

Efeito do Extrato de Ginkgo Biloba na Sobrevida de Retalhos Cutâneos em Ratos

Marcus Vinicius Ponte de Souza Filho¹

Paulo Roberto de Albuquerque Leal²

Juliano Carlos Sbalchiero³

Max Jefferson Marques Marques⁴

- 1] Médico Residente – Especialista pela SBCP; Serviço de Cirurgia Plástica Reconstructora e Microcirurgia – Instituto Nacional do Câncer – INCA.
- 2] Membro Titular da SBCP; Chefe do Serviço de Cirurgia Plástica Reconstructora e Microcirurgia – INCA.
- 3] Médico Assistente – Titular da SBCP; Chefe do Centro de Treinamento em Cirurgia Experimental e Microcirurgia do INCA.
- 4] Médico Residente; Serviço de Cirurgia Plástica Reconstructora e Microcirurgia – Instituto Nacional do Câncer – INCA.

INCA – Serviço de Cirurgia Plástica Reconstructora e
Microcirurgia

Endereço para correspondência:

Marcus Vinicius Ponte de Souza Filho

Pça. da Cruz Vermelha, 23 – 8º and. – Centro
Rio de Janeiro – RJ
22230-130

Fone: (21) 2506-6087
e-mail: mvponte@ig.com.br

Descritores: Ginkgo Biloba; retalhos cirúrgicos; sobrevivência de tecidos; pele; isquemia.

RESUMO

A perda parcial de retalhos cutâneos continua sendo responsável por uma parcela significativa de morbidade nas cirurgias estéticas e reconstroitoras. Várias terapias já foram propostas com o objetivo de aumentar a taxa de sobrevida dos retalhos. O presente trabalho tem como objetivo avaliar se o Extrato de Ginkgo Biloba (EGB) é efetivo na melhoria da taxa de sobrevida de retalhos cutâneos randomizados. Para tanto, utilizou-se o modelo experimental de retalho de dorso de rato descrito por McFarlane e modificado por Hammond. Os animais foram tratados por 5 dias com EGB (100 mg/kg, ip, 1x dia) ou solução salina (SF 0,9%, ip, 1x dia) – grupo controle – e sacrificados no sexto dia para a avaliação dos resultados. A média da área de sobrevida do retalho no grupo controle foi de $2,702 \pm 0,195 \text{ cm}^2$ (n=9) e no grupo tratado com EGB foi de $5,490 \pm 0,283 \text{ cm}^2$ (n=8). Nossos resultados mostraram que o tratamento dos animais com EGB aumentou de forma significativa ($p < 0,001$) a taxa de sobrevida dos retalhos cutâneos randomizados, sugerindo um possível papel para essa droga no manuseio de retalhos cutâneos com sofrimento vascular distal.

INTRODUÇÃO

A isquemia de retalhos, com conseqüente necrose, continua a ser um importante problema clínico, aumentando a morbidade dos procedimentos de reconstrução cirúrgica. Apesar de extensa pesquisa com utilização de diferentes estratégias para melhorar a sobrevida dos retalhos⁽¹⁾, o processo fisiopatológico sobre a isquemia dos retalhos permanece ainda não totalmente esclarecido, necessitando portanto de novas investigações, tanto experimentais quanto clínicas.

As várias terapias utilizadas para melhorar a sobrevida dos retalhos cutâneos randomizados têm sido direcionadas para melhoria do fluxo sanguíneo e oxigenação dos tecidos, diminuição das necessidades metabólicas ou bloqueio da lesão de reperfusão induzida pela isquemia^(2,3).

Diversos mediadores inflamatórios têm sido implicados no processo de lesão induzida pela isquemia, entre eles podemos citar: prostaglandinas, leucotrienos, fator ativador de plaquetas – PAF, óxido nítrico, radicais livres, fatores de crescimento e diversas outras citocinas^(4, 5, 6, 7, 8). Nesse processo, as células endoteliais, devido a sua localização na interfase entre o sangue e o tecido, parecem ter um importante papel, sendo as primeiras a atuar frente a variações na pressão parcial de oxigênio no sangue. Essas células apresentam numerosas funções importantes: regulam a liberação de moléculas antitrombóticas, sintetizam moléculas vasoativas, bem como compostos que regulam a atividade de leucócitos, plaquetas e células musculares lisas, além de funcionarem como barreira seletiva e secretarem vários metabólitos⁽⁹⁾.

O Extrato de Ginkgo Biloba (EGB) é amplamente utilizado no tratamento de várias doenças vasculares envolvendo eventos isquêmicos, tais como insuficiência cerebrovascular e insuficiência vascular periférica⁽¹⁰⁾, bem como experimentalmente no tratamento de lesões isquêmicas intestinais⁽¹¹⁾, cardíacas⁽¹²⁾ e retinianas⁽¹³⁾. O EGB atua protegendo a célula endotelial da diminuição do ATP induzido pela hipóxia⁽¹⁴⁾, funciona como um importante depurador de radicais livres⁽¹⁵⁾ e antagonista do Fator Ativador de Plaquetas – PAF⁽¹⁶⁾, além de parecer apresentar um importante papel na inibição da formação de Óxido Nítrico⁽¹⁷⁾.

OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi investigar o possível papel do EGB na sobrevida de retalhos cutâneos randomizados em ratos, comparando-o com o grupo controle.

MATERIAIS E MÉTODOS

MODELO EXPERIMENTAL

Vinte ratos Wistar (180-200 g) foram divididos em dois grupos de 10 animais, e o retalho cutâneo randomizado de dorso foi realizado em cada rato. O modelo utilizado foi aquele descrito por McFarlane⁽¹⁸⁾ e modificado por Hammond⁽¹⁹⁾. Todos os procedimentos foram realizados sob anestesia e depois os animais foram colocados em gaiolas separadas recebendo água e comida *ad libitum*. Todos os retalhos tiveram base caudal medindo 2 x 7 cm (Fig. 1). Um segmento triangular de pele de 2 cm foi confeccionado no ápice do retalho (Fig. 2). Deste segmento de pele retirou-se o panículo carnoso para viabilizar sua enxertia na base do retalho (Fig. 3). A ferida cirúrgica foi fechada (Fig. 4) e o retalho suturado sobre a área fechada, sendo dessa forma totalmente isolado do leito subjacente (Fig. 5).

GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os tratamentos foram iniciados 24 horas após a confecção dos retalhos e durante 5 dias, sendo os animais sacrificados no sexto dia para a avaliação dos resultados.

Grupo I (controle): os animais receberam 5 ml de solução fisiológica 0,9%, intraperitoneal, 1 vez ao dia, por 5 dias.

Grupo II: os animais receberam EGB (100 mg/kg), intraperitoneal, 1 vez ao dia, por 5 dias.

AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS

A área viável dos retalhos foi avaliada através da mensuração sobre uma folha vegetal milimetrada e os resultados foram expressos em cm² de tecido viável.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos em média \pm erro

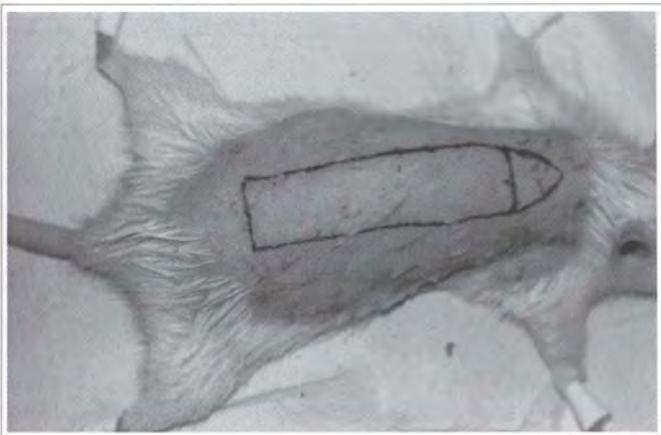


Fig. 1 - Marcação do retalho cutâneo randomizado do dorso do rato.

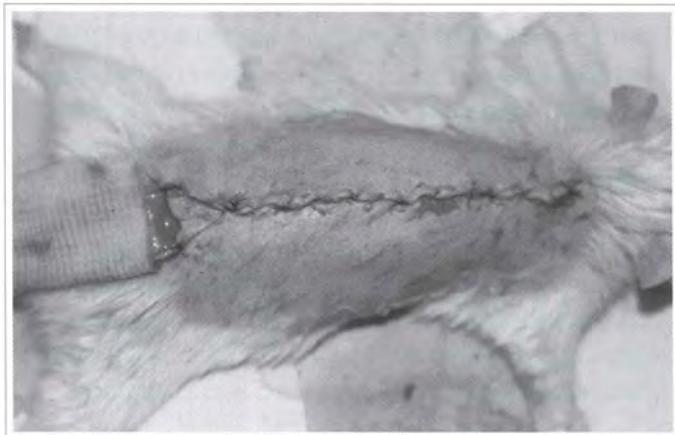


Fig. 4 - Fechamento da área doadora do retalho cutâneo randomizado do dorso do rato.

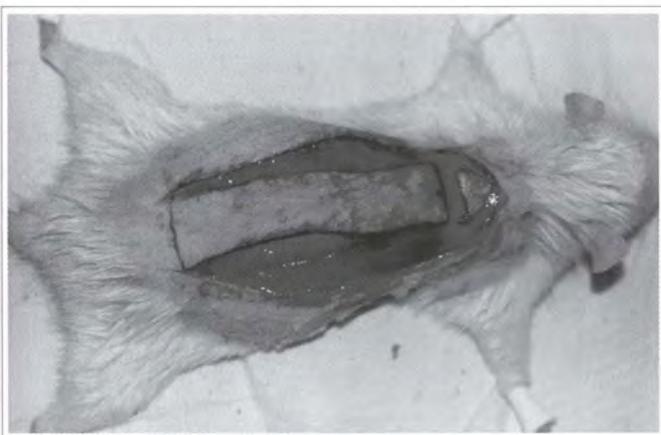


Fig. 2 - Incisão do retalho cutâneo randomizado do dorso do rato.

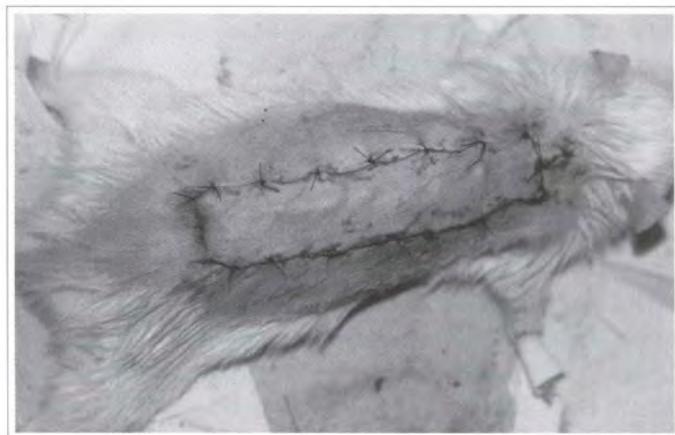


Fig. 5 - Fixação do retalho cutâneo randomizado do dorso do rato sobre sua área doadora fechada.

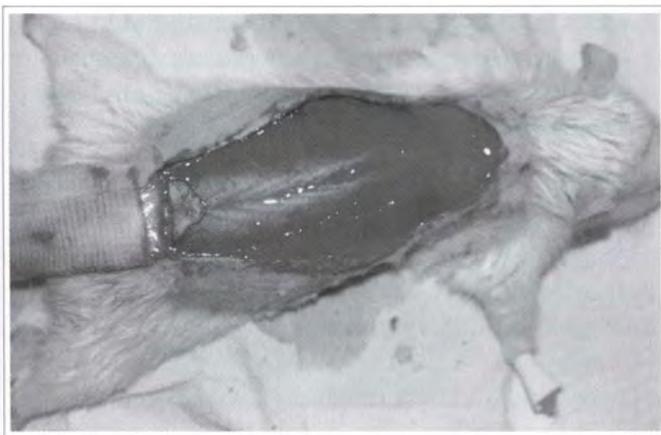


Fig. 3 - Enxertia do segmento triangular na base do retalho cutâneo randomizado do dorso do rato.



Fig. 6 - Delimitação clara entre a área viável e a não viável, com necrose em espessura total da porção distal do retalho cutâneo randomizado do dorso do rato.

padrão da média (EPM), sendo as comparações das médias do grupo controle e do grupo tratado com EGB realizadas por meio de análise de variância, seguido do teste t de Student, sendo considerado significativo quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Nenhum retalho realizado apresentou deiscência, processo inflamatório, infecção ou hematoma que pudesse comprometer o resultado final. Ocorreu uma morte cirúrgica no grupo I e duas no grupo II, porém todas ocorreram antes do início dos tratamentos.

Após 24 horas, os retalhos apresentaram uma coloração arroxeada em sua porção distal, porém sem uma demarcação clara entre a área viável e a não viável. Após 3 dias de tratamento, os retalhos já mostravam uma delimitação mais evidente do nível de necrose, a qual em sua maior parte era em espessura total. No sexto dia após a confecção dos retalhos, quando os animais foram sacrificados para a aferição dos resultados, o grau de necrose já estava totalmente definido, com delimitação clara entre a área viável e a não viável (Fig. 6).

O tratamento dos ratos com EGB por 5 dias aumentou de forma significativa a área de sobrevida dos retalhos quando comparada à do grupo controle ($p < 0,001$) (Figs. 7 e 8). A média de sobrevida dos retalhos no grupo controle foi de $2,702 \pm 0,195 \text{ cm}^2$ ($n=9$) e no grupo tratado com EGB foi de $5,490 \pm 0,283 \text{ cm}^2$ ($n=8$) (Tabela I) (Fig. 9).

Tabela I

Animal	Controle	EGB
1	3,26	4,81
2	2,68	5,18
3	2,66	5,63
4	2,80	4,33
5	2,89	5,62
6	3,70	6,64
7	1,65	5,54
8	2,25	5,17
9	2,43	-

Área de sobrevida dos retalhos nos grupos controle e tratados com extrato de Ginkgo Biloba – EGB (cm^2).

DISCUSSÃO

No presente trabalho nós reproduzimos o modelo experimental de perda aguda de retalho cutâneo randomizado descrito por McFarlane⁽¹⁸⁾ e modificado por Hammond⁽¹⁹⁾. Observou-se neste estudo que o Extrato de Ginkgo Biloba é uma droga efetiva na prevenção da necrose de retalho, uma vez que sua administração intraperitoneal por 5 dias foi capaz de aumentar de forma significativa ($p < 0,001$) a área de sobrevida dos retalhos cutâneos randomizados do dorso dos ratos.

A opção pela utilização desse modelo experimental modificado baseou-se nos seguintes fatos: i) a comparação direta do padrão de necrose e eventual sobrevida do retalho em ratos demonstrou que a porção distal do retalho, quando fixada diretamente sobre seu leito doador, é influenciada significativamente pelo efeito enxerto do leito receptor; ii) em humanos, sendo os retalhos geralmente mais espessos, um retalho recém-elevado é inicialmente dependente do suporte metabólico de seu pedículo, sendo o efeito enxerto pouco importante na sobrevida do retalho⁽¹⁸⁾; iii) a estratégia de separação do retalho do leito com o uso de tiras de plástico ou silicone utilizada por alguns autores⁽¹⁾ é uma solução imperfeita para o problema, sendo observados casos de intenso processo inflamatório, secreção, infecção, deiscência e perda do retalho⁽¹⁹⁾.

Com o fechamento da ferida cirúrgica abaixo do retalho, seu suporte metabólico fica limitado ao pedículo. Isso nos proporciona um modelo controlado de perda aguda de retalho, podendo ser considerado um teste rigoroso de sobrevida de retalhos, semelhante àqueles que ocorrem clinicamente quando um retalho é transposto para uma área severamente irradiada ou com excessivo tecido cicatricial, em que a revascularização pode ser mínima.

A Ginkgo Biloba (Ginkgoaceae) é uma antiga planta chinesa que vem sendo cultivada há séculos por ser considerada sagrada pelos seus efeitos medicinais. O extrato é preparado com folhas secas da planta. O Extrato de Ginkgo Biloba (EGB) é padronizado para possuir 24% de ginkgoflavanóides, 6% de terpenos (ginkgolídeos e bilobalídeos) e outros compostos não caracterizados⁽¹⁰⁾.

O efeito do EGB no aumento da sobrevida dos retalhos pode ser atribuído a uma série de fatores. Acreditamos que os mais importantes sejam: i) o



Fig. 7 - Comparação entre um animal do grupo controle (acima) e outro do grupo tratado com extrato de Ginkgo Biloba sobrevida do retalho cutâneo randomizado do dorso do rato.

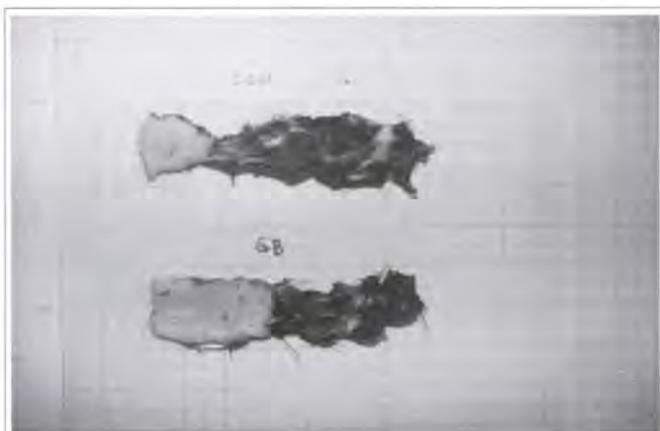


Fig. 8 - Comparação entre os retalhos cutâneos randomizados do dorso de ratos tratados com salina (CON) e com extrato de Ginkgo Biloba (GB). Os retalhos foram retirados dos animais e colocados sobre uma folha de papel milimetrado para facilitar a comparação.

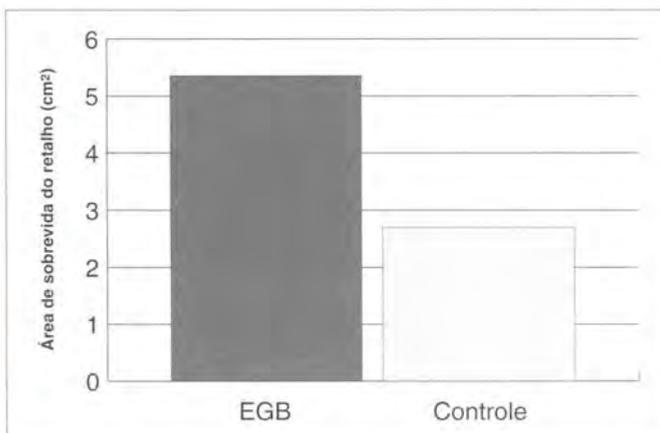


Fig. 9 - Aumento da sobrevida dos retalhos cutâneos randomizados com o tratamento dos animais com extrato de Ginkgo Biloba. Os resultados são expressos em média \pm EPM. Controle - n=9; EGB - n=8. $p < 0,001$.

potente papel como depurador de radicais livres dos flavanóides presentes no EGB, bem como o efeito inibitório sobre a formação de radicais livres atribuído a sua porção terpênica^(11, 12, 13, 15); ii) o ginkgolídeo B, presente na porção terpênica, atuando como um importante inibidor do Fator Ativador de Plaquetas - PAF⁽¹⁶⁾; iii) o efeito protetor da porção terpênica, principalmente dos bilobalídeos, sobre a mortalidade das células endoteliais induzida pela hipóxia, bem como a prevenção da diminuição do ATP induzida pela hipóxia⁽¹⁴⁾; e iv) a inibição da expressão do RNA mensageiro da enzima NO-sintase pelo EGB, provocando um bloqueio na síntese de Óxido Nítrico⁽¹⁷⁾.

O EGB pode atuar como um somatório das ações de seus diversos componentes, podendo um componente amplificar o efeito do outro. Semelhante ao que ocorre em outros processos inflamatórios⁽²⁰⁾, a formação de Óxido Nítrico pode ser o evento final na perda distal do retalho, sendo esta estimulada por uma série de citocinas e fatores de crescimento, entre eles o PAF, o qual é fortemente inibido pelo ginkgolídeo B presente na porção terpênica do EGB.

Acreditamos que o EGB possa ser uma droga útil no manuseio de retalhos cutâneos com sofrimento distal, entretanto o mecanismo através do qual ele atua necessita de maior esclarecimento, a fim de podermos ter maior segurança para definir sua indicação ideal.

CONCLUSÃO

O tratamento dos animais com Extrato de Ginkgo Biloba foi capaz de aumentar de forma significativa ($p < 0,001$) a área de sobrevida de retalhos cutâneos randomizados no modelo experimental de retalho de dorso do rato, descrito por McFarlane⁽¹⁸⁾ e modificado por Hammond⁽¹⁹⁾. Demais estudos experimentais devem ser realizados para elucidar melhor o mecanismo através do qual o EGB exerce seu efeito protetor sobre o sofrimento dos retalhos.

BIBLIOGRAFIA

1. Knight KR. Review of postoperative pharmacological infusions in ischemic skin flaps. *Microsurgery* 1994; 15:675-84.
2. Emery FM, Koday TR, Bomberger RA, et al. The effect of nifedipine on skin flap survival. *Plast Reconstr Surg*. 1990; 85:61-4.

3. Hawkes JS, Young CMA, Cleland LG. Ischemia reperfusion injury in pedicle skin flaps in the pig: lack of protective effect of SOD and allopurinol. *Br J Plast Surg.* 1989; 42:668-71.
4. Kirshner RE, Fyfe BS, Hoffman LA, et al. Ischemia reperfusion injury in myocutaneous flaps: role of leukocytes and leukotrienes. *Plast Reconstr Surg.* 1997; 99:1485-95.
5. Stotland MA, Kerrigan CL. The role of Platelet-Activating Factor in Musculocutaneous flap reperfusion injury. *Plast Reconstr Surg.* 1997; 99:1989-99.
6. Um SC, Suzuki S, Toyokuni S, et al. Involvement of Nitric Oxide in survival of random pattern skin flap. *Plast Reconstr Surg.* 1998; 101:785-92.
7. Banbury J, Siemionow M, Porvasnik S, et al. Improved perfusion after subcritical ischemia in muscle flaps treated with vascular endothelial growth factor. *Plast Reconstr Surg.* 2000; 7:1541-6.
8. Most D, Hoyt J, Sibley RK, et al. Parenchymal cytokine expression precedes clinically observed ischemia in dorsal flaps in the rat. *Plast Reconstr Surg.* 1996; 5:856-61.
9. Palombo JD, Blackburn GL and Forse RA. Endothelial cell factors and response to injury. *Surgery.* 1991; 173:505-18.
10. De Feudis FV. Ginkgo biloba extract (Egb 761): Pharmacological activities and clinical applications. Paris: Editions Scientifiques Elsevier, 1991.
11. Colak O, Sahin A, Alatas O, et al. The effect of Ginkgo biloba on the activity of catalase and lipid peroxidation in experimental strangulation ileus. *Int J Clin Lab Res.* 1998; 28:69-71.
12. Pietri S, Seguin JR, d'Arbigny P, et al. Ginkgo biloba extract (Egb 761) pretreatment limits free radical-induced oxidative stress in patients undergoing coronary bypass surgery. *Cardiovasc Drugs Ther.* 1997; 11:121-31.
13. Szabo ME, Droy-Lefaix MT, Doly M, et al. Free radical-mediated effects in reperfusion injury: a histologic study with superoxide dismutase and EGB 761 in rat retina. *Ophthalmic Res.* 1991; 23:225-34.
14. Janssens D, Michiels C, Delaive E, et al. Protection of hypoxia-induced ATP decrease in endothelial cells by ginkgo biloba extract and bilobalide. *Biochem Pharmacol.* 1995; 50:991-9.
15. Seif-El-Nasr M, El-Fattah AA. Lipid peroxide, phospholipids, glutathione levels and superoxide dismutase activity in rat brain after ischaemia: effect of ginkgo biloba extract. *Pharmacol Res.* 1995; 32:273-8.
16. Guinot P, Caffrey E, Lambe R, et al. Tanakan inhibits platelet-activating-factor-induced platelet aggregation in healthy male volunteers. *Haemostasis.* 1989; 19:219-23.
17. Varga E, Bodi A, Ferdinandy P, et al. The protective effect of EGb 761 in isolated ischemic/reperfused rat hearts: a link between cardiac function and nitric oxide production. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1999; 34:711-7.
18. McFarlane RM, DeYoung G, and Henry RA. The design of a pedicle flap in the rat to study necrosis and its prevention. *Plast Reconstr Surg.* 1965; 35:177-9.
19. Hammond DC, Brooksher RD, Mann RJ, et al. The dorsal skin-flap model in the rat: factors influencing survival. *Plast Reconstr Surg.* 1993; 91:316-21.
20. Souza-Filho MVP, Lima MVA, Pompeu MML, Ballejo G, Cunha FQ, Ribeiro RA. Involvement of Nitric Oxide in the Pathogenesis of Cyclophosphamide-Induced Hemorrhagic Cystitis. *Am J Pathol* 1997; 150:247-56.