



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**  
Centro Biomédico  
Faculdade de Ciências Médicas

Nsingi Nsosolo António

**Avaliação morfológica e imuno-histoquímica do efeito isolado e  
combinado da pentoxifilina e da hialuronidase em retalhos  
cutâneos randomizados em ratos**

Rio de Janeiro  
2016

Nsingi Nsosolo António

**Avaliação morfológica e imuno-histoquímica do efeito isolado e combinado da pentoxifilina e da hialuronidase em retalhos cutâneos randomizados em ratos**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Técnica Operatória e Cirurgia Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Ruy Garcia Marques

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Andréa Monte Alto Costa

Rio de Janeiro

2016

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

A 635 António, Nsingi Nsosolo  
Avaliação morfológica e imuno-histoquímica do efeito isolado e combinado da pentoxifilina e da hialuronidase em retalhos cutâneos randomizados em ratos / Nsingi Nsosolo António – 2016.  
59 f.

Orientador: Prof. Dr. Ruy Garcia Marques  
Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Andréa Monte Alto Costa

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas.

1. Cirurgia plástica – Teses. 2. Retalhos cirúrgicos – Teses. 3. Necrose - Teses. 4. Hialuronoglucosaminidase. 5. Ratos Wistar – Teses. I. Marques, Ruy Garcia. II. Costa, Andréa Monte Alto. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 617-089.844

Bibliotecária: Thais Ferreira Vieira - CRB7 5302

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Nsingi Nsosolo António

**Avaliação morfológica e imuno-histoquímica do efeito isolado e combinado da pentoxifilina e da hialuronidase em retalhos cutâneos randomizados em ratos**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Técnica Operatória e Cirurgia Experimental.

Aprovada em 5 de outubro de 2016.

Orientador : Prof. Dr. Ruy Garcia Marques  
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Andréa Monte Alto Costa  
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Waldemar Silva Costa  
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

---

Prof. Dr. Fernando Serra Guimarães  
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

---

Prof. Dr. Marcelo Abidu Figueiredo  
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2016

## DEDICATÓRIA

À minha amada esposa Laura, aos meus filhos Josiel e Natanael, e aos meus queridos pais Nsingi António e Mafuta Jeanne.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, a quem me prostro em adoração e louvor, fonte de toda bênção, sabedoria e proteção, razão da minha existência.

Ao meu orientador, Professor Ruy Garcia Marques, pela forma tão amável e encorajadora com que me orientou.

À minha coorientadora, Professora Andréa Monte Alto Costa, pela forma que me recebeu no Laboratório de Reparo Tecidual, instruiu-me e auxiliou-me na realização dos exames histológicos e imuno-histoquímica.

À Fernanda Seabra Schanuel, pelos inumeráveis auxílios a mim prestados,

Ao Marco Aurélio e ao Eduardo, também pela ajuda e camaradagem.

À Jeanine Sales, pela ajuda.

A todos alunos e professores do Laboratório de Reparo Tecidual, pelo auxílio e gentileza com que me distinguiram durante a minha passagem por lá.

A todos colegas e companheiros de batalha.

O temor do Senhor é o princípio da ciência; os loucos  
desprezam a sabedoria e a instrução.

*Provérbios de Salomão 1:7*

## RESUMO

ANTÔNIO, Nsingi Nsosolo. *Avaliação morfológica e imuno-histoquímica do efeito isolado e combinado da pentoxifilina e da hialuronidase em retalhos cutâneos randomizados em ratos*. 2016. 59 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

Os retalhos cutâneos randomizados são utilizados com muita frequência em Cirurgia Plástica, sobretudo para a reconstrução de tecidos, mas a possibilidade de ocorrência de necrose tem desafiado o seu uso. Vários estudos têm sido realizados visando encontrar meios para diminuir sua ocorrência. Para se avaliar o efeito isolado e combinado da pentoxifilina e da hialuronidase em retalhos cutâneos randomizados em ratos, foram utilizados 50 ratos Wistar machos, distribuídos em cinco grupos de dez: Controle I (CTL- I) – nenhum tratamento; Controle II (CTL -II) – solução salina intraperitoneal (IP) duas vezes por dia e intralesional (IL) uma vez por dia; Pentoxifilina (PTX) – pentoxifilina intraperitoneal duas vezes por dia e solução salina intralesional, uma vez por dia; Hialuronidase (HLD) – hialuronidase intralesional, uma vez por dia e solução salina por via intraperitoneal duas vezes por dia grupo; Pentoxifilina + Hialuronidase (PTX + HLD) – combinação das drogas nas mesmas doses e vias de administração. Todas as substâncias foram administradas do 1.º ao 13.º dia do pós-operatório, a área de necrose foi medida nos dias 7 e 14 de pós-operatório, os animais foram mortos no 14.º dia, e foram coletadas amostras para exame histológico e imuno-histoquímico. A percentagem da área de necrose no 7.º dia nos grupos PTX (M = 33,16 %; DP=±7,75), HLD (M = 21,04 %; DP=±7,13) e PTX + HLD (M = 28,04 %; DP=±10,50) foi menor (P<0,0001) quando comparadas aos grupos CTL -I (M = 48,17 %; DP=±9,18) e CTL - II (M = 46,24 %; DP=±8,02); no 14.º dia, os grupos PTX (M = 41,91 %; DP=±6,15), HLD (M = 43 %; DP=±4,711), e PTX + HLD (M = 40,56 %; DP=±8,67) também apresentaram menor área de necrose (P<0,001) quando comparados aos grupos CTL -I (M = 53,61 %; DP=±5,581) e CTL - II (M = 52,07 %; DP=±6,79). PTX e PTX + HLD apresentaram menor celularidade (P < 0,002) e V<sub>v</sub> de macrófagos (P < 0,003) e miofibroblastos (P < 0,0001) em relação aos controles; PTX mostrou maior L<sub>v</sub> dos vasos sanguíneos em comparação com todos os outros grupos (p < 0,0001). Neste modelo experimental, o uso isolado ou combinado de ambas as substâncias, aumentou a viabilidade dos retalhos, quando comparados aos controles. No 7º dia, o grupo PTX apresentou menor viabilidade que o HLD, enquanto que no 14º dia não houve diferença entre os grupos tratados. O uso isolado da PTX apresentou maior L<sub>v</sub> dos vasos sanguíneos e menor celularidade na derme profunda que quando utilizada em combinação com a HLD. Por outro lado, a utilização combinada dessas drogas mostrou-se mais eficiente em reduzir a celularidade da derme superficial e a V<sub>v</sub> dos macrófagos que o uso isolado da HLD.

Palavras-chave: Retalho cutâneo randomizado. Viabilidade. Necrose. Pentoxifilina. Hialuronidase.

## ABSTRACT

ANTÓNIO, Nsingi Nsosolo. *Morphological and immunohistochemistry evaluation of separate and combined effect of pentoxifylline and hyaluronidase on randomized rat skin flaps*. 2016. 59 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016

Randomized skin flaps are used very often in plastic surgery, especially for the reconstruction of tissues, but the possibility of necrosis has challenged its use. There have been several studies aimed at finding ways to reduce its occurrence. To evaluate the isolated and combined effect of pentoxifylline and hyaluronidase on randomized skin flaps were used 50 male Wistar rats divided into five groups of ten: Control I (CTL- I) – no treatment before or after the surgical procedure; Control II (CTL -II) - saline solution intraperitoneally (IP) twice a day and intralesional (IL) once a day; Pentoxifylline (PTX) – pentoxifylline intraperitoneally twice a day and saline solution intralesional once a day; Hyaluronidase (HLD) – hyaluronidase intralesional once a day and saline solution intraperitoneally twice daily; Hyaluronidase - pentoxifylline (PTX - HLD) – combination of both drugs at the same doses and routes of administration. All substances were administered from 1<sup>st</sup> to 13<sup>th</sup> days after surgery, necrotic area was measured on 7<sup>th</sup> and 14<sup>th</sup> post-operative days, the animals were killed in 14<sup>th</sup> of the experiment, then were collected samples for histological and immunohistochemical examination. In the 7<sup>th</sup> day necrotic area percent was reduced in PTX(M = 33.16 %; SD=±7.75), HLD(M = 21.04 %; SD =±7.13), and PTX-HLD(M = 28.04 %;SD=±10.50) (P<0.0001) compared to CTL -I (M = 48,17 %; DP=±9,18) e CTL - II (M = 46.24 %; SD=±8.02) . In the 14<sup>th</sup> percentage of the PTX(M = 41.91 %; SD=±6.15), HDL(M = 43 %;SD=±4.711), and PTX-HLD(M = 40.56 %; SD=±8.67) groups was also reduced (P<0.001) compared to to CTL -I (M = 53.61 %;SD=±5.581) and CTL - II (M = 52.07 %; SD=±6.79). PTX and PTX-HLD showed reduced dermis cellularity (P<0.002), V<sub>v</sub> of macrophages (P<0.003) and myofibroblasts (P<0.0001) compared to controls; PTX showed enhanced L<sub>v</sub> of blood vessels compared to all other groups (P<0.0001). The use of each substance alone or combined increased flap viability compared to controls. On the 7<sup>th</sup> day, PTX exhibited lower viability than HLD, while on the 14<sup>th</sup> day there was no difference between treated groups. PTX alone enhanced the L<sub>v</sub> of blood vessels while PTX-HLD did not. However, PTX-HLD was more effective in decreasing the dermis cellularity and macrophage V<sub>v</sub> than HLD alone.

Keywords: Randomized skin flap. Viability. Necrosis. Pentoxifylline. Hyaluronidase.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Pesagem e alojamento dos animais.....	21
Figura 2 –	Tricotomia da região dorsal dos animais.....	22
Figura 3 –	Confecção de retalho dorsal.....	23
Figura 4 –	Inoculação de substâncias.....	24
Figura 5 –	Coleta de fragmento de tecido.....	25
Figura 6 –	Grade M 42.....	27
Figura 7 –	Varição do peso dos animais.....	30
Figura 8 –	Porcentagem da área de necrose no 7º dia do experimento..	31
Figura 9 –	Retalhos cutâneos no 7º dia do experimento .....	32
Figura 10-	Porcentagem da área de necrose no 14º dia do experimento	33
Figura 11-	Retalhos cutâneos no 14º dia do experimento .....	34
Figura 12 -	Densidade volume celular da derme superficial .....	35
Figura 13 -	Fotomicrografia da derme superficial.....	36
Figura 14 -	Densidade volumétrica celular da derme profunda.....	37
Figura 15 -	Fotomicrografia da derme profunda.....	38
Figura 16-	Profundidade da lesão.....	39
Figura 17-	Fotomicrografia da profundidade da lesão.....	40
Figura 18-	Densidade volumétrica dos macrófagos.....	41
Figura 19-	Fotomicrografia de macrófagos.....	42
Figura 20-	Densidade volumétrica dos miofibroblastos.....	43
Figura 21-	Fotomicrografia de miofibroblastos.....	44
Figura 22-	Densidade de comprimento dos vasos sanguíneos.....	45
Figura 23-	Fotomicrografia dos vasos sanguíneos.....	46

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosina difosfato
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
CAP	Captopril
CEUA	Comitê de Ética de Uso de Animais
cm <sup>2</sup>	Centímetro quadrado
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
CTL-I	Controle- 1
CTL-II	Controle- 2
FCM	Faculdade de Ciências Médicas
HLD	Hialuronidase
IBRAG	Instituto de biologia Roberto Alcantara Gomes
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1
IL	Intralesional
IL-1,2,3,4....	Interleucina- 1,2,3,4.....
IP	Intraperitoneal
Kg	Quilograma
LCE	Laboratório de Cirurgia Experimental
LRT	Laboratório de Reparo Tecidual
LTB-4	Leucotrieno B-4
L <sub>v</sub>	Densidade de comprimento
MCP-1	Proteína quimiotática de monócito-1
mg	Miligrama
mm <sup>3</sup>	Milímetro cúbico
PGD-2	Prostaglandina D-2
PGE-2	Prostaglandina E-2
PPARs	Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma
PTX	Pentoxifilina
SIM	Sinvastatina

SSF	Solução salina fisiológica
TAM	Tamoxifeno
TNF-alfa	Fator de necrose tumoral- alfa
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
UI	Unidade internacional
UTR	Unidade de turbidez
VCAM-1	Molécula de adesão celular vascular-1
Vv	Densidade volumétrica
$\alpha$ -SMA	Alfa-actina de músculo liso
$\mu\text{m}$	Micrómetro

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
1	<b>OBJETIVO</b> .....	19
2	<b>MÉTODO</b> .....	20
2.1	<b>Animais e grupos</b> .....	20
2.2	<b>Anestesia e tricotomia</b> .....	22
2.3	<b>Confecção do retalho cutâneo</b> .....	22
2.4	<b>Administração das substâncias</b> .....	23
2.5	<b>Acompanhamento pós-operatório</b> .....	24
2.6	<b>Morte dos animais e coleta das amostras</b> .....	25
2.7	<b>Análise macroscópica</b> .....	26
2.8	<b>Análise histológica</b> .....	26
2.9	<b>Análise imuno-histoquímica</b> .....	28
2.10	<b>Análise estatística</b> .....	29
3	<b>RESULTADOS</b> .....	30
3.1	<b>Variação do peso</b> .....	30
3.2	<b>Resultados macroscópicos</b> .....	31
3.2.1	<u>Área de Necrose no 7º dia do Experimento</u> .....	31
3.2.2	<u>Área de Necrose no 14º dia do Experimento</u> .....	33
3.3	<b>Resultados histológicos</b> .....	35
3.3.1	<u>Densidade volumétrica (<math>V_V</math>) celular da derme superficial</u> .....	35
3.3.2	<u>Densidade volumétrica (<math>V_V</math>) celular da derme profunda</u> .....	37
3.3.3	<u>Profundidade da lesão</u> .....	38
3.4	<b>Resultados imuno-histoquímicos</b> .....	41
3.4.1	<u>Densidades volumétricas (<math>V_V</math>) dos macrófagos</u> .....	41
3.4.2	<u>Densidade volumétrica (<math>V_V</math>) dos miofibroblastos</u> .....	43
3.4.3	<u>Densidade de comprimento (<math>L_V</math>) dos vasos sanguíneos</u> .....	45
4	<b>DISCUSSÃO</b> .....	47
	<b>CONCLUSÃO</b> .....	54
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	55

## INTRODUÇÃO

Os retalhos cutâneos são segmentos de pele retirados de uma área doadora e transferidos para outra receptora, temporária ou permanentemente, sendo conectados à circulação sistêmica por meio de um pedículo vascular. De acordo com o suprimento sanguíneo, podem ser classificados em randomizados, quando esse suprimento depende do plexo vascular subdérmico, e axiais, quando são supridos diretamente por artéria e veia da pele.<sup>1</sup>

Os retalhos cutâneos randomizados são utilizados com muita frequência em Cirurgia Plástica, sobretudo para a reconstrução de tecidos.<sup>1-4</sup> No entanto, a possibilidade de ocorrência de necrose surge como um de seus maiores desafios,<sup>1,3</sup> sendo capaz de alterar de forma devastadora o resultado previamente idealizado.<sup>5</sup>

São vários os fatores envolvidos na necrose parcial ou total dos retalhos cutâneos randomizados, podendo estar relacionados ao paciente, tais como alterações metabólicas, alterações do tônus e obstrução vascular,<sup>4</sup> e à própria confecção do retalho. Por exemplo, nos retalhos muito longos, há dificuldade da chegada de suprimento sanguíneo aos segmentos mais distais, o que ocasiona a instalação de hipóxia e déficit de nutrientes. A hipóxia resultante dessa deficiência de suprimento sanguíneo contribui para a produção de metabólitos tóxicos, assim como para a vasodilatação e aumento da permeabilidade capilar, o que favorece a instalação de edema e possibilita a ocorrência de necrose.<sup>1,4</sup>

A necrose é o tipo de morte celular em que ocorre a perda da integridade da membrana celular e vazamento do conteúdo intracelular, levando à sua desintegração, sendo essa sequência de eventos resultante da ação lítica de enzimas. As enzimas responsáveis pela digestão da célula provêm dos lisossomos da própria célula lesada e dos lisossomos dos leucócitos recrutados pelo processo de inflamação.<sup>6-9</sup>

A célula necrosada caracteriza-se por apresentar citoplasma com eosinofilia aumentada e alteração do núcleo, que pode assumir três aspectos diferentes (cariólise, picnose e cariorrhexis), devido à quebra da molécula do ácido desoxirribonucleico (ADN) e à alteração da cromatina.<sup>10</sup> A necrose pode apresentar vários aspectos morfológicos distintos:

- 1- Necrose de coagulação: a arquitetura do tecido é preservada.<sup>6-8</sup>

- 2- Necrose de liquefação: as células inflamatórias e as enzimas dos leucócitos digerem (liquefazem) o tecido.<sup>6,7</sup>
- 3- Necrose de caseificação: distingue-se da necrose de coagulação pelo fato de apresentar a arquitetura do tecido completamente alterada, com as linhagens celulares tornando-se irreconhecíveis.<sup>6,7</sup>
- 4- Necrose gordurosa: os ácidos graxos liberados pela lise celular ligam-se ao cálcio, formando áreas calcificadas esbranquiçadas, típicas deste tipo de lesão.<sup>6,7</sup>
- 5- Necrose fibrinoide: neste tipo de necrose os depósitos de imunocomplexo se ligam à fibrina extravasada dos vasos, formando um composto amorfo rosado e brilhante, visível à microscopia óptica.<sup>6,7</sup>

Os mecanismos bioquímicos de lesão celular que ocorrem nos tecidos são complexos, interconectados e entrelaçam-se fortemente com várias vias metabólicas intracelulares. De um modo geral, os mecanismos lesivos são os mesmos, nos distintos tipos de lesão celular:

- 1- Depleção de trifosfato de adenosina (ATP): a forma de armazenamento de energia celular é o ATP, que é produzido principalmente pela fosforilação oxidativa da adenosina difosfato (ADP), que ocorre por intermédio da redução do oxigênio pelo sistema de transporte de elétrons da mitocôndria. As principais causas de depleção de ATP são: a redução de suprimento de oxigênio e nutrientes, o dano mitocondrial e a ação de algumas substâncias tóxicas. A depleção significativa do ATP tem efeito difuso em vários sistemas celulares importantes: a) a bomba de sódio da membrana plasmática reduz sua atividade, resultando no acúmulo de sódio no meio intracelular e no extravasamento de potássio para o meio extracelular; b) aumenta a glicólise anaeróbia na tentativa de manter a fonte de energia celular; e c) ocorre a falência da bomba de cálcio dependente do ATP, resultando no influxo de cálcio para o meio intracelular e, conseqüentemente, no dano de vários componentes celulares.<sup>6,8,11</sup>

- 2- Dano e disfunção mitocondrial – as mitocôndrias podem ser consideradas como pequenas ‘fábricas’ produtoras de energia para a célula, em forma de ATP; o dano mitocondrial é muitas vezes associado à formação de um canal de alta condutibilidade na membrana mitocondrial, chamado poro de transição da permeabilidade mitocondrial, que causa a perda da potência

da membrana mitocondrial, mudança no pH e, mais adiante, compromete a fosforilação oxidativa.<sup>6,8,11</sup>

3- Influxo de cálcio – o cálcio livre no citosol é mantido em níveis normais pela bomba de cálcio dependente do ATP, numa concentração 10.000 vezes menor que a do meio extracelular, porém a isquemia e certas toxinas causam aumento da concentração do cálcio no citosol, levando à ativação de várias enzimas, o que pode causar o dano celular.<sup>6,7,10,11</sup>

4- Acúmulo de radicais livres de oxigênio – os radicais livres são moléculas que apresentam um único elétron na última camada, podendo causar lesão celular por três mecanismos principais: a) peroxidação lipídica das membranas; b) ligação cruzada; e c) mudança nas proteínas e dano no ADN.<sup>6,7,10</sup>

5-Aumento da permeabilidade da membrana – o aumento da permeabilidade da membrana acontece em vários tipos de lesão celular, culminando com a morte celular. A membrana plasmática pode ser danificada pela isquemia, por várias toxinas microbianas, pelos componentes líticos do complemento e por uma variedade de agentes físicos e químicos.<sup>6,7,9</sup>

A isquemia, que é definida como diminuição do fluxo sanguíneo para os tecidos, é a principal causa de necrose dos retalhos cutâneos randomizados. Diferentemente do que acontece na hipóxia, em que a produção de energia pode continuar pela via da glicólise anaeróbia, na isquemia, devido à redução do suprimento sanguíneo, o aporte de substratos necessários para realização da glicólise anaeróbia fica comprometida e, conseqüentemente, a produção de energia pela via anaeróbia não ocorre, depois da exaustão dos todos os substratos. A glicólise anaeróbia também pode ser prejudicada pelo acúmulo de metabólitos que, numa situação normal, deveriam ser removidos pela circulação sanguínea.<sup>6,7</sup>

A busca de estratégias para garantir maior viabilidade dos retalhos cutâneos randomizados tem impulsionado pesquisas que objetivam não somente a redução dos efeitos deletérios, mas também a ampliação dos mediadores que favorecem a cicatrização das feridas.<sup>12-14</sup> Com este intuito, tem-se estudado a ação de várias substâncias, como as drogas vasodilatadoras, os antioxidantes, os corticosteroides e algumas enzimas.<sup>13,15,16</sup>

Cai *et al.* (2015) usaram o *huangqi* (Radix astragali) uma erva tradicional chinesa, para prevenir a ocorrência de necrose em modelo experimental em ratos, e

os resultados mostraram redução da área necrótica no sétimo dia do experimento.<sup>17</sup> Kaya *et al.* (2015) compararam o efeito da sildenafil, tadalafil, e da vardenafil sobre os retalhos cutâneos randomizados em modelo experimental em ratos.<sup>18</sup> Can *et al.* (2015) obtiveram a diminuição da área necrosada de retalhos cutâneos randomizados em ratos, com o uso da coenzima Q10 (ubiquinona).<sup>19</sup> Ozturk *et al.* (2012) mostraram o efeito benéfico da aminoguanidina em retalhos cutâneos randomizados em modelo experimental de ratos diabéticos.<sup>20</sup> Chung *et al.* (2013) estudaram o efeito da polidesoxiribonucleico sobre os retalhos cutâneos randomizados em ratos.<sup>21</sup>

A pentoxifilina (PTX) é um inibidor não seletivo da fosfodiesterase (3,7-dii-3,7-dimetil-1-5-oxoexil-1H-purina-2,6-diona),<sup>22</sup> derivada da metilxantina,<sup>16,23-25</sup> cuja fórmula molecular é C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>, e apresenta peso molecular de 278,31 daltons. É uma droga com múltiplas propriedades farmacológicas,<sup>26</sup> promove o relaxamento da musculatura lisa dos vasos sanguíneos, causando vasodilatação e prevenção de espasmo vascular;<sup>27,28</sup> aumenta a flexibilidade das células sanguíneas, inclusive dos eritrócitos, o que favorece a passagem do fluxo sanguíneo nos vasos periféricos;<sup>16,26,29,30</sup> promove a desagregação plaquetária e aumenta a fibrinólise, contribuindo na diminuição da viscosidade sanguínea;<sup>22,25,26,30,31</sup> e também diminui a produção de colágeno e de glicosaminoglicanos.<sup>31</sup>

PTX modula a atividade imunológica, ao agir sobre as citocinas e suprime a hiperatividade dos leucócitos, ao reduzir a liberação de superóxido e a adesão de neutrófilos,<sup>29</sup> inibe a ação das integrinas e da interleucina-2 (IL-2), impedindo a aderência dos linfócitos às células endoteliais,<sup>32</sup> e reduz a produção da IL-1 e do fator de necrose tumoral-alfa (TNF-alfa).<sup>26,30,31,33</sup> Foi demonstrado em estudo recente a sua ação na prevenção da infecção bacteriana em pacientes cirróticos e na redução da proliferação bacteriana intestinal,<sup>34</sup> sendo utilizada clinicamente no tratamento de doença vascular periférica.<sup>27,32,35</sup> Esse conjunto de ações pode favorecer o aumento da viabilidade dos retalhos cutâneos randomizados.

A hialuronidase (HLD) é uma enzima com peso molecular de aproximadamente 60.000 daltons. De acordo com a fonte de obtenção, podem-se diferenciar três tipos dessa enzima: 1- hialuronato-4-glicanohidrolase, presente no sêmen de mamíferos, nos lisossomos e em venenos de vários insetos e cobras; 2- hialuronato-3-glicanohidrolase, produzida pelas sanguessugas e algumas espécies de ancilostomas; e 3- hialuronidase bacteriana ou hialuronatoliase.<sup>36,37</sup>

HLD proveniente dos testículos de bovinos e ovinos é a mais utilizada na prática clínica.<sup>36,37</sup> Atua sobre o ácido hialurônico, despolarizando-o temporariamente e, conseqüentemente, reduz a viscosidade do meio intercelular, tornando o tecido mais permeável à dispersão de outras substâncias, ao mesmo tempo em que promove a reabsorção do excesso de fluidos, mobilizando edemas e infiltrações.<sup>38,39</sup> Acredita-se que isso aumente o fluxo do líquido intersticial para a base do retalho e, conseqüentemente, aumente a drenagem de metabólitos da extremidade do retalho para áreas mais distantes com vascularização normal, o que pode prevenir a ocorrência de necrose.<sup>40,41</sup> HLD é usada clinicamente para facilitar a absorção e dispersão de substâncias que tenham extravasado para os tecidos, após administração parenteral.<sup>42</sup>

Um estudo recente em modelo experimental em ratos mostrou que HLD tem efeito sobre o reparo tecidual, ao acelerar o fechamento de feridas.<sup>40</sup> Também foi mostrado que ela pode agir como reguladora da resposta inflamatória, ao mediar a expressão das citocinas pró- e anti-inflamatórias, como o TNF-alfa, a IL-1 $\alpha$ , IL-10, IL-4, dos mediadores lipídicos, como a prostaglandina E-2 (PGE-2), leucotrieno B-4 (LTB-4), e prostaglandina D-2 (PGD-2), bem como de fatores de transcrição, como os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs)  $\delta$ ,  $\alpha$  e  $\lambda$ .<sup>40</sup>

Como não existem relatos na literatura médica da avaliação do efeito combinado dessas drogas (PTX e HLD) e, considerando-se o efeito benéfico de cada uma delas sobre as propriedades reológicas dos fluidos orgânicos e sobre o processo de cicatrização, fundamentado em diferentes mecanismos de ação, realizou-se este estudo, com a hipótese de que com o seu uso combinado se obtenha melhoria na viabilidade de retalhos cutâneos randomizados em ratos.

## 1 OBJETIVO

Avaliar a viabilidade de retalhos cutâneos randomizados em ratos tratados com o uso combinado de pentoxifilina e de hialuronidase, comparado com o uso isolado de cada uma dessas substâncias.

## 2 MÉTODO

Este estudo foi desenvolvido no Laboratório de Cirurgia Experimental (LCE) da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) e no Laboratório de Reparo Tecidual (LRT) do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais do IBRAG – UERJ sob o protocolo n.º CEUA/014/2015. Todos os procedimentos seguiram, rigorosamente, os cuidados preconizados na legislação brasileira para uso de animais em pesquisa.<sup>43-45</sup>

### 2.1 Animais e grupos

Foram utilizados 50 ratos machos *Wistar*, com peso variando entre 250 e 300 gramas, provenientes do biotério do Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). Os ratos foram acondicionados em uma sala com temperatura controlada (22 °C), sob um ciclo de 12h de claro e 12h de escuro, e foram alojados em gaiolas individuais, sendo disponibilizados água e ração comercial *ad libitum*. (Figuras 1 )

**Figura 1-** Pesagem e alojamento dos animais



**Fonte:** Nsingi, 2016

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos, com dez animais, cada:

- Grupo controle1 (CTL-I): não receberam qualquer tratamento.
- Grupo controle 2 (CTL-II): 0,25 ml de solução salina fisiológica a 0,9% (SSF) por via intraperitoneal (IP), duas vezes ao dia, e 0,5 ml da mesma solução por via intralesional (IL), uma vez ao dia.
- Grupo pentoxifilina (PTX): 20 mg/kg de PTX IP duas vezes ao dia e 0,5 ml de SSF IL, uma vez ao dia.
- Grupo hialuronidase (HLD): 75UI/dia de HLD IL uma vez ao dia e 0,25 ml de SSF IP, duas vezes ao dia.
- Grupo PTX + HLD: combinação das duas drogas nas mesmas dosagens e vias de administração acima descritas.

A administração de SSF e das duas drogas (PTX e HLD) foi realizada desde o dia do procedimento cirúrgico até o décimo terceiro dia do pós-operatório.

## 2.2 Anestesia e tricotomia

Depois da distribuição em grupos, os animais foram submetidos anestesia, com a combinação de cloridrato de cetamina (150 mg/kg) e cloridrato de xilazina (15 mg/kg), na proporção de 2:1, sendo administrados 0,1 ml/100 g de peso corporal dessa combinação pela via intramuscular. Após a anestesia, os animais foram submetidos a tricotomia da região dorsal. (Figura 2)

**Figura 2-** Tricotomia na região dorsal



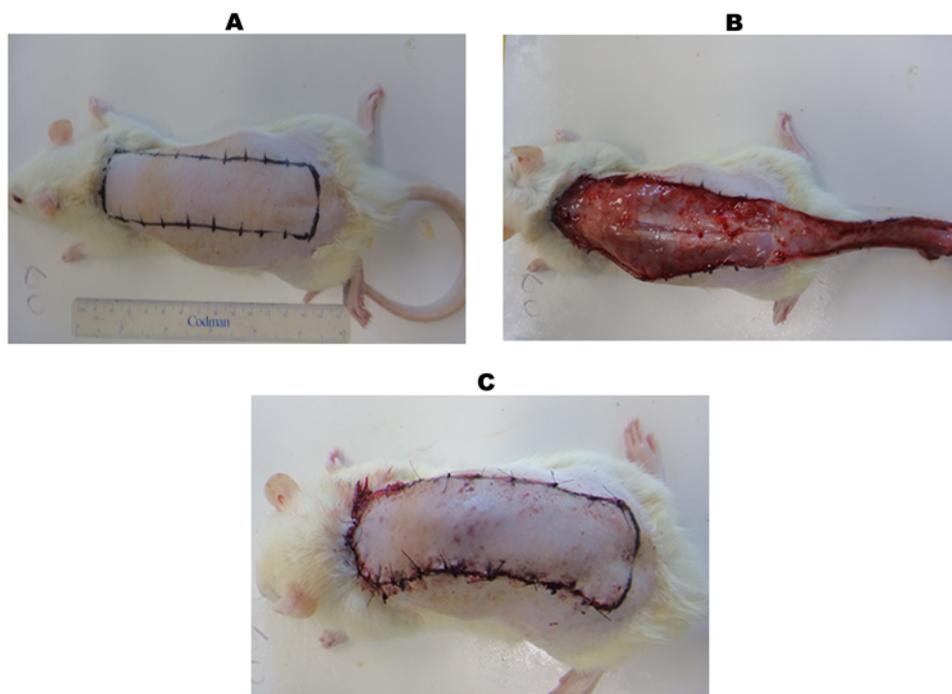
**Fonte:** Nsingi, 2016

## 2.3 Confeção do retalho cutâneo

Em seguida, procedeu-se à antissepsia com solução de clorexidina alcoólica e, com uma caneta de marcação, realizou-se o desenho do retalho cutâneo de 3 cm de largura e 10 cm de comprimento, com base caudal, segundo o modelo de McFarlene modificado,<sup>25,46-48</sup> ao nível de uma linha horizontal unindo as duas cristas ilíacas.

Posteriormente, realizou-se incisão com lâmina de bisturi 15, seguindo as delimitações do desenho, e, após dissecação do plano musculo-aponeurótico, elevou-se o retalho constituído por pele, tela subcutânea, panículo carnoso e fáscia superficial que, em seguida, foi reposicionado no seu leito de origem, com a utilização de pontos separados de náilon monofilamentar 4-0. (Figura 3- A, B e C)

**Figura 3-** Confeção do retalho na região dorsal



**Legenda:** A- Desenho do retalho 3:10 cm; B- Elevação do retalho com base caudal  
C- Reposicionamento do retalho em seu leito original.

**Fonte:** Nsingi, 2016

## 2. 4 Administração de substâncias

Após o procedimento cirúrgico, os animais receberam SSF, PTX (pentoxifilina solução injetável, Vascer) e HLD (hialuronidase 3000 UTR, Biometil), nas mesmas dosagens e vias de administração descritas acima. A inoculação foi realizada com a utilização de seringa de 1 ml, com agulha 13 x 4,5, tendo a administração IL sido

realizada nos dois terços cefálicos do retalho, nos planos intradérmico e subdérmico, e a administração IP com a introdução da agulha na cavidade abdominal.(Figura 4- A e B)

**Figura 4** – Inoculação de substâncias



**Legenda:** A - Via intralesional; B - Via intraperitoneal.

**Fonte:** Nsingi, 2016

A administração das substâncias foi realizada até ao décimo terceiro dia do experimento, sendo cada sessão precedida de sedação dos animais, com a utilização de anestésico inalatório sevoflurano (Sevocris: Cristália- Prod. Quim.Farm.Ltda, Itapira-SP).

## 2.5 Acompanhamento pós-operatório

Os animais foram avaliados diariamente, levando-se em consideração os seguintes parâmetros:

- Peso corporal
- Sinais de hematoma (inchaço, com coleção de sangue)
- Sinais de infecção (eritema, endureção e aumento da temperatura local)<sup>49</sup>
- Delimitação da área necrótica (pele escura, endurecida e sem pelos)

## 2.6 Morte dos animais e coleta das amostras

No 14.º dia do experimento, os animais foram mortos por sobredose anestésica, sendo colhidas amostras para o exame histológico e imunohistoquímico. Foi coletado um fragmento de tecido da área limítrofe entre o tecido viável e tecido necrótico ( figura 5).

As amostras coletadas foram imersas em SSF, para retirar o excesso de sangue, e em seguida imersas em formol a 10%, até o preparo histológico. Foram realizados cortes transversais com cerca de 5 mm que foram submetidos a desidratação com álcool e xilol, seguida da inclusão em parafina. Posteriormente, as peças contidas nos blocos de parafina foram submetidas a cortes sequenciais de aproximadamente 5 µm.

**Figura 5** – Coleta de amostra



**Legenda:** A coleta de amostra foi realizada na área limítrofe entre o tecido viável e o tecido necrótico.

**Fonte:** Nsingi, 2016

## 2.7 Análise macroscópica

A delimitação da área de necrose foi realizada no sétimo e décimo quarto dias do pós-operatório, utilizando-se papel transparente que foi colocado sobre o dorso dos animais e, com uma caneta de marcação, foram desenhados a área total do retalho e a área necrosada. Os dados obtidos foram processados por meio do *software* Adobe Photoshop (Adobe Photoshop 7.0, Los Angeles, CA), que negritou a área da necrose e a área total, e estas imagens foram analisadas, com a utilização do *software* Image J (National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA), para cálculo das áreas em pixels, convertidas posteriormente para cm<sup>2</sup>.

Para a conversão dos valores de pixels para cm<sup>2</sup>, foi utilizada uma régua que continha cinco quadrados que mediam 1 cm<sup>2</sup> cada, e com o uso do *software* Image J (National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA), realizou-se o cálculo da área desses quadrados em pixels. A média dos valores obtidos foi usada para fazer a conversão dos valores da área de necrose bem como da área total, de pixels para cm<sup>2</sup>, com o uso da regra de três simples, e desses dados, extraiu-se a porcentagem da área de necrose, com a utilização da seguinte fórmula:

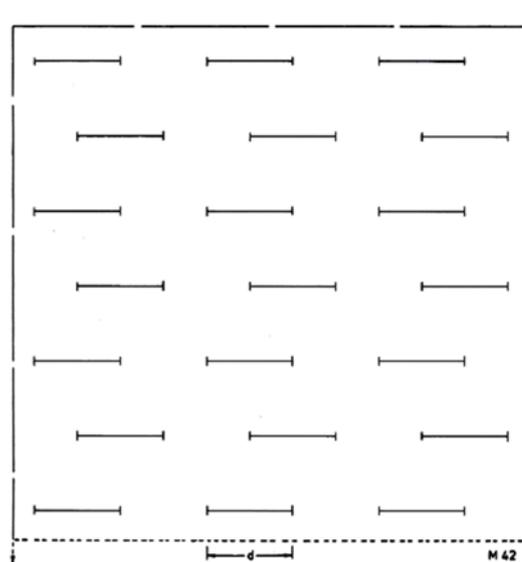
$$P = A_N \cdot 100 / A_T$$

**P**- Porcentagem, **A<sub>N</sub>**- Área de necrose, **A<sub>T</sub>**- Área total

## 2.8 Análise histológica

Os cortes foram corados com hematoxilina eosina e tricrômio de Masson, para a análise histológica (densidade volumétrica celular e profundidade da lesão). As imagens foram digitalizadas com o uso do *scanner* de lâminas Panoramic MIDI digital (3Dhistech Kft, Budapeste, Hungria).

Para análise da densidade volumétrica celular da derme superficial e profunda, foi utilizado o método estereológico de contagem de pontos, tendo sido utilizado à grade M42.

**Figura 6-** Grade M 42

**Fonte:** Nsingi, 2016 Adaptação

A densidade volumétrica celular ( $V_V$ ) é expressa como a porcentagem de pontos que esbarram em cada célula ( $P_P$ ) em relação ao número de pontos totais ( $P_T$ ) da grade teste.<sup>50,51</sup>

$$V_V = P_P / P_T \cdot 100$$

$V_V$  – densidade volumétrica;  $P_P$ - pontos que esbarram em cada célula;  $P_T$  pontos totais da grade.

Foram analisados dez campos de cada animal, capturados aleatoriamente, sendo os dados expressos em porcentagem.

Para o cálculo da profundidade da lesão, adotou-se como limite superficial a borda da crosta e o limite profundo a linha entre o tecido de granulação e o tecido saudável. Usando-se a escala de medição do *Software Panoramic Viewer*, foram realizadas cinco aferições da profundidade da lesão, tendo-se calculado, em

seguida, a média aritmética desses valores, sendo o resultado expresso em micrômetros.

## 2.9 Análise imuno-histoquímica

Para a análise imuno-histoquímica, utilizou-se o CD68 para a marcação dos macrófagos e o anticorpo contra  $\alpha$ -actina do músculo liso para marcar os miofibroblastos e vasos sanguíneos.

Para a quantificação dos macrófagos CD68 positivos, os cortes foram incubados em solução de tripsina 0,1%, para recuperação antigênica, sendo, em seguida, incubados em solução de metanol + peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), para inibir a atividade da peroxidase endógena, após o que foram incubados no anticorpo primário anti-CD68 (1:300; Serotec Ltd, Oxford, R.U). Depois da lavagem, os cortes foram incubados no anticorpo secundário – sistema Envision (1:2; DAKO), sendo utilizada a diaminobenzidina (DAB) como cromógeno. Finalmente, os cortes foram contrastados com hematoxilina de Dellafield.

Para a quantificação dos vasos sanguíneos e dos miofibroblastos, inicialmente os cortes foram incubados em solução de tripsina 0,1% e, posteriormente, realizou-se a inibição da peroxidase endógena com a incubação dos cortes em solução de metanol + peróxido de hidrogênio. Após a lavagem, os cortes foram incubados em anticorpo monoclonal de rato contra alfa-actina do músculo liso (1:1000; DAKO Rio de Janeiro Brasil) e depois no sistema Envision (1:20; DAKO). A DAB foi utilizada como cromógeno. Os cortes foram contrastados com hematoxilina de Dellafield.

Após a imuno-histoquímica ter sido realizada, as lâminas foram digitalizadas, utilizando o *scanner* de lâminas Pannoramic MIDI digital.

Para quantificar os macrófagos CD68 positivos e os miofibroblastos, dez campos aleatórios por animal foram capturados por meio do programa de análises de imagens Pannoramic Viewer. Foi utilizado o método estereológico de contagem de pontos para cálculo da densidade volumétrica dos macrófagos, sendo os resultados expressos em porcentagem.

Para a quantificação dos vasos sanguíneos, dez campos aleatórios por animal foram capturados com a utilização do programa de análises de imagens Panoramic Viewer, e fez-se a contagem de vasos por área teste ( $A_T = 26506,4 \mu\text{m}^2$ ), com a utilização de grade M42, tendo-se depois, extraído a média aritmética desses valores, e em seguida realizou-se o cálculo da densidade de comprimento com a utilização da fórmula  $L_V := 2.Q_A$  dividido pela  $A_T$  e o resultado foi expresso em  $\text{mm}/\text{mm}^3$ .<sup>51</sup>

## 2.10 Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados e representados como média e desvio padrão da média. Foi usado o teste D'Agostino e Pearson *omnibus normality* para verificar se os dados dos grupos correspondiam ou não à distribuição normal.

O teste *one way* ANOVA foi utilizado com pós-teste de Tukey para os dados paramétricos, enquanto o teste de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn, foi utilizado para os dados não paramétricos. Em todas as análises, um valor de  $p \leq 0,05$  foi estabelecido para a rejeição da hipótese nula de similaridade entre os grupos de animais. Todos os dados foram analisados usando o *software* GraphPadPrism (GraphPadPrism version 6.0, SanDiego, CA).

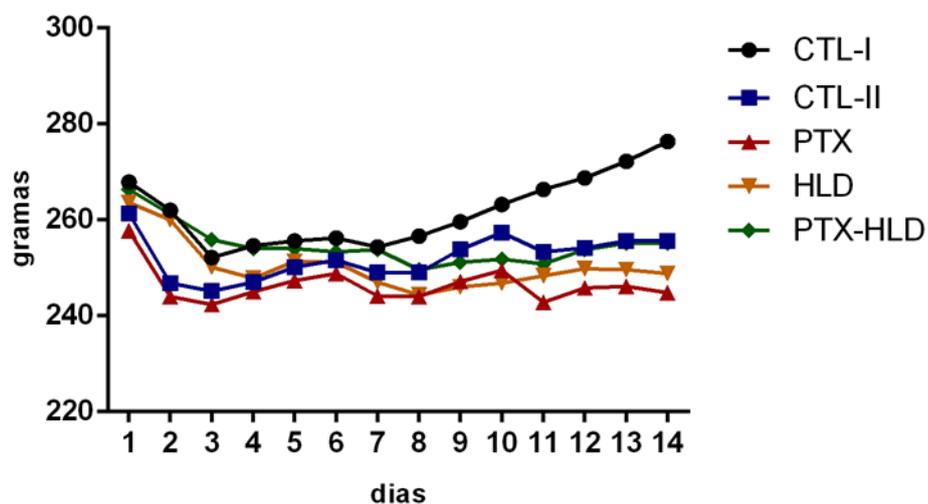
### 3 RESULTADOS

Durante o procedimento anestésico, um animal do grupo HLD evoluiu para óbito, tendo o estudo prosseguido com 49 ratos, ou seja, com apenas nove animais no grupo HLD, e dez em cada um dos grupos restantes.

#### 3.1 Variação do peso

Foi aferido o peso dos animais diariamente, ao longo de todo período do experimento, tendo-se verificado grande oscilação. No entanto, ao final do período do experimento, não houve aumento do peso, ao contrário, notou-se emagrecimento significativo dos animais de todos os grupos (CTL-II  $P < 0,0332$ ; PTX  $P < 0,0002$ ; HLD  $P < 0,0001$ ; PTX-HLD  $P < 0,0001$ ) à exceção dos animais do grupo CTL-I, que apresentaram aumento do peso final em comparação ao peso inicial ( $P < 0,0002$ ). (Figura 7)

**Figura 7** - Variação de peso dos animais



**Legenda:** o gráfico mostra a variação diária do peso dos animais dos diferentes grupos, do 1º ao 14º dia do experimento, realizada com a utilização do GraphPad Prisma 6.

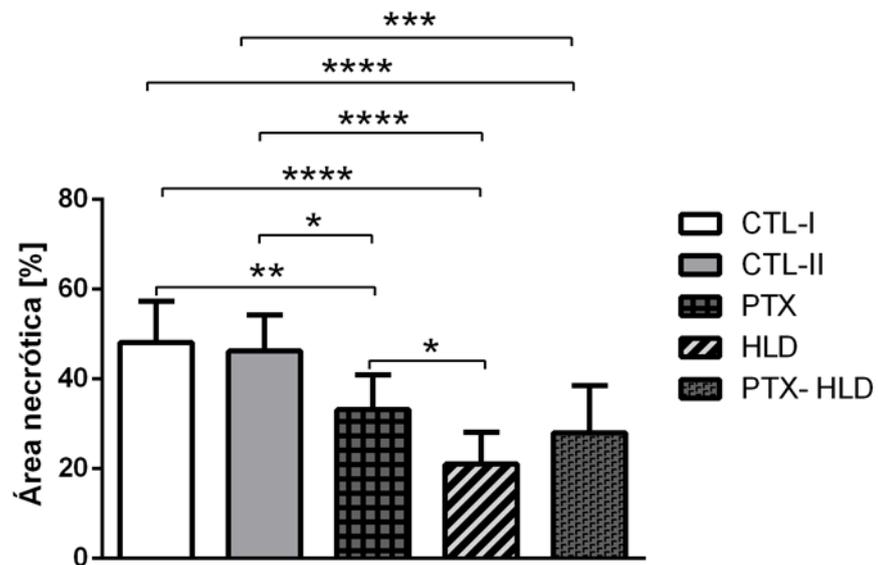
**Fonte:** Nsingi, 2016

### 3. 2 Resultados macroscópicos

#### 3. 2.1 Área de necrose no 7º dia do experimento

A análise estatística da porcentagem da área de necrose no 7º dia do experimento revelou, que os grupos CTL-I (M=48,17%; DP=±9,18) e CTL-II (M=46,24%; DP=±8,02) apresentaram maior porcentagem da área necrosada, quando comparados com os grupos PTX (M=33,16%; DP=±7,75%), HLD (M=21,04%;DP=±7,13%) e PTX-HLD (M=28,04%;DP=±10,50). (Figuras 8 e 9)

**Figura 8-** Área necrótica no 7º dia do experimento



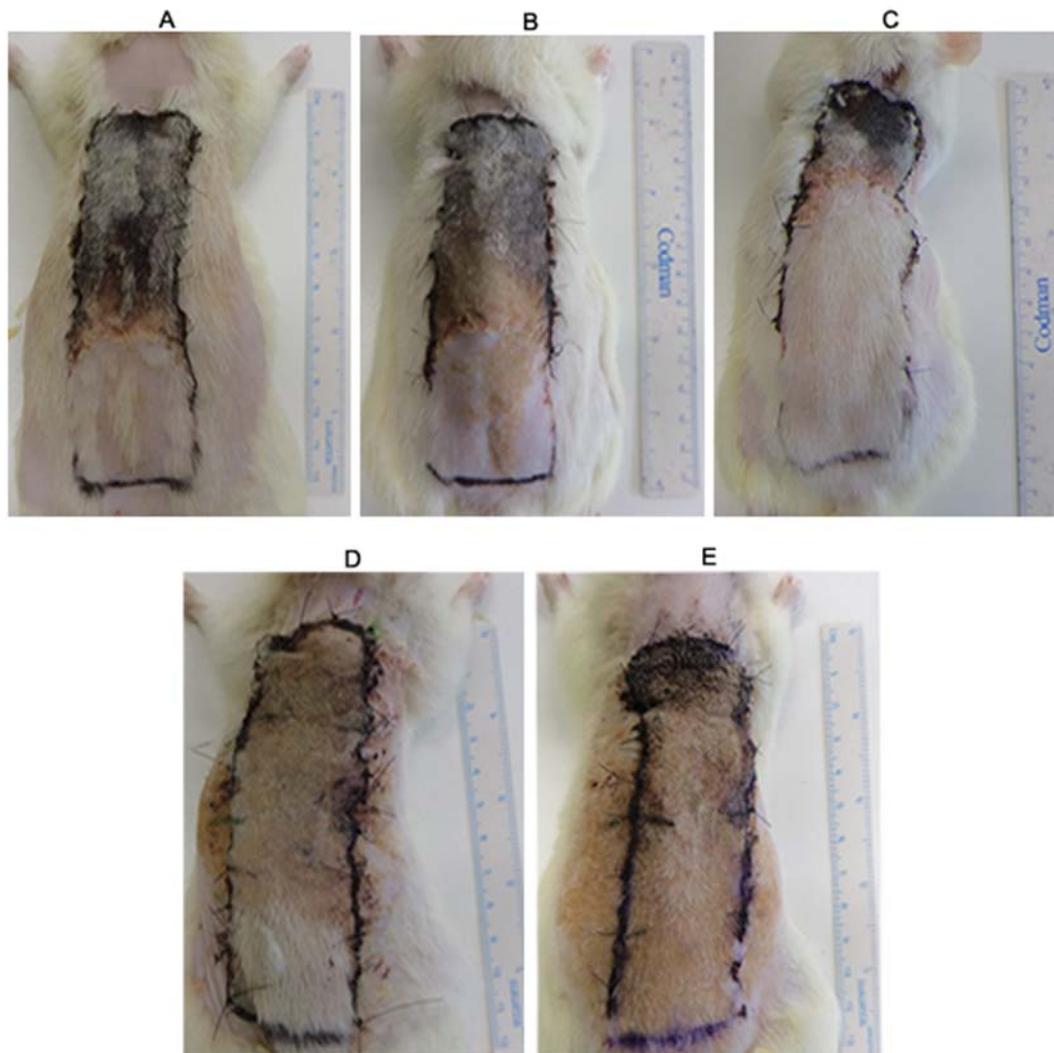
**Legenda:** Percentagem da área necrótica dos diferentes grupos no 7º dia do experimento realizada com os testes one-way ANOVA e Tukey de múltiplas comparações em GraphPad Prism 6.

**Nota:**

Comparação entre as colunas abaixo das extremidades do segmento de reta  
 \*\*\*\* P < 0,0001    \*\*\* P < 0,001    \*\* P < 0,002    \* P < 0,01

Fonte: Nsingi, 2016

**Figura 9** - Retalhos no 7º dia do experimento



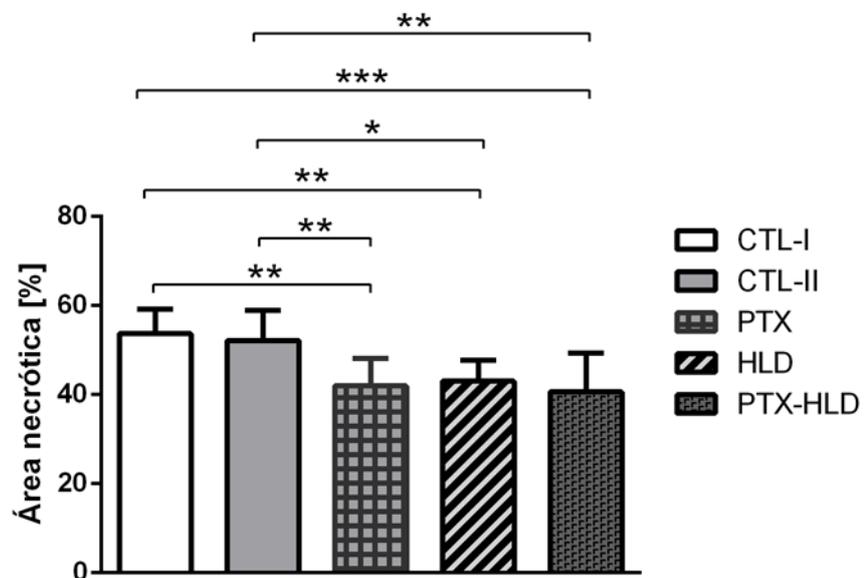
**Legenda:** Retalhos cutâneos realizados nos animais no 7.o dia do pós-operatório, mostrando a diferença da área necrosada entre os diferentes grupos: A- Grupo Controle - I (CTL-I); B - Grupo Controle - II (CTL-II); C- Grupo Pentoxifilina (PTX); D- Grupo Hialuronidase (HLD) ; E- Grupo Pentoxifilina + Hialuronidase (PTX-HLD).

**Fonte:** Nsingi, 2016

### 3. 2.2 Áreas de necrose no 14º dia do experimento

A segunda demarcação da pele necrosada foi realizada no 14º dia do experimento e a análise estatística dos dados revelou aumento da porcentagem da área de necrose, em todos os grupos quando comparadas com as do 7º dia do experimento, porém mais acentuado no grupo HLD (tendo passado de M=21,04%; DP=±7,137 para M=43%; DP=±4,711). Os demais grupos apresentaram os seguintes resultados no 14º dia do experimento: CTL-I (M=53,61%; DP=±5,58), CTL-II (M=52,07%; DP=±6,79), PTX (M=41,91%; DP=±6,15) e PTX-HLD (M=40,56 %; DP=±8,67). No entanto, ao comparar-se a porcentagem de área necrosada dos distintos grupos, verificou-se que os grupos CTL-I e CTL-II apresentaram maior porcentagem de área necrosada em relação aos grupos PTX, HLD e PTX-HLD, com diferença significativa. (Figuras 10 e 11)

**Figura 10-** Área necrótica no 14º dia do experimento



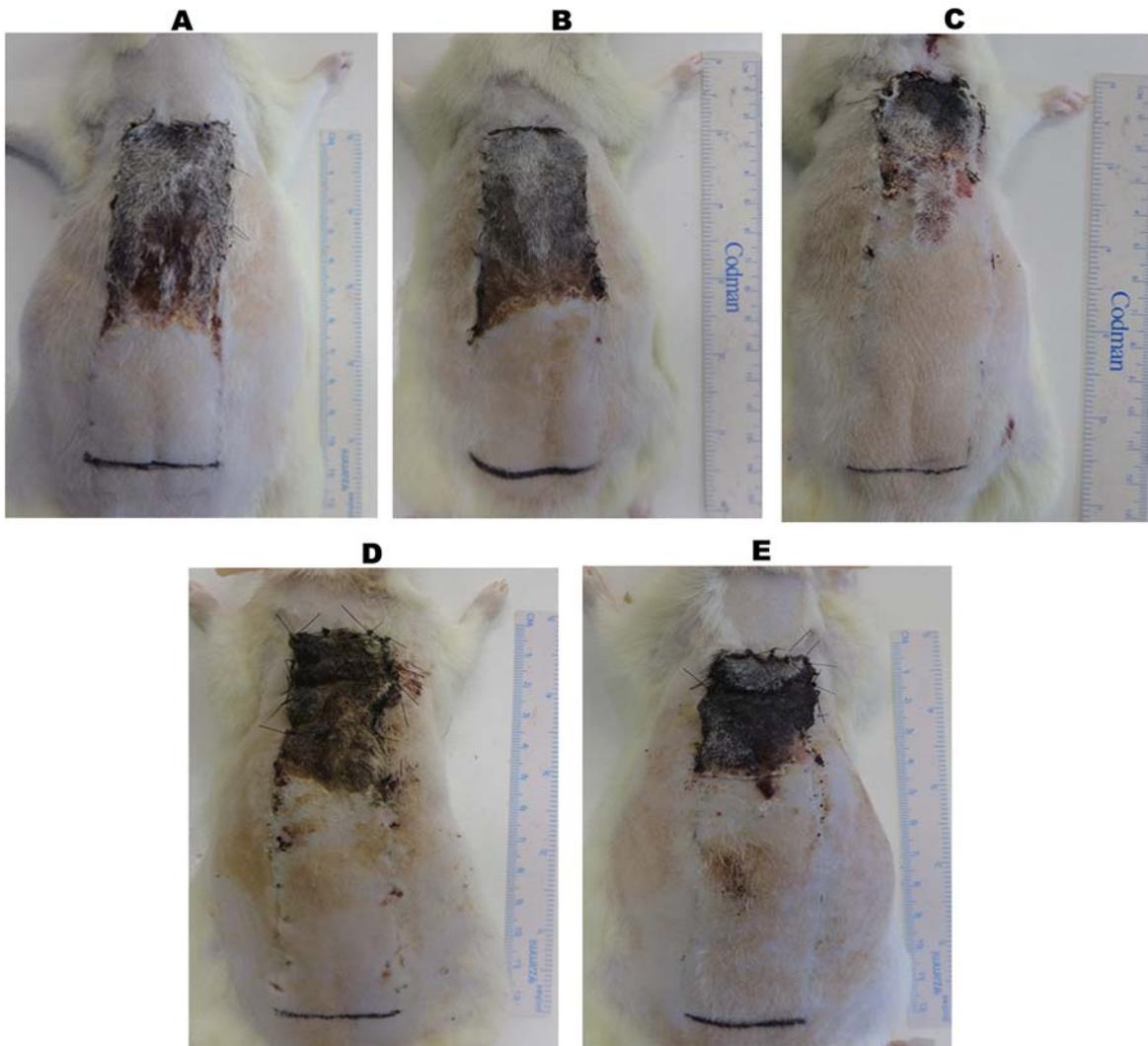
**Legenda:** Percentagem da área necrótica dos diferentes grupos no 14º dia do experimento realizada com os testes one-way ANOVA e Tukey de múltiplas comparações em GraphPad Prism 6.

**Nota:**

Comparação entre as colunas abaixo das extremidades do segmento de reta.  
 \*\*\* P < 0,001      \*\* P < 0,002      \* P < 0,01

Fonte: Nsingi, 2016

**Figura 11-** Retalhos no 14o dia do experimento



**Legenda:** Retalhos cutâneos realizados nos animais no 14.o dia do pós-operatório, mostrando a diferença da área necrosada entre os diferentes grupos: A- Grupo Controle - I (CTL-I); B-Grupo Controle - II (CTL-II); C- Grupo Pentoxifilina (PTX); D- Grupo Hialuronidase(HLD); E- Grupo Pentoxifilina + Hialuronidase (PTX-HLD).

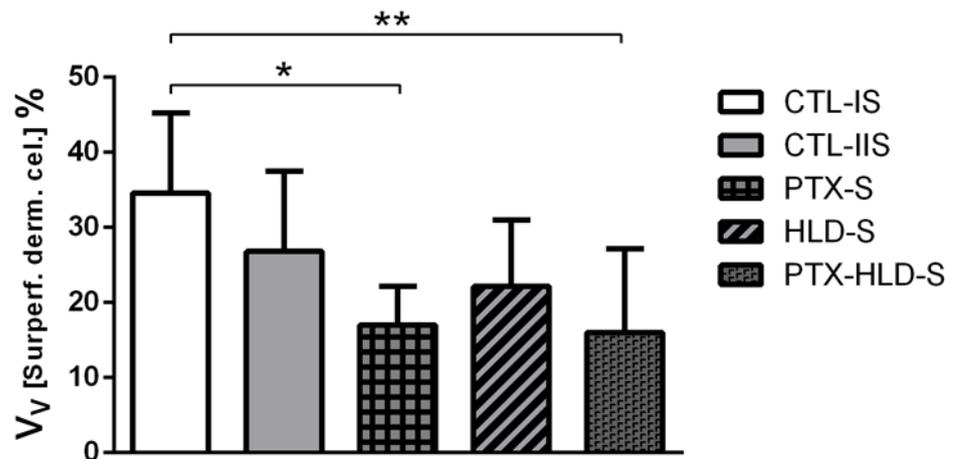
**Fonte:** Nsingi, 2016

### 3.3 Resultados histológicos

#### 3.3.1 Densidade volumétrica ( $V_V$ ) celular da derme superficial

O resultado da densidade volumétrica celular da derma superficial revelou que os grupos PTX (M=17%; DP=±5,16) e PXT-HLD (M=15,98%; DP=±11,12) apresentaram menor  $V_V$  celular em relação aos grupos CTL-I (M=34,54%; DP=±10,54), CTL-II (M=26,76%; DP=±10,74) e HLD (M=22,09; DP=±8,86). A  $V_V$  dos grupos PTX e PTX-HLD apresentou diferença significativa ( $p=0,0015$ ), quando comparada com o grupo CTL-I. (Figuras 12 e 13)

**Figura 12-** Densidade volumétrica ( $V_V$ ) celular da derme superficial



**Legenda:** Densidade volumétrica ( $V_V$ ) celular da derme superficial dos diferentes grupos realizada com os testes Kruskal-Wallis e Dunn de múltiplas comparações em GraphPad Prism 6.

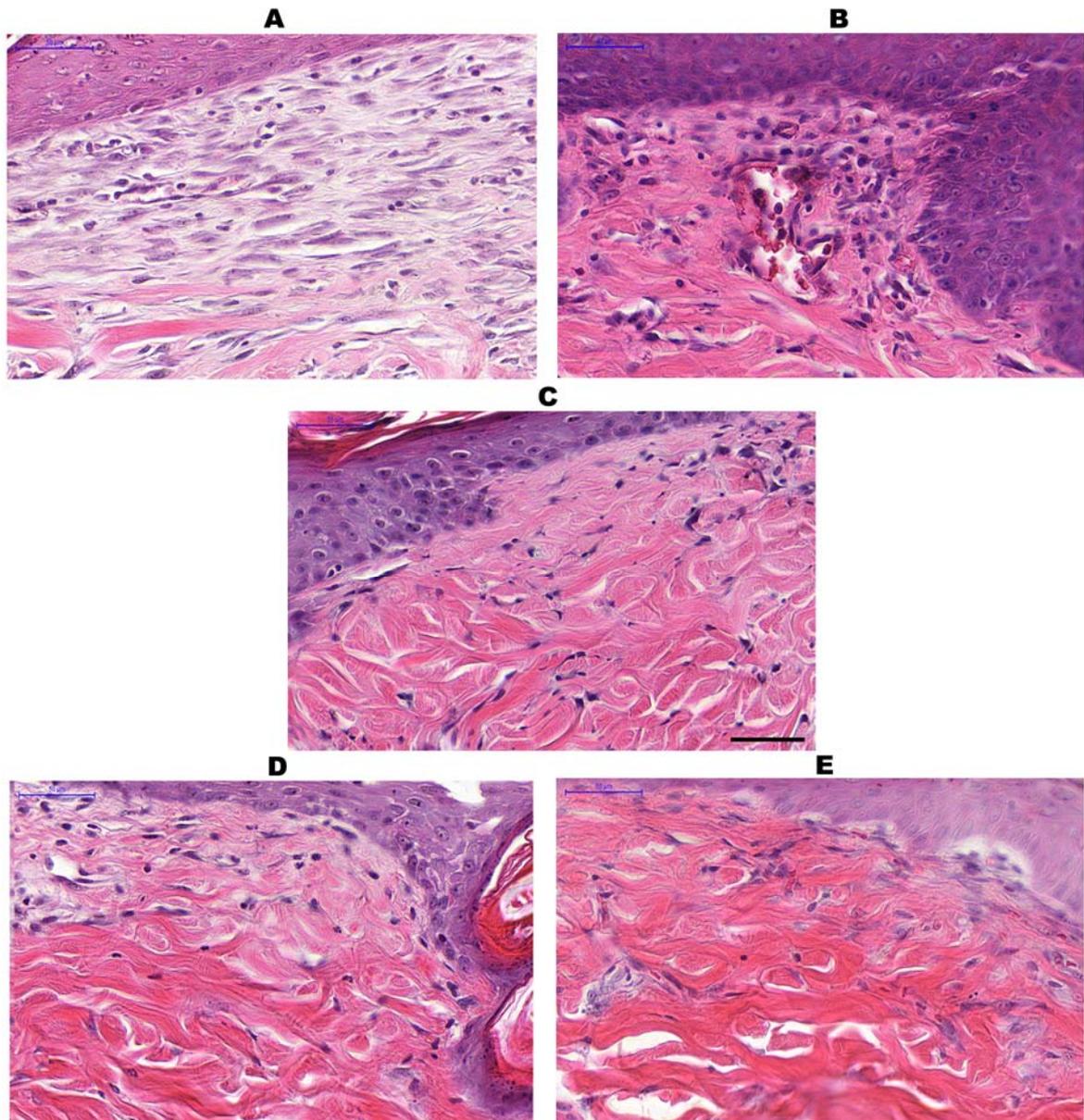
**Nota:**

— Comparação entre as colunas abaixo das extremidades do segmento de reta.

\*\*  $P < 0,002$       \*  $P < 0,01$

Fonte: Nsingi, 2016

**Figura 13-** Histologia da derme superficial



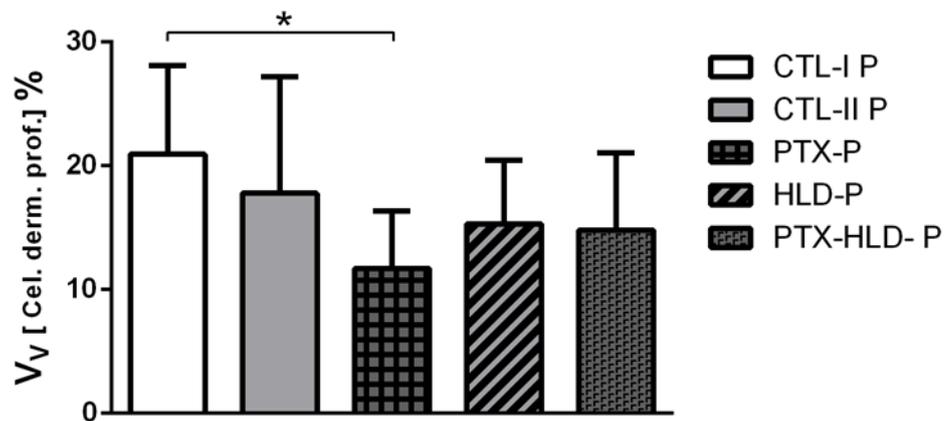
**Legenda:** Fotomicrografias da derme superficial corado com HE Barra: 50µm, mostrando a celularidade:  
 A- Grupo Controle-I (CTL-I); B- Grupo Controle-II (CTL-II); C - Grupo Pentoxifilina (PTX) ;  
 D - Grupo Hialuronidase (HLD); E - Grupo Pentoxifilina + Hialuronidase (PTX-HLD).

**Fonte:** Nsingi, 2016

### 3.3.2 Densidade volumétrica ( $V_V$ ) celular da derme profunda

Os grupos PTX (M=11,71%; DP=±4,65) e PTX-HLD (M=14,81%; DP=±6,24) apresentaram menor celularidade na derme profunda, quando comparados com os CTL-I (M=20,95%; DP=±7,15) e CTL-II (M=17,78%; DP=±9,42) e HLD (M=15,31%; DP=±5,12). Houve diferença significativa entre os grupos PTX e CTL-I. (Figuras 14 e 15)

**Figura 14-** Densidade volumétrica ( $V_V$ ) celular da derme profunda



**Legenda:** Célula densidade volumétrica ( $V_V$ ) celular da derme profunda dos diferentes grupos realizadas com os testes de Kruskal-Wallis e Dunn de múltiplas comparações em GraphPad Prism 6.

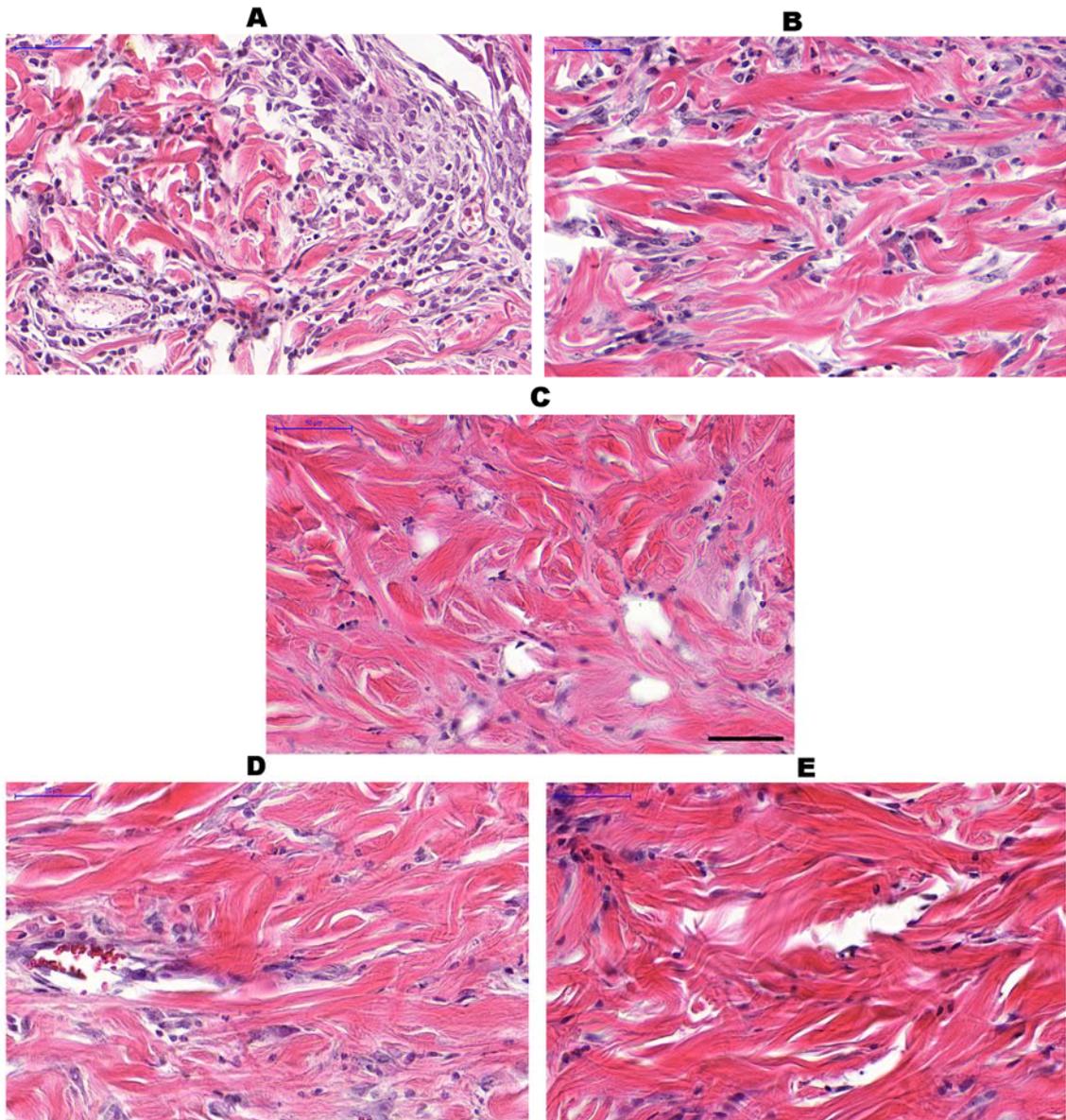
**Nota:**

Comparação entre as colunas abaixo das extremidades do segmento de reta.

\*  $P < 0,0201$

Fonte: Nsingi, 2016

**Figura 15-** Histologia da derme profunda



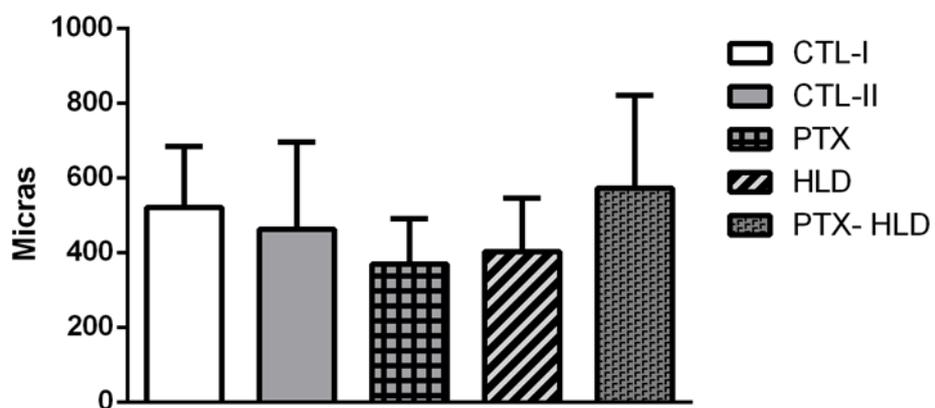
**Legenda:** Fotomicrografias da derme profunda corado com HE Barra: 50  $\mu$ m, mostrando a celularidade: A- Grupo Controle-I (CTL-I); B- Grupo Controle-II (CTL-II); C- Grupo Pentoxifilina (PTX); D- Grupo Hialuronidase (HLD); E- Grupo Pentoxifilina +Hialuronidase (PTX-HLD).

**Fonte:** Nsingi, 2016

### 3 3.3 Profundidade da lesão

A análise estatística da profundidade da lesão entre os grupos CTL-I (M=521,1  $\mu$ m; DP= $\pm$ 163,8), CTL-II (M=463,8  $\mu$ m; DP= $\pm$ 232,2), PTX (M=369,4  $\mu$ m; DP= $\pm$ 121,1), HLD (M=401,9  $\mu$ m; DP= $\pm$ 143,2), PTX-HLD (M=572,4  $\mu$ m; DP= $\pm$ 247,8) não apresentou diferença significativa ( $p < 0,262$ ). (Figuras 16 e 17)

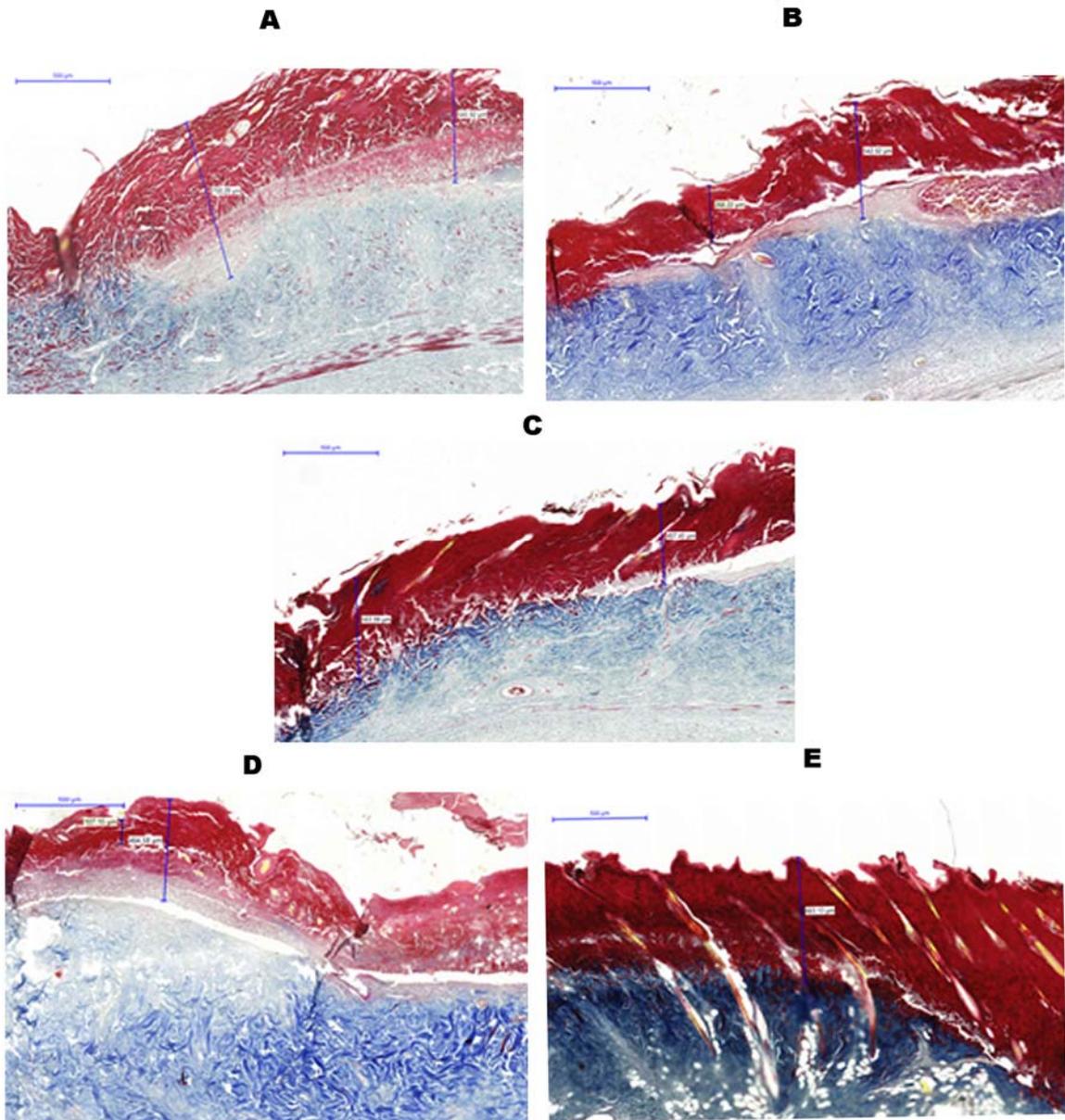
**Figura 16-** Profundidade da lesão



**Legenda:** Profundidade da lesão dos diferentes grupos, realizada como teste de Kruskal-Wallis . em GraphPad Prism 6.

**Fonte:** Nsingi, 2016

**Figura 17-** Histologia da profundidade da lesão



**Legenda:** Fotomicrografias que mostram a profundidade da lesão (crosta e tecido de granulação) corado com Tricrômio de Masson Barra 500  $\mu\text{m}$ : A- Grupo Controle-I (CTL-I); B - Grupo Controle-II (CTL-II); C- Grupo Pentoxifilina (PTX); D- Grupo Hialuronidase (HLD); E- Grupo Pentoxifilina + Hialuronidase (PTX-HLD).

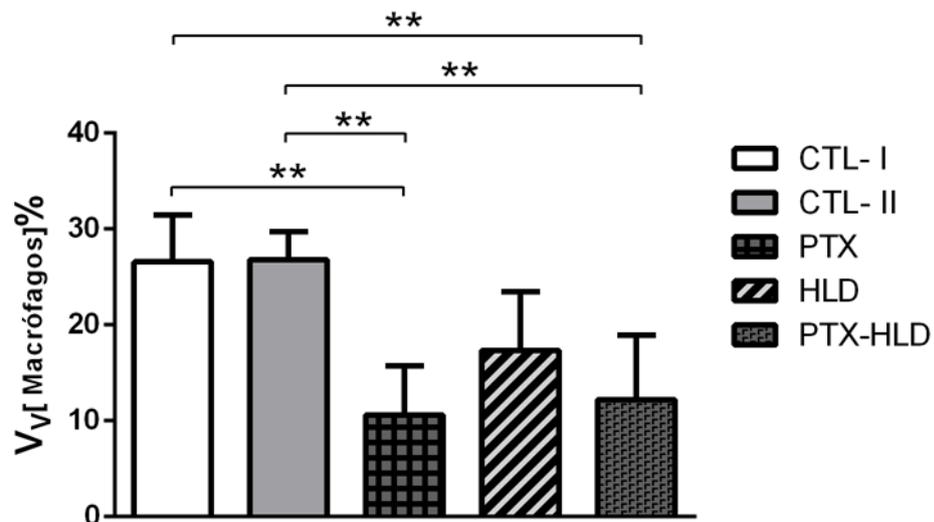
**Fonte:** Nsingi, 2016

### 3.4 Resultados imuno-histoquímicos

#### 3.4.1 Densidades volumétricas ( $V_V$ ) dos macrófagos

A análise estatística da densidade volumétrica dos macrófagos mostrou que os grupos PTX (M=10,59%; DP±5,13) e PTX-HLD (M=12,19%; DP=±6,72), apresentaram menor percentagem em relação aos grupos CTL-I (M=26,55%; DP=±4,90), CTL-II (M=26,79%; DP=±2,89) e HLD (M=17,32%; DP=±6,08). Houve diferença significativa ( $p < 0,0003$ ) na comparação dos grupos PTX e PTX-HLD com os grupos CTL-I e CTL-II. (Figuras 18 e 19)

**Figura 18-** Densidades volumétricas ( $V_V$ ) dos macrófagos



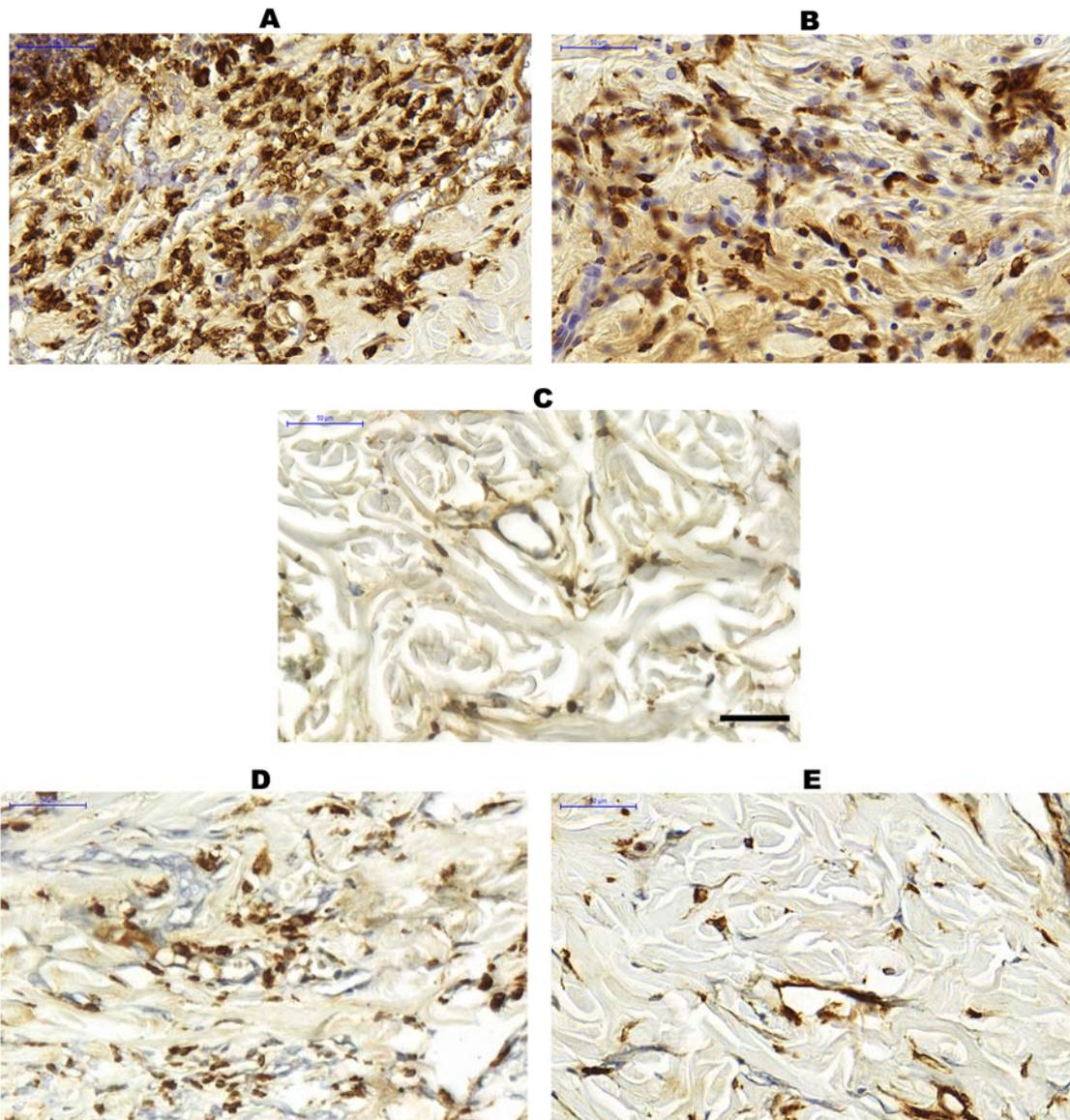
**Legenda:** Densidade volumétrica ( $V_V$ ) de macrófagos dos diferentes grupos, realizada com os testes One-way ANOVA e Tukey de múltiplas comparações em Graph Pad Prism 6.

**Nota:**

— Comparação entre as colunas abaixo das extremidades do segmento de reta.  
 \*\*  $P < 0,003$

Fonte: Nsingi, 2016

**Figura 19-** Imuno-histologia de macrófagos



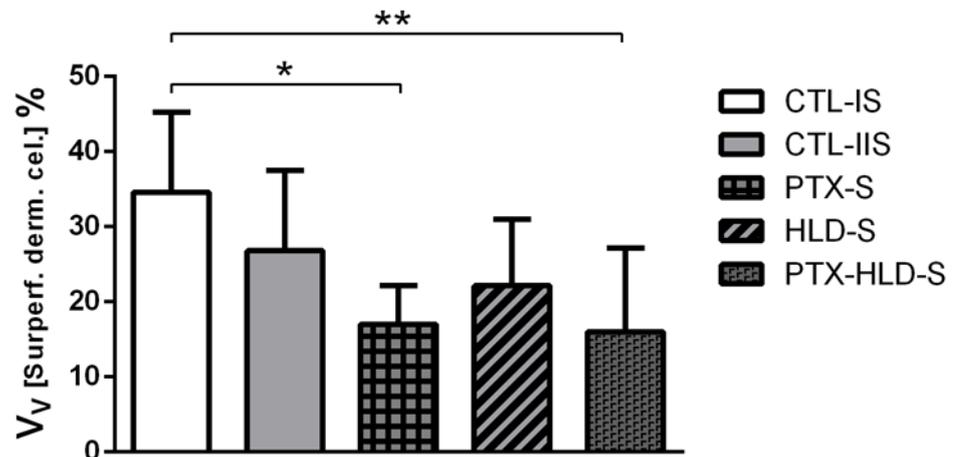
**Legenda:** Fotomicrografias de cortes marcados com anticorpo CD68 para identificação Imuno-histoquímica de macrófagos, Barra 50  $\mu\text{m}$ : A- Grupo Controle-I (CTL-I); B- Grupo Controle-II (CTL-II); C- Grupo Pentoxifilina (PTX); D- Grupo Hialuronidase (HLD); E- Grupo Pentoxifilina + Hialuronidase (PTX-HLD).

**Fonte:** Nsingi, 2016

### 3.4.2 Densidade volumétrica ( $V_V$ ) dos miofibroblastos

A densidade volumétrica de miofibroblastos foi menor nos grupos PTX ( $M = 2,86 \%$ ;  $DP = \pm 1,11$ ) e PTX - HLD ( $M = 2,44\%$ ;  $DP = \pm 0,61$ ) quando comparados com a dos grupos CTL I ( $M = 9,85\%$ ;  $DP = \pm 4,13$ ) e CTL II ( $M = 7,32 \%$ ;  $DP = \pm 2,10$ ) com diferença significativa. O grupo HLD ( $M = 4,29 \%$ ;  $DP = \pm 2,04$ ) apresentou  $V_V$  de miofibroblastos significativamente menor que o grupo CTL- I. (Figuras 20 e 21)

**Figura 20-** Densidade volumétrica de miofibroblastos



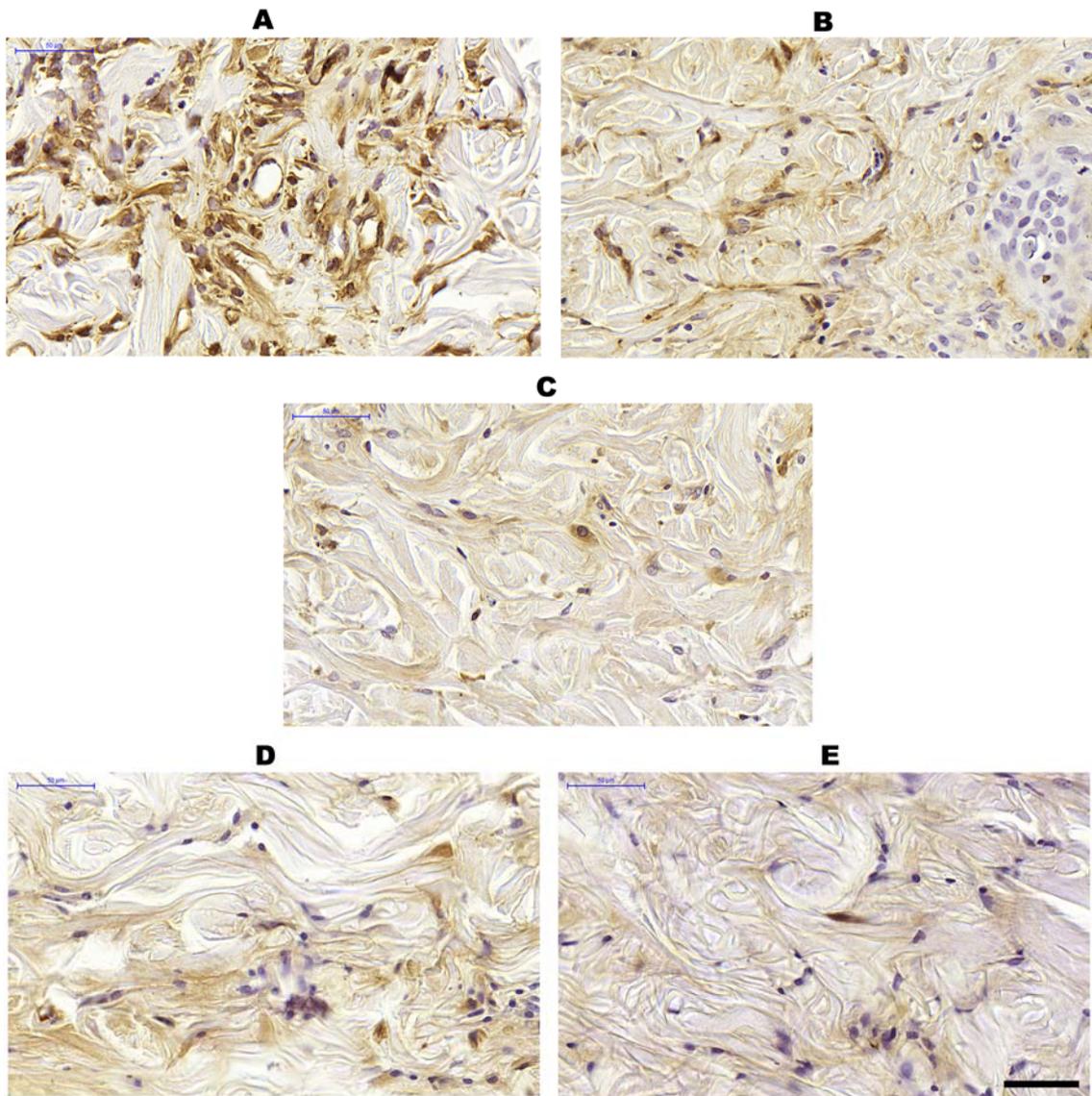
**Legenda:** Densidade volumétrica ( $V_V$ ) celular da derme superficial dos diferentes grupos realizada com os testes Kruskal-Wallis e Dunn de múltiplas comparações em GraphPad Prism 6.

**Nota:**

— Comparação entre as colunas abaixo das extremidades do segmento de reta.  
 \*\*  $P < 0,002$       \*  $P < 0,01$

**Fonte:** Nsingi, 2016

**Figura 21-** Imuno-histologia de miofibroblastos



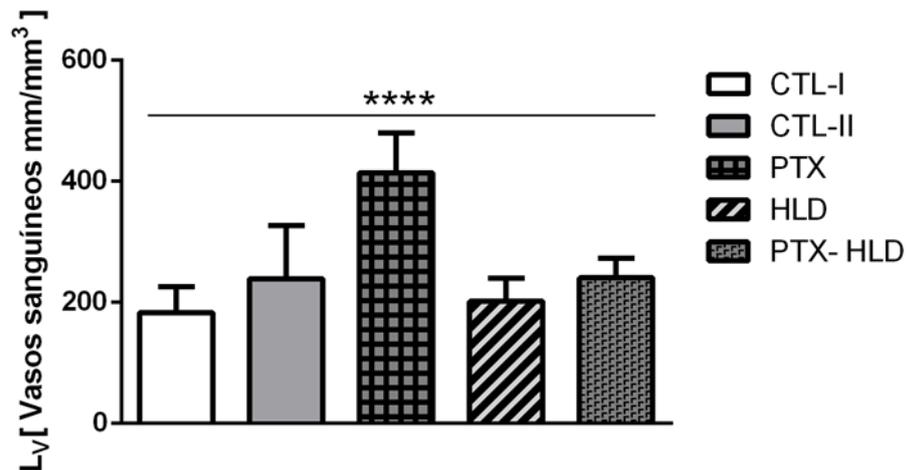
**Legenda:** Fotomicrografias de cortes marcados com anticorpos para  $\alpha$ -actina de musculo liso para à identificação Imuno-histoquímica de miofibroblastos, Barra 50  $\mu\text{m}$ : A - Grupo Controle - I (CTL-I); B - Grupo Controle - II (CTL-II); C - Grupo Pentoxifilina (PTX); D - Grupo Hialuronidase (HLD); E - Grupo - Pentoxifilina + Hialuronidase (PTX-HLD).

**Fonte:** Nsingi, 2016

### 3.4.3 Densidade de comprimento ( $L_V$ ) dos vasos sanguíneos

A densidade de comprimento dos vasos sanguíneos ( $L_V$ ) dos Grupos CTL-I (M= 182,5mm/mm<sup>3</sup>; DP= ± 43,34), CTL-II (M= 238,8mm/mm<sup>3</sup>; DP=± 88,06), HLD (M= 201,3 mm/mm<sup>3</sup>; DP=± 37,96) e PTX-HLD (M= 240,0 mm/mm<sup>3</sup>; DP=± 32,95) foi significativamente menor, quando comparados com a do grupo PTX (M= 413,8 mm/mm<sup>3</sup>; DP=± 65,89). (Figuras 22 e 23)

**Figura 22-** Densidade de comprimento ( $L_V$ ) dos vasos sanguíneos



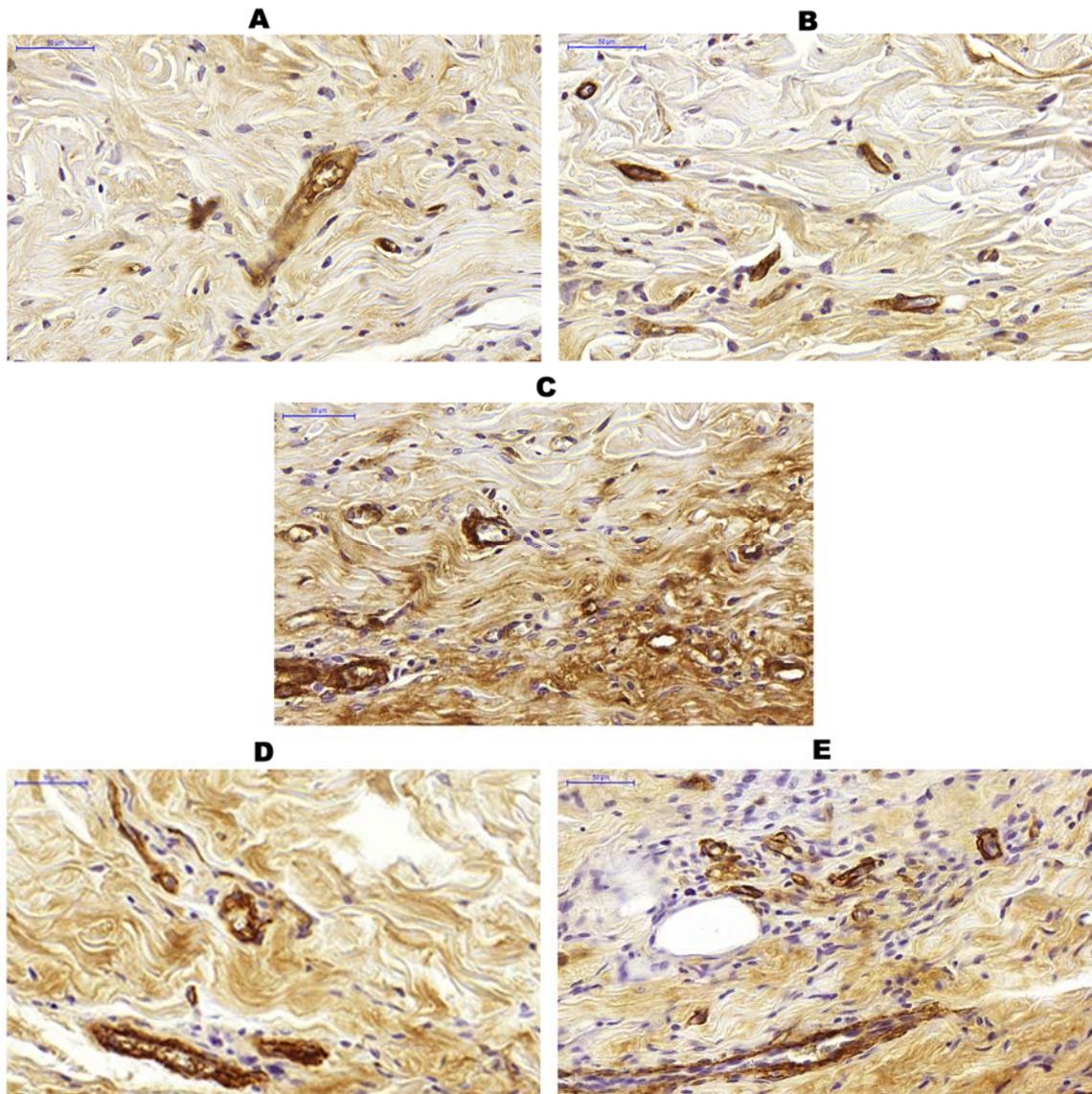
**Legenda:** Densidade de comprimento ( $L_V$ ) dos vasos sanguíneos de diferentes grupos, realizada com os testes One-way ANOVA Tukey de múltiplas comparações em GraphPad Prism 6.

**Nota:**

———— Comparação entre a coluna do meio com as demais abaixo da linha  
 \*\*\*\* P < 0,0001

Fonte: Nsingi, 2016

**Figura 23-** Imuno-histologia dos vasos sanguíneos



**Legenda:** Fotomicrografias de cortes marcados com anticorpos para  $\alpha$ -actina do musculo liso para à identificação Imuno-histoquímica de vasos sanguíneos, Barra 50  $\mu$ m: A- Grupo Controle-I (CTL-I); B- Grupo Controle-II (CTL-II); C- Grupo Pentoxifilina (PTX); D- Grupo Hialuronidase (HLD); E- Grupo Pentoxifilina + Hialuronidase (PTX-HLD).

**Fonte:** Nsingi, 2016

## 4 DISCUSSÃO

A necrose total ou parcial de retalhos cutâneos randomizados continua se constituindo em um dos grandes desafios em Cirurgia Plástica e vários estudos têm sido realizados visando à diminuição de sua ocorrência. Com esse intuito, o efeito de diversas substâncias tem sido pesquisado.

Neste estudo, foi avaliada a ação combinada da pentoxifilina (PTX) e da hialuronidase (HLD), comparado com a ação isolada de cada uma delas, sobre os retalhos cutâneos randomizados em ratos.

Para isso, foi usado o modelo de retalho cutâneo com base caudal (McFarlene modificado), adaptado por Adamson em 1967, a partir do modelo original idealizado por McFarlene em 1965, com base cefálica.<sup>(47)</sup> O retalho cutâneo pediculado de Mcfarlene e suas modificações é considerado modelo padrão, sendo utilizado com muita frequência em estudos experimentais que visam à busca de substâncias capazes de aumentar a viabilidade dos retalhos cutâneos.<sup>52-57</sup>

PTX é usada com muita frequência em Cirurgia Plástica, com o objetivo de prevenir a ocorrência de necrose. No entanto, ainda não existe padronização da dose nem do período (pré ou pós-operatório) em que essa droga deve ser administrada para se obter resultados satisfatórios. Nos estudos existentes na literatura foram utilizadas diferentes doses, com administração em períodos diferentes (pré-preoperatório, pós-operatório ou em ambos), os resultados variaram muito e não foi notada superioridade de um determinado esquema terapêutico (dose + período de administração) sobre os demais.<sup>1,27,58-60</sup>

Bayat *et al.* (2006), em um estudo em modelo de Mc Farlene em ratos, usando uma dose de 20mg/kg de peso corporal de PTX, por via IP duas vezes ao dia, iniciando 30 dias antes do procedimento cirúrgico e se estendendo até o sétimo dia do pós operatório, mostraram aumento da viabilidade do retalho, da proliferação de fibroblastos, da organização das fibras de colágeno e do tecido de granulação.<sup>1</sup>

Freedman *et al.* (1989) avaliaram o efeito de PTX sobre retalhos cutâneos randomizados (McFarlene), usaram a dose de 50mg/kg de peso corporal, por via IP, com início duas semanas anteriores ao procedimento cirúrgico, e após o período de sete dias de acompanhamento pós-operatório, os resultados não mostraram diminuição da área necrótica.<sup>58</sup>

Roth *et al.* (1988) estudaram o efeito de PTX sobre retalhos cutâneos randomizados em ratos, tendo administrado a droga em três períodos diferentes (pré-operatório, pós-operatório, pré e pós-operatório), havendo redução da área necrótica em todos os grupos tratados nos diferentes períodos.<sup>27</sup>

Hayden *et al.* (1993) utilizaram a dose de 10 mg/kg de peso corporal de PTX, por via IP, de 12/12 horas, administrados em quatro períodos diferentes (três em regimes pré-operatório e um no pós-operatório imediato), verificando aumento da viabilidade do retalho apenas no grupo em que a administração da droga foi feita a partir do pós-operatório imediato.<sup>59</sup>

Hodgson *et al.* (1987) em porcos domésticos, usaram a dose de 25 mg/kg/dia de PTX, durante sete dias do pós-operatório, mas os resultados não mostraram qualquer aumento da viabilidade do retalho no grupo tratado quando comparado com o controle.<sup>60</sup> Topalan *et al.* (1993) mostraram diminuição da área necrótica em ratos, usando a dose de 25 mg/kg de peso corporal por via IP, uma vez por dia, durante dez dias e com início no pós-operatório imediato.<sup>24</sup>

Neste estudo, PTX foi administrada na dose de 20 mg/kg de peso corporal, por via IP duas vezes ao dia, com início no pós-operatório imediato. A porcentagem da área necrótica foi aferida no 7.º e no 14.º do pós-operatório, e os resultados mostraram diminuição significativa da porcentagem da área necrótica nas duas aferições, corroborando com estudos prévios que apresentaram diminuição da área necrótica com o uso pós-operatório dessa substância.<sup>27,59</sup>

Nos casos em que PTX é administrada a partir do período pós-operatório, provavelmente os fatores que favorecem o aumento da viabilidade do retalho não estejam relacionados com a propriedade dessa droga de aumentar a flexibilidade dos eritrócitos, pois de acordo com alguns estudos, isso ocorreria apenas em caso de uso por longo prazo.<sup>1,30</sup>

Pressupondo-se que quando a administração de PTX é realizada após o procedimento cirúrgico, não haveria tempo suficiente para que a droga exercesse seu efeito sobre a membrana plasmática dos eritrócitos, de modo a aumentar sua flexibilidade, pois para que isso ocorra é necessário que o eritrócito esteja no início do seu ciclo de vida. Sabido que o ciclo de vida completo do eritrócito é de 120 dias, alguns autores na literatura defendem a ideia de que PTX é eficaz apenas quando seu uso antecede o procedimento cirúrgico.<sup>1,30</sup>

No entanto, sabe-se que PTX possui várias outras propriedades farmacológicas,<sup>21</sup> tais como efeito antiagregante plaquetário, efeito antioxidante e propriedade anti-inflamatória. Esta última é favorecida pela sua ação inibidora da síntese de citocinas pró-inflamatórias e de outros mediadores da inflamação, que possivelmente iniciam precocemente, o que pode explicar seu efeito benéfico quando administrada após o procedimento cirúrgico.<sup>26,29-33</sup>

HLD também é muito utilizada em Cirurgia Plástica, sobretudo para tratar complicações secundárias a procedimentos estéticos, como aquelas resultantes do preenchimento dérmico com ácido hialurônico.<sup>(39)</sup> Na literatura, os estudos experimentais em animais em que foi avaliado o efeito dessa droga sobre a viabilidade dos retalhos cutâneos randomizados, não existe uma dose padrão estabelecida para sua administração. Entretanto, em todos eles, foi administrada localmente no plano subdérmico, com início no pós-operatório imediato.<sup>38,61</sup>

Pimentel *et al.* (1999) em um modelo de retalhos cutâneos randomizados em coelhos, usando uma dose de 1 ml de HLD (200 UI/ml), intralesional, uma vez ao dia, com início no pós-operatório imediato, indo até ao sétimo dia do experimento, mostraram diminuição da área de necrose.<sup>61</sup>

Bogado *et al.* (2002) avaliaram o efeito de HLD sobre a viabilidade de retalhos cutâneos randomizados em ratos, usando as doses de 100 UI/dia e 50 UI/dia IL, com início no pós-operatório imediato, indo até ao sexto dia do pós-operatório. Esses autores verificaram a viabilidade dos retalhos no sétimo dia, com diminuição da área necrosada nos dois grupos tratados (grupo 100 UI e 50 UI), porém sem diferença entre eles.<sup>12</sup>

Neste estudo, foi utilizada a dose de 75 UI/dia de HLD, por via IL, com início no pós-operatório imediato, e a aferição da área de necrose foi realizada em dois períodos distintos (7.º e 14.º dias do pós-operatório), havendo redução da porcentagem da área de necrose nas duas aferições. Porém, ao se comparar os dados dos dois períodos, constatou-se que houve aumento considerável da porcentagem da área necrótica na última aferição, o que leva a inferir que o uso de HLD por longo prazo possa prejudicar a viabilidade dos retalhos cutâneos randomizados.

São desconhecidos os mecanismos de ação da HLD, porém sabe-se que ela atua sobre o ácido hialurônico, despolarizando-o temporariamente, diminuindo a viscosidade do interstício celular e facilitando a dispersão de substâncias pelos

tecidos. Essas ações favorecem a mobilização de edema e a drenagem venosa com isso o escoamento de metabólitos que poderiam ser tóxicos aos tecidos da porção mais distal, para a base do retalho com circulação normal e, dessa maneira, diminuem a possibilidade de ocorrência de necrose.<sup>61</sup>

A necrose é um tipo de lesão celular irreversível, passível de ser quantificada mediante a aferição da área necrótica ou o cálculo da porcentagem da área necrosada. Para tal, existem vários métodos descritos na literatura que permitem realizar essas operações.<sup>3,4,21,25, 62</sup>

Neste estudo, a porcentagem da área necrosada foi calculada com utilização papel celofane transparente. Este método é usado por muitos autores que avaliam o reparo tecidual<sup>63-65</sup> e tem-se mostrado bastante eficaz, pois permite a determinação precisa da linha de demarcação entre a área de necrose e o tecido viável, sob palpação e visualização direta.

A necrose em retalhos cutâneos randomizados resulta da isquemia e/ou da congestão venosa.<sup>3,4</sup> A isquemia propicia o início da resposta inflamatória, ao levar o acúmulo de infiltrado inflamatório no tecido lesado. Durante a resposta inflamatória, os leucócitos trazidos no local da lesão liberam citocinas pró-inflamatórias, tais como IL e TNF- $\alpha$ ,<sup>21</sup> bem como outros mediadores da inflamação. Isso pode prolongar o processo inflamatório e levar ao dano tecidual. Por outro lado, como tentativa de reparo tecidual, ocorre a proliferação de fibroblastos, miofibroblastos, vasos sanguíneos e deposição de fibras colágenas.<sup>66,67</sup>

A quantificação da distribuição dos fibroblastos, miofibroblastos, leucócitos e vasos e sanguíneos e da deposição de fibras colágenas no tecido lesado é uma prática utilizada com muita frequência para avaliar o processo de lesão e reparo tecidual, e para isso são utilizados vários métodos. Uma delas é a utilização de métodos estereológicos, ferramentas precisas que permitem a aquisição de informações de estruturas tridimensionais, baseadas principalmente em observações feitas em cortes bidimensionais.<sup>50</sup>

Neste estudo, usou-se a estereologia para determinar a  $V_v$  celular e a  $V_v$  de macrófagos. Os resultados mostraram que PTX usada isoladamente ou em combinação com HLD, diminuiu a  $V_v$  celular,  $V_v$  dos macrófagos e dos miofibroblastos. Estes resultados são corroborados com os achados de diversos autores que mostraram a propriedade que essa droga tem de inibir a proliferação celular (fibroblastos, fibrócitos, miofibroblastos, linfócitos, neutrófilos, monócitos e

macrófagos),<sup>68,69</sup> Esses achados parecem, em parte, estar relacionados com a propriedade anti-inflamatória dessa droga, proporcionada pela sua capacidade de reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias e de moléculas adesivas, bem como de outros mediadores da inflamação.<sup>70</sup>

Shirazi *et al.* (2014), em estudo sobre a comparação estereológica do efeito da PTX, captopril (CAP), sinvastatina (SIM) e tamoxifeno (TAM) sobre a estrutura renal e vesical após obstrução uretral parcial, em modelo experimental em ratos, mostraram que PTX reduziu o número de fibroblastos e fibrócitos, preservando a estrutura renal e vesical, consequentemente prevenindo a fibrose desses órgãos.<sup>68</sup>

Nakagawa *et al.* (2015) mostram a redução do infiltrado inflamatório pulmonar, ao atenuar a interação leucócito-endotelial com uso de PTX, em modelo experimental de choque hemorrágico e sepse em ratos.<sup>70</sup>

Garcia *et al.* (2015), em estudo sobre a inflamação em ratos diabéticos, mostraram que PTX reduziu o processo inflamatório, ao diminuir a produção das citocinas pró-inflamatórias.<sup>69</sup>

O uso isolado de HLD não diminuiu a  $V_v$  celular nem a  $V_v$  dos macrófagos, porém foi capaz de reduzir a  $V_v$  dos miofibroblastos. Um estudo desenvolvido por Fronza *et al.* (2014), em modelo experimental de cicatrização de ferida em ratos, mostrou que essa droga aumentou a celularidade no tecido lesado na fase inicial, ocorrendo a redução progressiva até igualar-se com o grupo controle na fase tardia.<sup>40</sup>

A quantificação dos vasos sanguíneos pode ser realizada utilizando-se o anticorpo contra  $\alpha$ -actina do músculo liso, que reage diretamente contra a  $\alpha$ -actina do músculo liso presente nos pericitos e nas células musculares lisas dos vasos sanguíneos.<sup>71,72</sup>

Amadeu *et al.* (2003) em estudo sobre a análise estereológica do padrão vascular na cicatriz hipertrófica e no queiloide, utilizaram o anticorpo contra  $\alpha$ -actina do músculo liso para quantificação dos vasos sanguíneos.<sup>71</sup> Em outro estudo, Ontranto *et al.* (2013) usaram a mesma ferramenta para quantificar os vasos sanguíneos.<sup>72</sup>

Neste estudo, foi usado o anticorpo mononuclear contra alfa-actina do músculo liso para ratos para quantificar o número de vasos sanguíneos, presentes no tecido isquemiado. Este anticorpo atua diretamente sobre a alfa-actina do músculo liso presente nas células musculares lisas dos vasos sanguíneos e nos

miofibroblastos. A utilização desse anticorpo, como método para quantificar os vasos sanguíneos em tecidos isquemiados, tem-se mostrado bastante eficaz, apesar de apresentar algumas limitações, como por exemplo, a sua incapacidade de marcar pequenos vasos sanguíneos, desprovidos de alfa-actina.<sup>71,72</sup>

Os resultados obtidos mostraram que somente o uso isolado de PTX foi capaz de aumentar  $L_v$  dos vasos sanguíneos, corroborando com estudos prévios.<sup>30,68</sup>

Lucca *et al.* (2014) mostraram o aumento do número de vasos sanguíneos, no retalho miocutâneo transversal do reto abdominal em modelo experimental em ratos tratados com pentoxifilina.<sup>30</sup> Shirazi *et al.* (2014), em estudo sobre a comparação estereológica do efeito de PTX, CAP, SIM e TAM sobre a estrutura renal e vesical após obstrução uretral parcial em ratos, mostraram que PTX preservou significativamente a  $L_v$  dos vasos sanguíneos.<sup>68</sup>

Esperava-se neste estudo a obtenção de maior ganho na viabilidade dos retalhos tratados com o uso combinado das duas drogas, haja vista que, teoricamente, a combinação do efeito dessas drogas reduziria a ação lesiva da isquemia e/ou da congestão venosa, fundamentado no fato de PTX possuir, dentre seus vários efeitos, a capacidade de diminuir a síntese de citocinas pró-inflamatórias e de moléculas adesivas (atenuar a ação lesiva das células inflamatórias sobre o tecido privado de suprimento sanguíneo)<sup>26,31,33</sup>, a ação anti-agregante plaquetária (favorece a diminuição da viscosidade sanguínea, facilitando o fluxo sanguíneo pelos vasos periféricos)<sup>22,25</sup>. Por outro lado, HLD promove a mobilização de edema e a drenagem venosa, facilitando o escoamento de metabólitos, que poderiam ter efeito nocivo ao retalho.<sup>40,41</sup> No entanto, existem outros fatores poucos compreendidos que interferem na sobrevida dos retalhos.

Como mencionado anteriormente, PTX e HLD são substâncias que possuem capacidade de atuar sobre as propriedades reológicas dos fluidos orgânicos, por isso são utilizados para prevenir a necrose de tecidos. Também apresentam outras propriedades que os capacitam preservar a viabilidade dos tecidos, quando esses são submetidos a condições adversas, porém os mecanismos pelos quais elas exercem esse efeito ainda são pouco compreendidos.

Existem na literatura estudos que mostraram a capacidade dessas substâncias de modular a resposta inflamatória, ao regularem a expressão de mediadores da inflamação e de moléculas de adesão endotelial.<sup>32,34,40,70,73</sup>

Mohammadpour *et al.* (2014), em estudo clínico em 40 pacientes com doença arterial coronariana, avaliaram o efeito da PTX sobre os níveis séricos de moléculas adesivas capazes de influenciar a resposta inflamatória, designadamente: molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1), molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1), proteína quimiotática de monócito-1 (MCP-1) e IL-18. Os resultados mostraram que o uso de PTX por um período de um mês reduziu os níveis séricos da ICAM-1 e da VCAM-1.<sup>73</sup>

Marques *et al.* (2014), em modelo experimental de isquemia/reperfusão intestinal em ratos, mostraram que o uso combinado da pentoxifilina e da solução salina hipertônica diminuiu a expressão da ciclo-oxigenase-2 (COX-2), que é uma enzima que exerce papel importante no processo de inflamação.<sup>74</sup>

Fronza *et al.* (2014), em modelo experimental de cicatrização de ferida em ratos, mostraram que HLD alterou a liberação das citocinas pró e anti-inflamatórias em função do tempo, tendo aumentado a produção da IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IL-4 e IL-10 no segundo dia do experimento.<sup>40</sup> No sétimo dia, houve diminuição de todas as citocinas, e no décimo quarto e vigésimo primeiro dias, as citocinas atingiram níveis normais.<sup>40</sup>

A avaliação bioquímica dos mediadores da inflamação e de outras substâncias envolvidas no processo de reparo tecidual, quando correlacionada com as análises morfométricos, pode ajudar em grande medida na compreensão dos mecanismos que permitem diversas substâncias a prevenção da ocorrência de necrose em retalhos cutâneos randomizados.

Para melhor compreensão do mecanismo de ação dessas duas drogas e de outras utilizadas com a finalidade de aumentar a viabilidade dos retalhos, é recomendável a realização de novos estudos que levem em consideração a análise bioquímica de substâncias pró e anti-inflamatórias, e de outros mediadores envolvidos no processo de reparo tecidual.

## CONCLUSÃO

Neste modelo experimental, o uso isolado ou combinado de PTX e HLD aumentou significativamente a viabilidade dos retalhos cutâneos randomizados, quando comparados aos dois grupos controles. No entanto, não houve diferença significativa entre os três grupos tratados.

O uso isolado da PTX apresentou maior  $L_v$  dos vasos sanguíneos e menor celularidade na derme profunda que quando utilizada em combinação com a HLD. Por outro lado, a utilização combinada dessas drogas mostrou-se mais eficiente em reduzir a celularidade da derme superficial e a  $V_v$  dos macrófagos que o uso isolado da HLD.

## REFERÊNCIAS

1. Bayat M, Chelcheraghi F, Piryaei A, Rakhshan M, Mohseniefar Z, Rezaie F, et al. The effect of 30-day pretreatment with pentoxifylline on the survival of a random skin flap in the rat: An ultrastructural and biomechanical evaluation. *Med Sci Monit.* 2006;12:201-7.
2. Brito NM, Dias CS, Picanço JM, Dias FS, Silveira EL, Carvalho RA. Efeito da pentoxifilina na viabilidade de retalhos. *Rev Med (PUC-RS).* 2001;11:338-42.
3. Krammer CW, Ibrahim RM, Hansen TG, Sorensen J. The effect of epinephrine and dobutamine on skin flap viability in rats: a randomized double blind placebo-controlled study. *Plast Reconstr Surg.* 2015;68:113-9.
4. Mota DS, Furtado E, Bottino DA, Bouskela E. Effect of bufedil and pentoxifylline on hamster skin flap microcirculation: prediction of flap viability using orthogonal polarization spectral image. *Clinics (SP).* 2009;64:797-802.
5. Figueiredo JC, Zampar AG, Arias VE, Morro R, Pinheiro AS, Melega JM. Influência do buflomedil e do sildenafil na sobrevivência de retalhos randomizados em ratos. *Rev Bras Cir Plast.* 2011;26:390-3.
6. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Cell Injury, Cell Death, and Adaptations. In: Kumar V, Abbas AK, Aster JC, editors. *Robbins, basic pathology.* Philadelphia: Saunders Elsevier Inc.; 2013. p. 1-28.
7. Bezabeh M, Tesfaye A, Ergicho B, Erke M, Mengistu S, Bedane A, et al. Cellular Reactions to Injury In: Bezabeh M, Tesfaye A, Ergicho B, Erke M, Mengistu S, Bedane A, et al., editors. *General Pathology.* Addis Abeba: USAID; 2004. p. 14-23.
8. Krysko DV, Berghe TV, D'Herde K, Vandenabeele P. Apoptosis and necrosis: Detection, discrimination and phagocytosis. *Methods.* 2008;44:205-21.
9. Proskuryakov SY, Konoplyannikov AG, Gabai VL. Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Exp Cell Res.* 2003; 283: 1-16.
10. Kanduc D, Mittelman A, Serpico R, Sinigaglia E, Sinha AA, Natale C, et al. Cell death: Apoptosis versus necrosis (Review). *Int J Oncol.* 2002;21:165-70.
11. Golstein P, Kroemer G. Cell death by necrosis towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci.* 2006; 32:37-43.
12. Bogado CE, Ely JB, Acampora AJ, Neves RE. Efeito da hialuronidase na sobrevida de retalhos cutâneos em ratos. *Act Cir Bras.* 2002;17:14-6.
13. Hammond DC, Brookshe RD, Mann RJ, Beernink JH. The dorsal skin flap in the rat: factors influencing survival. *Plast Reconstr Surg.* 1993;91:316-21.
14. Barral SM, Araújo ID, Vidigal PV, Mayrink CA, Carvalho FG, Matias GN, et al. Efeitos do sildenafil pela via intraperitoneal na viabilidade de retalhos cutâneos de ratos. *Rev Med (MG).* 2012;22:139-45.

15. Estevão LR, Medeiros JP, Evêncio LB, Simões RS, Mendonça FS, Neto JE. Effects of the topical administration of copaiba oil ointment (*Copaifera langsdorffii*) in skin flaps viability of rats. *Act Cir Bras.* 2013;28:863-9.
16. Erdemir F, Firat F, Markoc F, Atilgan D, Parlaktas BS, Kuyucu YE, et al. The effect of pentoxifylline on penile cavernosal tissues in ischemic priapism-induced rat model. *Int Urol Nephrol.* 2014;46:1961-7.
17. Cai L, Cao B, Lin D. Effects of Traditional Chinese Medicine Huangqi Injection (*Radix astragali*) on Random Skin Flap Survival in Rats. *J Reconstr Microsurg.* 2015.
18. Kaya B, Çerkez C, Işılğan SE, Göktürk H, Yiğman Z, Serel S, et al. Comparison of the effects of systemic sildenafil, tadalafil, and vardenafil treatments on skin flap survival in rats. *J Plast Surg Hand Surg.* 2015 24:1-5.
19. Can A, Temel M, Dokuyucu R, Mutaf M. The Effect of Coenzyme Q10 (Ubiquinone) on Random Pattern Skin Flap Survival in Rat Model. *Ann Plast Surg* 2015; 7.
20. Ozturk A, Firat C, Parlakpınar H, Bay-Karabulut A, Kirimlioglu H, Gurlek A. Beneficial Effects of Aminoguanidine on Skin Flap Survival in Diabetic Rats. *Exp Diabetes Res.* 2012;2012:1-8.
21. Chung KI, Kim HK, Kim WS, Bae TH. The Effects of Polydeoxyribonucleotide on the Survival of Random Pattern Skin Flaps in Rats. *Arch Plast Surg.* 2013;40:181-6.
22. 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;100:66-71.
23. Mischeski DA, Nakamoto HA, Júnior PT, Nobrega L, Ferreira MC. Effect of allopurinol and pentoxifylline in improving viability of avulsed flap. *Ann Plast Surg* 2013;70:366-9.
24. Topalan M, Arinci A, Erer M, Guvenc H. The effect of parenteral pentoxifylline therapy on skin flap survival. *Eur J plast Surg.* 1993;16:33- 5.
25. Isken T, Serdaroglu I, Ozgentas E. The effects of the pentoxifylline on survival of the skin flaps in streptozotocin-diabetic rats. *Ann Plast Surg.* 2009;62:446-50.
26. Hashemi M. The Study of Pentoxifylline Drug Effects on Renal Apoptosis and BCL-2 Gene Expression Changes Following Ischemic Reperfusion Injury in Rat. *Iran J Pharm Res.* 2014;13:181-9.
27. Roth AG, Briggs PC, Jones EW, Heckler F. Augmentation of skin flap survival by parenteral pentoxifylline. *Brit J Plast Surg.* 1988;41:515-20.
28. Yessenow RS, Maves MD. The effect of pentoxifylline on random skin flap survival. . *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1989;115:179-81.
29. Aziret M, Irkorucu O, Reyhan E, Erdem H, Das K, Ozkara S, et al. The effects of vardenafil and pentoxifylline administration in an animal model of ischemic colitis. *Clinics (SP).* 2014;69:763-9.
30. Lucca AF, Brasolin AG, Feitosa RG, Enokihara MM, Gomes HF, Ferreira LM. Histological modification in TRAM flap in rats treated with pentoxifylline. *Act Cir Bras.* 2014;29:34-7.

31. Hassan I, Dorjay K, Anwar P. Pentoxifylline and its applications in dermatology. *Indian Dermagol online J.* 2014;5:510-6.
32. Goel PN, Gude RP. Pentoxifylline regulates the cellular adhesion and its allied receptors to extracellular matrix components in breast cancer cells. *Biomed Pharmacother.* 2014;68:93-9.
33. Garcia FA, Pinto SF, Cavalcante AF, Lucetti LT, Menezes SM, Felipe CF, et al. Pentoxifylline decreases glycemia levels and TNF-alpha, iNOS and COX-2 expressions in diabetic rat pancreas. *Springerplus.* 2014;3:283.
34. Mostafa TM, Ibrahim OM, Badra GA, Abdallah MS. Role of pentoxifylline and sparfloxacin in prophylaxis of spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotic patients. *ISRN Gastroenterol.* 2014;2014:1-9.
35. Rewale V, Prabhakar KR, Chitale AM. Pentoxifylline: a new armamentarium in diabetic foot ulcers. *J Clin Diagn Res.* 2014;8:84-6.
36. Di Cerbo A, Aponte M, Esposito R, Bondi M, Palmieri B. Comparison of the effects of hyaluronidase and hyaluronic acid on probiotics growth. *MBC Microbiol.* 2013;13:2-6.
37. Hilton S, Schrupf H, Buhren BA, Bolke E, Gerber PA. Hyaluronidase injection for the treatment of eyelid edema: a retrospective analysis of 20 patients. *Eur J Med Res.* 2014;19:2-5.
38. Grossman JA, McGonagle BA, Dowden RV, Dinner MI. The effect of hyaluronidase and dimethyl sulfoxide on experimental skin flap survival. *Ann Plast Surg.* 1983;11:223-6.
39. Bailey SH, Fagien S, Rohrich RJ. Changing role of hyaluronidase in plastic surgery. *Plast Reconstr Surg.* 2014;133:127-32.
40. Fronza M, Caetano GF, Leite MN, Bentecourt CS, Silva FW, Anrade TA, et al. Hyaluronidase Modulates Inflammatory Response and Accelerates the Cutaneous Wound Healing. *PLoS one.* 2014;9:1-12.
41. Zimmet SE. The prevention of cutaneous necrosis following extravasation of hypertonic and tetradecyl sulphate. *J Dermatol Surg Oncol.* 1993;19:641-6.
42. Yan MY, Fan QL, Li AQ, Chen JL, Dong BF, Going M. Treatment of Cutaneous Injuries of Neonates Induced by Drug Extravasation with Hyaluronidase and Hirudoid. *Iran J Pediatr.* 2014;24:352-8.
43. Marques RG, Morales MM, Petroianu A. Brazilian law for scientific use of animals. *Act Cir Bras.* 2009;24:69-74.
44. Filipecki ATP, Machado CJS, Valle S, Teixeira MO. The Brazilian Legal Framework on the Scientific Use of Animals. *ILAR J.* 2011;52:8-15.
45. Ramalli Jr EL, Ho W, Alves M, Rocha EM. Progress in animal experimentation ethics: a case study from a Brazilian medical school and from the international medical literature. *Act Cir Bras.* 2012 27:659-63.
46. Dunn RM, Mancoll J. Flap models in the rat: a review and reappraisal. *Plast Reconstr Surg.* 1992;90:319-19.

47. Kelly CP, Gupta A, Koskin M, Jackson IT. A new design of a dorsal flap in the rat to study necrosis and its prevention. *Plast Reconstr Surg.* 2010;63:1553-6.
48. Syed SA, Tasaki Y, Fuji T, Hiano A, Kosbayashi K. A new experimental model: the vascular pedicle flap over the dorsal aspect (flank and hip) of the rat. *Brit J Plast Surg.* 1992;45:23-5.
49. White B, Seaton RA. Complicated skin and soft tissue infections: literature review of evidence and experience with daptomycin. *Infect Drug resist.* 2011;4:115-27.
50. Lacerda CAM. Fisiologia e fisiopatologia: Estereologia do rim: determinação do Vv, Nv e volume médio do glomérulo. *J Bras Nefrol.* 2000;22:103-9.
51. Lacerda CAM. Stereological tools in biomedical research. *An Acad Bras Cienc.* 2003;75: 469-86.
52. Cao B, Wang L, Lin D, Cai L, Gao W. Effects of lidocaine on random skin flap survival in rats. *Dermatol Surg.* 2015;41:53-8.
53. Cai L, Huang W, Lin D. Effects of traditional Chinese medicine Shuxuetong injection on random skin flap survival in rats. *Scientific World Journal.* 2014;2014.
54. Baykan H, Ozyazgan I, Selçuk CT, Altıparmak M, Özköse M, Özyurt K. Effect of sildenafil citrate in nicotine-induced ischemia: An experimental study using a rat model. *Can J Plast Surg.* 2013;21:217-20.
55. Ozyazgan I, Doğan H. The effect of tens on random pattern flap survival in nicotine rats. *Ann Plast Surg.* 2015;74:365-70.
56. Oksuz M, Yuce S, Kocak OF, Canbaz Y, Ragbetli MC, Mercantepe T. Effects of ozone pretreatment on viability of random pattern skin flaps in rats. *J Plast Surg Hand Surg.* 2015;21:1-6.
57. Bin C, Dingsheng L, Leyi C, Bin L, Yuting L, Liren W, et al. Beneficial effects of Xuebijing injection on random skin flap survival in rats. *J Surg Res.* 2015;196:421-6.
58. Freedman AM, Hyde GL, Luce EA. Failure of pentoxifylline to enhance skin flap survival in the rat. *Ann Plast Surg.* 1989; 23:31-4
59. Hayden RE, Snyder BJ. Pharmacologic manipulation of random skin flaps with pentoxifylline. *Laryngoscope.* 1993;103:185-8.
60. Hodgson RS, Brummet RE, Cook TA. Effect of Pentoxifylline on experimental skin flap survival. *Arch Oto laryngol Head Neck Surg.* 1987;113:950-52.
61. Pimentel LASG, R.C.S. . Injeção local de hialuronidase para aumento da sobrevivência de retalhos cutâneos. Estudo experimental. *Rev Bras Cir Plast.* 1999;140:49-58.
62. Freitas FAS, Piccinato CE, Cherri J, Marchesan WG. Efecte of Pentoxifylline and Heparin on reperfusion Injury Island Skin Flap in Rats Exposed to Tobacco. *J Surg Res.* 2010;164:139-45.
63. Romana-Souza B, Assis de Brito TL, Pereira GR, Monte-Alto-Costa A. Gonadal hormones differently modulate cutaneous wound healing of chronically stressed mice. *Brain Behav Immun.* 2014;36:101-10.

64. Donato-Trancoso A, Gonçalves L, Costa AMA, Silva FA, Romana-Souza B. Seed oil of *joannesia princeps* improves cutaneous wound healing in experimental mice. *Acta Histochem.* 2014;116:1167-77.
65. Amadeu TP, Costa A. Nitric oxide synthesis inhibition alters rat cutaneous wound healing. *J Cutan Pathol.* 2006;33: 465–73.
66. Masoumpour MB, Nowroozzadeh MH, Razeghinejad MR. Current and Future Techniques in Wound Healing Modulation after Glaucoma Filtering Surgeries. *Open Ophthalmol J.* 2016; 10:68–85.
67. Martino MM, Maruyama K, Kuhn GA, Satoh T, Takeuchi O, Muller R, et al. Inhibition of IL-1R1/MyD88 signalling promotes mesenchymal stem cell-driven tissue regeneration. *Nat Commun.* 2015;7: 11051.
68. Shirazi M, Soltani MR, Jahanabadi Z, Abdollahifar MA, Tanideh N, Noorafshan A. Stereological Comparison of the Effects of Pentoxifylline, Captopril, Simvastatin, and Tamoxifen on Kidney and Bladder Structure After Partial Urethral Obstruction in Rats. *Korean J Urol.* 2014;55:756-63.
69. Garcia FA, Rebouças JF, Balbino TQ, da Silva TG, de Carvalho-Júnior CH, Cerqueira GS, et al. Pentoxifylline reduces the inflammatory process in diabetic rats relationship with decreases of pro-inflammatory cytokines and inducible nitric oxide synthase. *J Inflamm (Lond).* 2015 12:33:1-10.
70. Nakagawa NK, Cruz RJ, Aikawa P, Correia CJ, Cruz JW, Mauad T, et al. Pentoxifylline attenuates leukocyte-endothelial interactions in a two-hit model of shock and sepsis. *J Surg Res.* 2015;193:421-8.
71. Amadeu T, Braune A, Lacerda CM, Porto LC, Desmoulière A, Costa AMA. Vascularization Pattern in Hypertrophic Scars and Keloids: A Stereological Analysis. *Pathol Res Pract.* 2003; 199( ): 469-73.
72. Otranto M, Nascimento AP, Costa AMA. Insulin resistance impairs cutaneous wound healing in mice. *Wound Repair Regen.* 2013 21:464–72.
73. Mohammadpour AH, Falsoleiman H, Shamsara J, Allah Abadi G, Rasooli R, Ramezani M. Pentoxifylline decreases serum level of adhesion molecules in atherosclerosis patients. *Iran Biomed J.* 2014;18:23-7.
74. Marques GM, Rasslan R, Belon AR, Carvalho JG, Felice Neto R, Rasslan S, et al. Pentoxifylline associated to hypertonic saline solution attenuates inflammatory process and apoptosis after intestinal ischemia/reperfusion in rats. *Act Cir Bras.* 2014;29:735-41.