

Efeitos da Pentoxifilina e o Cloridrato de Buflomedil em Retalhos Randomizados em Ratos sob Influência da Nicotina

Paulo Roberto Leal, MD, TCBC, TSBCP, FACS¹

Marcela Caetano Cammarota²

Juliano Sbalchiero, MD, TSBCP³

Max Marques e Marques²

Marcelo Moreira²

- 1] Chefe do Serviço de Cirurgia Plástica e Microcirurgia do INCA.
- 2] Médico Residente do Serviço DE Cirurgia Plástica e Microcirurgia do INCA.
- 3] Staff do Serviço Cirurgia Plástica e Microcirurgia do INCA.

Instituto Nacional de Câncer - Serviço de Cirurgia
Plástica Reparadora e Microcirurgia

Endereço para correspondência:

Paulo Roberto Leal

Praça da Cruz Vermelha, 23 – 8º andar

Rio de Janeiro – RJ

20230-130

Fone: (21) 2506-6087

e-mail: prleal@inca.gov.br

Descritores: Isquemia; necrose; nicotina; retalhos; tabagismo.

RESUMO

São abundantes na literatura trabalhos que demonstraram os efeitos nocivos da nicotina na microcirculação, resultando em maior risco de isquemia de retalhos cutâneos. Na tentativa de reverter esses efeitos, foi desenvolvido um estudo experimental no qual foram testadas duas drogas: a pentoxifilina, que atua alterando a viscosidade sanguínea, e o buflomedil, que é uma substância vasoativa com ação na microcirculação. Após tratamento com nicotina durante 6 semanas, 40 ratos foram subdivididos em 4 grupos e operados para confecção de um retalho cutâneo dorsal randomizado. O grupo A não recebeu tratamento com as drogas. Os grupos B e C foram tratados no pós-operatório durante 7 dias com pentoxifilina e buflomedil, respectivamente. O grupo D, controle, recebeu apenas soro. Quando comparados, houve uma diferença significativa entre os grupos A e D ($p < 0,05$), mostrando uma participação efetiva da nicotina na ocorrência de necrose. Os grupos tratados com as drogas mostraram uma resposta clínica importante na melhora da sobrevida dos retalhos, entretanto esses valores não foram estatisticamente significantes ($p > 0,05$). Concluímos que essas drogas mostram alguma efetividade na reversão dos efeitos causados pela nicotina, mas se faz necessário ampliar as amostras para obtermos resultados com significado estatístico.

INTRODUÇÃO

Evidências clínicas e experimentais demonstram o aumento do risco de necroses de retalhos cutâneos em indivíduos expostos ao tabagismo. O aumento da morbidade devido à hipoperfusão vascular implica que os metabólitos da nicotina possuem importantes efeitos na microcirculação⁽¹⁾. Mosley e Finseth foram os primeiros a relatar os efeitos negativos na cicatrização observando a diminuição do fluxo sanguíneo nas regiões distais dos dedos e alteração na cicatrização na mão do fumante⁽²⁾. Outro estudo de Rees e cols. demonstrou que os pacientes fumantes têm probabilidade 2 vezes maior de desenvolver necroses cutâneas após ritidectomia quando em comparação aos não-fumantes⁽³⁾.

A fumaça do cigarro contém mais de 3.800 componentes, mas só o monóxido de carbono, o óxido nítrico, o hidrogênio, a cianida e a nicotina têm sido amplamente identificados como os mais importantes causadores dos efeitos negativos, tanto no sistema cardiovascular como na microcirculação da pele⁽¹⁾. A nicotina diminui o fluxo sanguíneo cutâneo em 30 a 40% devido ao estímulo de liberação de catecolaminas e norepinefrina, produzindo vasoconstrição. Reduz a síntese de prostaciclina vasodilatadora e aumenta a liberação de tromboxane A₂ vasoconstritor. Na microcirculação atua induzindo ativação e agregação plaquetária, produzindo microtromboses⁽²⁾. Além disso, altera o processo de cicatrização das feridas ao diminuir a proliferação de fibroblastos e macrófagos e estimular as catecolaminas, que são co-fatores em formação de chalonas, as quais inibem o processo de epitelização.

Alguns estudos foram realizados com drogas vasodilatadoras como a nifedipina e a nitroglicerina em ratos expostos à fumaça de cigarro, com resultados clínicos significativos na sobrevida de retalhos randomizados⁽⁴⁾.

A pentoxifilina é um derivado das metilxantinas utilizado no tratamento da claudicação intermitente, que melhora a viscosidade sanguínea, uma vez que aumenta a capacidade de deformação dos eritrócitos e granulócitos, diminui os níveis de fibrinogênio e a liberação de tromboxane, inibe a agregação plaquetária e aumenta os níveis de prostaciclina. Em indivíduos com coagulação sanguínea normal não foram evidenciados esses efeitos, somente alteração da viscosidade sanguínea⁽²⁾.

O cloridrato de buflomedil é uma substância vasoativa com ação na microcirculação cerebral e periférica, que age através do bloqueio de passagem de cálcio para a musculatura lisa vascular. Não apresenta ação

bloqueadora adrenérgica e nem modifica as constantes hemodinâmicas⁽⁵⁾. Devido a esses efeitos, tem sido utilizado empiricamente na cirurgia plástica para melhorar a perfusão dos retalhos, sem ainda existir um estudo que demonstre a efetividade dessa droga.

OBJETIVO

O primeiro objetivo é estabelecer os efeitos negativos da nicotina na sobrevida de retalhos randomizados em ratos. O segundo é verificar a influência da pentoxifilina (Trental[®] ou Pentox[®]) e do cloridrato de buflomedil (Bufedil[®]) na sobrevida de retalhos randomizados em ratos expostos à nicotina em doses que produzem níveis comparáveis a de fumantes humanos.

MATERIAL E MÉTODO

Quarenta ratos da raça LOU / M, fêmeas, com peso entre 250 e 350 g e idade entre 6 a 8 meses foram utilizados no estudo. Este grupo foi dividido randomizadamente em 4 grupos, com 10 animais cada um :

A: ratos expostos a nicotina

B e C: ratos expostos a nicotina e a drogas

D: grupo controle

GRUPO A: NICOTINA + SORO

Nicotina: 0,5 mg/kg em 0,1 ml de solução salina injetada no subcutâneo 2 vezes/dia por 6 semanas no pré-operatório e 1 semana no pós-operatório.

Soro: 1 ml de solução salina intraperitoneal por 1 semana no pós-operatório.

GRUPO B: NICOTINA + PENTOXIFILINA

Nicotina: 0,5 mg/kg em 0,1 ml de solução salina injetada no subcutâneo 2 vezes/dia por 6 semanas no pré-operatório e 1 semana no pós-operatório.

Pentoxifilina: 20 mg/kg em 1,0 ml de solução salina intraperitoneal 2 vezes/dia por 1 semana no pós-operatório.

GRUPO C: NICOTINA + BUFLOMEDIL

Nicotina: 0,5 mg/kg em 0,1 ml de solução salina injetada no subcutâneo 2 vezes/dia por 6 semanas no pré-operatório e 1 semana no pós-operatório.

Buflomedil: 34,2 mg/kg em 1,0 ml de solução salina intraperitoneal 2 vezes/dia por 1 semana no pós-operatório.

GRUPO D: GRUPO CONTROLE: SORO + SORO

Soro: 0,1 ml de solução salina por via subcutânea 2 vezes/dia por 6 semanas e 1,0 ml intraperitoneal 2 vezes/dia por 1 semana no pós-operatório.

TÉCNICA

Inicialmente realizamos um teste piloto para ajuste da dose da nicotina. Durante 1 semana, os 30 ratos foram submetidos a aplicações de nicotina intradérmica na dose inicial de 2 mg/kg, que foi lentamente diminuída até alcançar uma dose não convulsivante. A dose-

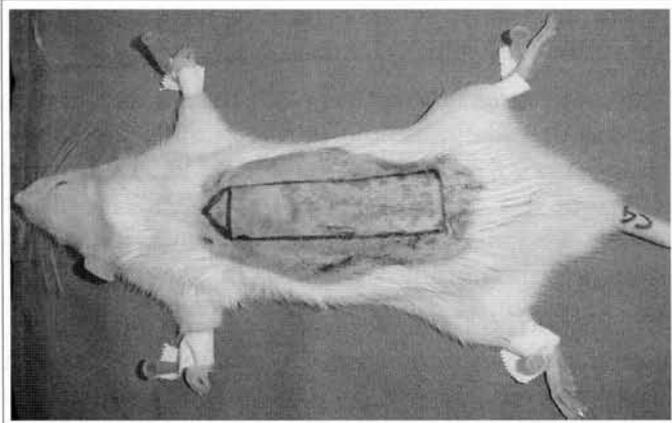


Fig. 1 - Marcação do retalho na região dorsal do rato.

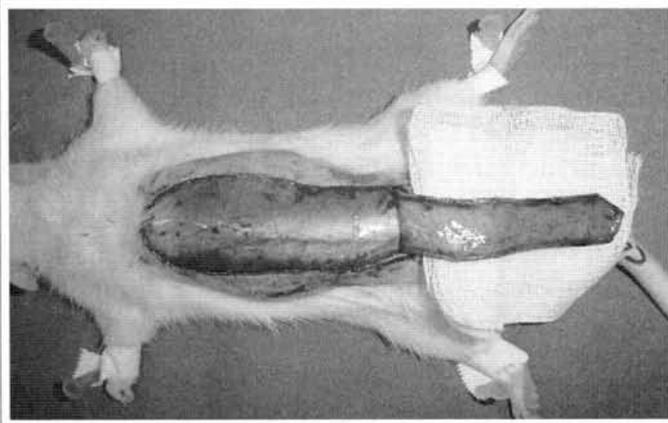


Fig. 2 - Confeção do retalho dorsal.

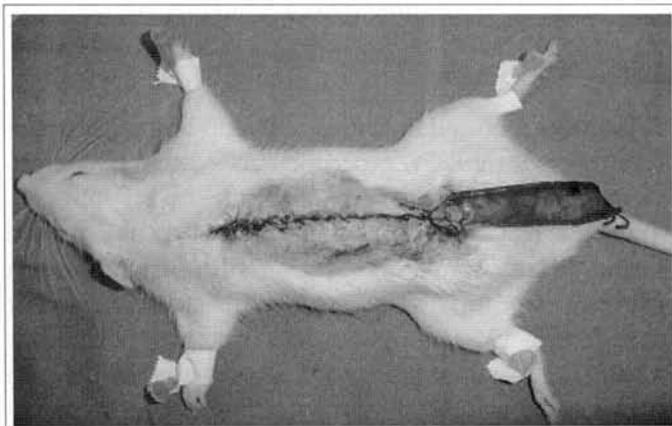


Fig. 3 - Síntese primária da área doadora com fixação do enxerto na base do retalho.

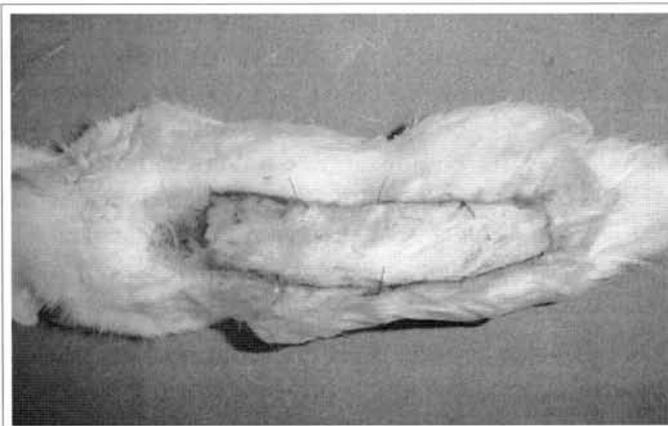


Fig. 4 - Fixação do retalho na região dorsal após sutura da área doadora.

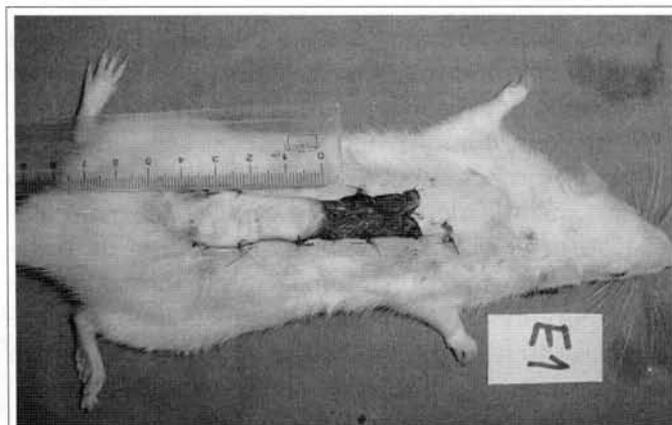


Fig. 5 - Medida da área viável em centímetros.

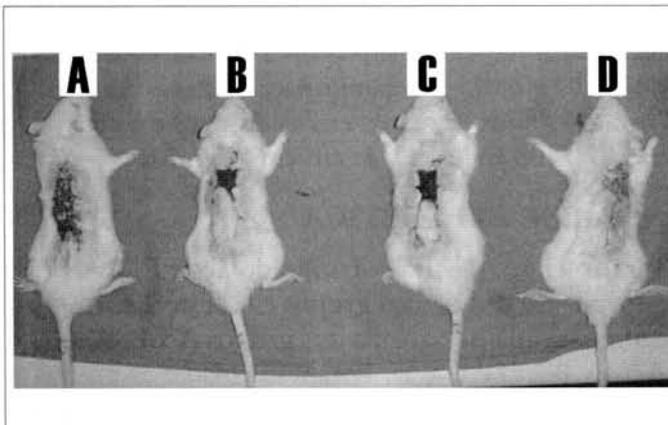


Fig. 6 - Comparação dos grupos: A = necrose quase total do retalho, B e C = necrose parcial e D = mínima necrose.

padrão ficou estabelecida em 0,5 mg/kg, compatível com várias descrições da literatura^(1,2).

Após 6 semanas de tratamento com nicotina para os grupos A, B, e C e soro para D, os ratos foram submetidos ao procedimento cirúrgico. Para anestesia utilizou-se Ketamina + Clorpromazina nas doses de 2,5 ml/kg e 0,5 ml/kg, respectivamente, por via intramuscular. Os retalhos dorsais foram realizados segundo a técnica de Mc Farlane⁽⁶⁾ modificada por Hammond⁽⁷⁾ de base caudal, baseados no nível da crista ilíaca posterior, constituídos por pele e panículo carnoso (Figs. 1 e 2).

Para o desenho desses retalhos, foram utilizados moldes de 2 x 7 cm, adicionando um triângulo de compensação em sua extremidade distal (2 x 1,5 x 1,5) que foi utilizado como enxerto de pele total (Fig. 1).

Após a dissecação e elevação do retalho, a área doadora foi aproximada primariamente com sutura contínua (Fig. 3). O enxerto foi fixado à base do retalho elevado para impedir qualquer contato deste com o leito vascularizado onde, normalmente, não é possível a aproximação da área doadora. O retalho foi fixado sobre a pele dorsal suturada com 4 pontos laterais, equidistantes e um em cada ângulo (Fig. 4). Após o procedimento, a região dorsal dos ratos foi envolvida com curativo tipo Bioclusive® e eles foram colocados em gaiolas separadas, recebendo água e comida *ad libitum*.

Os ratos dos grupos A, B e C continuaram recebendo nicotina durante o pós-operatório e os grupos B e C receberam pentoxifilina e buflomedil, respectivamente. O grupo D continuou recebendo soro intramuscular e intraperitoneal.

O percentual de necrose da pele dos retalhos foi avaliado no 5º e 7º dia de pós-operatório e observado por mais um dia para confirmação desses dados. As medidas foram efetuadas em milímetros e a área de tecido viável foi calculada em cm² (Fig. 5).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliar o trabalho foi utilizado Teste F (Anova) para análise dos quatro grupos e o Teste T foi aplicado para análise pareada dos grupos A x B, A x C, A x D, B x D e C x D. Foram calculadas as médias e os desvios padrão. A significância adotada foi para "p" menor ou igual a 0,05.

RESULTADOS

Os resultados de cada grupo estão expostos na Tabela I. Houve, em todo experimento, um total de 4 mortes, sem um fator causal identificável. Essas mortes ocorreram durante o procedimento anestésico ou no pós-operatório imediato. Alguns ratos foram excluídos do trabalho, pois, apesar do cuidado para isolar a área operada com curativo oclusivo, ocorreu autofagia de parte do retalho, dificultando uma avaliação adequada.

Para esses resultados apresentados foram calculadas as médias de cada grupo e o desvio padrão, que foi de: grupo A = 6,83 ± 0,70, grupo B = 7,71 ± 1,73, grupo C = 7,68 ± 1,42 e grupo D = 8,91 ± 2,67 (Fig. 8). O grupo que apresentou menor desvio padrão foi o A e o que apresentou maior desvio foi o D.

O resultado do Teste F foi 1,65 e mostrou um $p > 0,05$, portanto não foi significativo. As análises pareadas com Teste T resultaram em $p < 0,05$ quando comparados os grupos A e D (Fig. 7). Os demais grupos, apesar de clinicamente expressarem uma notória diferença, não tiveram "p" significativo a 5% (Fig. 6).

DISCUSSÃO

A farmacocinética da nicotina tem sido bastante estudada e diversos modelos experimentais existem na tentativa de simular os efeitos do tabagismo no ser humano. Trabalhos realizados comparando a ação da nicotina em forma de base com a do sal tartarato mostraram que a primeira exibe um nível plasmático maior e mantido por mais tempo. Dessa forma, quando optamos por utilizar a base, necessitamos ajustar a dose previamente definida para a administração do tartarato. Por esse motivo, realizamos um teste piloto, durante uma semana, para estudar os efeitos clínicos da droga e definir a dose não letal para aquela linhagem de ratos escolhida.

Outra dificuldade constante ao estudar os efeitos da nicotina em modelos experimentais é alcançar o nível plasmático que realmente simule um adulto fumante. As variáveis, como o tipo de exposição (fumaça de cigarro, injeções subdérmicas, cápsulas de liberação lenta), quantidade de exposições/dia para manutenção do nível plasmático constante, tempo de tratamento, tipo de nicotina, linhagem do animal utilizado, são muitas e influenciam sobremaneira os resultados encontrados. Portanto, tais variáveis necessitam de outros estudos para serem mais bem definidas.

Optamos, baseados em um extenso levantamento bibliográfico, por definir o tempo de tratamento com nicoti-

na em 6 semanas. Durante o procedimento cirúrgico, amostras de sangue dos animais foram colhidas e estocadas para prosseguir os estudos com a dosagem do nível plasmático de cotinina, metabólito da nicotina. Mas podemos considerar o tratamento efetivo, uma vez que, quando comparados os grupos A (nicotina) e D (soro), encontramos uma diferença significativa ($p < 0,05$) na sobrevida dos retalhos dos ratos não-fumantes.

A atuação da pentoxifilina na sobrevida de retalhos randomizados tem sido bastante explorada. Seus efeitos hematológicos incluem aumento da capacidade de deformação eritrocitária e aumento do fluxo sanguíneo capilar⁽¹⁰⁾. Entretanto, outros resultados têm sido descritos. A pentoxifilina aumenta o estado de hipercoagulabilidade, diminuindo a agregação plaquetária, aumentando a plasmina, o fator ativador de plasminogênio, a antitrombina III, e diminuindo o fibrinogênio, alfa-2-antiplasmina, alfa-1-antitripsina e alfa-2-macroglobulina⁽¹¹⁾.

Apesar de todos os efeitos descritos, sua aplicabilidade clínica ainda é controversa. Estudos experimentais têm mostrado resultados conflitantes. Alguns autores como Karacaoglan e col. demonstraram aumento na sobrevida de retalhos com uso da pentoxifilina^(12,16). Enquanto outros⁽¹³⁾ não correlacionam as alterações microscópicas com o aumento da sobrevida do retalho. Outro aspecto importante é o período de início do tratamento. Para Williams e cols.⁽¹⁴⁾ é necessário um tratamento pré-operatório de, no mínimo, 14 dias para alcançar os efeitos desejados. Já o trabalho realizado por Hayden⁽¹⁵⁾, testando 3 diferentes regimes de uso, incluindo administração pré-operatória, não confirmou os achados anteriores.

Neste trabalho iniciamos a aplicação da droga no mesmo dia da cirurgia, com base em trabalhos já realizados⁽¹⁵⁾, prolongando o uso por 7 dias. Os resultados mostraram uma melhora na sobrevida dos retalhos, como podemos observar na Tabela I e no Fig. 8, entretanto esses valores não foram significativos ($p > 0,05$).

O cloridrato de buflomedil apresenta um efeito inibitório na agregação plaquetária e melhora a capacidade de deformação dos eritrócitos com fluibilidade anormal. Estudos realizados *in vitro* sugerem que esta droga tem efeito antagonista inespecífico do íon cálcio e um efeito de bloqueio dos receptores alfa, não específico⁽⁵⁾.

Os estudos experimentais têm mostrado bons resultados na tentativa de reverter a isquemia de retalhos. Uhl e cols.⁽¹⁸⁾ demonstraram que essa droga pode ter uso terapêutico em retalhos cutâneos e que o tratamento pré-operatório adicional por 5 dias não alterou os resultados anteriores. Outro trabalho, iniciando o tratamento 4 horas antes da operação e 5 minutos após, resultou em valores significativos para os dois grupos⁽¹⁹⁾.

Em nosso estudo, o buflomedil foi utilizado da mesma forma que a pentoxifilina. Os resultados encontrados também foram bastante semelhantes. Não houve significância quando comparado o grupo tratado com buflomedil com os demais grupos, apesar da marcada melhora clínica. Atribui-se a esse achado, assim como aos resultados encontrados no grupo da pentoxifilina, o fato de a amostra ser pequena, mesmo tratando-se de um estudo experimental. Possivelmente, aumentando

Tabela I

Rato	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D
1	†	8,2	7,6	4,2
2	7	6,6	6	11,6
3	7	†	5,6	*
4	5,8	6,6	8,6	*
5	7,2	6,4	8,2	*
6	6,4	9,4	9	9
7	*	7,8	11	7,2
8	†	10	7,4	10,6
9	8	6,4	6	11,6
10	6,4	†	†	8,2
média	6,83	7,68	7,71	8,91

Medidas das áreas viáveis dos retalhos de cada grupo em cm².

*Impossibilidade de aferição adequada da área viável. †Morte.

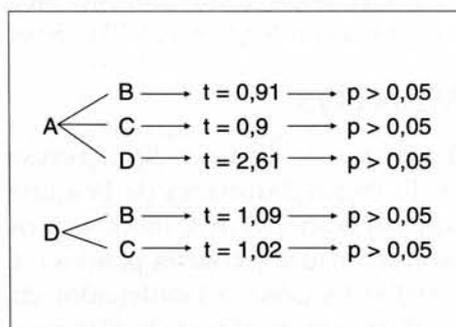


Fig. 7 – Resultados do teste T para cada par e sua significância.

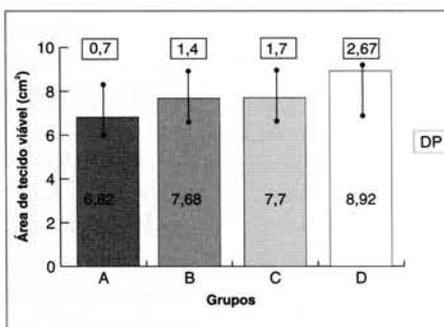


Fig. 8 – Média das áreas de cada grupo e desvio padrão.

o número de eventos, diluir-se-iam os resultados discrepantes, como o observado no rato D1, que destoava completamente dos achados no restante do grupo. Dessa forma, podemos inferir que existe uma tendência deste estudo a se tornar estatisticamente significativa, aumentando o número de observações em cada grupo.

CONCLUSÃO

Diversas drogas têm sido testadas na tentativa de reverter os efeitos deletérios da nicotina, entretanto, os achados ainda permanecem obscuros. Nenhum resultado definitivo foi encontrado, mas há evidências clínicas de que algumas medicações exercem efeitos favoráveis, melhorando a sobrevida dos retalhos cutâneos. Este trabalho confirmou os já descritos efeitos da nicotina, mostrando maior sofrimento dos retalhos confeccionados em ratos expostos a essa droga. O buflomedil e a pentoxifilina, apesar da melhora apresentada na vascularização dos retalhos, não registraram resultados estatisticamente significantes. Assim, necessitamos ampliar nossa pesquisa, aumentando o número de casos de cada grupo para que os dados se tornem significantes.

BIBLIOGRAFIA

1. Forrest CR, Oang CY, Lindsay WK. Pathogenesis of ischemic necrosis in random-pattern skin flaps induced by long-term low dose nicotine treatment in the rat. *Plast Reconstr Surg* 1991; 87(3):518-28.
2. Aker JS, Mancoll J, Lewis B, Collen LB. The effect of Pentoxifylline on random-pattern skin-flap necrosis induced by nicotine treatment in the rat. *Plast Reconstr Surg* 1997; 100(1):66-71.
3. Rees TD, Liverett DM, Guy CL. The effect of cigarette smoking on skin-flap survival in the face lift patient. *Plast Reconstr Surg* 1984; 73(6): 911-5.
4. Davis BW, Lewis RD, Pennington G. The impact of vasodilators on random-pattern skin flap survival in the rat following mainstream smoke exposure. *Ann Plast Surg* 1998; 40(6):630-6.
5. Thomas JG, MD, Rainer KES, Hammersen E, MD, Messmer K, MD. Increase in skin-flap survival by the vasoactive drug buflomedil. *Plast Reconstr Surg* 1991; 87(1):130-41.
6. Mcfarlane RM, De Young G, Henry RA. The design of a pedicle flap in the rat to study necrosis and its prevention. *Plast Reconstr Surg* 1965; 35:177.
7. Hammond DC, Brooksher RD, Mann RJ, et al. The dorsal skin flap model in the rat: factors influencing survival. *Plast Reconstr Surg* 1993; 91(2):316-21.

8. Nolan J, Jenkins RA, Kurihara K, Schultz R. The acute effects of cigarette smoke exposure on experimental skin flaps. *Plast Reconstr Surg* 1985; 75(4):544 -51.
9. Forrest CR, Pang CY, Lindsay WK. Dose and time effects of nicotine treatment on the capillary blood flow and viability of random pattern skin flaps in the rat. *Br J Plast Surg* 1987; 40(3):295-9.
10. Freedman AM, Hyde GL, Luce EA. Failure of pentoxifylline to enhance skin flap survival in the rat. *Ann Plast Surg* 1989; 23(1):31-4.
11. Samlaska CP, Winfield EA. Pentoxifylline. *J Am Acad Dermatol* 1994; 30(4):603-21.
12. Karacaoglan N, Akbas H. Effect of parenteral pentoxifylline and topical nitroglycerin on skin flap survival. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1999; 120(2):272-4.
13. Pratt ME, Williams PB. Pentoxifylline and acetylsalicylic acid in a pig random skin-flap model. *J Otolaryngol* 1996; 25(6):393-8.
14. Williams PB, Hankins DB, Layton CT, Phan T, Pratt ME. Long-term pretreatment with pentoxifylline increases random skin flap survival. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1994 Jan;120(1):65-71
15. Hayden RE, Snyder BJ. Pharmacologic manipulation of random skin flaps with pentoxifylline. *Laryngoscope* 1993; 103(2):185-8.
16. Monteiro DT, Santamore WP, Nemir PJR. The influence of pentoxifylline on skin-flap survival. *Plast Reconstr Surg* 1986; 77(2):277-81.
17. Quirinia A, Gottrup F, Viidik A. Failure of buflomedil to improve healing in ischaemic skin flaps. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 1996; 30(2):81-7.
18. Uhl E, Rosken F, Curri SB, Menger MD. Reduction of skin flap necrosis by transdermal application of buflomedil bound to liposomes. *Plast Reconstr Surg* 1998; 102(5):1598-1604.
19. Galla TJ, Saetzler RK, Hammersen E, Messmer K. Increase in skin-flap survival by the vasoactive drug buflomedil. *Plast Reconstr Surg* 1991; 87(1):130-6.

AGRADECIMENTOS

Ao Sr. Emílio Faustino de Paula e Sra. Teresa Gonçalves Correia, Biólogos Assistentes de Pesquisa do Biotério do Instituto Nacional de Câncer, sem os quais não seria possível a realização desta pesquisa, e ao Dr. Marcello André Barcinsk, Coordenador da Pesquisa Básica do Instituto Nacional de Câncer e orientador deste trabalho.