

EFEITO DE SUBSTÂNCIAS ANTIOXIDANTES (VITAMINA C, VITAMINA E E GINGKO BILOBA) NA VIABILIDADE DE RETALHO CUTÂNEO DORSAL EM RATOS

*Effect of antioxidants (vitamin C, vitamin E and Gingko biloba) on the viability of dorsal skin flaps in rats*DANIELE PACE¹, ANTÔNIO CARLOS CAMPOS², RUTH GRAF³

RESUMO

O uso de substâncias antioxidantes tem sido relacionado a menor formação de radicais livres e menor dano tecidual em situações de hipóxia. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de substâncias antioxidantes (vitamina C, vitamina E e Gingko biloba), intraperitonealmente, na viabilidade de retalho cutâneo dorsal em ratos. Foram utilizados 24 ratos da linhagem Wistar, distribuídos em 4 grupos de 6 ratos cada, correspondentes aos grupos controle, Vitamina C, Vitamina E e Gingko biloba. O retalho cutâneo foi desenhado no dorso de cada rato, medindo 10 x 3 cm, com pedículo caudal. No grupo controle, foi aplicado 1 ml de solução fisiológica 0,9% após 24 horas da confecção do retalho, intraperitonealmente, por 6 dias consecutivos. No grupo Vitamina C, foi aplicada vitamina C na dose 340 mg/kg de 12/12 horas, no grupo Vitamina E, foi aplicada vitamina E na dose 20 mg/kg 1x/dia e, no grupo Gingko biloba, foi aplicado Gingko biloba na dose de 100 mg/kg 1x/dia, por 6 dias consecutivos. No 14º dia de experimento, foi realizada planimetria digital, na qual foram avaliadas a área total, área viável e área de necrose dos retalhos. A avaliação histológica foi realizada mediante biópsia da área viável para quantificar a neovascularização do retalho. No dia 14, a planimetria digital revelou que a viabilidade do retalho no grupo controle foi $65,93 \pm 1,49\%$, no grupo Vitamina C, $78,05 \pm 5,38\%$ ($p = 0,0039$), no grupo Vitamina E, $75,08 \pm 7,54\%$ ($p = 0,0161$) e, no grupo Gingko biloba, foi $72,16 \pm 5,40\%$ ($p = 0,0245$). Histologicamente, os retalhos apresentaram aumento do número de vasos em todos os grupos, sendo que no grupo controle foi $17,33 \pm 3,88$, no grupo Vitamina C, $37,33 \pm 4,08$, no grupo Vitamina E, $27,17 \pm 3,25$ e, no grupo Gingko biloba, $37,17 \pm 9,38$. Conclui-se que a viabilidade do retalho cutâneo dorsal em ratos é maior nos grupos que receberam substâncias antioxidantes e a neovascularização do retalho está aumentada em todos os grupos, porém mais pronunciada nos grupos que receberam as substâncias antioxidantes.

Descritores: Retalhos cirúrgicos. Antioxidantes. Ácido ascórbico. Vitamina E. Gingko biloba. Ratos Wistar.

SUMMARY

The use of antioxidants has been related with less free radicals formation and less tissular injury in hypoxia conditions. The goals of this study were to evaluate the effects of antioxidants (vitamin C, vitamin E and Gingko biloba), intraperitoneally, on the viability of dorsal skin flap in rats. Twenty-four Wistar rats were studied and divided into 4 groups of 6 animals each, according to the given antioxidants Vitamin C, Vitamin E and Gingko biloba, and a control group given normal saline. A 10 x 3cm cutaneous flap, was drawn over the dorsal portion of each animal, with caudal base. After 24 hours of the procedure, the control group received 1 ml of normal saline, the Vitamin C group received vitamin C 340 mg/kg 12/12 hours, the Vitamin E group received vitamin E 20 mg/kg/day and the Gingko biloba group received 100 mg/kg/day, intraperitoneally, for 6 days. On day 14, digital planimetry was performed to determine the total area, living and necrosis area of the flaps. Histological studies were performed through by biopsy of the living area, counting the neovascularity of the flap. On day 14, the viability of the flap in the control group was $65.93 \pm 1.49\%$, Vitamin C group was $78.05 \pm 5.38\%$ ($p = 0.0039$), Vitamin E group was $75.08 \pm 7.54\%$ ($p = 0.0161$) and the Gingko biloba group was $72.16 \pm 5.40\%$ ($p = 0.0245$). Histologically, the flaps showed a great number of vessels in all groups. The number of vessels in the flap of the control group was 17.33 ± 3.88 , Vitamin C group was 37.33 ± 4.08 , the Vitamin E group was 27.17 ± 3.25 and the Gingko biloba group was 37.17 ± 9.38 . It is concluded that the viability of the dorsal skin flaps and the neovascularity of the flaps in rats is improved by the use of antioxidants in all groups of rats.

Descriptors: Surgical flaps. Antioxidants. Ascorbic acid. Vitamin E. Gingko biloba. Rats, Wistar.

1. Mestre em Cirurgia pela Universidade Federal do Paraná (UFPR), Membro Aspirante da SBCP.
2. Cirurgião do Aparelho Digestivo, Coordenador do programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da UFPR.
3. Doutora em Cirurgia pela UFPR, Professora da Disciplina de Cirurgia Plástica da UFPR, Membro Titular da Sociedade Brasileira de Cirurgia Plástica (SBCP), Visiting Professor da ISAPS.

Correspondência para: Daniele Pace
Rua Solimões, 1175 - Mercês - Curitiba, PR - CEP: 80810-070
Tel.: 0xx41 3021-7700 Fax: 0xx41 3121-7701 - E-mail: danielepace@hotmail.com

INTRODUÇÃO

Retalhos cutâneos são muito utilizados em cirurgia plástica, tanto reconstrutora como estética. Uma das grandes preocupações pós-operatórias é a viabilidade destes retalhos, a qual depende de vários fatores, entre os quais o tamanho e a irrigação sanguínea do retalho. Várias substâncias já foram testadas com o objetivo de diminuir a área de necrose dos retalhos de pele, de maneira a favorecer o resultado cirúrgico, como substâncias vasodilatadoras, anestésicos, analgésicos, enzimas, substâncias antioxidantes, dentre outros. O radical livre é resultante do metabolismo normal da célula, é uma molécula com um ou mais elétrons sem par em sua órbita. Eles tendem a reagir com outras moléculas na tentativa de emparelhar seus elétrons. Este processo resulta em lesões para muitas células, que até então não apresentavam nenhuma alteração, por danificar o DNA e as proteínas. Os radicais livres têm papel importante na reperfusão do tecido isquêmico, pois são produzidos em excesso em áreas isquêmicas. A necrose de um retalho pode ocorrer por infecção, deiscência ou hematoma, mas a demora na reperfusão do tecido é o principal componente de injúria, porque gera os radicais livres¹⁻³. As substâncias antioxidantes são defesas naturais contra os radicais livres e várias são descritas como vitaminas, coenzima Q-10, ácido lipóico, ervas e muitas outras que possuem a capacidade de diminuir o nível de estresse oxidativo. A capacidade antioxidante da vitamina C, também conhecida como ácido ascórbico, baseia-se na sua ação de captar e liberar o íon hidrogênio, promovendo a diminuição da formação de radicais livres⁴. A vitamina E, conhecida também como alfa-tocoferol, possui mecanismo de proteção da membrana plasmática celular contra a peroxidação lipídica causada pelos radicais livres formados durante a reperfusão tecidual de retalho cutâneo isquêmico^{4,5}. O Gingko biloba é um extrato das folhas verdes da árvore de Gingko e sua principal ação é no sistema circulatório, onde promove a dilatação dos capilares e melhor oxigenação dos tecidos. Previne a agregação plaquetária e a formação de placas ateroscleróticas nas paredes arteriais por meio da inibição do fator de ativação plaquetária⁶. Este estudo tem por objetivo analisar a ação de substâncias antioxidantes (vitamina C, vitamina E e Gingko biloba), por via intraperitoneal, na viabilidade de retalho cutâneo dorsal em ratos, mediante os seguintes parâmetros: macroscopia - área de viabilidade do retalho e, microscopia - neovascularização do retalho.

MÉTODO

Este estudo foi realizado no Laboratório de Fisiologia da Universidade Tuiuti do Paraná e aprovado pela Comissão de Ética em pesquisa em consoante à Declaração de Helsinki. Foram seguidas as Normas para Apresentação de Documentos Científicos da Universidade Federal do Paraná, UFPR (2000); foi utilizada

a Nômina Anatômica Veterinária (1983) e foram obedecidos os princípios éticos em experimentação animal, preconizados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, COBEA. Foram utilizados 24 ratos (*Ratus Norvegicus albinus*), da linhagem Wistar, machos, adultos, com peso entre 200-500g, saudáveis. Os animais foram divididos em quatro grupos de seis ratos cada, definidos como grupo controle, grupo Vitamina C, grupo Vitamina E e grupo Gingko biloba. Utilizou-se anestesia tipo inalatória com éter etílico a 97%, com ventilação espontânea. Após a anestesia, foi demarcado e realizado retalho cutâneo no dorso de cada animal, com pedicelo de base caudal de 3 cm de largura por 10 cm de comprimento, medido com régua graduada em cm, e elevado da musculatura dorsal, constituído por pele e tela subcutânea, utilizando-se como plano de dissecação a fáscia aponeurótica⁷. Tomou-se o cuidado de não lesar o pedicelo do retalho, onde se encontravam os vasos sacrais (Figura 1). O retalho foi imediatamente recolocado em sua posição original e suturado por planos (Figura 2). As substâncias

Figura 1 – Pedicelo do retalho dorsal de base caudal. O pedicelo caudal tem duas artérias sacrais (II) para a sua nutrição, que penetram na base do retalho.



Figura 2 - Detalhe do retalho após síntese em rato do grupo controle.



Figura 3 - Cópia da área por aposição para planimetria digital.



antioxidantes foram administradas do primeiro ao sexto dia de pós-operatório, após 24 h da confecção do retalho. No grupo controle, os animais receberam, por via intraperitoneal, 1 ml de solução fisiológica 0,9%, nos dias 1 a 6 diariamente. No grupo Vitamina C, os animais receberam vitamina C na dose de 340 mg/kg de 12/12h diluída em 1 ml de soro fisiológico a 0,9% e administrada por via intraperitoneal. No grupo Vitamina E, os animais receberam vitamina E na dose de 20 mg/kg 1x/dia e, no grupo Ginkgo biloba, os animais receberam extrato seco de Ginkgo biloba, na dose de 100mg/kg 1x/dia, administrados da mesma forma em todos os grupos. Todos os animais foram avaliados, diariamente, do dia 1 ao 14. Considerou-se viabilidade do retalho toda a área do retalho que apresentava aspecto normal de textura, coloração e morfologia, semelhante ao tecido não descolado. Área de necrose foi considerada toda área com textura pétrea, coloração escurecida e presença de crostas. Foi determinada a área total do retalho, área de viabilidade proximal e área de necrose distal em cm². A avaliação da área do retalho cutâneo foi realizada em todos os animais no 14º dia. As áreas de viabilidade e necrose do retalho de cada rato foram copiadas utilizando-se filme transparente e caneta solúvel em álcool, conforme demonstrado na Figura 3. As figuras obtidas foram digitalizadas com auxílio de "scanner" com resolução óptica de 100 dpi, enviadas a um computador Pentium® II e analisadas por meio do programa de computador Corel DRAW 9®. A avaliação microscópica foi realizada a partir do estudo histológico das biópsias obtidas das áreas dos retalhos cutâneos, em todos os grupos, no dia 14. Para o estudo histológico foi ressecado de cada retalho um fragmento de forma retangular, medindo 20 x 5 mm, na sua porção viável, na zona de transição entre o retalho elevado e o tecido normal não descolado adjacente ao retalho para avaliação do número de vasos sanguíneos. Neste estudo, foi considerada a variável área total do retalho, e foram aplicados os testes não-paramétrico de Kruskal-Wallis e de Mann-Whitney. Adotou-se o nível de significância de 5% ou $p = 0,05$ para rejeição da hipótese de nulidade para ambos os testes.

Figura 4 - Retalho do rato do grupo vitamina C no dia 14. Nota: 14 dpo = décimo quarto dia de pós-operatório.



RESULTADOS

A observação diária do processo de cicatrização foi realizada do dia 1 ao 14. O retalho apresentou evolução para necrose de sua ponta, iniciando com edema e isquemia de sua porção distal (Figura 4). Pode ser observado na Figura 5, que as porcentagens das áreas de viabilidade dos retalhos nos grupos da Vitamina C, Vitamina E e Ginkgo biloba foram maiores do que a porcentagem da área de viabilidade do grupo controle. Observou-se que a porcentagem da área de viabilidade do retalho no grupo Vitamina C ($p = 0,0039$) foi superior às porcentagens das áreas de viabilidade dos retalhos nos grupos Vitamina E ($p = 0,0161$) e Ginkgo biloba ($p = 0,0245$). No presente estudo, pode-se verificar que o uso de substâncias antioxidantes aumentou a área de viabilidade dos retalhos quando comparados ao grupo controle, pois a média de viabilidade do grupo controle foi 65,93%, enquanto o grupo Vitamina C foi 78,05% ($p = 0,0039$), grupo

Vitamina E foi 75,08% (p = 0,0161) e grupo Gingko biloba foi 72,16% (p = 0,0245), demonstrando que em todos os grupos onde foram administradas as substâncias antioxidantes houve um aumento significativo da área de viabilidade do retalho quando comparados ao grupo controle, sendo que o grupo Vitamina C foi superior a todos eles. O aspecto histológico da neovascularização do retalho no grupo controle, Vitamina C, Vitamina E e Gingko biloba revelou grande quantidade de pequenos vasos jovens, característicos do processo de neoangiogênese (Figura 6). O número de vasos encontra-se aumentado nas áreas dos retalhos nos grupos

Figura 5 – Porcentagem das áreas de viabilidade dos retalhos no dia 14.

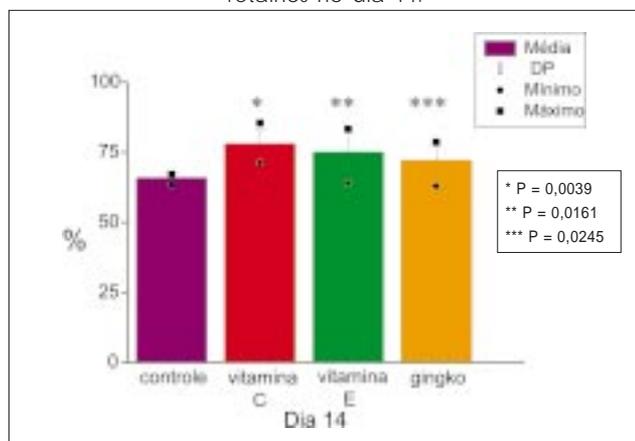


Figura 6 – Corte histológico do retalho cutâneo no dia 14 do rato do grupo vitamina c, TG, 100X. Observa-se neoformação vascular composta de pequenos vasos na área do retalho no canto inferior esquerdo, sendo que as hemácias em seu interior são evidenciadas pela cor vermelha (□). Esta coloração comprova que estes vasos não têm camada muscular média lisa, a qual se coraria em púrpura por esta técnica.

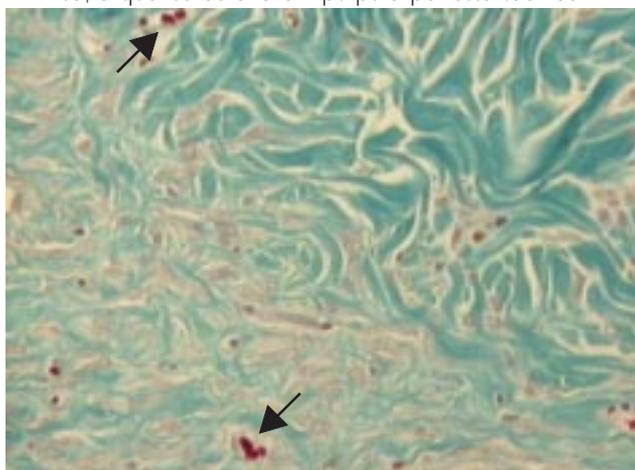
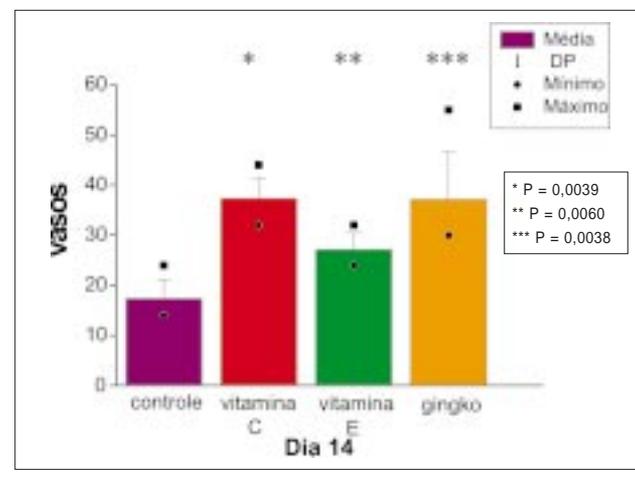


Figura 7 – Número de vasos nas áreas dos retalhos no dia 14.



Vitamina C (p = 0,0039), Vitamina E (p = 0,0060) e Gingko biloba (p= 0,0038) e maiores em relação ao número de vasos na área do retalho do grupo controle, demonstrando o aumento da neovascularização proporcionada pelas substâncias antioxidantes sobre as áreas dos retalhos. Os grupos Vitamina C e Gingko biloba apresentaram resultados muito semelhantes, superiores aos encontrados no grupo Vitamina E (Figura 7).

DISCUSSÃO

Neste estudo, foram realizados retalhos semelhantes ao trabalho de Khouri et al.⁷, que modificaram o retalho proposto inicialmente por McFarlane et al.⁸, para retalho de 10 x 3 cm utilizando pedículo caudal. Neste retalho, há duas artérias sacrais nutridoras do retalho ao invés de somente uma, o que confere maior viabilidade ao retalho. Foram encontrados na literatura escassos trabalhos que estudaram os efeitos das substâncias antioxidantes⁹⁻¹², sendo que as mais estudadas foram a vitamina C, vitamina E e Gingko biloba. Hayden et al.¹⁰ iniciaram a administração da Vitamina C e Vitamina E uma hora após o retalho ter sido elevado e encontraram média de viabilidade do retalho nestes grupos de 84 a 89% (p < 0,005), superior ao encontrado no grupo controle, que foi de 67%. No presente estudo, a média de viabilidade do retalho no grupo Vitamina C foi 78% (p = 0,0039) e no grupo Vitamina E foi 75,12% (p = 0,0161), resultados inferiores aos encontrados pelos autores acima.

Neste estudo, a Vitamina C, a Vitamina E e o Gingko biloba foram aplicados por via intraperitoneal, similar ao trabalho de Bekerecioglu et al.⁹, que utilizaram a mesma via de administração da Vitamina C e do Gingko biloba, com exceção da vitamina E que foi aplicada por via intramuscular. Também no trabalho de Souza Filho et al.¹² foi utilizada

a via intraperitoneal para o uso de *Gingko biloba*. A via intraperitoneal é considerada rápida, segura e de fácil acesso. No presente trabalho, foram utilizadas as doses de vitamina C de 340 mg/kg de 12/12h, vitamina E na dose de 20 mg/kg 1x/dia e *Gingko biloba* na dose de 100 mg/kg 1x/dia. As doses são semelhantes às empregadas por Bekerecioglu et al.⁹, que utilizaram a vitamina C na dose de 340 mg/kg de 12/12 h, *Gingko biloba*, na dose de 100 mg/kg por dia e vitamina E, na dose de 20 mg/kg, porém em dias alternados, intervalo muito prolongado uma vez que a meia vida da Vitamina E é 24 h, por um período de 6 dias. Souza Filho et al.¹² também utilizaram o *Gingko biloba* na dose de 100 mg/kg 1x/dia, por um período de 5 dias.

CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que a viabilidade do retalho cutâneo dorsal em ratos é maior nos grupos que receberam substâncias antioxidantes e a neovascularização do retalho, evidenciada pelo aumento do número de vasos, está aumentada em todos os grupos, porém é mais pronunciada nos grupos que receberam as substâncias antioxidantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rotstein OD. Oxidants and antioxidant therapy. *Crit Care Clin.* 2001;17(1):239-47.
2. Bulkley GB. Free radicals and other reactive oxygen metabolites: clinical relevance and the therapeutic efficacy of antioxidant therapy. *Surgery.* 1993;113(5):479-83.
3. Prada FS, Arrunategui G, Alves MC, Ferreira MC, Zumiotti AV. Effect of allopurinol, superoxide-dismutase and hyperbaric oxygen on flap survival. *Microsurgery.* 2002; 22(8):352-60.
4. Rock CL, Jacob RA, Bowen PE. Update on the biological characteristics of the antioxidant micronutrients: vitamin C, vitamin E, and the carotenoids. *J Am Diet Assoc.* 1996;96(7):693-704.
5. Freedman JE, Keaney J Jr. Vitamin E inhibition of platelet aggregation is independent of antioxidant activity. *J Nutr.* 2001;131(2):374S-7S.
6. McCaleb R. How much do you know about ginkgo biloba. *Better Nutrition.* 1994;56(5):60-3.
7. Khouri RK, Angel MF, Edstrom LE. Standardizing the dorsal rat flap. *Surg Forum.* 1986;37:590-1.
8. McFarlane RM, DeYoung G, Henry RA. The design of a pedicle flap in the rat to study necrosis and its prevention. *Plast Reconstr Surg.* 1965;35(2):177-82.
9. Bekerecioglu M, Tercan M, Ozyazgan I. The effect of *Gingko biloba* extract (Egb 761) as a free radical scavenger on the survival of skin flaps in rats: a comparative study. *Scand J Plast Reconstr Hand Surg.* 1998;32(2):135-9.
10. Hayden RE, Paniello RC, Yeung CS, Bello SL, Dawson SM. The effect of glutathione and vitamins A, C and E on acute skin flap survival. *Laryngoscope.* 1987; 97(10):1176-9.
11. Zaccaria A, Weinzweig N, Yoshitake M, Matsuda T, Cohen M. Vitamin C reduces ischemia-reperfusion injury in a rat epigastric island skin flap model. *Ann Plast Surg.* 1994;33(6):620-3.
12. Souza Filho MVP, Leal PRA, Sbalchiero JC, Marques MJM. Efeito do extrato de *Gingko biloba* na viabilidade de retalhos cutâneos em ratos. *Rev Soc Bras Cir Plast.* 2002;17(2):45-56.