciocutâneo abdominal transversal do músculo reto do abdome, após abdominoplastia, em ratos.



## **8. REFERÊNCIAS**

## 8. Referências

André FM, Gehl J, Sersa G, Prémat V, Hojman P, Eriksen J, et al. Efficiency of high- and low-voltage pulse combinations for gene electrotransfer in muscle, liver, tumor, and skin. *Hum Gene Ther.* 2008 Nov;19(11):1261-72.

Boyd JB, Taylor GI, Corlett R. The vascular territories of the superior epigastric and deep inferior epigastric systems. *Plast Reconstr Surg.* 1984 Jan;73(1):2-14.

Clugston PA, Perry LC, Fisher J, Maxwell GP. A rat transverse rectus abdominis musculocutaneous flap model: effects of pharmacological manipulation. *Ann Plast Surg.* 1995 Feb;34(2):154-61.

Chesnoy S, Huang L. Enhanced cutaneous gene delivery following intradermal injection of naked DNA in a high ionic strength solution. *Mol Ther.* 2002 Jan;5(1):57-62.

Codner MA, Bostwick J III. The delayed TRAM flap. *Clin Plast Surg.* 1998 Apr;25(2):183-9.

Dulak J, Jozkowicz A. Angiogenic gene therapy with vascular endothelial growth factor – hope or hype? *Eur Surg.* 2002 Apr;34(2):101-4.

Dunn RM, Mancoll J. Flap models in the rat: a review and reappraisal. *Plast Reconst Surg.* 1992 Aug;90(2):319-27.

## 8. Referências

Dunn RM , Huff W, Mancoll J. The rat rectus abdominis myocutaneous flap: a true myocutaneous flap model. *Ann Plast Surg.* 1993 Oct;31(4):352-7.

Ely PB, d'Acampora AJ, Miltersteiner AR, Hoff FC. Dispositivo do tipo colar cervical para proteção de ferida operatória abdominal em ratos. *Acta Cir Bras.* 1997;12 suppl 2:15-6.

Ely PB, Miltersteiner AR, Hoff FC. Retalho miocutâneo transverso de músculo reto abdominal (TRAM flap) – modelo experimental em ratos. *Acta Cir Bras.* 1997;12 suppl 2:75.

Ely PB, Goldenberg S, d'Acampora AJ. Efeito da autonomização no retalho miocutâneo abdominal transverso de músculo reto abdominal – estudo experimental em ratos. *Acta Cir Bras.* 1999;14(2):25.

Ely PB, Ferreira LM. Modelo experimental do retalho musculocutâneo abdominal transverso de músculo reto do abdome (*TRAM flap*) em ratos. *Acta Cir Bras [CD-ROM].* 2003;18(Spec Ed):[about 4 screens].

Ferrara N, Davis-Smith T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev.* 1997 Feb;18(1):4-25.

Gandolfo E. A breast reconstruction with a lower abdominal myocutaneous flap. *Br J Plast Surg.* 1982 Oct;35(4):452-7.

## 8. Referências

Garcia EB, Ferreira LM, Sabino Neto M, Sallum N. Experimental model of cranially pedicled TRAM flap in rats. *Acta Cir Bras.* 2004;19 suppl 1:59-64.

Hallock GG, Rice DC. Evidence for the efficacy of TRAM flap delay in a rat model. *Plast Reconst Surg.* 1995a Nov;96(6):1351-7.

Hallock GG, Rice DC. Physiologic superiority of the anatomic dominant pedicle of the TRAM flap in a rat model. *Plast Reconst Surg.* 1995b Jul;96(1):111-8.

Hallock GG, Rice DC. Fate of the TRAM flap after abdominoplasty in a rat model. *Plast Reconstr Surg.* 1998 Jun;101(7):1828-35.

Hartrampf CR, Schefflan M, Black PW. Breast reconstruction with a transverse abdominal island flap. *Plast Reconstr Surg.* 1982 Feb;69(2):216-24.

Hartrampf CR, Bennett GK. Autogenous tissue reconstruction in the mastectomy patient. *Ann Surg.* 1987 May;205(5):508-19.

Hartrampf CR. The transverse abdominal island flap for breast reconstruction. *Clin Plast Surg.* 1988 Oct;15(4):703-16.

Hartrampf CR, Beckenstein MS. The use of the transverse rectus abdominis musculocutaneous flap after abdominoplasty. *Ann Plast Surg.* 1995 Oct;35(4):409-11; discussion 411-2.

## 8. Referências

Hayward PG, Alison WE, Carp SS, PS Hui, MC Robson. Local infiltration of an angiogenic growth factor does not stimulate delay phenomenon. *Br J Plast Surg.* 1991;44:526-9.

Hojman P, Gissel H, Andre FM, Cournil-Henrionnet C, Eriksen J, Gehl J, et al. Physiological effects of high- and low-voltage pulse combinations for gene electrotransfer in muscle. *Hum Gene Ther.* 2008 Nov;19(11):1249-60.

Hudson DA. The Surgically delayed unipedicled TRAM flap for breast reconstruction. *Ann Plast Surg.* 1996 Mar;36(3):238-42.

Ishii CH, Bostwick J, Rainet TJ, Coleman JJ, Hester TR. Double-pedicle transverse rectus abdominis myocutaneous flap for unilateral breast and chest-wall reconstruction. *Plast Reconstr Surg.* 1985 Dec;76(6):901-7.

Isner JM, Pieczek A, Schainfeld R, Blair R, Haley L, Asahara T, et al. Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF 165 in patient with ischaemic limb. *Lancet.* 1996 Aug;348:370-4.

Karacaoglu E, Yuksel F, Turan SO, Zienowicz RJ. Chemical delay: an alternative to surgical delay experimental study. *Ann Plast Surg.* 2002 Jul;49(1):73-80.

Khouri RK, Brown DM, Leal-Khouri SM, Tark KC, Shaw WW. The effect of basic fibroblast growth factor on the neovascularization process: skin flap survival and staged flap transfers. *Br J Plast Surg.* 1991;44:585-8.

## 8. Referências

Kroll SS, Gherardini G, Martin JE, Reece GP, Miller MJ, Evans GRD, et al. Fat necrosis in free and pedicled TRAM flaps. *Plast Reconstr Surg.* 1998 Oct;102(5):1502-7.

Lantiere LA, Martin Garcia N, Wechsler J, Mitrofanoff M, Raulo Y, Baruch J. Vascular endothelial growth factor expression in expanded tissue: a possible mechanism of angiogenesis in tissue expansion. *Plast Reconstr Surg.* 1998 Feb;101(2):392-8.

Lineaweaver WC, Lei M-P, Mustain W, Oswald TM, Cui D, Zhang F. Vascular endothelium growth factor, surgical delay, and skin flap survival. *Ann Surg.* 2004 Jun;239(6):866-73.

Losordo DW, Vale PR, Symes JF, Dunnington CH, Esakof DD, Maysky M, et al. Gene therapy for myocardial angiogenesis: Initial clinical results with direct myocardial injection of ph VEGF 165 as sole therapy for myocardial ischemia. *Circulation.* 1998 Dec;98:2800-4.

Mir LM, Moller PH, André F, Gehl J. Electric pulse-mediated gene delivery to various animal tissues. *Adv Genet.* 2005;54:83-114.

Ozgentas HE, Shenaq S, Spira M. Development of TRAM flap model in the rat and study of vascular dominance. *Plast Reconstr Surg.* 1994 Dec;94(7):1018-24.

## 8. Referências

O'Toole G, Mackenzie D, Lindeman R, Buckley MF, Marucci D, McCarthy N, et al. Vascular endothelial growth factor gene therapy in ischaemic rat skin flaps. *Br J Plast Surg*. 2002;55:55-8.

Özkan Ö, Coskunfirat OK, Özentas HE, Yildirim I, Dikici MB. Is it possible to increase the survival of the transverse rectus abdominis musculocutaneous flap following previous abdominoplasty using a delay procedure? An experimental study in the rat. *Plast Reconst Surg*. 2005 Dec;116(7):1945-52.

Padubidri A, Browne E. Effect of vascular endothelial growth factor (VEGF) on survival of random extension of axial pattern skin flaps in the rat. *Ann Plast Surg*. 1996 Dec;37(6):604-11.

Pinfildi CE, Liebano RE, Hochman BS, Enokihara MM, Lippert R, Gobbato RC, Ferreira LM. Effect of low-level laser therapy on mast cells in viability of the transverse rectus abdominis musculocutaneous flap. *Photomed Laser Surg*. Forthcoming 2009.

Ribuffo D, Marcelino M, Barnett GR, Houseman ND, Scuderi N. Breast reconstruction with abdominal flaps after abdominoplasties. *Plast Reconst Surg*. 2001 Nov;108(6):1604-8.

Rizzuto G, Cappelletti M, Maione D, Savino R, Lazzaro D, Costa P, et al. Efficient and regulated erythropoietin production by naked DNA injection and muscle electroporation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999 May;96:6417-22.

Robbins TH. Rectus abdominis myocutaneous flap for breast reconstruction. *Aust N Z J Surg.* 1979 Oct;49(5):527-30.

Schefflan M, Dinner MI. The transverse abdominal island flap: indications, contraindications, results and complications. *Ann Plast Surg.* 1983 Jan;10(1):24-35.

Seify H, Bilkay U, Jones G. Effect of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis on TRAM flap harvesting after abdominoplasty. *Plast Reconstr Surg.* 2003a Mar;111(3):1212-6.

Seify H, Bilkay U, Jones G. Improvement of TRAM flap viability using human VEGF-induced angiogenesis: a comparative study of delay techniques. *Plast Reconstr Surg.* 2003b Sep;112(4):1032-9.

Semple JL. Retrograde microvascular augmentation (turbocharging) of the single-pedicle TRAM flap through a deep inferior epigastric arterial and venous loop. *Plast Reconstr Surg.* 1994 Jan;93(1):109-17.

Sozer SO, Cronin ED, Biggs TM, Gallegos, ML. The use of the transverse rectus abdominis musculocutaneous flap after abdominoplasty. *Ann Plast Surg.* 1995 Oct;35(4):409-12.

Takeshita S, Pu L, Stein LA, Lawrence A, Sniderman AD, Allan D, et al. Intramuscular administration of vascular endothelial growth factor induces



## 8. Referências

dose-dependent collateral artery augmentation in a rabbit model of chronic limb ischemia. *Circulation*. 1994a Nov;90(5):228-34.

Takeshita S, Zheng LP, Brogi E, Kearney M, Pu L, Bunting S, et al. Therapeutic angiogenesis: a single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hind limb model. *J Clin Invest*. 1994b Feb;93(2):662-70.

Taub PJ, Marmur JD, Zhang WX, Senderoff D, Nhat P, Phelps R, et al. Locally administered vascular endothelial growth factor cDNA increases survival of ischemic experimental skin flaps. *Plast Reconstr Surg*. 1998 Nov;102(6):2033-9.

Taub PJ, Silver L, Weinberg H. Plastic surgical perspectives on vascular endothelial growth factor as gene therapy for angiogenesis. *Plast Reconstr Surg*. 2000;105(3):1034-42.

Taylor GI, Minabe T. The angiosomes of the mammals and other vertebrates. *Plast Reconstr Surg*. 1992 Feb;89(2):181-215.

Tepper OM, Mehrara BJ. Gene therapy in plastic surgery. *Plast Reconstr Surg*. 2002 Feb;109(2):716-34.

Uhl E, Barker JH, Bondar I, Galla TJ, Lehr H-A, Messmer K. Improvement of skin flap perfusion by subdermal injection of recombinant human basic fibroblast growth factor. *Ann Plast Surg*. 1994 Apr;32(4):361-6.

## 8. Referências

Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, et al. Direct gene transfer into mouse in vivo. *Science*. 1990 Mar;247:1465-8.

Zachary, I. Vascular endothelial growth factor. *Int J Biochem Cell Biol*. 1998 Mar;30:1169-74.

Zhang F, Fischer K, Komorowska-Timek E, Guo M, Cui D, Dorsett-Martin W, et al. Improvement of skin paddle survival by application of vascular endothelial growth factor in a rat TRAM flap model. *Ann Plast Surg*. 2001 Mar;46(3):314-9.

Zhang F, Yang F, Hu EC, Sones W, Lei M, Lineaweaver WC. Vascular endothelial growth factor gene therapy in improvement of skin paddle survival in a rat TRAM flap model. *J Reconstr Microsurg*. 2005 Aug;21(6):391-6.

## **NORMAS ADOTADAS**

ICMJE – International Committee of Medical Journals Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journal. Disponível no endereço eletrônico: <http://www.icmje.org>.

COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) – Princípios éticos da experimentação animal. Disponível no endereço eletrônico: <http://www.meusite.com.br/cobea/index.htm>.

Terminologia Anatômica. Terminologia Anatômica Internacional. São Paulo: Ed. Manole; 2001. 248p.

Ministério da Saúde – Conselho Nacional de Saúde – Resolução nº 196/96 sobre pesquisa envolvendo seres humanos. Brasília – DF; 1996. 24p.

Consulta ao DeCS – Descritores em Ciências da Saúde. Disponível no endereço eletrônico: <http://decs.bvs.br/> – terminologia em saúde.

International Committee On Veterinary Gross Anatomical Nomenclature – Nomina anatômica veterinária. 3. ed. New York, Ithaca; 1983. 216p.

Ferreira LM, Goldenberg S, Nahas FX, Barbosa MVJ, Ely PB, Blanes L, Bretos JLG. Orientação normativa para elaboração e apresentação de teses. São Paulo: Livraria Médica Paulista; 2008. 84p.

## ABSTRACT

**Introduction:** Transverse rectus abdominis musculocutaneous (TRAM) flap may present necrosis, in patients with risk factors. Abdominoplasty is a risk factor due to disruption and transection of vascular perforators. Perspectives on naked plasmid DNA encoding vascular endothelial growth factor (VEGF) as gene therapy for angiogenesis and neovascularization of TRAM flap harvesting after abdominoplasty, originated this study.

**Objective:** The objective of this study was to determine the effect of VEGF plasmid DNA in TRAM flap's rat model viability after abdominoplasty.

**Methods:** Thirty-two Wistar rats were distributed into four groups (n=8). The caudal pedicled TRAM flap was harvested in all animals and it was the only procedure in the group I (TRAM). In groups II (Abdominoplasty) and III (Plasmid), an abdominoplasty procedure was performed with intramuscularly injection of saline solution and plasmid DNA without VEGF gene, respectively. In Group IV (VEGF) 100 micrograms of plasmid encoding VEGF, was injected into the rectus muscle. TRAM flaps were harvested thirty days after abdominoplasty.

**Results:** TRAM group, Abdominoplasty group, Plasmid group and VEGF group showed a mean percentage of necrosis of 24.65%, 62.49%, 57.80% and 18,33%, respectively (p=0,001). TRAM flap's immunohistochemical analysis with antibody HHF-35 showed a significant increase in number of vessels in the group IV.

**Conclusion:** The plasmid vector including VEGF after abdominoplasty improved TRAM flap viability and the number of the vessels in rats.

## APÊNDICE

**TABELA 10** - Comparações do número de vasos da zona I do retalho TRAM entre os grupos

Grupos comparados		Conclusão	Nível descritivo (p)
TRAM	Abdominoplastia	TRAM = Abdominoplastia	0,40
TRAM	Plasmídeo	TRAM = Plasmídeo	0,95
TRAM	VEGF	TRAM = VEGF	0,25
Abdominoplastia	Plasmídeo	Abdominoplastia = Plasmídeo	0,64
Abdominoplastia	VEGF	Abdominoplastia = VEGF	0,12
Plasmídeo	VEGF	Plasmídeo = VEGF	0,24

**TABELA 11** - Comparações do número de vasos da zona IV do retalho TRAM entre os grupos

Grupos comparados		Conclusão	Nível descritivo (p)
TRAM	VEGF	TRAM = VEGF	0,52

**TABELA 12** - Necrose do retalho no grupo TRAM

Rato	Porcentagem de necrose	Área do retalho cm <sup>2</sup>	Área de necrose em cm <sup>2</sup>
8	5,34	11,04	0,59
10	27,47	10,41	2,86
12	33,37	8,93	2,98
15	56,53	8,19	4,63
21	18,88	8,95	1,69
24	27,7	12,49	3,46
32	3,29	10,01	0,33

**TABELA 13 - Necrose do retalho no grupo Abdominoplastia**

Rato	Porcentagem de necrose	Área do retalho cm <sup>2</sup>	Área de necrose em cm <sup>2</sup>
5	100	9,81	9,81
9	41,14	8,41	3,46
14	86,44	8,85	7,65
18	17,21	10,92	1,88
20	67,64	8,5	5,75
23	52,26	10,6	5,54
31	72,8	10,59	7,71

**TABELA 14 - Necrose do retalho no grupo Plasmídeo**

Rato	Porcentagem de necrose	Área do retalho cm <sup>2</sup>	Área de necrose em cm <sup>2</sup>
2	34,5	9,54	3,3
4	24,9	8,15	2,03
6	34,91	7,79	2,72
11	78,67	9,8	7,71
13	84,84	7,06	5,99
17	91,61	5,25	4,81
25	62,57	9,46	5,92
29	51,03	9,19	4,69

**TABELA 15 - Necrose do retalho no grupo VEGF**

Rato	Porcentagem de necrose	Área do retalho cm <sup>2</sup>	Área de necrose em cm <sup>2</sup>
1	0	13,05	0
3	2,28	10,05	0,23
7	7,8	9,86	0,77
16	18,8	7,52	1,42
19	35,27	10,29	3,63
28	42,17	8,94	3,77
30	22,04	8,71	1,92

**TABELA 16 - Contagem de vasos do grupo TRAM**

Rato	Média				Total do retalho
	Zona 1	Zona 2	Zona 3	Zona 4	
8	3,8	6,4	6,8	5,2	5,55
10	7	3,4	3,4	0	3,45
12	4	0	5,4	0	2,35
15	3,6	0	0	0	0,9
21	4,4	5,2	8,2	0	4,45
24	5,4	5	8,2	4,8	5,85
32	2,4	6,2	5,8	5	4,85
<b>Total</b>	<b>4,37</b>	<b>3,74</b>	<b>5,40</b>	<b>2,14</b>	<b>3,91</b>

**TABELA 17 - Contagem de vasos do grupo Abdominoplastia**

Rato	Média				Total do retalho
	Zona 1	Zona 2	Zona 3	Zona 4	
5	0	0	0	0	0
9	4,8	4,4	4,6	0	3,45
14	3,2	0	0	0	0,8
18	2,8	2,8	4,2	0	2,45
20	4,4	2,4	0	0	1,7
23	6,8	0	5,4	0	3,05
31	3,4	0	0	0	0,85
<b>Total</b>	<b>3,62</b>	<b>1,37</b>	<b>2,02</b>	<b>0</b>	<b>1,75</b>

**TABELA 18 - Contagem de vasos do grupo Plasmídeo**

Rato	Média				Total do retalho
	Zona 1	Zona 2	Zona 3	Zona 4	
2	5,6	6,2	2,4	0	3,55
4	7,8	0	4,6	0	3,1
6	2,4	4	0	0	1,6
11	3,4	0	0	0	0,85
13	0	3,2	0	0	0,8
17	4,6	0	0	0	1,15
25	4,4	0	0	0	1,1
29	4,4	0	4,8	0	2,3
	<b>4,07</b>	<b>1,67</b>	<b>1,47</b>	<b>0</b>	<b>1,80</b>

**TABELA 19** - Contagem de vasos do grupo VEGF

Rato	Média				
	Zona 1	Zona 2	Zona 3	Zona 4	Total do retalho
1	4,6	7,2	3,6	7,2	5,65
3	12	7,6	5,6	6,8	8
7	4	4	3,2	3,6	3,7
16	5,2	5,8	6,4	3,6	5,25
19	3,2	4,6	3,8	0	2,9
28	5,6	2,6	0	0	2,05
30	6	5	10,4	0	5,35
<b>Total</b>	<b>5,8</b>	<b>5,25</b>	<b>4,71</b>	<b>3,02</b>	<b>4,7</b>

**TABELA 20** - Resultados dos testes de normalidade (Kolmogorov-Smirnov) e de igualdade de variâncias (Levene)

Contagem média de vasos	Kolmogorov-Smirnov (p)	Levene (p)
Zona I	0,668	0,813
Zona II	0,058	0,329
Zona III	0,073	0,888
Zona IV*	0,118	0,800
Soma das zonas	0,925	0,323

\*Considerando somente os grupos VEGF e TRAM



**PROTOCOLO**

RATO NÚMERO: \_\_\_\_\_

GRUPO: \_\_\_\_\_

IDADE: \_\_\_\_\_

SEXO: \_\_\_\_\_

PESO: \_\_\_\_\_

**PROCEDIMENTO DE ABDOMINOPLASTIA**

DATA: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_\_\_

ANESTESIA: \_\_\_\_\_

INÍCIO DO PROCEDIMENTO: \_\_\_\_\_

TÉRMINO DO PROCEDIMENTO: \_\_\_\_\_

**PROCEDIMENTO DE CONFECÇÃO DO TRAM**

DATA: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_\_\_

ANESTESIA: \_\_\_\_\_

INÍCIO DO PROCEDIMENTO: \_\_\_\_\_

TÉRMINO DO PROCEDIMENTO: \_\_\_\_\_

**APLICAÇÃO DO VEGF**

DATA: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_\_\_

ANESTESIA: \_\_\_\_\_

INÍCIO DO PROCEDIMENTO: \_\_\_\_\_

TÉRMINO DO PROCEDIMENTO: \_\_\_\_\_

DOSE EM CADA PONTO: \_\_\_\_\_ DOSE TOTAL: \_\_\_\_\_

**OBSERVAÇÕES:**

---

---

---

---

---

## PROTOCOLO

### MENSURAÇÃO DA ÁREA DE NECROSE

DATA: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

ANESTESIA: \_\_\_\_\_

INÍCIO DO PROCEDIMENTO: \_\_\_\_\_

TÉRMINO DO PROCEDIMENTO: \_\_\_\_\_

FOTOGRAFIA DIGITAL NÚMERO: \_\_\_\_\_

ÁREA TOTAL DO RETALHO: \_\_\_\_\_

ÁREA DE NECROSE DO RETALHO: \_\_\_\_\_

PORCENTAGEM DE NECROSE: \_\_\_\_\_

### ANÁLISE HISTOLÓGICA (avaliador 1)

DATA: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

VASOS DA ZONA I: \_\_\_\_\_

VASOS DA ZONA II: \_\_\_\_\_

VASOS DA ZONA III: \_\_\_\_\_

VASOS DA ZONA IV: \_\_\_\_\_

VASOS DO RETALHO: \_\_\_\_\_

### ANÁLISE HISTOLÓGICA (avaliador 2)

DATA: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

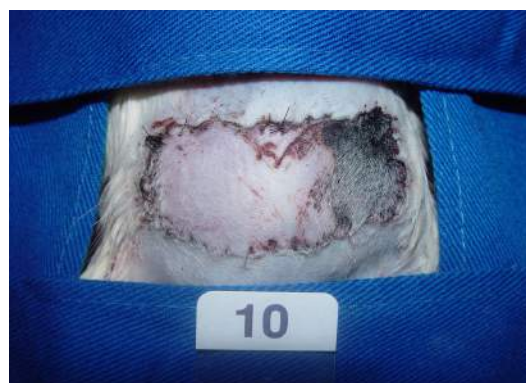
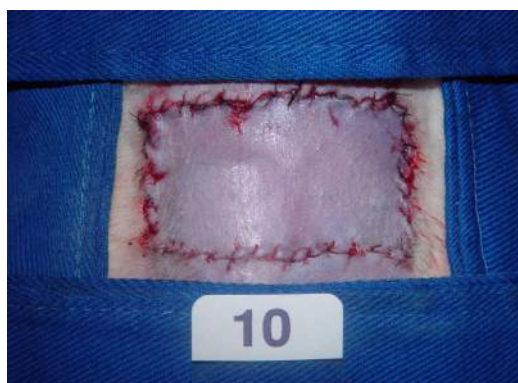
VASOS DA ZONA I: \_\_\_\_\_

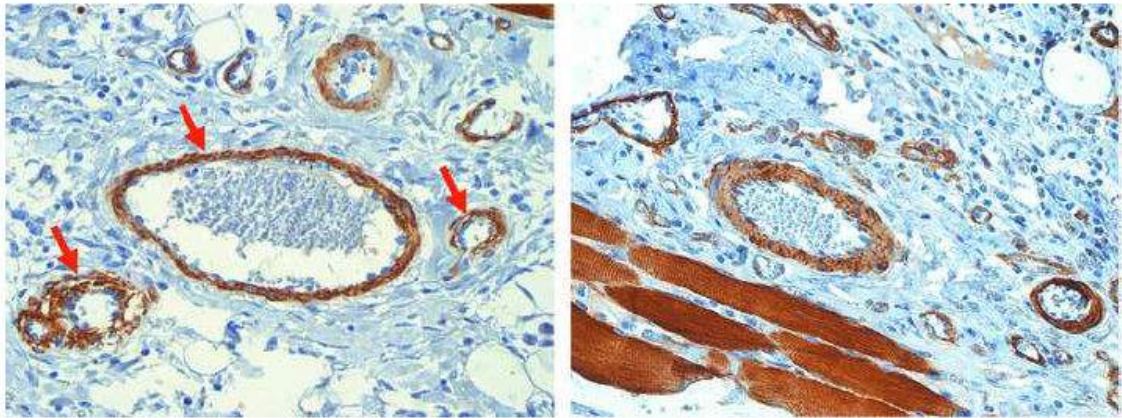
VASOS DA ZONA II: \_\_\_\_\_

VASOS DA ZONA III: \_\_\_\_\_

VASOS DA ZONA IV: \_\_\_\_\_

VASOS DO RETALHO: \_\_\_\_\_





A

B

**Figura 30:** Marcador HHF-35 com aumento de 400X. **A:** as setas mostram a formação de um complexo antígeno-anticorpo ao redor dos vasos sanguíneos, possibilitando a contagem para análise de morfometria. **B:** Lâmina com aumento de 400 X mostrando a marcação dos vasos e fragmento de músculo da zona I.

# ANEXOS

## ANEXO 1



Imagem 0714

Pesquisador(a) ANDRÉ LUZ PERES DE FREITAS

Co-Investigadores: Lygia Mizello Ferreira(orientadora), Hélio Francisco de Carvalho (Sócio)

Disciplina/Departamento: Cirurgia Plástica/Cirurgia da Universidade Federal de São Paulo-Hospital São Paulo

Patrocinador: Recursos Próprios

### PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref. Projeto de pesquisa intitulado: "Efeito da falta de alinhamento da musculatura cervical (NCSM) no retorno TRAM após abdoanoplastia em ratos".

**CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO:** experimental, categoria C.

**RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE:** não se aplica.

**OBJETIVOS:** Estudar o efeito do VEGF plasmidial na viabilidade de retalho TRAM, após abdoanoplastia, em rato.

**RESUMO:** Estudo com 40 ratos Wistar CPM, Anestésico: dietiléter e zolozepam. Eutanásia: overdose de anestésico. Serão avaliados 4 grupos: I- submetidos ao procedimento do retalho TRAM; II- submetidos ao procedimento de abdoanoplastia e injeção de solução salina; III- realizado procedimento de abdoanoplastia e injeção de vetor plasmidial SEM o VEGF; IV- procedimento de abdoanoplastia e injeção de vetor plasmidial COM o VEGF. Após 10 dias, será realizado o retalho miocutâneo transverso do abdômen reto do animal (TRAM). O vetor plasmidial pCF-VEGF será construído pelo Laboratório Interdisciplinar de Terapia Gênica - CINTÉRCEN da UNESP. Em todos os grupos, após um período de cinco dias do procedimento do TRAM, será avaliada a área de necrose do retalho. Os ratões serão sacrificados e realizadas avaliações histopatológicas e ensaio histo-angiogênico, com CD 34 e CD 31 para avaliar a neovascularização.

**FUNDAMENTOS E RACIONAL:** Estudo experimental, para avaliar o efeito da falta de alinhamento da musculatura cervical (NCSM) no retalho TRAM após abdoanoplastia em ratos.

**MATERIAL E MÉTODO:** Estudo descritivo de procedimentos, utilizando metodologia de revisão de equipe envolvida.

**TGE:** não se aplica.

**DETALHAMENTO FINANCEIRO:** sem financiamento externo - R\$ 17.520,00

**CRONOGRAMA:** 12 meses.

**OBJETIVO ACADÊMICO:** mestrado.

**ENTRADA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA:** 22/02/2008 e 22/02/2009.



Universidade Federal de São Paulo  
Faculdade Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa  
Hospital São Paulo

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo (AMM/USP) e (APROV/USP) adota o princípio de pesquisa responsável:

1. Consentir toda e qualquer alteração de projeto e termo de consentimento livre e esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do COMITÊ, após análise das mudanças propostas.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas de pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 11 anos para possível avaliação dos órgãos competentes.

Assinatura:

Prof. Dr. José Damas Medina Pastana  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da  
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

## ANEXO 2



**Título do Projeto :** Bactéria Escherichia Coli DH5 alpha não patogênica transformada com plasmídeos que expressam VEGF.

**Pesquisador Principal:** Sang Won Han

**Aluno:** André Luiz P. de Freitas

**Departamento/Disciplina:** CINTERGEN - UNIFESP

A CIBio UNIFESP analisou e aprovou o projeto de pesquisa acima referido conforme determinação da Lei 11.104 de 24 de março de 2005 (Lei de Biossegurança). É dever do pesquisador comunicar à CIBio qualquer modificação no projeto ou qualquer evento imprevisto durante a realização dos procedimentos descritos. Solicitamos ainda, relatório anual das atividades desenvolvidas.

Data do próximo relatório: fevereiro de 2008

São Paulo, 02 março de 2007

  
Prof. Dr. André Luiz P. de Freitas  
Presidente da CIBio-UNIFESP

## ANEXO 3

### Zoletil 50

Zoletil 50 é indicado para anestesia e contenção de várias espécies animais, tanto selvagens quanto silvestres.



Cartucho acompanhado por uma bula, contendo 1 frasco-ampola com liofilizado e 1 frasco-ampola com 5 mL de diluente.



#### Fórmula

Tiletamina(cloridrato).....125,0 mg  
 Zolazepam(cloridrato).....125,0 mg  
 Excipiente.....q.s.p.....660,0 mg

Cada frasco ampola de diluente contém:

Água estéril.....5,0 mL

#### Posologia

Cães: 0,20 mL/Kg/IM ou 0,12 mL/Kg/EV.

Gatos: 0,15 a 0,20 mL/Kg/IM ou 0,10 mL/Kg/EV.

Suínos: 0,20 a 0,40 mL/Kg/IM ou 0,12 a 0,24 mL/Kg/EV.

Manutenção da anestesia: 1/3 a 1/2 da dose original.

#### Propriedades

Zoletil 50 associa um novo composto da família das feniciclidinas - a tiletamina - a um composto da família das benzodiazepinas - o zolazepam - na proporção de 1:1, permitindo uma anestesia geral eficaz, segura e com um mínimo de efeitos secundários. Ações decorrentes das propriedades conjugadas dos 2 compostos: Cataléptica rápida sem agitação seguida de um relaxamento; Analgésica: superficial, visceral; Anestesia cirúrgica: conservação dos reflexos faríngeos, laríngeos e das pálpebras; Sem depressão bulbar; Possibilidade de sialorréia; Despertar: calmo e sem agitação, longe de estímulos auditivos e visuais violentos e reaparecimento rápido da coordenação motora. Fora de seu efeito anestésico, Zoletil 50 induz

poucas manifestações sobre os diferentes sistemas do organismo; Sistema nervoso: nenhuma ação sobre os receptores adrenérgicos; Conservação dos reflexos laríngeos, faríngeos e das pálpebras; Sistema Digestivo: conservação da tonicidade lingual; Sistema Cardio-Vascular: hipertensão e taquicardia de indução; Nenhuma variação de pressão intra-ocular; Sistema Respiratório: polipnéia de indução (essencialmente cães); Sistema Reprodutor: nenhum efeito abortivo, teratogênico ou embriotóxico.

### **Vantagens**

A combinação de Tiletamina (anestésico) e Zolazepam (tranquilizante) proporciona flexibilidade e segurança em diversos procedimentos.

Proporciona indução imediata.

Versatilidade: pode ser administrado por via intramuscular ou endovenosa; pode ser aplicado em diversas espécies animais, inclusive silvestres.

Despertar calmo e sem agitação.

### **Efeitos Colaterais**

Não possui.

### **Contra Indicações**

Zoletil é contra-indicado para animais nas seguintes condições:

Tratamentos com organofosforados sistêmicos;

Descompensações cardiorespiratórias;

Hipertensão grave;

Insuficiência pancreática.

### **Precauções**

Aconselha-se prévia dieta líquida, de doze horas no mínimo. As doses adicionais do produto, a fim de se prolongar uma intervenção, devem ser dadas levando-se em conta o fato que a cinética de eliminação dos dois componentes são ligeiramente diferentes e que há risco de se favorecer um efeito da tiletamina com despertar mais agitado por parte do animal.

O uso da coleira antiparasitária não constitui, por si só, uma contra-indicação, recomenda-se, entretanto, que ela seja retirada 24 horas antes do uso do Zoletil 50.

### **Validade**

24 meses após a data de fabricação.



## ANEXO 4

### Nuvilab CR-1

Composição do produto: Milho integral moído, farelo de soja, farelo de trigo, carbonato de cálcio, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, premix vitamínico mineral e aminoácidos.

Níveis de garantia por quilograma do produto:

Umidade (máx)	12,50%
Proteína Bruta (min)	22,00%
Extrato Etéreo (min)	4,50%
Matéria Mineral (máx)	10,00%
Matéria Fibrosa (max)	8,00%
Cálcio (máx)	1,40%
Fósforo (min)	0,80%

Enriquecimento por Quilograma do Produto:

Vitaminas: Vitamina A 12.000,00 UI; vitamina D3 1.8000,00 UI; vitamina E 30,00 mg; vitamina K3 3,00 mg; vitamina B1 5,00 mg; vitamina B2 6,00 mg; vitamina B6 7,00mg; Vitamina B12 20,00 mcg; niacina 60,00 mg; ácido pantotênico 20,00 mg; ácido fólico 1,00mg; biotina 0,05 mg; colina 600,00 mg.

Microelementos Minerais: Ferro 50,00mg; zinco 60,00mg; cobre 10,00 mg; iodo 2,00 mg; manganês 60,00 mg; selênio 0,05mg; cobalto 1,50 mg.

Aminoácidos: Lisina 100,00 mg; metionina 300mg.

Aditivos: Antioxidantes 100,00mg

Indicação: Alimento equilibrado para camundongos e ratos de laboratório, baseado em recomendações do National Research Council e National Institute of Health – USA

Uso: Administração à vontade através de comedouros suspensos.

Apresentação: Peletizada (extrusada ou farelada sob consulta).

## FONTES CONSULTADAS

Bussab WO, Morettin PA. Estatística Básica. 5. ed. São Paulo: Saraiva; 2006.

Ferreira ABH. Miniaurélio século XXI escolar. 4. ed. Rio de Janeiro: Nova Fronteira; 2001.

Morales MM. Terapias Avançadas. 1. ed. São Paulo: Atheneu; 2007.

Fleiss JL. Statistical methods for rates and proportions. 2. ed. New York: John Wiley; 1981. 38p.

Neter J, Kutner MH, Nachtsheim CJ, Wasserman W. Applied linear statistical models. 4 ed. Boston: Irwin; 1996.

Siegel, S. Estatística não-paramétrica para ciências do comportamento. 2.ed. Porto Alegre: Artmed; 2006.