

TIAGO SANTOS SILVEIRA

**FATOR DE CRESCIMENTO DO ENDOTÉLIO
VASCULAR NA VIABILIDADE DO RETALHO
MUSCULOFASCIOCUTÂNEO TRANSVERSO
DO RETO DO ABDOME, EM RATOS
SUBMETIDOS À NICOTINA.**

**Dissertação apresentada à Universidade
Federal de São Paulo, para obtenção do
título de Mestre em Ciências.**

SÃO PAULO

2009

TIAGO SANTOS SILVEIRA

**FATOR DE CRESCIMENTO DO ENDOTÉLIO
VASCULAR NA VIABILIDADE DO RETALHO
MUSCULOFASCIOCUTÂNEO TRANSVERSO
DO RETO DO ABDOME, EM RATOS
SUBMETIDOS À NICOTINA.**

**Dissertação apresentada à Universidade
Federal de São Paulo, para obtenção do
título de Mestre em Ciências.**

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. LYDIA MASA KO FERREIRA

CO-ORIENTADORES: Prof. HEITOR CARVALHO GOMES

Prof. CARLOS EDUARDO PINFILDI

SÃO PAULO

2009

Silveira, Tiago Santos.

Fator de Crescimento do Endotélio Vascular na viabilidade do Retalho Musculofasciocutâneo Transverso do Reto do Abdome, em ratos submetidos à nicotina./ Tiago Santos Silveira. -- São Paulo, 2009.

xv, 92f.

Tese (Mestrado) - Universidade Federal de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica.

Título em inglês: Vascular Endothelial Growth Factor in the viability of Transverse Rectus Abdominis Musculofasciocutaneous, in rats submitted to nicotine.

1. Fatores de Crescimento do Endotélio Vascular. 2. Terapia de Genes.
3. Eletroporação. 4. Retalhos Cirúrgicos. 5. Necrose. 6. Nicotina. 7. Ratos.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIRURGIA PLÁSTICA

COORDENADOR: Prof. Dr. MIGUEL SABINO NETO

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais EDVALDO e ALCINÉA e aos meus irmãos IGOR, TAIANA E YAN, em retribuição pela ausência durante os últimos anos. Apesar da distância, estamos sempre unidos pelo amor fraternal. Sem vocês, nada teria acontecido, com vocês, tudo fica mais fácil.

AGRADECIMENTOS

À **Prof^a. Dr^a. LYDIA MASAKO FERREIRA**, Professora Titular da Disciplina de Cirurgia Plástica do Departamento de Cirurgia da UNIFESP, Chefe do Departamento de Cirurgia da UNIFESP e orientadora deste trabalho, por ter me orientado durante este estudo, pelo exemplo de liderança, pelo conhecimento transmitido e pelas oportunidades concedidas.

Ao **Prof. HEITOR CARVALHO GOMES**, Professor Co-orientador do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica da UNIFESP, por ter co-orientado este trabalho, pelos ensinamentos na lida com os animais do laboratório, pelo companheirismo e por ter se mostrado um verdadeiro amigo. Agradeço pelos estímulos e pelos momentos agradáveis que tivemos durante esse tempo e tenho certeza que sempre permaneceremos com essa amizade.

Ao **Prof. CARLOS EDUARDO PINFILDI**, Professor Co-orientador do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica da UNIFESP, por ter me acompanhado com sábios ensinamentos e conselhos desde antes da minha entrada no curso de Aperfeiçoamento em Cirurgia Plástica da UNIFESP, durante esta etapa da pós-graduação *Stricto Sensu* e no futuro, espero poder compartilhar da sua presença enquanto professor.

Ao **Prof. VICTOR EDUARDO ARRUIA ARIAS**, Professor do Departamento de Patologia da UNIFESP, por todo empenho nas avaliações das lâminas. Sou muito grato pela disposição e paciência.

Às secretárias da Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP, **SANDRA DA SILVA, MARTA REJANE DOS REIS SILVA e SILVANA APARECIDA COSTA DE ASSIS**, por ajudarem na organização burocrática dos créditos e por me acompanharem sempre ajudando, em todo processo de pós-graduação.

Ao **Prof. SANG HON WAN**, Coordenador do Centro Interdisciplinar de Terapia Gênica (CINTERGEN), pelos ensinamentos durante minha passagem pelo seu laboratório e por ceder às estruturas do CINTERGEN para realização de parte deste trabalho.

À Bióloga **BIANCA LISBÔA**, doutoranda do Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular da UNIFESP, pela ajuda, paciência, competência e pelos preceitos prestados para realização deste trabalho.

Aos amigos **PASCALE TACANI, VIVIANE WOOD, MARCO NEVES, RAFAEL GOBBATO, ANDRÉ PIRES, FABIANE FURTADO, MAÍRA COSTA** colegas de pós-graduação, por ajudarem nos momentos de laboratório e por incentivarem a realização do mestrado durante esta fase da minha vida. A partir desta pós-graduação, tenho certeza que posso contar com vocês não somente para assuntos acadêmicos.

A todos os Professores Orientadores e Colaboradores do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica da UNIFESP pelas críticas sempre construtivas que fizeram com que eu aprendesse que tenho muito que aprender durante toda a minha vida. Vocês foram fundamentais para realização desse sonho e serão essenciais daqui pra frente.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo incentivo à pesquisa através da bolsa concedida para realização desse trabalho.

“Mestre não é aquele que sempre ensina, mas que de repente aprende.”

GUIMARÃES ROSA (1958)

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	iv
AGRADECIMENTOS	v
EPÍGRAFE	viii
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
RESUMO	xv
1.INTRODUÇÃO.....	1
2.OBJETIVO	5
3.LITERATURA.....	8
4.MÉTODOS.....	23
5.RESULTADOS.....	39
6.DISSCUSSÃO.....	46
7.CONCLUSÃO.....	58
8.REFERÊNCIAS.....	60
NORMAS ADOTADAS.....	67
ABSTRACT.....	68
APÊNDICE 1.....	69
APÊNDICE 2.....	71
APÊNDICE 3.....	72
APÊNDICE 4.....	73
APÊNDICE 5.....	74
APÊNDICE 6.....	75
APÊNDICE 7.....	76
APÊNDICE 8.....	77

Lista de Figuras

Figura 1.	Organograma ilustrando a divisão entre os grupos	26
Figura 2.	Região abdominal após depilação digital	28
Figura 3.	Injeção intradérmica do plasmídeo.	28
Figura 4.	Eletroporação intra-dérmica com eletrodos metálicos na zona 1 do retalho TRAM.	29
Figura 5.	Incisão da pele por todo perímetro do retalho TRAM, em reto.	30
Figura 6.	Dissecção do plano supra-aponeurótico, de lateral para medial até a linha Alba do retalho TRAM, em reto.	30
Figura 7.	Dissecção do plano supra-aponeurótico ipsilateral ao pedículo do retalho TRAM.	31
Figura 8.	Incisão na linha Alba e na porção cranial do músculo reto do abdome	31
Figura 9.	Sutura contínua da área doadora do retalho TRAM.	31
Figura 10.	Sutura da pele, por todo perímetro do retalho TRAM, com fio de náilon 4-0.	32
Figura 11.	Desenho da área do retalho, demarcando a área de necrose do TRAM.	33
Figura 12.	Mensuração digital da área de necrose pelo <i>software</i> Adobe Photoshop®	34
Figura 13.	Biópsia da pele anexada em cortiça	36
Figura 14.	Clivagem da biópsia, de acordo com as zonas	36
Figura 15.	Grade para contagem de vasos	37

Lista de Figuras

- Figura 16 Distribuição dos valores da porcentagem da área de necrose, em relação aos grupos do estudo 41
- Figura 17. Distribuição dos valores da porcentagem da densidade vascular, em relação aos grupos do estudo. 43
- Figura 18. **A:** Fotomicrografia da zona 1, da pele do rato, do grupo Controle em aumento de 400 X. **B:** Fotomicrografia da zona 1, da pele do rato, do grupo VEGF em aumento de 400X. As setas mostram os vasos sanguíneos. 44
- Figura 19. **A:** Fotomicrografia da zona 1, da pele do rato, do grupo Nicotina em aumento de 400 X. **B:** Fotomicrografia da zona 1, da pele do rato, do grupo Nicotina+VEGF em aumento de 400X. As setas mostram os vasos sanguíneos. 45

Lista de Tabelas

Tabela 1	Valores das porcentagens de área de necrose de cada animal em relação ao grupo	41
Tabela 2	Comparação estatística da Área de Necrose entre os grupos (Análise de Variância de Kruskal-Wallis).	42
Tabela 3	Valores das medianas da Porcentagem da Densidade Vascular por zona	43
Tabela 4	Comparação da Densidade Vascular entre os grupos (Análise de Variância de Kruskal-Wallis)	44

Lista de Abreviaturas

-bFGF	<i>b-Fibroblast Growth Factor</i>
-°C	Graus Celsius
-ad-VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> mediado por adenovírus
-CEDEME	Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais
-CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
-cm	Centímetro
-CMV	Citomegalovírus
-COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
-FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
-g	Gramas
-He-Ne	Hélio-Neônio
-h-VEGF	<i>human- Vascular Endothelial Growth Factor</i>
-Hz	Hertz
-J/cm ²	Joules por centímetro quadrado
-Kg	Quilograma
-LASER	<i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i>
-INCA	Instituto Nacional do Câncer
-mA	mili Ampéres
-MEC	Matriz Extracelular
-MDA	Malondialdeído
-mg	Miligrama
-mJ/mm	milijoule por milímetro
-ml	Mililitro
-mm	Milímetros
-ng/ml	nanograma por mililitro

- TRAM *Transverse Rectus Abdominis Musculocutaneous*
- UNIFESP Universidade Federal de São Paulo
- V Volt
- VEGF *Vascular Endothelial Growth Factor*

RESUMO

Introdução: Diversos fatores podem diminuir a viabilidade do retalho TRAM, dentre eles a nicotina que tem sido responsabilizada pela perda parcial ou total destes retalhos. **Objetivo:** Avaliar a ação do Fator de Crescimento do Endotélio Vascular na viabilidade do Retalho Musculofasciocutâneo Transverso do Reto do Abdome, em ratos submetidos à nicotina. **Métodos:** Foram utilizados 60 Ratos Wistar EPM-1, machos adultos, pesando de 230 a 300g, aleatorizados em 4 grupos de 15 animais cada: Grupo Controle composto por animais que foram submetidos ao retalho TRAM; Grupo Nicotina composto por animais que foram submetidos à nicotina e ao retalho TRAM; Grupo VEGF composto por animais submetidos à administração de VEGF plasmidial antes do retalho TRAM; e Grupo Nicotina+VEGF composto por animais que foram submetidos à nicotina, tratados com administração de VEGF e submetidos ao retalho TRAM. Para análise dos resultados foi realizado método de análise da área de necrose e de densidade vascular. **Resultados:** Houve diferença estatisticamente significativa na comparação entre todos os grupos, com relação às variáveis área de necrose e densidade vascular ($p < 0,05$). Os animais do Grupo VEGF apresentaram a menor área de necrose (4.10%) e a maior densidade vascular (39%) em relação aos outros grupos do estudo. **Conclusão:** O Fator de Crescimento do Endotélio Vascular aumentou a viabilidade do retalho musculofasciocutâneo transverso do reto do abdome, em ratos submetidos à nicotina.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais freqüente no mundo e o mais comum entre as mulheres. A cada ano, cerca de 22% dos casos novos de câncer em mulheres são de mama. (INCA, 2008).

Apesar da mastectomia ser um dos tratamentos mais indicados nos casos de câncer de mama, ainda é um procedimento radical, pois “amputa”, não só uma parte física, mas também um símbolo psicológico de feminilidade, sexualidade e maternidade (INCA,2008).

A Cirurgia Plástica tem papel importante na recuperação do bem estar físico e mental das pacientes mastectomizadas, principalmente na reconstrução mamária (VEIGA *et al.*, 2002; VEIGA *et al.*, 2004).

Para tanto, o retalho musculofasciocutâneo transverso do reto do abdome é considerado um dos mais indicados para essa reconstrução, pois além de fornecer bom resultado estético, promove grande satisfação (VEIGA *et al.*, 2002) e utiliza tecido autólogo capaz de recuperar grandes volumes mamários (HARTRAMPF, SCHEFLAN, BLACK, 1982).

Entretanto, o retalho *TRAM* (*Transverse Rectus Abdominis Musculocutaneous*) apresenta fatores que podem diminuir sua viabilidade, aumentando assim a incidência de necrose do tecido tegumentar e conseqüentemente dificuldades para reparar a lesão (SEIFY, BILKAY, JONES, 2003; DONCATTO, DA SILVA, DA SILVA, 2007).

Segundo GOMES *et al.*(2004), o fumo, mais especificamente a nicotina, tem propriedades vasoconstritoras aguda, diminuindo o fluxo sanguíneo e conseqüentemente, aumentando o risco de necrose do retalho, podendo diminuir a sobrevivência do mesmo (AKER *et al.*, 1997; GOMES

et al., 1998; GOMES, FERREIRA, CAMPOS, 2001; ELY *et al.*, 2003; MAUAD *et al.*, 2006; RUSSO *et al.*, 2006; LEITE *et al.*, 2007; CAMPOS *et al.*, 2008).

LOVICH & ARNOLD (1994), mostraram que a nicotina pode afetar adversamente os múltiplos estágios do processo de reparação tecidual e, ao estudar pacientes fumantes submetidas a retalhos musculofasciocutâneos, observaram que a complicação mais comum foi a necrose do pedículo e da pele suprajacente.

Em ratos submetidos ao retalho randômico dorsal com prévia administração de nicotina, observou-se que a sobrevivência dos mesmos foi significativamente menor (VAN-ADRICHEM, 1996; AKER, *et al.*, 1997; MAUAD *et al.*, 2006; RUSSO *et al.*, 2006;). ELY *et al.* (2003) administraram nicotina em ratos submetidos ao retalho *TRAM* e demonstraram que a nicotina está diretamente relacionada à isquemia e necrose cutânea.

Vários estudos em retalhos cirúrgicos experimentais foram realizados (SEIFY, BILKAY, JONES, 2003; PINFILDI *et al.*, 2005; YANG *et al.*, 2005; MAUAD *et al.*, 2006; PRADO *et al.*, 2005; TYNER *et al.*, 2006; DONCATTO, DA SILVA, DA SILVA, 2007; MEIRER *et al.*, 2007), utilizando agentes farmacológicos como Dimetil Sulfoxido (LEITE *et al.*, 2007), Acetilcisteína (ABLA *et al.*, 2005) e Propanolol (FONSECA *et al.*, 2004), ambos relatando aumento da viabilidade cutânea.

Com o objetivo de minimizar os efeitos colaterais de recursos farmacológicos, pesquisadores estudaram os agentes físicos como o LASER (PINFILDI *et al.*, 2008) e a TENS (LIEBANO *et al.*, 2008) em modelos de retalhos experimentais e ambos observaram aumento da

viabilidade de retalhos musculofasciocutâneos e redução da necrose tegumentar.

Nos últimos anos, com o advento da terapia gênica, surgiram pesquisas utilizando os organismos geneticamente modificados com intuito de tratar e ou curar determinadas alterações teciduais, bem como a utilização dos fatores de crescimento para induzir a proliferação celular (KHOURI, BROWN, LEAL-KHOURI, 1991).

Os fatores de crescimento são grupos de polipeptídeos endógenos compostos pelo aglutinado de 10 a 100 aminoácidos, que são sintetizados por vários tipos celulares e que atuam no organismo através de sinalização autócrina, parácrina e endócrina, e ultimamente vem sendo estudado com a finalidade de aumentar a viabilidade de retalhos cutâneos e musculares em modelos animais (KHOURI, BROWN, LEAL-KHOURI, 1991; SEIFY, BILKAY, JONES, 2003; YANG *et. al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 2001; MEIRER *et. al.*,2007).

O Fator de Crescimento do Endotélio Vascular humano (*hVEGF*) é conhecido como um poderoso vasodilatador, que aumenta a permeabilidade vascular e está associado a ativação de metaloproteinases que atuam tanto na lise como na despolimerização de proteínas da Matriz Extracelular (MEC), favorecendo a proliferação e a taxia de células endoteliais.

Para potencializar a transfecção de genes nos tecidos, são utilizados agentes físicos como correntes elétricas para eletroporação (GEHL, 2003)

A Eletroporação aumenta o potencial de transporte de membrana, promovendo uma formação transitória aquaporinas na bicamada lipídica, permitindo que macromoléculas migrem através desses poros (GEHL *et. al.*, 2003).

Estudos experimentais sugerem que o *VEGF* plasmidial, incrementado pela eletroporação, pode aumentar a viabilidade de retalhos musculofasciocutâneos (SEIFY, BILKAY, JONES, 2003; YANG *et. al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 2001).

Entretanto, não foram encontrados trabalhos experimentais em ratos previamente expostos à nicotina, tratados com *VEGF* plasmidial sob eletroporação e submetidos ao retalho TRAM.

OBJETIVO

2. OBJETIVO

Avaliar a ação do Fator de Crescimento do Endotélio Vascular na viabilidade do Retalho Musculofasciocutâneo Transverso do Reto do Abdome, em ratos submetidos à nicotina.

LITERATURA

3. LITERATURA

Os primeiros relatos da utilização do retalho *TRAM* para reconstrução mamária de mastectomizadas datam do final da década de 70 e início da década de 80, em que ROBBINS (1979) inicialmente descreveu a técnica de reconstrução mamária para mastectomizadas usando retalho musculocutâneo do reto do abdome com disposição vertical, entretanto em apenas quatro pacientes. Posteriormente GANDOLFO (1982) e HARTRAMPF, SCHEFLAN, BLACK (1982) citam a utilização do músculo reto do abdome como substituto dos implantes de silicone.

Como vantagens GANDOLFO (1982) publicou um técnica semelhante à HARTRAMPF, SCHEFLAN, BLACK (1982) em que ambos descreveram a reconstrução mamária com utilização do retalho *TRAM*, realizada com a paciente em decúbito dorsal durante toda operação, sem mudança de decúbito no transoperatório, como no caso da realização do retalho de músculo grande dorsal, além de que não se faz necessário o uso de implante mamário, tendo em vista que há volume suficiente de gordura, músculo e pele para simular uma mama, e a simetria pode ser obtida com mais facilidade, pois a quantidade de tecidos transferíveis e o seu arco de rotação, são de tal forma que é possível reconstruir inclusive a porção infra-clavicular e a projeção da prega peitoral.

HARTRAMPF (1988) realizaram uma revisão narrativa crítica enfatizando refinamentos da técnica operatória e quantificando as contra indicações em notas de 0 a 10 no diferentes fatores de risco. O grupo I

composto por pacientes sem fatores de risco e com nota 0, o grupo II composto por pacientes com nota ≤ 2 em que apresentam riscos leves e que os cirurgiões devem atentar para minimizar os riscos. O grupo III composto por pacientes com nota > 2 e ≤ 5 que representa uma situação intermediária, mas que podem ser indicados à cirurgia e por último os paciente com nota superior a 5 ou três ou mais fatores de risco, não devem ser submetidos à reconstrução mamária com retalho TRAM. Nesta ultima classificação o autor coloca os pacientes tabagistas, portadores de obesidade mórbida, doenças auto-imune, diabéticos, pacientes com dependência química, doença cardiovascular grave, hipertensão não controlada e pacientes submetidos a cirurgia abdominal com secção dos vasos epigástricos.

KERRIGAN (1983) foi o precursor do modelo experimental de retalho cutâneo dorsal em porcos e neste estudo, concluiu que a viabilidade dos retalhos cutâneos está relacionada a fatores extrínsecos sistêmicos, como tabagismo, infecção, aterosclerose, hipotensão e fatores locais como a compressão e trombose do pedículo. Todavia, o único fator intrínseco, foi atribuído à insuficiência arterial do pedículo, devido secção de vasos sanguíneos, linfáticos e terminações nervosas simpáticas. Desde então, passou a se estudar mecanismos coadjuvantes, que cooptem à insuficiência vasculo-nervosa do retalho.

LOVICH & ARNOLD (1994) realizaram um estudo retrospectivo com 300 pacientes fumantes, ex-fumantes e não-fumantes, ambas mastectomizadas, submetidas ao retalho TRAM. As pacientes foram distribuídas em 3 grupos; o Grupo 1 foi composto de pacientes não-

fumantes; o Grupo 2 foi composto por pacientes ex-fumantes, mas que pararam de fumar por um período de 1 ano antes da reconstrução mamária e o Grupo 3, composto por fumantes que não largaram o hábito antes da reconstrução mamária. As pacientes do Grupo 3 apresentaram mais complicações no período pós-operatório imediato quando comparadas às pacientes que não fumavam e às ex-fumantes e os principais danos foram a necrose muscular parcial associada a perda do retalho cutâneo.

SPEAR *et al.* (2005) estudaram durante 10 anos, de forma retrospectiva, uma amostra de 200 pacientes, tabagistas, ex-tabagistas e não-tabagistas, que foram submetidas ao retalho *TRAM* para reconstrução mamária pós-mastectomia. As pacientes foram distribuídas em 3 grupos, sendo um grupo de tabagistas representando 15,5% da amostra, um grupo de ex-tabagistas que pararam de fumar 4 semanas antes da reconstrução mamária, representando 17,5% da amostra, e um grupo de pacientes não-tabagistas, composto por 67% da amostra. Este trabalho mostrou através da regressão logística que as pacientes tabagistas apresentaram diversos fatores de risco como infecção, retardo no processo de reparo tecidual e necrose parcial do retalho; as pacientes ex-tabagistas, apresentaram retardo no processo de cicatrização pós-operatório, hematomas e 23% das pacientes deste grupo apresentaram perda total do retalho com necrose subcutânea. Assim, os autores contra indicam o procedimento operatório em pacientes tabagistas e em pacientes ex-tabagistas que pararam de fumar quatro semanas antes da reconstrução mamária.

VEIGA *et al.*(2002) avaliaram os resultados estéticos e testaram a fiabilidade dos sistemas de classificação utilizados para determinar o nível

de satisfação com reconstrução mamária por retalho TRAM em 20 pacientes que haviam sofrido mastectomia. Os resultados foram avaliados e comparados no 3º, 6º e 12º meses após a reconstrução utilizando a avaliação do próprio paciente em escores de 0 a 10 e também a avaliação de dois cirurgiões plásticos experientes com escores de 0 a 10. Na avaliação por categorias, não houve diferença significativa ($p < 0,001$) entre os pacientes e os avaliadores no 3º e 6º mês pós-operatório. No 12º mês, um dos avaliadores atribuiu escore significativamente menor ($p < 0,001$) do que os pacientes e os outros avaliadores. Os autores observaram um maior nível de satisfação pelos pacientes do que pelos avaliadores.

VEIGA *et al.* (2004) avaliaram o impacto do retalho TRAM de 25 pacientes mastectomizadas. Aplicaram o questionário de qualidade de vida SF-36 no 3º, 6º e 12º mês após a reconstrução mamária e compararam com 20 pacientes que não fizeram a reconstrução mamária. Concluíram que houve melhoria progressiva da qualidade de vida das pacientes submetidas ao TRAM em 7 dos oito tópicos avaliados, enquanto as pacientes do grupo controle não apresentaram melhora da qualidade de vida, exceto no tópico de função física.

FORREST, XU, PANG (1994) realizaram um estudo experimental em porcos *Yorkshire*, em que foi administrado 4,0mg/kg de nicotina, intramuscular, duas vezes ao dia, durante 4 e 5 semanas. Observaram redução do fluxo sanguíneo capilar nos retalhos cirúrgicos e uma redução na área viável dos retalhos, sugerindo que estes efeitos vasculares deletérios estão relacionados ao aumento nos níveis de noradrenalina (5×10^{-7} M) no fragmento de pele coletado do retalho cirúrgico, em relação aos

níveis circulantes (1.8×10^{-9} M) dos porcos tratados com nicotina. Foi também observado que os efeitos vasoconstritores da noradrenalina foram significativamente aumentados na presença da N-omega-monometil-L-arginina que se trata de um inibidor do óxido nítrico endotelial.

VAN-ADRICHEM *et al.* (1996) investigaram os efeitos da nicotina em ratos submetidos ao retalho retalho randômico dorsal com pedículo distal. A administração da nicotina foi realizada via inalatória e os animais foram contidos em uma câmara de indução de fumaça de cigarro. A cada dois segundos, 35 ml de fumaça de cigarro (1,5 mg de nicotina), diluída em 700 ml de ar ambiente foi introduzida na câmara que possuía 20.8% de oxigênio, 0,3% de dióxido de carbono e 200 ppm de monóxido de carbono, durante períodos de 20 minutos, com quatro horas de intervalo. Os 30 ratos foram aleatorizados em 3 grupos de 10 animais cada, sendo um grupo onde os animais sofreram administração da nicotina, seis semanas antes e duas semanas após o procedimento operatório; um grupo composto por 10 animais que sofreram administração da nicotina somente seis semanas antes do procedimento operatório e um grupo controle, composto de 10 animais que foram alojados na câmara de indução de fumaça de cigarro e foram submetidos aos mesmos procedimentos inalatórios dos outros animais, entretanto com ar ambiente, sem nicotina. Os animais que não foram expostos à nicotina apresentaram viabilidade média de 65.4%, no 14º dia após a operação, entretanto os animais submetidos à nicotina, seis semanas antes do procedimento operatório, apresentaram 52.7% de viabilidade no 14º dia após o procedimento operatório e os animais expostos à nicotina por seis semanas antes e por duas semanas após o

procedimento operatório apresentaram viabilidade de 47.5% no 14º dia pós operatório.

FORREST, PANG, LINDSEY (1987) comparam as diferenças hemodinâmicas e sobrevida retalhos cutâneos randômicos dorsais de ratos submetidos as doses de 1, 2, 4 ou 8 mg/kg/dia de nicotina durante 5 semanas, com início 4 semanas antes do procedimento operatório. Observaram que as doses de 2, 4 e 8 mg/Kg/dia estavam associadas com a redução do fluxo capilar distal do retalho bem como uma área de necrose maior quando comparado aos animais do grupo controle que receberam solução salina (0,9%). Concluíram que a nicotina pode causar hipóxia e necrose aguda em retalhos cutâneos randômicos e que os efeitos deletérios da nicotina são dose-dependentes.

FORREST, PANG, LINDSEY (1991) objetivaram estudar os efeitos da exposição à baixas doses de nicotina, a longo prazo, no tecido cutâneo de ratos submetidos ao retalho randômico dorsal. Administraram nicotina (0,6mg/kg) duas vezes ao dia, via subcutânea, durante 24 semanas e observaram que o fluxo capilar sanguíneo distal, bem como a viabilidade dos retalhos estiveram estatisticamente reduzidos quando comparados aos animais do grupo controle que foram submetidos aos mesmos procedimentos, entretanto com cloreto de sódio (0,9%). Entretanto não observaram danos à microvasculatura em ambos os grupos.

AKER *et al.* (1997) descreveram que pentoxifilina (20mg/Kg) via subcutânea, bloqueou o efeito deletério da nicotina (0,6mg/kg) durante 24

semanas no pré-operatório de ratos submetidos ao retalho randômico dorsal.

ELY *et al.* (2003) aplicaram nicotina (2mg/Kg) via subcutânea, duas vezes ao dia. Após 28 dias de administração da nicotina os animais foram submetidos ao retalho *TRAM* e 48 horas após o retalho, foi analisada a área macroscópica de necrose do retalho que foi significativamente maior (nos animais que foram tratados com nicotina em relação aos animais do grupo controle que receberam 0,2ml de solução de Cloreto de Sódio (0.9%).

PINFILDI *et al.* (2005) verificaram a eficácia do laser hélio-neônio (He-Ne) na viabilidade do retalho cutâneo randômico dorsal em ratos. Foi utilizada a densidade de energia de 3 Joules por centímetros quadrados (J/cm^2) imediatamente após o procedimento operatório e nos outros 4 dias subsequentes. As porcentagens da área de necrose de todos os grupos foram avaliadas no sétimo dia pós-operatório com o método do gabarito de papel e o melhor tratamento proposto foi o que aplicou a Terapia a Laser dentro e fora do retalho.

PINFILDI *et al.* (2008) quantificaram a proliferação mastocitária na pele de ratos submetidos ao retalho *TRAM* e tratados com Terapia a Laser de Baixa Intensidade nas doses de 3, 6, 72, 144 J/cm^2 em um ponto sobre o pedículo vascular do retalho e nas doses de 3 e 6 J/cm^2 em 24 pontos dentro e fora do retalho. Ao avaliar a área de necrose observaram que os melhores resultados foram nos animais tratados com um ponto sobre o pedículo, na dose de 72 J/cm^2 (%) e 144 J/cm^2 (%) e que na contagem morfométrica de

mastócitos foi maior nos animais dos grupos estimulados em um ponto sobre o pedículo, nas doses de 6J/cm² e 144J/cm², sugerindo novos estudos com doses acima de 144J/cm².

MEIRER *et al.* (2007) compararam os efeitos da Terapia Gênica por Fator de Crescimento do Endotélio Vascular mediado pelo adeno-vírus (ad-*VEGF*) com as Ondas de Choque (2500 impulsos e 0.15mJ/mm), em ratos submetidos ao retalho randômico abdominal. Neste trabalho, os autores observaram que os animais tratados com as Ondas de Choque obtiveram menor porcentagem de necrose (2,23%) quando comparados aos tratador com ad-*VEGF* (9,25%) enquanto que o controle apresentou 17,4% de necrose, ambos ao sétimo dia após a elevação do retalho, sugerindo que as Ondas de Choque são melhores para tratar lesões cutâneas isquêmicas no modelo proposto.

LIEBANO, ABLA, FERREIRA (2006) utilizaram 75 ratos Wistar que foram submetidos ao retalho cutâneo randômico dorsal e estudaram o efeito da estimulação elétrica nervosa tanscutânea de alta frequência (80 Hertz), duração de pulso de 200µs e amplitudes de 5,10,15 e 20 miliapéres (mA). Ao sétimo dia pós-operatório foi realizada avaliação da área de necrose e os animais tratados com a amplitude de 15mA tiveram menor área de necrose (39.92%) quando comparada aos animais do grupo controle (61.92%).

LIEBANO, ABLA, FERREIRA (2008) utilizaram 75 ratos Wistar que foram submetidos ao retalho cutâneo randômico dorsal e estudaram o

efeito da estimulação elétrica nervosa tanscutânea de baixa frequência (2 Hertz), duração de pulso de 200 μ s e amplitudes de 5,10,15 e 20 miliapéres (mA). Ao sétimo dia pós-operatório foi realizada avaliação da área de necrose e os animais tratados com a amplitude de 15mA tiveram uma menor área de necrose (32.14%) quando comparada aos animais do grupo controle (43.88%).

RUSSO *et al.* (2006) utilizaram 16 ratos Wistar que foram submetidos ao retalho cutâneo randômico dorsal e estudaram o efeito da estimulação elétrica nervosa tanscutânea de baixa frequência (2 Hertz), duração de pulso de 200 μ s e amplitude 15mA. Ao sétimo dia pós-operatório foi realizada avaliação da área de necrose e os animais tratados com a amplitude de 15mA tiveram uma menor área de necrose (21%) quando comparada aos animais do grupo controle (45%).

MUAD *et al.* (2006) compararam a ação isolada e associada do buflomedil (6mg/kg) e da pentoxifilina (20mg/kg) na viabilidade de retalhos cutâneos dorsais de ratos tratados com doses subcutâneas de nicotina (4mg/kg) 40 dias pré-operatório e 7 dias pós-operatório. Os animais do grupo nicotina apresentaram menor área de tecido viável (60,7%) que os animais do grupo controle (73,7%). A área de tecido viável dos animais do grupo buflomedil foi de 76,4%, pentoxifilina 74,2% e pentoxifilina associada ao buflomedil 74,0%. Não foram encontradas diferenças significativas quando as drogas foram utilizadas isoladamente ou em associação.

ABLA *et al.*(2005) analisaram a Acetilcisteína (300 mg/kg) por gavagem, 15 minutos antes da elevação do retalho cutâneo randômico, em ratos. A área média de necrose no grupo controle foi 66% e no grupo Acetilcisteína 52%. Os níveis de malondialdeído (MDA) foram menores nas amostras de pele do retalho no grupo controle (1235ng/ml) do que nas amostras do grupo acatylcisteína (2346ng/ml) e o oposto observado nas amostras de pele normal dos animais do grupo controle (2038ng/ml) e do grupo acetilcisteína (935ng/ml).

LEITE *et al.* (2007) utilizaram 14 ratos *Wistar* para estudar os efeitos farmacológicos antioxidantes do Dimetil Sulfoxido em retalho randômico dorsal de ratos expostos à nicotina. Todos os animais do experimento foram submetidos a aplicação de nicotina (1.2mg/kg/dia) durante 7 dias pré-operatórios e após a elevação do retalho, os animais foram aleatorizados em dois grupos de sete animais cada, sendo um grupo controle, em que os animais deste grupo receberam água destilada (2 ml/Kg) por gavagem 5 minutos após o procedimento operatório enquanto que os outro sete animais receberam Dimetil Sulfóxido (2ml/kg) por gavagem, cinco minutos após os procedimentos operatórios.

Ao avaliar a área de necrose, observaram média de 40,2% nos animais do grupo controle enquanto que os animais tratados com Dimetil Sulfoxido apresentaram média de 20,6% de necrose.

KHOURI *et al.* (1991) utilizaram ratos para identificar a propriedade angiogênica do fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF) em dois grupos diferentes. Os animais do primeiro grupo foram tratados com 1µg de

bFGF em solução de colágeno administrado via subcutânea e observaram um aumento da viabilidade quando comparado aos animais que passaram pelo mesmo procedimento, entretanto sem o bFGF. Neste modelo, os autores citam que o bFGF aumentou o número da rede vasculares entre a ante a porção cranial e a porção caudal, impedindo a necrose. No segundo grupo foram realizados dois retalhos abdominais de 6X2.5cm em cada animal e tratou-se apenas um dos retalhos com 1µg via subcutânea. Neste modelo não observaram diferenças estatisticamente significantes.

UHL *et al.* (1994) descreveram os efeitos do bFGF humano em modelo de retalho cutâneo em orelha de rato *nude*. Os animais foram aleatorizados em grupos com diferentes doses de bFGF humano (480ng, 1200ng e 2700 ng) e em intervalos de tempo diferentes de 6 e 18 dias de aplicação antes da elevação do retalho. Analisaram a perfusão microvascular dos retalhos no quinto dia pós-operatório através do marcador fluorescente isotiocianato-dextrano administrado via intravenosa. Os melhores resultados foram dos animais previamente tratados por 18 dias antes do procedimento operatório na dose de 2700ng (bFGF Humano). Os autores concluíram seu estudo afirmando que o bFGF humano é tempo e dose dependente.

HAYWARD *et al.* (1991) estudaram o bFGF (100 µg via subcutânea) para conferir sua importância na angiogênese, em modelo de retalho randômico dorsal em ratos. Analisaram o fluxo sanguíneo através de laser Doppler antes e após a elevação do retalho e não observaram diferenças significantes no número e no diâmetro dos vasos, entretanto, na

análise histológica foi observado um número aumentado de fibroblastos perivascular.

TEPPER & MEHRARA (2002) realizaram um artigo de revisão narrativa sobre Terapia Gênica em cirurgia plástica e discutem a importância de novos avanços científicos neste ramo da Medicina Regenerativa com suas vantagens e desvantagens, concluindo que a Terapia Gênica possivelmente será aplicabilidade no processo de reparo tecidual ósseo e no tecido nervoso.

O'TOOLE *et al.*(2002) compararam o potencial angiogênico de três isoformas de VEGF (a165, b167 e b186) em modelo de retalho cutâneo abdominal. Os vetores plasmídias foram administrada via subcutânea (50µg) na região do retalho de oito em oito centímetros, por toda extensão do mesmo. Concluíram que os grupos tratados com as isoformas a165 e b167 apresentaram viabilidade maior quando compara aos outros grupos, todavia não houve diferença entre número e calibre dos vasos.

ZHANG *et al.* (2001) estudaram o aumento da viabilidade do retalho TRAM, em ratos, com a aplicação do VEGF recombinante. Utilizaram a via subdérmica no pré-operatório e as vias intravenosa e intra-arterial, no intra-operatório. A dose do VEGF recombinante também variou de 50 microgramas para o grupo subdérmico a 100 microgramas para os outros dois grupos. Obtiveram melhora da viabilidade do TRAM, apenas no grupo com aplicação pré-operatória subdérmica.

SEIFY, BILKAY, JONES (2003), compararam o efeito do VEGF recombinante e da autonomização cirúrgica, na viabilidade do TRAM, em ratos tratados no pré-operatório de dez dias. O VEGF recombinante foi administrado, por via intramuscular e intra-arterial, em dose única de 100 microgramas. Conseguiram melhora da viabilidade do TRAM no grupo autonomizado, nos grupos tratados com o VEGF e nos grupos onde houve associação.

GEHL (2003) define que a eletroporação utiliza pulsos curtos de alta ou baixa voltagem com objetivo de superar a barreira do estrato córneo da pele e das membranas celulares e com isso formar poros para aumentar o influxo de conteúdo extracelular para dentro da célula. O autor relata que a eletroporação se mostrou eficaz para o carregamento de uma grande variedade de moléculas, sendo corantes, marcadores, anticorpos, e para oligonucleotídeos de DNA e RNA e pode ser aplicada tanto *in vitro* como *in vivo*. Atualmente são feitos tratamentos de câncer com objetivo de controlar a proliferação celular utilizando técnicas de eletroporação.

SASAKI & PANG (1980), descreveram um método para avaliar a necrose tecidual de retalhos cutâneos randômicos, utilizando papel vegetal, grafite e balança de precisão. A vantagem desse método está na facilidade de utilização e custo, devido a vasta utilização na literatura

SANO *et al.* (2001) estudaram a validade de dois métodos: gabarito de papel e programa de computador (Adobe Photoshop). Para tanto utilizaram 64 ratos que foram submetidos ao retalho TRAM e foi realizado

método de gabaritos de papel para então digitalizar forma de bitmap. Foi avaliado pelo *software*, onde cada bitmap foi colorido correspondendo à área viável e não viável dos retalhos. A partir disso, a soma dos pixels individuais coloridos foram somados para calcular a porcentagem da área de viabilidade dos retalhos. A comparação de ambos os métodos em 64 ratos mostrou que a área viável do retalho foi levemente maior quando usado o método com software do programa de computador, porém, não houve diferença estatisticamente significativa em comparação ao grupo avaliado com o método gabarito de papel ($p=0,479$). Portanto, sugerem o método computadorizado por ser específico para retalho TRAM em rato e por evitar pequenos erros no momento da pesagem do gabarito, no método convencional.

MÉTODOS

4. MÉTODOS

4.1- ANÁLISE E APROVAÇÃO DO PROJETO

O Projeto de Pesquisa foi submetido e aprovado pela Comissão Interna de Biossegurança (Apêndice 1) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), sob protocolo número 0223/08(Apêndice 2).

4.2- TIPO DE PESQUISA

O presente estudo é primário, intervencional, experimental, analítico, controlado, aleatorizado e duplo-cego, que foi realizado no laboratório de Microcirurgia da Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP.

4.3- AMOSTRA

Foram utilizados 60 ratos da linhagem Wistar-EPM1(*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia*, *Mammalia*), machos, adultos, pesando entre 230 e 300 gramas (g), com peso médio de 270g no início do experimento,

oriundos do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia (CEDEME) da UNIFESP.

Os animais foram acondicionados em gaiolas individuais de polipropileno, durante 15 dias antes do início do experimento, recebendo ração e água *ad libitum* durante todo o período do trabalho, tendo ciclos de claro-escuro de 12 horas cada, com temperatura constante de 22° *Celsius* (C), segundo as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 2007).

4.4 - DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

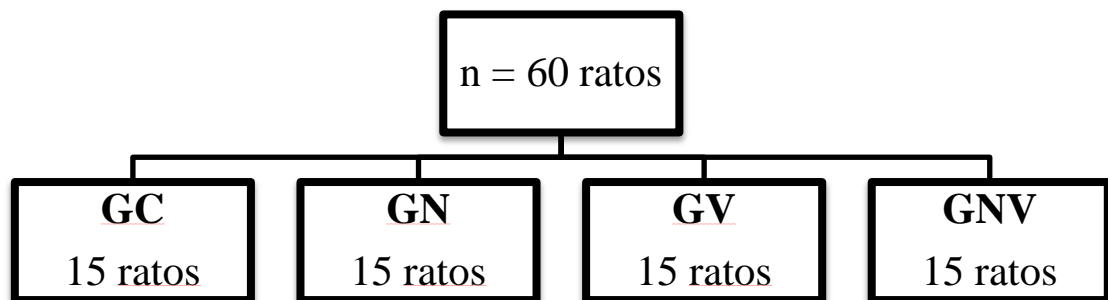
Os animais foram aleatorizados pelo método de envelopes opacos selados e distribuídos em quatro grupos, de acordo com os procedimentos operatórios e terapêuticos de cada grupo, como segue.

Grupo Controle (GC): Nos animais deste grupo foi realizado apenas o retalho *TRAM*;

Grupo Nicotina (GN): Os animais deste grupo foram submetidos à aplicação subcutânea de nicotina na região dorsal, dois cm a direita da quinta vértebra lombar, diariamente, por sete dias antes da realização do retalho *TRAM*, na região dorsal do animal, sobre a articulação coxo-femoral;

Grupo VEGF (GV): Nos animais deste grupo, foi realizada injeção intradérmica de *VEGF* plasmidial, seguida de eletroporação, um minuto antes do procedimento operatório de retalho *TRAM*;

Grupo Nicotina+ VEGF (GNV): Os animais deste grupo foram submetidos à administração subcutânea de nicotina na região dorsal dois cm a direita da quinta vértebra lombar diariamente, por sete dias pré-operatórios na região dorsal do animal, sobre a articulação coxo-femoral. Um minuto antes do procedimento operatório do retalho *TRAM*, os animais deste grupo foram tratados com injeção intradérmica de *VEGF* plasmidial, seguida de eletroporação, como segue o organograma:



GC- Grupo Controle (n= 15ratos)

GN- Grupo Nicotina (n= 15 ratos)

GV- Grupo VEGF (n= 15 ratos)

GNV- Grupo Nicotina VEGF (n=15 ratos)

Figura 1- Organograma ilustrando a distribuição dos grupos.

4.5- ADMINISTRAÇÃO DA NICOTINA

A nicotina foi administrada com auxílio de seringa de insulina de um mililitro (ml) e agulha hipodérmica de 45x13 milímetros (mm). Foram injetados 1,2 miligramas (mg) de nicotina, por quilograma (Kg) de peso do animal, por dia, durante 7 dias pré-operatórios, na região dorsal, dois centímetros (cm) a direita da quinta vértebra lombar.

4.6- PROCEDIMENTO TERAPÊUTICO

Para realização do tratamento com o plasmídeo codificando o gene VEGF, os animais do GV e do GNV foram previamente anestesiados com associação de 100 mg/Kg de Cloridrato de Ketamina com 50 mg/kg de Cloridrato de Xilazina. Os animais foram retirados da gaiola, contidos pela região dorsal para aplicação via intramuscular, de anestésicos, no músculo gastrocnêmio direito. Para aplicação dos anestésicos, foi utilizada seringa de 1 ml e agulha hipodérmica de 45 x 13 mm.

Em plano anestésico os animais foram posicionados em decúbito dorsal, sobre mesa operatória, para realização da depilação digital da região abdominal, em uma área de 6 cm látero-lateral por 7 cm crânio caudal, adotando como limite cranial a margem inferior do apêndice xifóide (Figura 2).

Após a tricotomia, foi demarcado o campo operatório, dois cm abaixo do apêndice xifóide, medindo cinco cm látero-lateral por 3 cm crânio-caudal.

As zonas do retalho *TRAM*, foram desenhadas para então ser injetado o vetor plasmidial, utilizando seringa de 1 ml de insulina e agulha hipodérmica de 45 x 13 mm, foi administrado via intradérmica, na zona 1, 1,5 cm abaixo do limite cranial do retalho, 50 µg de vetor plasmidial em 50 µl de PBS (*Phosphate-Buffered Saline*, pH 7,4) (Figura 3).

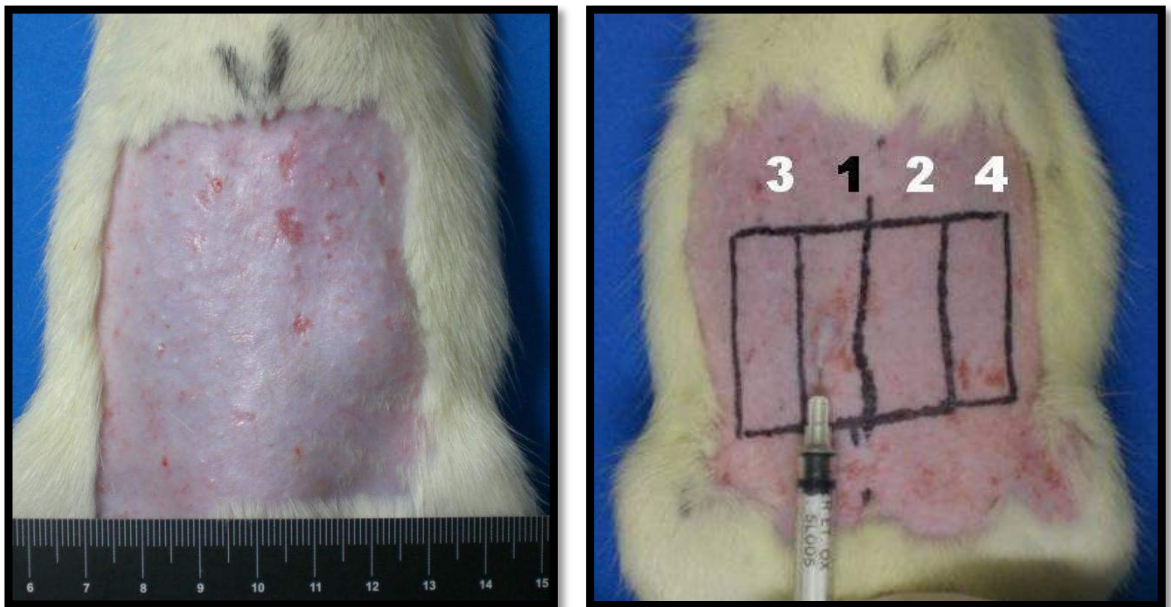


Figura 2- Região abdominal após depilação digital

Figura 3- Injeção intradérmica do plasmídeo.

O vetor plasmidial uP foi construído pela inserção de uma sequência de *DNA* contendo o intron 1 do gene CMV (citomegalovirus) com sinal de splicing entre o promotor CMV e o sítio de policlonagem do vetor pVAX (Invitrogen). O cDNA do gene VEGF₁₆₅ (*Vascular Endothelial Growth Factor 165*) foi inserido entre os sítios Eco RI e Eco RV do vetor uP. O

vetor foi produzido em larga escala e purificado por cromatografia utilizando o kit de Megaprep (Qiagen) e dissolvido em tampão PBS.

Logo após a administração do plasmídeo foi realizada a eletroporação utilizando um eletroestimulador (Electro Square Porator ECM 830; BTX, San Diego, CA) de alta voltagem (>30 Volts) com eletrodo tipo agulha de 5 mm (Figura 4). Três pulsos de 80 volts (V) foram conduzidos no local da injeção com 50 milissegundos de duração e com 1 segundo de intervalo entre os pulsos. (Figura 4).

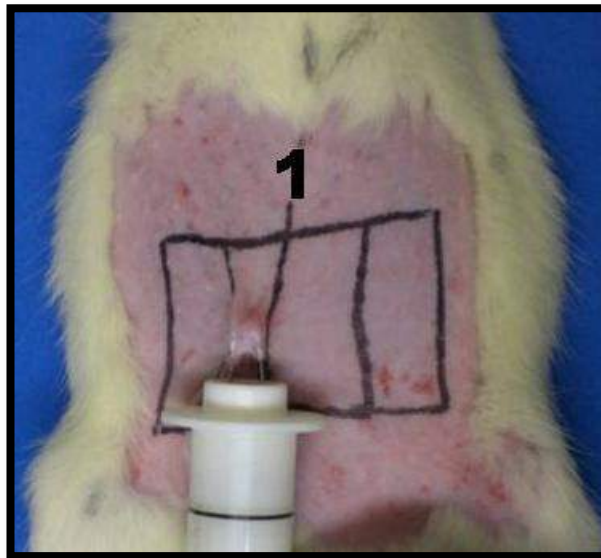


Figura 4- Eletroporação intra-dérmica com eletrodos metálicos na zona 1 do retalho TRAM.

4.7- TÉCNICA OPERATÓRIA

Todos os animais foram operados pelo mesmo pesquisador, que não tinha conhecimento dos grupos os quais pertenciam os animais. A técnica

operatória foi realizada em concomitância com o modelo de retalho *TRAM* descrito por ELY & FERREIRA (2003).

Um minuto após o procedimento terapêutico, ainda anestesiados, os animais foram preparados para o procedimento operatório, realizando anti-sepsia com iodo, de toda região abdominal e a pele foi incisada em todo o perímetro do retalho com auxílio de lâmina de bisturí número 15 (Figura 5).

A dissecação do mesmo iniciou-se no lado contralateral (esquerdo) ao pedículo, com a dissecação no plano supra-aponeurótico, de lateral para medial, antes de alcançar a Linha Alba (Figura 6).

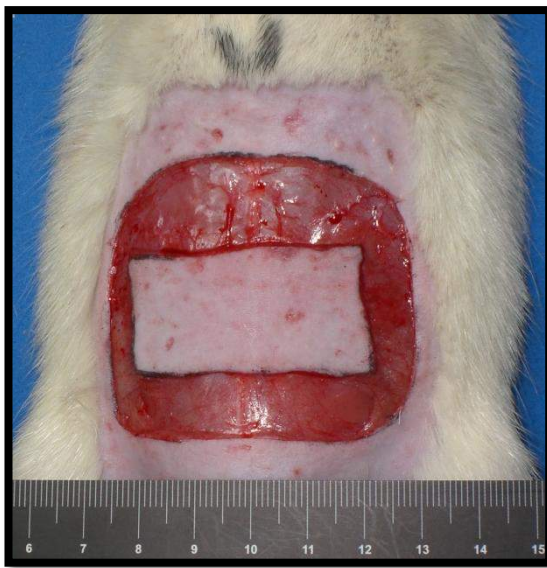


Figura 5- Incisão da pele por todo o perímetro do retalho TRAM, em reto.

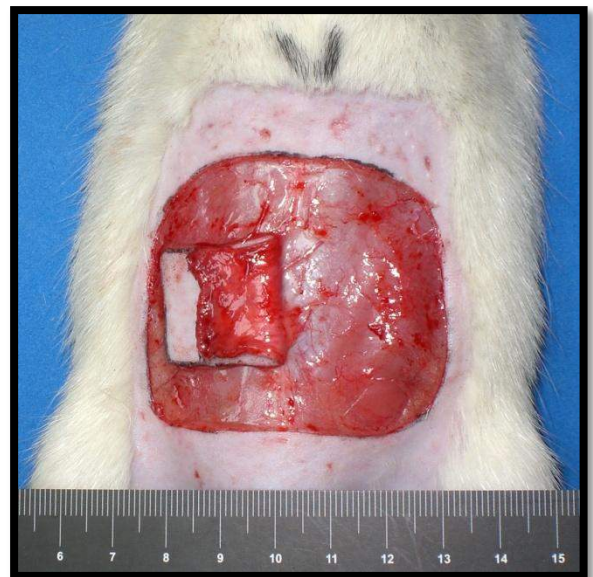


Figura 6- Dissecção do plano supra-aponeurótico, de lateral para medial até a linha Alba do retalho TRAM, em reto.

Ipsilateralmente (direito) ao pedículo, o retalho foi dissecado antes da margem lateral direita do músculo reto do abdome (Figura 7).

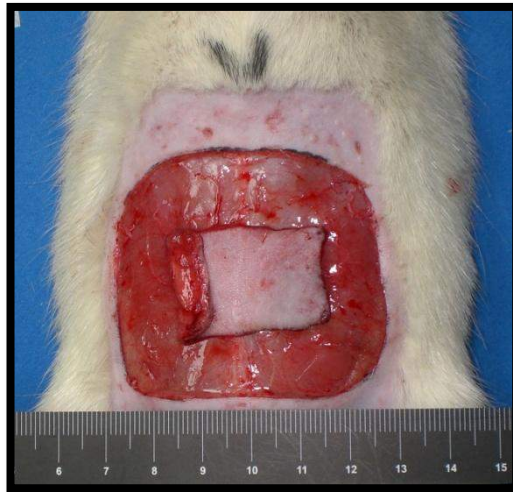


Figura 7- Dissecção do plano supra-aponeurótico ipsilateral ao pedículo do retalho TRAM.

Posteriormente, foi realizada incisão ao longo da Linha Alba, seguida por incisão na porção cranial do músculo reto do abdome direito (Figura 8). O retalho foi elevado após secção da margem lateral do músculo reto do abdome e a área doadora fechada, por meio de sutura contínua com náilon monofilamentar 4-0 (Figura 9).

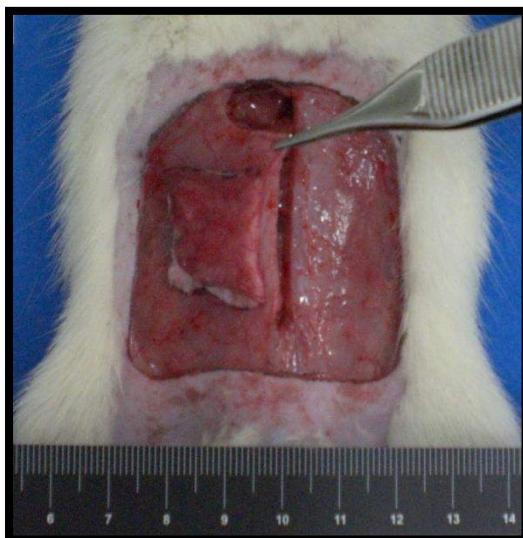


Figura 8- Incisão na linha Alba e na porção cranial do músculo reto do abdome

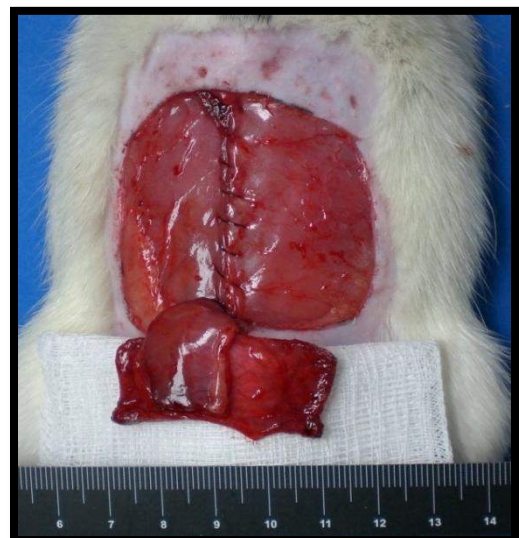


Figura 9- Sutura contínua da área doadora do retalho TRAM

O retalho ficou pediculado somente no músculo reto do abdome direito, baseado na artéria epigástrica profunda caudal direita e a pele foi suturada com fio de náilon 4-0, primeiro com pontos separados, na linha média e nos quatro ângulos do mesmo.

Em seguida foi realizada sutura contínua, com o fio de náilon 4-0, por todo perímetro do retalho (Figura 10).

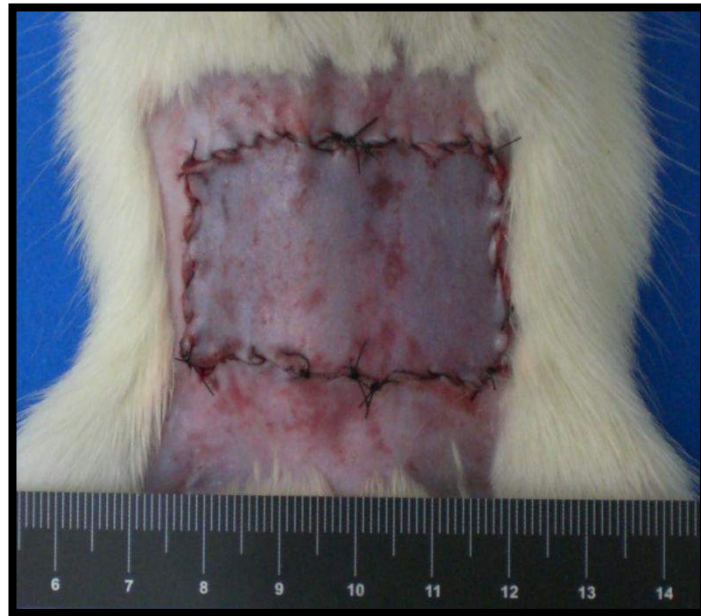


Figura 10- Sutura da pele, por todo perímetro do retalho TRAM, com fio de náilon 4-0.

Após o procedimento operatório e, diariamente, até o dia da eutanásia, foi realizado método analgésico com 5 mg/kg de Cloridrato de Tramadol, por gavagem.

4.8- ANÁLISES MACROSCÓPICAS DA ÁREA DE NECROSE

A análise macroscópica foi realizada pelo método sugerido por SANO *et al.*(2001) para quantificar a porcentagem macroscópica de necrose em retalho *TRAM*, com a utilização de papel vegetal, grafite 2B e *Software* Adobe Photoshop CS/2®. Para esta mensuração, os animais foram anestesiados, no 5º dia pós-operatório, com a associação de 100 mg/Kg de Cloridrato de Quetamina, com 50 mg/Kg de Cloridrato de Xilazina, via intramuscular, no músculo gastrocnêmio direito .

Ao atingirem plano anestésico, os animais foram posicionados em decúbito dorsal, para sobrepor um corte de papel vegetal, com gramatura de 90 g /95 metros quadrados (m²), medindo 10 cm de largura por 10 cm de comprimento. Com a grafite 2B, os pesquisadores desenhavam todo o comprimento do retalho e em seguida a região do retalho onde houve necrose (Figura 11). Esta avaliação foi realizada por dois pesquisadores que não sabiam a quais grupos os animais pertenciam.

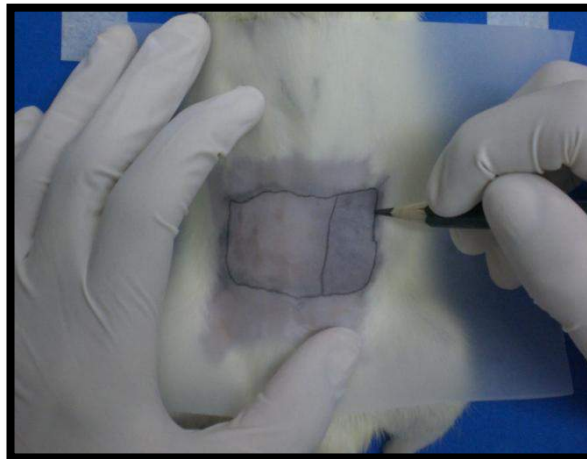


Figura 11- Desenho da área do retalho, demarcando a área de necrose do *TRAM*.

O tecido viável foi determinado como sendo pele de cor rósea, macia, com pêlos e temperatura elevada. O tecido necrosado teve como parâmetros pele escurecida, rígida, sem pêlos e hipotérmica.

Os moldes desenhados em papel vegetal foram digitalizados em escâner, na resolução de 300 dpi. Com o *software* Adobe Photoshop foi mensurada, em pixels, a área total do retalho e em seguida a área de necrose do retalho também em pixels (Figura 12).

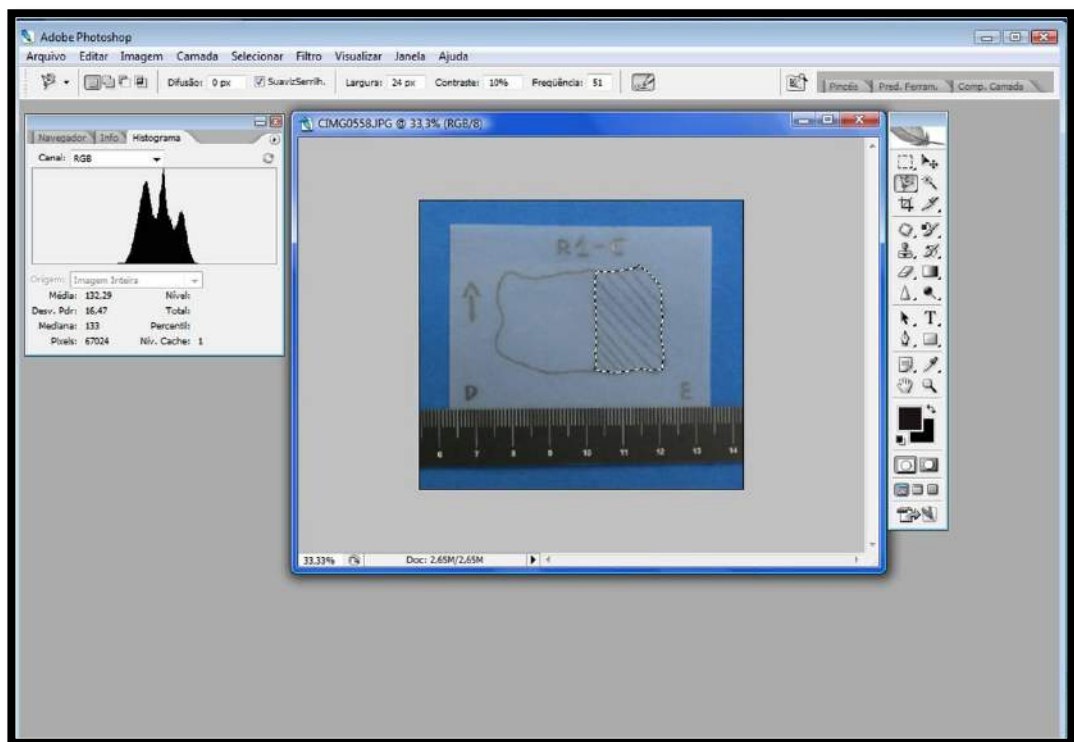


Figura 12- Mensuração digital da área de necrose pelo *software* Adobe Photoshop®

Para determinar a porcentagem da área macroscópica de necrose de cada animal foi aplicada a seguinte fórmula:

$$\text{PORCENTAGEM DE ÁREA DE NECROSE} = \frac{\text{Número de pixels da área de necrose do retalho}}{\text{Número de pixels da área total do retalho}} \times 100$$

Os valores de área de necrose e de área total do retalho foram inseridos no *software* Microsoft Office Excel 2007® para organização dos dados, formatação das tabelas e envio para análise estatística.

4.9 – ANÁLISES MICROSCÓPICAS DE DENSIDADE VASCULAR

Após as mensurações macroscópicas feitas pelos dois pesquisadores, os animais, ainda anestesiados, foram submetidos à biopsia do fragmento de pele que compreendia todo o perímetro do retalho, incluindo as áreas que necrosaram.

Este fragmento de pele foi fixado em solução de formalina tamponada a 10%, com Ph de 7.0, em temperatura de 20°C, por 24 horas, e encaminhado para processamento. Para evitar retração das proteínas fibrosas da derme, durante a fixação, as amostras de pele foram anexadas a cubos retangulares de cortiça, medindo 5x3x1 cm (figura 13).

Posteriormente à fixação por 24 horas, as amostras de pele foram clivadas em cortes longitudinais, totalizando quatro fragmentos de aproximadamente 1,25 cm de largura por 3 cm de comprimento, de acordo com a zona de isquemia do retalho (figura 14).

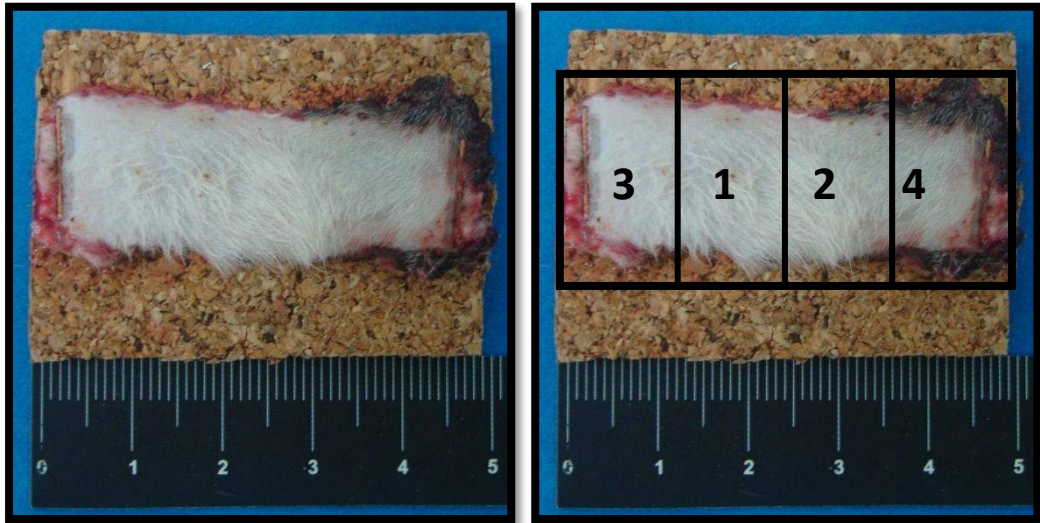


Figura 13- Biópsia da pele anexada em cortiça.

Figura 14- Clivagem da biópsia de acordo com as zonas.

Cada fragmento de pele, de acordo com a zona, foi desidratado em banhos crescentes de álcool, seguido pela clarificação em banhos de xilol, infiltrados em parafina a 60°C e posteriormente emblocados em parafina.

Os blocos de parafina foram encaminhados para microtomia, onde foram realizados com cortes histológicos de 5 micrômetros (μm), dos quatro fragmentos, de cada zona de necrose do retalho, totalizando 4 cortes histológicos, sendo um de cada zona do retalho.

Para coloração de Hematoxilina e Eosina as lâminas, contendo os fragmento de pele, foram desparafinizadas em xilol, hidratadas em banhos decrescentes de álcool até a água deionizada, corada em Hematoxilina de Mayer, seguida da coloração de Eosina-Floxina.

Posteriormente, as lâminas com os fragmentos de pele foram desidratadas em banhos crescentes de álcool e clarificadas em xilol.

Após coradas, as lâminas foram montadas com bálsamo e lamínula para serem e analisadas.

O método de contagem morfométrica de vasos, expresso em porcentagem esterelógica de densidade vascular tecidual, seguindo o princípio de Delesse, sugerido por ARIAS & SOARES (2000).

Para mensuração da densidade vascular foram realizadas fotomicrografias de cada zona de isquemia de todos os ratos do experimento.

As fotomicrografias foram realizadas com câmera digital Sony® acoplada ao microscópio óptico Zeiss®, em aumento de 400 x.

Um gradado, com 100 pontos foi sobreposto às fotomicrografias nos quais foram contados os vasos que coincidiam com os pontos e o valor da densidade vascular expresso em porcentagem. Esta mensuração foi realizada por dois pesquisadores, nos quais não tinham conhecimento de quais lâminas pertenciam aos animais de cada grupo.

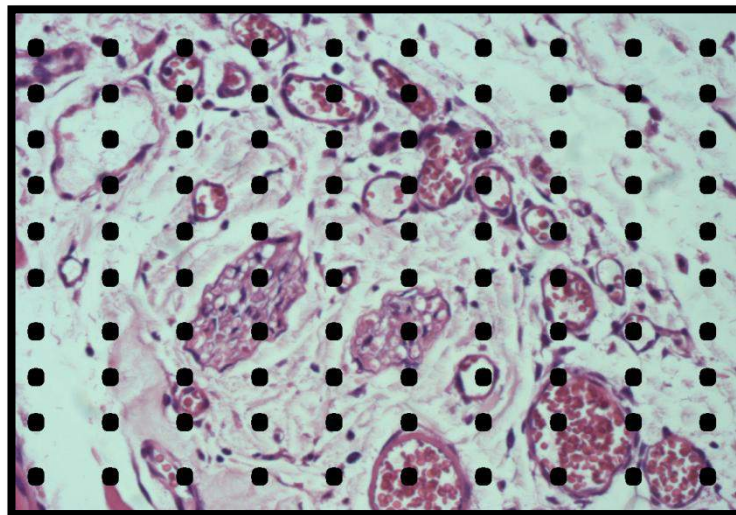


Figura 15- Grade para contagem de vasos

Ao final da contagem dos vasos, de cada lâmina referente às zonas, foi realizada a média aritmética do percentual de densidade vascular de

cada animal e os valores foram inseridos no *software* Microsoft Office Excel 2007® para organização dos dados, formatação das tabelas e envio para análise estatística.

4.10- ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Foram comparadas as medidas dos pesos dos animais, entre os grupos, para verificar se houve diferenças de idades e estado nutricional dos ratos, no dia zero (d0) do experimento. Para comparação entre os grupos foi utilizada a análise de variância de Kruskal-Wallis.

Para análise dos resultados foi utilizada concordância entre dois avaliadores, tanto para variável área de necrose como para variável densidade vascular e para calcular estas diferenças foi realizado o teste de Wilcoxon.

Para avaliar a diferença das porcentagens das variáveis área de necrose e densidade vascular, entre os grupos da pesquisa, foi utilizada a análise de variância de Kruskal Wallis.

Ficou previamente estabelecido em 0,05 ou 5% o nível de rejeição da hipótese de nulidade e ao término do trabalho, os dados estatísticos foram apresentados na forma de tabelas e gráficos.

RESULTADOS

5- RESULTADOS

Ao final do experimento, não foi constatado óbito de animais e para análise comparativa dos pesos dos animais, em relação aos grupos foi realizada análise variância de Kruskal-Wallis, que demonstrou não haver diferenças estatisticamente significantes no dia zero do experimento (APÊNDICE 3).

As análises de área de necrose (APÊNDICE 4) e densidade vascular (APÊNDICES 5, 6, 7 e 8), foram avaliadas por dois pesquisadores e para comparação entre os avaliadores, foi aplicado o teste de Wilcoxon que demonstrou não haver diferenças estatisticamente significantes entre os avaliadores, portanto para aplicação dos testes estatísticos seguintes, foram utilizados apenas os dados do avaliador 1.

Ao avaliar a área de necrose na Tabela 1, pôde-se observar que a maior porcentagem mediana foi a do GN (62.19%), seguida pelo GC (44.18%), GNV (12.58%) e a menor porcentagem foi a do GV (4.10%), ilustrado pela a Figura 15

TABELA 1- Valores das porcentagens de área de necrose de cada animal em relação ao grupo

Animal	Controle	Nicotina	VEGF	Nicotina+VEGF
1	40.08	55.35	3.88	19.68
2	41.04	57.30	25.42	21.41
3	53.57	56.63	4.31	12.95
4	53.61	60.70	4.54	13.18
5	45.34	54.76	5.00	16.40
6	48.69	77.84	4.10	12.42
7	44.18	63.53	3.63	5.84
8	34.30	62.19	4.66	5.63
9	51.27	71.07	0.00	16.83
10	38.35	68.00	0.00	9.90
11	41.79	59.60	20.34	12.58
12	48.54	68.39	4.29	11.18
13	53.53	60.78	0.00	10.18
14	38.08	64.71	2.94	5.36
15	34.48	69.08	0.00	21.61
Mediana	44.18%	62.19%	4.10%	12.58%

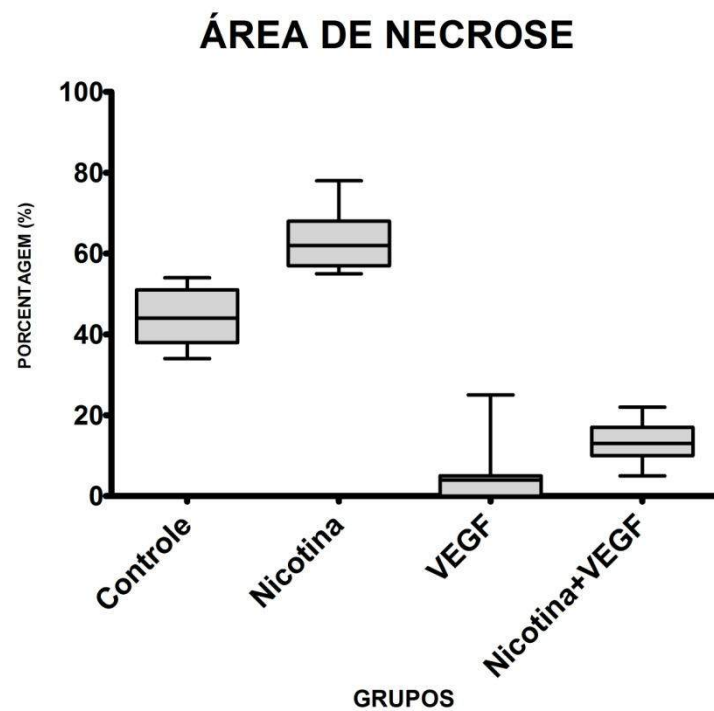


Figura 16- Distribuição dos valores da Porcentagem da área de necrose, em relação aos grupos do estudo.

De acordo com os resultados da Tabela 2, houve diferença estatisticamente significativa na comparação entre os grupos Controle e Nicotina ($p < 0,05$), Controle e VEGF ($p < 0,05$), Controle e Nicotina + VEGF ($p < 0,05$), Nicotina e VEGF ($p < 0,05$), Nicotina e Nicotina+VEGF ($p < 0,05$), e, na comparação entre os grupos VEGF e Nicotina+VEGF ($p < 0,05$).

TABELA 2- Comparação estatística da Área de Necrose entre os grupos (Análise de Variância de Kruskal-Wallis).

Comparações da Área de Necrose	Diferenças entre Postos	Z calculado	Z crítico	p
Postos médios- Controle e Nicotina	90.325	5.0441	2.635	< 0.05
Postos médios- Controle e VEGF	232.5667	12.9874	2.635	< 0.05
Postos médios- Controle e Nicotina+VEGF	157.1083	8.7735	2.635	< 0.05
Postos médios- Nicotina e VEGF	322.8917	18.0314	2.635	< 0.05
Postos médios- Nicotina e Nicotina+VEGF	247.4333	13.8176	2.635	< 0.05
Postos médios- VEGF e Nicotina+VEGF	75.4583	4.2139	2.635	< 0.05

A porcentagem da densidade vascular foi considerada através do valor mediano calculado pelas zonas 1, 2, 3 e 4 de cada animal e distribuída pelos grupos do estudo (APÊNDICE 5).

A Tabela 3 demonstra que o grupo Nicotina (6%), apresentou menor porcentagem de densidade vascular em relação ao grupo Controle (11,75%), já o grupo Nicotina+VEGF (32,75%) apresentou uma maior porcentagem de densidade vascular, superada apenas pelo grupo VEGF (39%), como mostra a Figura 16.

TABELA 3- Valores das medianas da Porcentagem da Densidade Vascular por zona

	Controle	Nicotina	VEGF	VEGF+Nicotina
Zona 1	12.5	8	40.5	34
Zona 2	11.5	7	39	33.5
Zona 3	12	5	39	32
Zona 4	7.5	1.5	38	30.5
Mediana	11.75	6	39	32.75

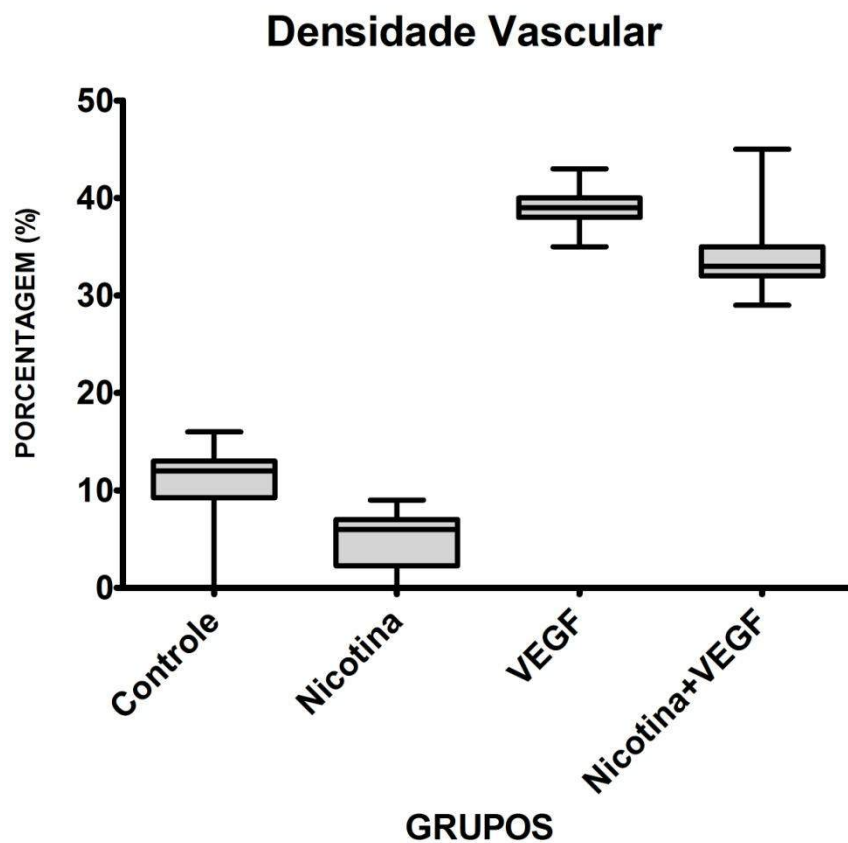


Figura 17- Distribuição dos valores da Porcentagem da densidade vascular, em relação aos grupos do estudo.

TABELA 4- Comparação da Densidade Vascular entre os grupos (Análise de Variância de Kruskal-Wallis)

Comparações da Densidade Vascular	Diferença entre Postos	Z calculado	Z crítico	p
Postos médios- Controle e Nicotina	90.325	5.0441	2.635	< 0.05
Postos médios- Controle e VEGF	232.5667	12.9874	2.635	< 0.05
Postos médios- Controle e Nicotina+VEGF	157.1083	8.7735	2.635	< 0.05
Postos médios- Nicotina e VEGF	322.8917	18.0314	2.635	< 0.05
Postos médios- Nicotina e Nicotina+VEGF	247.4333	13.8176	2.635	< 0.05
Postos médios- VEGF e Nicotina+VEGF	75.4583	4.2139	2.635	< 0.05

A Análise de Variância de Kruskal-Wallis observada na Tabela 4 ratificou diferenças estatisticamente significantes, na comparação entre todos os grupos ($p < 0,05$).

De acordo com o demonstrado na Tabela 4, a densidade vascular foi maior no grupo VEGF em relação ao controle como mostra a Figura 17.

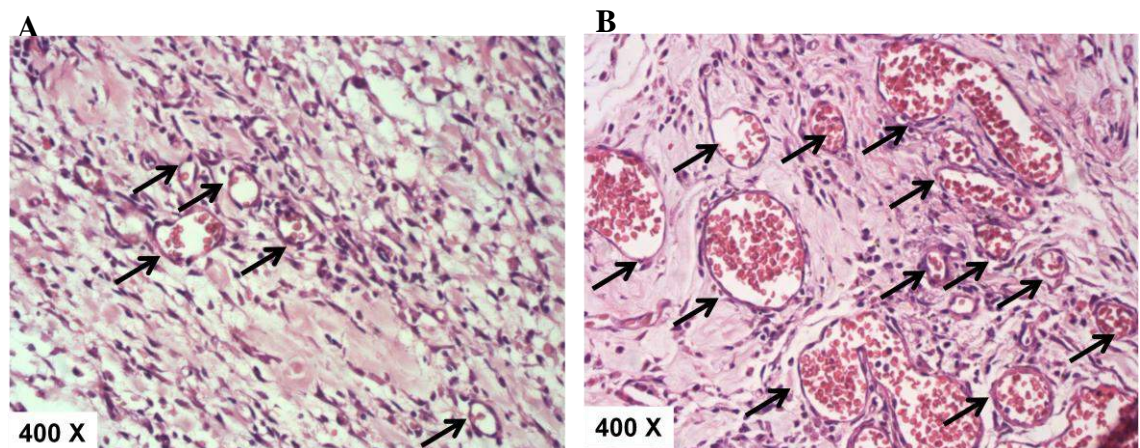


FIGURA 18- **A:** Fotomicrografia da zona 1, da pele do rato, do grupo Controle em aumento de 400 X. **B:** Fotomicrografia da zona 1, da pele do rato, do grupo VEGF em aumento de 400X. As setas mostram os vasos sanguíneos.

Houve diferença estatisticamente significativa na comparação entre o grupo Nicotina e o grupo Nicotina+VEGF, onde a densidade vascular foi maior no grupo Nicotina+VEGF, como mostra a Figura 18.

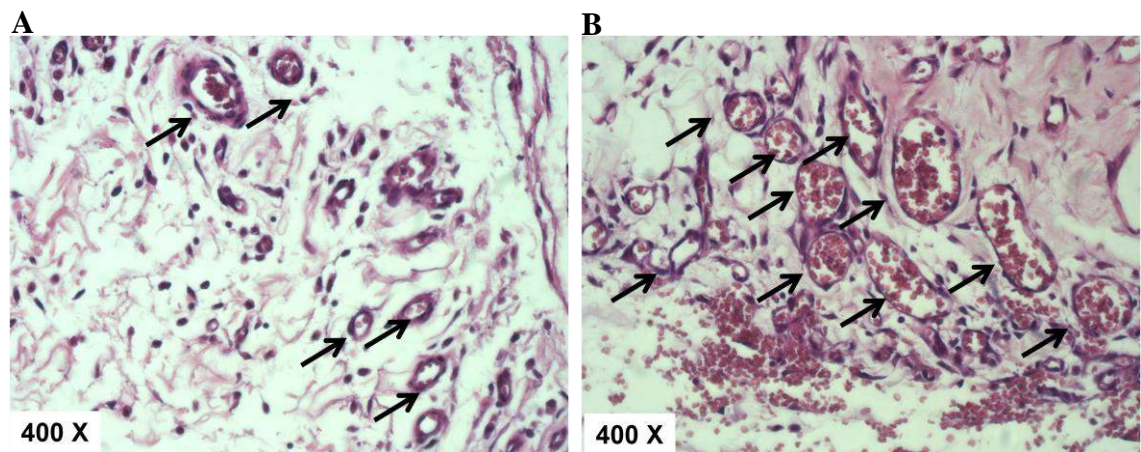


FIGURA 19- **A:** Fotomicrografia da zona 1, da pele do rato, do grupo Nicotina em aumento de 400 X. **B:** Fotomicrografia da zona 1, da pele do rato, do grupo Nicotina+VEGF em aumento de 400X. As setas mostram os vasos sanguíneos.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Para o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2008), o câncer de mama é o que mais causa óbito entre mulheres no Brasil e apesar de um procedimento invasivo que mutila não somente o segmento físico, como também os símbolos psicológicos de feminilidade, sexualidade e maternidade, a mastectomia ainda é uma das alternativas terapêuticas largamente utilizadas.

A cirurgia plástica apresenta um papel fundamental para a reconstrução mamária de mastectomizadas, onde o retalho TRAM, apresenta grande aceitação pelos cirurgiões e pacientes (VEIGA *et al.*, 2002; VEIGA *et al.*, 2004).

Embora apresente várias vantagens, não apenas na reconstrução física do segmento corporal amputado, como também, para o bem estar psicológico de pacientes mastectomizadas, o retalho *TRAM* apresenta fatores que podem diminuir sua viabilidade e para possibilitar o melhor entendimento dos mecanismos fisiopatológicos do retalho *TRAM*, foram desenvolvidos modelos experimentais (KERRIGAN, 1983).

Dentre os mecanismos que podem diminuir a viabilidade do retalho TRAM, o único intrínseco ao retalho é a redução do suprimento sanguíneo, decorrente da secção dos feixes vâsculo-nervosos da pele (HARTRAMPF, SCHEFLAN, BLACK, 1982), e esta redução do fluxo sanguíneo pode ser exacerbada em condições patológicas como a diabetes e principalmente em condições comportamentais como o tabagismo.

Ao estudar pacientes tabagistas, mastectomizadas e submetidas ao retalho *TRAM*, LOVICH & ARNOLD (1994), mostraram que o habito de

fumar esteve relacionado com a perda parcial do pedículo muscular e da pele suprajacente. Estes dados corroboram com os achados de SPEAR *et al.* (2005) que estudaram durante 10 anos, de forma retrospectiva, uma amostra de 200 pacientes distribuídas em concomitância com a distribuição realizada por LOVICH & ARNOLD (1994), sendo um grupo composto por pacientes tabagistas, outro grupo composto de pacientes ex-tabagistas e um terceiro grupo composto de pacientes não-tabagistas, que foram submetidas ao retalho *TRAM* para reconstrução mamária pós-mastectomia e concluíram neste trabalho, que através da regressão logística, as pacientes tabagistas apresentaram diversos fatores de risco como infecção, retardo no processo de reparo tecidual e necrose parcial do retalho. As pacientes ex-tabagistas apresentaram retardo no processo de cicatrização pós-operatório, hematomas e 23% da amostra deste grupo apresentaram perda total do retalho, com necrose subcutânea. Assim, SPEAR *et al.* (2005) contra-indicam o procedimento operatório em pacientes tabagistas e em pacientes ex-tabagistas que pararam de fumar quatro semanas antes da reconstrução mamária.

FORREST, XU, PANG (1994) relataram que o tabagismo reduz a viabilidade de retalhos cutâneos, tanto em estudos clínicos quanto em ensaios experimentais em porcos *Yorkshire*, ressaltando que os mecanismos fisiopatológicos da nicotina em retalhos cirúrgicos ainda não são bem conhecidos, embora relate em seus estudos que os efeitos vasoconstritores da noradrenalina foram significativamente aumentados na presença da N-omega-monometil-L-arginina que se trata de um inibidor do óxido nítrico endotelial.

Em pesquisas envolvendo ratos, há uma grande discordância da literatura quando às vias de administração, bem como as dosagens de

nicotina pois VAN-ADRICHEM *et al.* (1996) investigaram os efeitos da nicotina em ratos submetidos ao retalho retalho randômico dorsal com pedículo distal. A administração da nicotina foi realizada via inalatória e os animais foram contidos em uma câmara de indução de fumaça de cigarro. A cada dois segundos, 35 ml de fumaça de cigarro (1,5 mg de nicotina), diluída em 700 ml de ar ambiente foi introduzida na câmara que possuía 20.8% de oxigênio, 0,3% de dióxido de carbono e 200 ppm de monóxido de carbono, durante períodos de 20 minutos, com quatro horas de intervalo.

Os animais que não foram expostos á nicotina apresentaram viabilidade média de 65.4% no 14º dia após a operação, entretanto os animais submetidos à nicotina, durante seis semanas antes do procedimento operatório, apresentaram 52.7% de viabilidade no 14º dia pós-operatório e os animais expostos à nicotina por seis semanas antes e por duas semanas após o procedimento operatório apresentaram viabilidade de 47.5% no 14º dia pós operatório.

Apesar de eficazes, estes métodos inalatórios de administração da nicotina são mais caros quando comparados aos métodos injetáveis, por necessitarem de equipamentos específicos e treinamento profissinal especializado para lidar com estes métodos devido a biossegurança dos pesquisadores envolvidos neste tipo de pesquisa.

FORREST, PANG, LINDSEY (1987), aplicaram via subcutânea as doses de 0, 1, 2, 4 e 8 mg/kg, diluídos em 2ml de solução salina, por 4 semanas antes e uma semana após da elevação do retalho e concluíram que as doses de 2, 4 e 8 mg/Kg diminuíram a viabilidade dos retalhos. Corroborando com estes achados, FORREST, PANG, LINDSEY (1991) e AKER *et al.* (1997) aplicaram via subcutânea, em dias alternados, 0.6mg/kg, por 24 semana em ratos submetidos posteriormente ao retalho

randômico dorsal e também observaram uma redução na viabilidade dos retalhos.

ELY *et al.* (2003) aplicaram nicotina (2mg/Kg) via subcutânea, por 28 dias pré-operatórios, duas vezes ao dia. Os animais foram submetidos ao retalho *TRAM* e 48 horas após o retalho, foi analisada a área macroscópica de necrose do retalho que foi significativamente maior nos animais que foram tratados com nicotina em relação aos animais do grupo controle que receberam 0,2ml de solução de Cloreto de Sódio (0.9%).

LEITE *et al.* (2007) utilizaram 14 ratos *Wistar*, aleatorizados em dois grupos de sete animais cada. Todos os animais deste estudo receberam nicotina (1.2mg/kg/dia) via subcutânea, por sete dias pré-operatórios, e foram submetidos ao procedimento operatório de retalho randômico dorsal. Cinco minutos após o término dos procedimentos operatórios os animais do grupo nicotina receberam 2 ml/kg de água destilada por gavagem e os animais do grupo nicotina+ dimetil sulfoxido receberam 2 ml/kg de dimetil sulfoxido. No sétimo dia pós-operatório foram avaliados as áreas macroscópicas de necrose e observaram diferenças significantes entre as médias do grupo nicotina (40.2%) comparada ao grupo nicotina+ dimetil sulfoxido (20.6%).

A definição das doses de nicotina e das vias de administração para o presente experimento, foram adotadas levando em consideração o estresse do animal, os baixos custos e a facilidade de administração, sendo o trabalho de LEITE *et al.* (2007), seguido como método eficaz para o modelo experimental de tabagismo em ratos, por apresentar baixo custo e fácil aplicação em relação aos trabalhos de VAN-ADRICHEM *et al.* (1996). Além de que LEITE *et al.* (2007) aplicaram a nicotina via subcutânea por 7 dias pré-operatórios com doses de 1.2mg/kg/dia.

Entretanto ELY *et al.* (2003) aplicaram nicotina via subcutânea por 28 dias pré-operatórios com doses de 2 mg/kg duas vezes ao dia, o que ocasiona um estresse maior aos animais, com efeito semelhante quanto á viabilidade dos retalhos.

Apesar de utilizar modelos de retalhos diferentes, estes resultados confirmam os achados do presente experimento, em que se pôde observar diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) nos animais do GN que apresentaram área de necrose mediana de 62.19% em relação aos animais do GC com 44.18% de área de necrose. Estes resultados do GC foram semelhantes aos resultados encontrados por PINFILDI *et al.* (2008) que apresentaram 37.49% de área de necrose nos animais do grupo controle em que foram submetidos ao retalho TRAM e à simulação de tratamento com *LASER*.

Tais achados sugerem que a nicotina aplicada via subcutânea (1.2mg/kg/dia) promove redução da viabilidade tanto em modelos de retalho randômico como em retalho TRAM, em ratos.

Houve também diferença significativa na comparação da área de necrose dos animais do GN com os animais do GV (4.10%) e do GN com os animais do GNV (12.58%).

Com o objetivo de se estudar a o aumento da vascularização e o processo de angiogênese, vários pesquisadores utilizam agentes físicos como Laser (PINFILDI *et al.*, 2006; PINFILDI *et al.*, 2008), ondas de choque (MEIRER *et al.*, 2007), TENS (LEBANO, ABLA, FERREIRA, 2006; RUSSO *et al.*, 2006; LEBANO, ABLA, FERREIRA, 2008) e recursos farmacológicos como a pentoxifilina e buflomedil (MUAD *et al.*, 2006), acetilcisteína (ABLA *et al.*, 2005) , dimetil sulfóxido (LEITE *et al.*, 2007) e com os avanços da Medicina Regenerativa, pesquisadores vêm

utilizando os conhecimentos da Terapia Gênica, empregando genes específicos, que expressam fatores de crescimento, para aumentar as respostas vasculares sobre lesões isquêmicas da pele (KHOUR *et al.*, 1991; UHL *et al.*, 1994; TEPPER & MEHRARA, 2002).

KHOUR *et al.* (1991) demonstraram que a administração do Fator de Crescimento de Fibroblasto (FGF) aumentava a viabilidade da pele após aplicação intradérmica seguida de retalho randômico, concomitantemente, UHL *et al.* (1994), concluíram que o uso de FGF pré-operatório preveniu a necrose de retalho de pele. Contudo, HAYWARD *et al.* (1991), não encontraram melhora na viabilidade do retalho após a aplicação do FGF. Todavia, TEPPER & MEHRARA (2002) sugerem que um método de Terapia Gênica eficaz é a injeção direta do DNA através de um vetor plasmidial, nos tecidos e células pois os plasmídeos são fragmentos de DNA presentes em bactérias, que conferem resistência a antibióticos. Através de engenharia genética, estes plasmídeos podem ser tratados incorporando genes para a produção de fatores de crescimento. Uma vez incorporado às células alvo, este gene atua estimulando a síntese do fator de crescimento.

No presente estudo, utilizou-se este método de injeção direta do DNA através de um vetor plasmidial por ser um método mais simples e barato quando comparado ao método que utiliza a injeção direta da proteína recombinante.

O Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF) é o fator angiogênico mais influente. Foi, inicialmente identificado em células tumorais, aumentando a permeabilidade vascular à macromoléculas e TEPPER & MEHRARA (2002) referem que as limitações da utilização dos fatores de crescimento recombinantes podem ser causados pela rápida

inativação enzimática desta proteína e por apresentar um alto custo para sua preparação.

Em contrapartida, O'TOOLE *et al.*(2002) relataram aumento da viabilidade do retalho abdominal em ratos com utilização do VEGF plasmidial. Neste estudo, foram utilizadas algumas isoformas da proteína, entretanto, os pesquisadores relatam que a mais fisiologicamente ativa é a isoforma 165. Estes dados forneceram os parâmetros para realização do presente estudo.

FERRARA & DAVIS-SMYTH (1997) relatam que a secreção e expressão do VEGF, relacionadas à hipóxia tecidual, causa vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, proliferação de células endoteliais e ativação de metaloproteinases, que lisam a matriz extracelular para crescimento de um novo vaso.

Tais relatos concordam com ZHANG *et al.* (2001), nos quais estudaram o aumento da viabilidade do retalho TRAM, em ratos, com a aplicação do VEGF recombinante via subdérmica no pré-operatório e as vias intravenosa e intra-arterial, no intra-operatório. A dose do VEGF recombinante também variou de 50 microgramas para o grupo subdérmico a 100 microgramas para os outros dois grupos. Obtiveram aumento na viabilidade do TRAM, apenas no grupo com aplicação pré-operatória subdérmica (25.6% de área de necrose).

Estes achados corroboram com o presente experimento onde obteve resultados significantes na aplicação intradérmica na dose de 50µg nos animais do GV e do GNV com área de necrose de 12.58% e 4.10% respectivamente.

Diferentemente, SEIFY, BILKAY, JONES (2003), compararam o efeito do VEGF recombinante e da autonomização cirúrgica, na viabilidade do TRAM, em ratos tratados no pré-operatório de dez dias via intramuscular e intra-arterial, em dose única de 100 microgramas. Obtiveram melhora da viabilidade do TRAM no grupo autonomizado, nos grupos tratados com o VEGF e nos grupos onde houve associação. Apesar de discordar dos achados de ZHANG *et al.* (2001), SEIFY, BILKAY, JONES (2003) demonstraram que a via sistêmica de terapia gênica interferiu positivamente para sobrevivência do retalho TRAM.

No presente estudo, utilizou-se o método de injeção direta de DNA através de um vetor plasmidial, método esse mais simples, porém com objetivo de aumentar a penetração do vegf.

A Terapia Gênica, usualmente utiliza recursos para potencializar a transfecção de genes nas células-alvo, principalmente através da eletroporação.

A eletroporação é a utilização de pulsos elétricos de microssegundos a milissegundos de duração, através de uma corrente alternada de alta voltagem que ultrapassa a membrana celular, promovendo um rearranjo morfológico da bicamada lipídica, formando canais hidrofílicos em sua extensão, tornando-a altamente permeável a moléculas exógenas, presentes na MEC (GEHL, 2003).

Para quantificação macroscópica da eficácia dos métodos empregados com finalidades terapêuticas, SASAKI & PANG (1980), descreveram um método para avaliar a necrose tecidual de retalhos cutâneos randômicos, utilizando papel vegetal, grafite e balança de precisão. A vantagem desse método está na facilidade de utilização e custo, devido a vasta utilização na literatura, mostrando ser um método eficaz e

confiável (SASAKI & PANG, 1980; LIEBANO *et al.*, 2002; PINFILDI *et al.*, 2005).

SANO *et al.* (2001), utilizaram este método para avaliação de retalho TRAM, utilizando o gabarito de papel, escaneado eletronicamente e salvo em bitmap (.bmp) para posterior análise da área de necrose com o *software* Adobe Photoshop 6.0.

A utilização de um método computadorizado evita alguns pequenos erros no momento da demarcação dos limites do retalho; porém esses autores discutem que mesmo esses pequenos erros não fazem diferença no momento da aferição (SANO *et al.* 2001) e para o presente estudo, utilizou-se o método computadorizado, por se tratar de um método específico para avaliar a área de necrose de retalho TRAM, uma vez que o método descrito por SASAKI & PANG (1981) foi utilizado para avaliar a área de necrose de retalho randômicos dorsais.

No presente estudo, além da análise macroscópica da área de necrose foi necessário retirar amostras teciduais para realizar a análise histológica de densidade vascular.

PINFILDI *et al.* (2008) retiraram fragmentos de pele da zona 1 do retalho TRAM e também um fragmento de tecido viável fora do retalho. As zonas de necrose do retalho TRAM experimental respeitam as zonas do retalho TRAM humano descritas por HARTRAMPF (1988), correspondendo a zona 1 com maior suprimento sanguíneo as zonas 2 e 3 intermediárias e a zona 4 com menor vascularização.

Devido a possibilidade de diferentes níveis de vascularização em determinadas zonas do retalho, optou-se em retirar todo o retalho e avaliar todas as zonas do TRAM. As regiões onde apresentaram necrose eram

desprovidas de vasos e foram consideradas igual a zero na contagem morfológica.

ZHANG *et al.*(2001) realizaram a contagem morfológica de capilares através de amostras de pele processadas, emblocadas em parafina, coradas por hematoxilina e eosina e avaliadas por microscopia ótica, em aumento de 400 vezes. Observaram que os animais tratados com VEGF intradérmico apresentaram 4 capilares por campo quando comparados aos animais do grupo controle. Em concordância com este método de quantificação de contagem morfológica de perfis de vasos, o presente estudo mostrou que não apenas o número de vasos esteve aumentado, como também o diâmetro destes vasos como mostram as tabelas 3 e 4 e as figuras 16, 17 e 18 respectivamente.

Estes achados sugerem que a Terapia Gênica por VEGF pasmidial aumentou a viabilidade de retalhos cutâneos experimentais devido à redução da necrose cutânea e ao aumento da densidade vascular, todavia, trata-se de um estudo experimental e que não transpõem a realidade clínica uma vez que ainda faltam estudos para analisar os potenciais efeitos do VEGF tópico.

Para isso os autores sugerem que sejam realizados novos estudos experimentais que forneçam parâmetros dos níveis de VEGF plasmático e na MEC cutânea, através de dosagens bioquímicas, antes, durante e após os procedimentos terapêuticos para quantificar o número e o diâmetro dos vasos sofre alteração mediada pela terapia gênica em ratos expostos á nicotina.

Além do VEGF, há uma série de mediadores químicos que interferem no processo de angiogênese dentre os quais a histamina através da degranulação mastocitária e o fator de crescimento de fibroblasto-2

(básico) expreso por células endotelias e fibroblastos dérmicos também podem ser estudados para identificar se há interferência da terapia gênica por VEGF nestes mediadores químicos.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

O Fator de Crescimento do Endotélio Vascular aumentou a viabilidade do retalho musculofasciocutâneo transverso do reto do abdome, em ratos submetidos à nicotina.

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

Abla LEF, Gomes HFC, Percario S, Ferreira LM. Acetylcysteine in random skin flap in rats. *Acta Cir Bras.* 2005; 20(2): 121-3.

Aker JS, Mancoll J, Lewis B, Colen LB. The effect of Pentoxifylline on random-pattern skin-flap necrosis induced by nicotine treatment in the rat. *Plast Reconstr Surg.* 1997; 100(1): 66-71.

Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Leis e regulamentos locais. [on line]. Célia Virgínia Pereira Cardoso. Brasil [data desconhecida]. Acessado em 15/05/2007. Disponível na World Wide Web: <<http://www.cobea.org.br/home.php?pg=legislacao#>>.

Doncatto LF, da Silva JB, da Silva VDI. Cutaneous Viability in a Rat Pedicled TRAM Flap Model. *PRS J.* 2007; 119(5):1425-30.

Campos JHO, Gomes HFC, Santos WLC, Araujo MCM, Ferreira LM. Effect of nicotine treatment and withdrawal on random-pattern skin flaps in rats. *Exp Toxicol Pathol.* 2008; 60: 449-52.

Ely PB, Ferreira LM. Transverse rectus abdominis musculocutaneous flap (TRAM flap) – Experimental model in rats. *Acta Cir Bras.* 2003; 7: 46-53.

Ely PB, Kobayashi LA, Campos JOH, Gomes HFC, Ferreira LM. Efeito da Nicotina no retalho musculocutâneo abdominal transversal do músculo reto do abdome, com pedículo caudal, em ratos. *Arquivos Catarinenses de Medicina.* 2003; 32(1): 324-6.

Forrest CR, Xu N, Pang CY. Evidence for nicotine-induced skin flap ischemic necrosis in the pig. *Can J Physiol Pharmacol.* 1994; 72(1):30-8

Forrest CR, Pang CY, Lindsay WK. Dose and time effects of nicotine treatment on the capillary blood flow and viability of random pattern skin flaps in the rat. *Br J Plast Surg*. 1987; 40(3):295-9.

Forrest CR, Pang CY, Lindsay WK. Pathogenesis of ischemic necrosis in random-pattern skin flaps induced by long-term low-dose nicotine treatment in the rat. *Plast Reconstr Surg*. 1991; 87(3):518-28.

Gandolfo E. A breast reconstruction with a lower abdominal myocutaneous flap. *Br J Plast Surg*. 1982; 25: 452-7

Gehl, J. Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research. *Acta Physiol Scand*. 2003; 177: 437-47.

Gomes HFC, Ferreira LM, Campos JHO. Efeitos da Nicotina nos retalhos cutâneos em ratos. *Acta Cir Bras*. 2001; 16:15-20

Gomes HFC, Garcia EB, Landman MRL, Scardoeli CAC, Ferrira LM. Effect of N-Acetylcysteine in a random skin flap after administration of nicotine, in rats. *Folha Médica*. 1998; 117:209-11.

Gorczyca W, Markiewski M, Kram Al. Immunohistochemical analysis of bcl-2 and p53 expression in breast carcinomas: their correlation with Ki-67 growth fraction. *Virchows Arch* 1995; 426: 229-33.

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

Hartrampf CR Jr, Bennett GK. Autogenous tissue reconstruction in the mastectomy patient. A critical review of 300 patients. *Ann Surg*. 1987; 205(5): 508-19.

Hayward PG, Alison WE Jr, Carp SS, Hui PS, Robson MC. Local infiltration of an angiogenic growth factor does not stimulate the delay phenomenon. *Br J Plast Surg.* 1991; 44(7):526-9.

Instituto Nacional do Câncer. Falando sobre Câncer de Mama [on line]. Ministério da saúde. Brasil [data desconhecida]. Acessado em 15/12/2008. Disponível na World Wide Web:
<http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/index.asp?link=conteudo_view.asp&ID=5>

Kerrigan CL. Skin flap failure: pathophysiology. *Plast Reconstr Surg.* 1983;72:766-77.

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

Leite MT, Gomes HFC, Percário S, Russo CRA, Ferreira LM. Dimethyl sulfoxide as a block to the deleterious effect of nicotine in a random skin flap, in rat. *Plast Reconstr Sur.* 2007; 120: 1819-22.

Liebano RE, Ablá LE, Ferreira LM. Effect of low-frequency transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) on the viability of ischemic skin flaps in the rat. A amplitude study. *Wound Repair Regen.* 2008; 16(1): 65-9.

Liebano RE, Ablá LE, Ferreira LM. The effect of transcutaneous electrical nerve stimulation on the viability of random skin flap in rats. *Can J Surg.* 2002; 10(4):151-4

Lovich SF, Arnold PG. The effect of smoking on muscle transposition. *Plast Reconstr Surg.* 1994; 93(4):825-8.

- Nakahara-Jr MN, Silveira TS, Ferreira LM, Gomes HFC. Avaliação da densidade vascular em retalhos TRAM de ratos após aplicação de VEGF plasmidial. *Revista da Sociedade Brasileira de Cirurgia Plástica*. 2008; 23: 102.
- Mauad RJ, Shimizu MH, Mauad T, De Tolosa EM. Buflomedil and pentoxifylline in the viability of dorsal cutaneous flaps of rats treated with nicotine. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2006; 59 (4):387-92.
- Meirer R, Huemer GM, Oehlbauer M, Wanner S, Piza-Kazer H, Kamelger FS. Comparison of the effectiveness of gene therapy with vascular endothelial growth factor or shock wave therapy to reduce ischaemic necrosis in an epigastric skin flap model in rats. *J Plast Reconstr Aesthetic Sur*. 2007; 60: 266-71.
- O'Toole G, MacKenzie D, Lindeman R, Buckley MF, Marucci D, McCarthy N, Poole M. Vascular endothelial growth factor gene therapy in ischaemic rat skin flaps. *Br J Plast Surg*. 2002; 55(1):55-8.
- Pinfildi CE, Liebano RE, Hochman BS, Ferreira LM. Helium-neon laser in viability of random skin flap in rats. *Lasers Surg Med*. 2005;37(1):74-7
- 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*. 2008 Sep 11
- Robbins TH. Post-mastectomy breast reconstruction using a rectus abdominis musculocutaneous island flap. *Br J Plast Surg*. 1981;34(3):286-90.
- Russo CR, Leite MT, Gomes HC, Ferreira LM. Transcutaneous electrical nerve stimulation in viability of a random skin flap in nicotine- treated rats. *Ann Plast Surg*. 2006; 57(6): 670-2.

Sano K, Hallock GG, Wasser TE, Robson PA, Rice DC. Comparison of a new method for computer analysis with standard techniques for measuring survival rates in the rat transverse rectus abdominis musculocutaneous flap. *Ann Plast Surg.* 2001;47:647-51.

Sasaki GH, Pang CY. Hemodynamics and viability of acute neurovascular island skin flap in rats. *Plast Reconstr Surg.* 1980; 65: 152-8.

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.* 2003; 112 (4): 1032-9.

Siegel S, Castellan-Jr. NJ. *Nonparametric Statistics.* 2^a Ed, McGraw-Hill Int. New York, 1998; 399.

Tepper OM, Mehara BJ. Gene Therapy in Plastic Surgery. *Plast Reconstr Surg.* 2002; 109: 716-34.

Uhl E, Barker JH, Bondàr I, Galla TJ, Lehr HA, Messmer K. Improvement of skin flap perfusion by subdermal injection of recombinant human basic fibroblast growth factor. *Ann Plast Surg.* 1994; 32(4):361-5

Van Adrichem LN, Hoegen R, Hovius SE, Kort WJ, Van Strik R, Vuzevski VD, Van Der Meulen JC. The effect of cigarette smoking on the survival of free vascularized and pedicled epigastric flaps in the rat. *Plast Reconstr Surg.* 1996; 97(1): 86-96.

Veiga DF, Sabino-Neto M, Ferreira LM, Garcia EB, Veiga-Filho J, Novo NF, Rocha JLBS. Quality of life outcomes after pedicled TRAM flap delayed breast reconstruction. *Br J Plast Surg.* 2004; 57: 252-7.

Veiga DF, Sabino-Neto M, Garcia EB, Veiga-Filho J, Juliano Y, Ferreira LM, Rocha JLBS. Evaluations of the aesthetic results and patient satisfaction with the late pedicled TRAM flap breast reconstruction. *Ann Plast Surg.* 2002; 48(5): 515-20.

Yang LW, Zhang JX, Zeng L, Xu JJ, Du FT, Luo W, Luo ZJ, Jiang JH. Vascular Endothelial Growth Therapy with intramuscular injections of psmid DNA enhance the survivor of random pattern flaps in a rat model. *Br J Plast Surg.* 2005; 58: 339-47.

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

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>.

- C.O.B.E.A. (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) - Princípios éticos da experimentação animal (no caso do uso dos mesmos). Disponível no endereço eletrônico: <http://www.meusite.com.br/cobea/index.htm>.

- Terminologia Anatômica. Terminologia Anatômica Internacional. São Paulo: Ed. Manole Ltda.; 2001.248p.

- Consulta ao DeCS - Descritores em Ciências da Saúde. <http://decs.bvs.br/> –terminologia em saúde.

- INTERNATIONAL COMMITTEE ON VETERINARY GROSS ANATOMICAL NOMENCLATURE - Nomina anatômica veterinária. 3.ed. New York, Ithaca, 1983. 216p.

- Goldenberg S. Orientação Normativa para Elaboração e Difusão de Trabalhos Científicos. São Paulo: 2001. Disponível em: <http://www.metodologia.org>.

ABSTRACT

Introduction: Several factors can reduce the viability of the TRAM flap, among them the nicotine has been made responsible by the loss partial or total of these flaps.

Objective: To evaluate the action of the Vascular endothelial Growth Factor in the viability of the Transverse Rectus Abdominis Musculocutaneous, in rats submitted to the nicotine.

Methods: Sixty Wistar EPM-1 rats were used, adult males, weighing from 230 to 300g, randomized in 4 groups of 15 animals each: Group Control composed by animals that were submitted to the TRAM flap; Group Nicotine composed by animals that were nicotine exposed and submitted of TRAM flap; Group VEGF composed by animals submitted to the administration of VEGF plasmidial before the TRAM flap; and Group Nicotina+VEGF composed by animals that were exposed to the nicotine, trated with administration of VEGF and submitted to the TRAM flap. For analysis of the results they were done necrosis area and vascular density.

Results: There was estatistic significant differentiates in the comparison among all of the groups, regarding the variables necrosis area and vascular density ($p < 0,05$).

Conclusion: The Vascular Endothelial Growth Factor increased the viability of the Transverse Rectus Abdominis Musculocutaneous, in rats submitted to the nicotine.

APÊNDICE 1 – Aceite do Comitê de ética em Pesquisa.



Universidade Federal de São Paulo

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 4 de abril de 2008.
CEP 0223/08

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisador(a) HEITOR FRANCISCO DE CARVALHO GOMES

Co-Investigadores: Maira Silva da Costa, Tiago Santos Silveira, Lydia Masako Ferreira (orientadora), Sang Won Han

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: "Terapia gênica por fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) na viabilidade do retalho musculocutâneo transversal do reto do abdome (TRAM), em ratos tratados com nicotina".

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: Experimental, categoria D - estudo crônico.

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: Não se aplica.

OBJETIVOS: Avaliar a influência da terapia gênica por VEGF, na viabilidade do retalho musculocutâneo do reto do abdome (TRAM) em ratos tratados com nicotina..

RESUMO: Estudo com 40 ratos Wistar. Anestésico: quetamina/xilazina. Analgésico: tramadol. Eutanásia: overdose do anestésico. Os animais serão distribuídos, aleatoriamente, em 4 grupos de 10 animais cada. Grupo C- será realizado apenas o retalho TRAM (controle); grupo V- será realizado o retalho TRAM, tratado por terapia gênica com plasmídeo sob eletroporação; grupo N- realizado o retalho TRAM, tratado com nicotina; grupo VN- realizado o retalho TRAM, tratado com nicotina e por terapia gênica com plasmídeo, sob eletroporação. No 7º dia após a aplicação da nicotina, um minuto antes do procedimento operatório, os animais do grupo NV serão tratados com aplicação subdérmica de 0,2 ml de solução de plasmídeo de VEGF, sobre a região do pedículo do retalho TRAM, seguido da eletroporação por corrente pulsada de baixa voltagem. A análise macroscópica será realizada pelo método do gabarito de papel, para quantificar a porcentagem de necrose. Ao final do 5º dia após o procedimento operatório, os animais serão sacrificados e retirado todo o fragmento de pele referente às dimensões do retalho e o material fixado para análise histopatológica. Serão realizados métodos histológicos de coloração por HE, vermelho de picrossírius, Verhoeff-van Gieson. Para análise imunohistoquímica, será realizado actina-alfa de músculo liso, CD34 e antígeno Ki67..

FUNDAMENTOS E RACIONAL: O retalho musculocutâneo transversal do reto do abdome (TRAM) é considerado um dos mais indicados para a reconstrução mamária. No entanto, o retalho TRAM apresenta fatores que podem diminuir sua viabilidade, com altos índices de necrose do tecido tegumentar, com ou sem necrose do tecido adiposo subcutâneo e, além de grande deficiência no processo de reparação tecidual. A nicotina tem propriedades de

APÊNDICE 1 – Aceite do Comitê de ética em Pesquisa.



Universidade Federal de São Paulo

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

vasoconstrição aguda, diminuindo o fluxo sanguíneo, aumentando o risco de necrose do retalho. Estudos sugerem que a terapia gênica por VEGF pode facilitar a sobrevivência de enxertos de pele e retalhos musculocutâneos. Este estudo visa avaliar a influência da terapia gênica com VEGF, na viabilidade do TRAM em ratos tratados com nicotina..

MATERIAL E MÉTODO: Estão descritos os procedimentos a serem realizados, estando este estudo inserido na linha de pesquisa do laboratório.

DETALHAMENTO FINANCEIRO: A apresentação do orçamento detalhado permitiu a análise econômica viabilizando assim, a realização do projeto..

CRONOGRAMA: 6 meses.

OBJETIVO ACADÊMICO: Não envolve obtenção de título.

ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: 30/3/2009 e 30/3/2010.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU e APROVOU** o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

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

APÊNDICE 2 – Aceite da Comissão Interna de Biossegurança.



Título do Projeto : Terapia Gênica por fator de crescimento do endotélio vascular na viabilidade do retalho musculocutâneo transverso do reto do abdômen em ratos tratados com nicotina.

Pesquisador Principal: Heitor Francisco de Carvalho Gomes

Orientador : Lydia Masako Ferreira

Departamento:Disciplina: Cirurgia Plástica

Desenvolvimento do Projeto: CINTERGEN

Projeto CIBio no. 67 GRUPO I

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 : abril de 2009

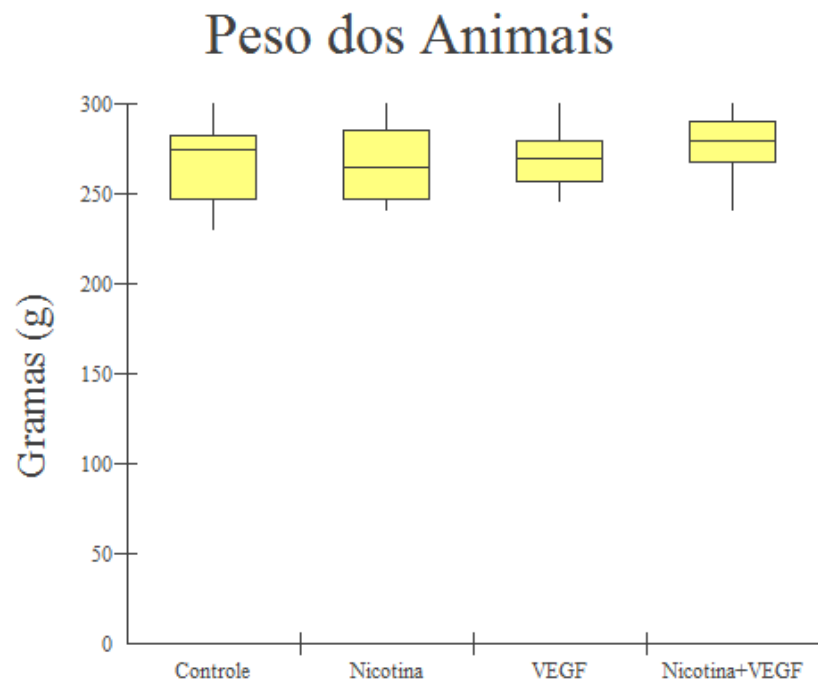
São Paulo, 2 de maio de 2008


Prof. Dr. João Bosco Pesquero
Presidente da CIBio/UNIFESP

APÊNDICE 3- Análise estatística do peso dos animais no início do experimento.

Animal	Peso			
	Controle	Nicotina	VEGF	Nicotina+VEGF
1	240	240	260	300
2	300	250	270	290
3	235	255	250	250
4	230	265	260	265
5	280	260	280	290
6	260	290	280	280
7	245	290	290	250
8	300	280	270	270
9	290	300	245	240
10	280	240	260	280
11	275	240	250	300
12	285	300	255	300
13	280	280	275	270
14	260	275	280	280
15	250	245	300	290
Mediana	275	265	270	280

Teste de Kruskal-Wallis (p) = 0,489



APÊNDICE 4- Comparação entre avaliadores da variável área de necrose.

Animal	Controle		Nicotina		VEGF		Nicotina + VEGF	
	Avaliador 1	Avaliador 2	Avaliador 1	Avaliador 2	Avaliador 1	Avaliador 2	Avaliador 1	Avaliador 2
1	40.08	40.95	55.35	55.94	3.88	4.72	19.68	20.01
2	41.04	43.60	57.30	55.45	25.42	24.16	21.41	19.65
3	53.57	54.00	56.63	57.18	4.31	6.91	12.95	12.87
4	53.61	51.75	60.70	58.44	4.54	4.54	13.18	13.47
5	45.34	43.80	54.76	56.03	5.00	5.04	16.40	16.33
6	48.69	44.97	77.84	77.30	4.10	4.03	12.42	12.16
7	44.18	42.74	63.53	59.85	3.63	3.51	5.84	6.09
8	34.30	36.55	62.19	61.50	4.66	4.66	5.63	7.62
9	51.27	50.54	71.07	70.85	0.00	0.00	16.83	17.52
10	38.35	40.35	68.00	67.33	0.00	0.00	9.90	9.90
11	41.79	39.77	59.60	67.22	20.34	16.47	12.58	11.76
12	48.54	55.09	68.39	66.98	4.29	5.35	11.18	10.37
13	53.53	62.70	60.78	60.69	0.00	0.00	10.18	10.55
14	38.08	34.74	64.71	66.45	2.94	5.61	5.36	5.23
15	34.48	38.59	69.08	69.55	0.00	0.00	21.61	21.51
Mediana	44.18%	43.60%	62.19%	61.50%	4.10%	4.66%	12.58%	12.16%
Teste de Wilcoxon (p) =	0.495		0.532		0.767		0.975	

APÊNDICE 5- Comparação entre avaliadores da variável densidade vascular do grupo Controle.

Animal	Zona 1 (%)		Zona 2 (%)		Zona 3 (%)		Zona 4 (%)	
	Avaliador	Avaliador	Avaliador	Avaliador	Avaliador	Avaliador	Avaliador	Avaliador
	1	2	1	2	1	2	1	2
1	12	12	10	11	10	10	7	7
2	14	14	12	11	11	12	6	7
3	12	13	10	10	12	10	8	8
4	13	12	12	11	11	10	9	8
5	14	14	12	11	0	0	9	7
6	13	12	14	14	12	12	0	0
7	12	13	10	11	13	12	7	8
8	16	17	15	16	14	13	13	12
9	13	12	13	12	11	12	0	0
10	13	12	12	13	12	12	8	8
11	14	12	10	11	13	13	7	9
12	14	12	11	11	12	12	0	0
13	12	12	10	11	0	0	9	8
14	14	14	11	10	11	12	0	0
15	16	17	15	14	12	14	10	10
Mediana	13%	12%	12%	11%	12%	12%	7%	8%
Teste de Wilcoxon (p)=	0.332		1.0		1.0		0.799	

APÊNDICE 6- Comparação entre avaliadores da variável densidade vascular do grupo Nicotina.

Animal	Zona 1 (%)		Zona 2 (%)		Zona 3 (%)		Zona 4 (%)	
	Avaliador	Avaliador	Avaliador	Avaliador	Avaliador	Avaliador	Avaliador	Avaliador
	1	2	1	2	1	2	1	2
1	8	8	7	7	0	0	0	0
2	9	7	6	6	5	6	3	3
3	7	9	8	8	5	5	0	0
4	9	7	7	9	0	0	4	4
5	7	8	8	7	6	5	0	0
6	8	9	8	6	6	6	2	2
7	9	7	7	8	6	5	0	0
8	7	8	8	7	0	0	1	1
9	8	9	6	8	5	5	0	0
10	7	7	7	8	7	7	3	1
11	9	8	6	6	0	0	3	3
12	7	7	7	7	5	6	2	2
13	8	8	6	8	0	0	0	0
14	9	8	8	7	6	7	3	2
15	7	8	7	6	5	6	2	3
Mediana	8%	8%	7%	7%	5%	5%	2%	1%
Teste de Wilcoxon (p) =	0.755		0.610		0.463		0.422	

APÊNDICE 7- Comparação entre avaliadores da variável densidade vascular do grupo VEGF.

Animal	Zona 1 (%)		Zona 2 (%)		Zona 3 (%)		Zona 4 (%)	
	Avaliador 1	Avaliador 2	Avaliador 1	Avaliador 2	Avaliador 1	Avaliador 2	Avaliador 1	Avaliador 2
1	40	43	37	38	38	39	37	38
2	39	38	38	37	37	36	35	34
3	39	39	40	39	39	40	38	38
4	42	42	37	38	39	38	37	38
5	41	41	40	40	38	39	38	39
6	40	40	37	38	40	40	37	37
7	41	41	38	39	39	39	39	37
8	40	40	39	39	40	40	37	37
9	42	42	38	38	38	38	37	39
10	43	43	39	39	39	39	38	38
11	37	38	37	36	35	35	35	33
12	40	40	39	39	39	40	38	39
13	41	42	40	40	40	39	39	37
14	40	40	39	40	38	38	40	39
15	43	43	40	40	39	39	38	37
Mediana	40%	41%	39%	39%	39%	39%	38%	38%
Teste de Wilcoxon (p) =	0.273		0.528		0.735		0.504	

APÊNDICE 8- Comparação entre avaliadores da variável densidade vascular do grupo Nicotina+VEGF.

Animal	Zona 1 (%)		Zona 2 (%)		Zona 3 (%)		Zona 4 (%)	
	Avaliador	Avaliador	Avaliador	Avaliador	Avaliador	Avaliador	Avaliador	Avaliador
	1	2	1	2	1	2	1	2
1	34	35	35	33	33	31	29	29
2	33	34	34	34	32	32	30	29
3	34	32	35	33	32	32	30	29
4	33	34	34	33	33	32	31	32
5	35	35	33	32	31	32	30	30
6	45	45	40	41	40	41	39	40
7	43	44	43	41	42	43	40	40
8	33	34	34	32	33	33	29	30
9	34	34	33	33	32	32	29	30
10	34	33	34	33	34	33	30	31
11	35	34	33	32	32	32	32	31
12	33	34	33	31	32	33	29	30
13	34	33	34	31	31	31	30	32
14	45	46	44	42	43	43	42	42
15	34	34	33	32	31	32	29	31
Mediana	34%	34%	34%	33%	32%	32%	30%	31%
Teste de Wilcoxon (p) =	0.624		0.654		0.779		0.109	