

Avaliação da exposição e interrupção da nicotina em tempos diferentes na evolução de retalho cutâneo ao acaso de dorso de ratos por meio de fluxometria a laser e de picrosírius

Assessment of the exposure and interruption of nicotine at different times in the rats' dorsum random cutaneous flap evolution by laser flowmetry and picrosirius

GUATAÇARA SCHENFELDER

SALLES JÚNIOR¹,

ROWILSON CLEBER DE MELO²,

FERNANDO ROBERTO

SCHMIDT²,

FERNANDO HINTZ GRECA³,

ULRICH DIETZ⁴,

UBIRAJARA ARAÚJO⁵,

CRISTIANO MACHADO INÁCIO⁵,

OSVALDO MALAFAIA⁶,

PAULO AFONSO NUNES NASSIF⁷,

JURANDIR MARCONDES

RIBAS FILHO⁸

Trabalho realizado no Instituto de Pesquisas Médicas (IPEM) do Programa de Pós-Graduação em Princípios da Cirurgia da Faculdade Evangélica do Paraná (FEPAR); e no Laboratório de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, PR.
Artigo recebido: 08/04/2008
Artigo aceito: 10/09/2008

RESUMO

Introdução: Os benefícios da interrupção do tabagismo previamente à cirurgia ainda não estão bem definidos. **Objetivo:** Avaliar a influência da interrupção da nicotina em um retalho cutâneo, por meio da fluxometria a laser e com picrosírius. **Método:** Foram utilizados 56 ratos, divididos em grupos expostos à nicotina 2mg/kg/dia, e a 0,5mg/kg/dia, e somente à solução salina. Os animais foram subdivididos de acordo com o tempo de exposição, em 1 e 2 semanas de interrupção previamente à cirurgia e tratamento ininterrupto até 10 dias do pós-operatório. Após o 10º dia, foram avaliados os retalhos cutâneos do dorso do animal, por meio de fluxometria a laser, formação de colágeno, e diferenciação em maduro e imaturo, pelo picrosírius. **Resultados:** A fluxometria foi maior no controle e nos grupos de baixas doses. A interrupção da droga mostrou aumento da fluxometria somente nos grupos de baixa dose. A proporção de colágeno maduro para imaturo foi inversamente proporcional à dose e ao tempo de exposição à droga. **Conclusões:** A nicotina prejudica a evolução de um retalho cutâneo do dorso de ratos, sendo dependente da dose. O tempo de interrupção altera a fluxometria e a proporção de formação de colágeno, quando dada em baixa dose.

Descritores: Nicotina. Fluxometria por laser-doppler. Retalhos cirúrgicos. Picratos.

SUMMARY

Introduction: The benefits of the interruption of the tabagism previously the surgery not yet well are defined. **Objective:** The objective of this study was to assess the influence of the interruption of exposure to nicotine on a cutaneous flap, by laser flowmetry and picrosirius. **Method:** 56 rats were used, divided in groups and administred nicotine 2mg/kg/day, 0,5mg/kg/day and just saline solution. Animals were subdivided according to exposure time to the drug, that is, in one and two weeks' interruption prior to surgery, and constant treatment up to ten days after surgical procedure. They were organized in seven groups. A cutaneous flap was performed on the animals' dorsum and on the tenth day of PO the laser flow measurement and the formation of collagen and its differentiation in mature and immature by picrosirius. **Results:** The flowmetry was bigger in the control and the groups of low doses. The interruption of the drug only showed increase of the flowmetry in the groups of low dose. The ratio of mature colageno for immature was inversely proportional to the dose and the time of exposition to the drug. **Conclusion:** The nicotine harms the evolution of a remnant cutaneous of the back of rats, being dependent of the dose. The interruption time modifies the flowmetry and the ratio of formation of colageno, when given in low dose.

Descriptors: Nicotine. Laser-doppler flowmetry. Surgical flaps. Picrates.

1. Médico; Mestrado em Cirurgia, Membro especialista da Sociedade Brasileira de Cirurgia Plástica.
2. Médico.
3. Médico; Mestrado em Anatomia; Doutorado em Técnica Operatória e Cirurgia Experimental; Professor Associado da Universidade Federal do Paraná e Professor Titular da Pontifícia Universidade Católica do Paraná.
4. Médico; Mestrado em Clínica Cirúrgica, Doutorado em Clínica Cirúrgica; Pós-doutorado.
5. Médico; Mestrado em Cirurgia.
6. Médico; Doutorado em Anatomia Médica; Livre-Docência; Professor titular da Universidade Federal do Paraná, Coordenador do Instituto de Pesquisas Médicas do Hospital Universitário Evangélico de Curitiba e Professor titular da disciplina de Clínica Cirúrgica da Faculdade Evangélica do Paraná.
7. Médico; Mestrado em Clínica Cirúrgica; Doutorado em Clínica Cirúrgica; Professor adjunto da Faculdade Evangélica do Paraná.
8. Médico; Mestrado em Morfologia e em Clínica Cirúrgica; Doutorado em Clínica Cirúrgica; Professor titular da Faculdade Evangélica do Paraná.

INTRODUÇÃO

Os efeitos deletérios da exposição à nicotina constituem um grande problema no âmbito da cirurgia plástica, muitas vezes comprometendo resultados e levando a conseqüências extremamente graves, como necroses parciais ou até mesmo totais de retalhos¹.

Diversos estudos já comprovaram as ações maléficas da nicotina na vascularização de retalhos, especialmente em retalhos cutâneos, porém ainda hoje não se compreende muito sobre os efeitos da interrupção do tabagismo previamente a uma cirurgia²⁻⁴.

OBJETIVOS

1. Verificar por meio da fluxometria a laser o fluxo sanguíneo nos retalhos cutâneos de ratos expostos a doses altas e baixas de nicotina, bem como, após sua interrupção em diferentes períodos de tempo.
2. Quantificar a formação de colágeno e diferenciar a porcentagem de colágeno maduro e imaturo nos retalhos cutâneos de ratos expostos a diferentes quantidades de nicotina, bem como, após a interrupção desta exposição por diferentes períodos de tempo.

MÉTODO

O estudo foi realizado no Instituto de Pesquisas Médicas (IPEM) do Programa de Pós-Graduação em Princípios da Cirurgia da Faculdade Evangélica do Paraná (FEPAR), no Laboratório de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental da Pontifícia Universidade Católica do Paraná e com apoio e colaboração da Universidade de Würzburg, na Alemanha.

Utilizaram-se para este experimento 56 ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia*), da linhagem Wistar, procedentes do Laboratório de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, com idades entre 100 a 120 dias e pesos variando de 200 a 320 gramas, distribuídos em 7 grupos com 8 animais cada um.

Os 56 animais foram separados em três grupos principais. Grupo nicotina 2mg/kg (n=24), grupo nicotina 0,5mg/kg (n=24) e grupo controle (n=8). Os grupos submetidos a exposição de nicotina foram subdivididos em 3 subgrupos, de acordo com o tempo de exposição e interrupção da nicotina.

O grupo exposto à nicotina 2mg/kg (n=24) foi subdividido em A, B e C, sendo A: tratamento diário com nicotina durante 4 semanas, procedimento cirúrgico e continuidade do tratamento por mais 10 dias do pós-operatório; B: tratamento diário com nicotina por 4 semanas, interrupção do tratamento por uma semana, procedimento cirúrgico e manutenção sem tratamento por mais 10 dias do pós-operatório; e C: tratamento diário com nicotina e interrupção por duas

semanas, procedimento cirúrgico e manutenção sem tratamento por mais 10 dias do pós-operatório.

O grupo exposto à nicotina 0,5mg/kg (n=24) foi subdividido em D, E e F, sendo D: tratamento diário com nicotina durante 4 semanas, procedimento cirúrgico e continuidade do tratamento por mais 10 dias do pós-operatório; E: tratamento diário com nicotina durante 4 semanas, interrupção do tratamento por uma semana, procedimento cirúrgico e manutenção sem tratamento por mais 10 dias do pós-operatório; e F: tratamento diário com nicotina durante 4 semanas, interrupção do tratamento por duas semanas, procedimento cirúrgico e manutenção sem tratamento por mais 10 dias do pós-operatório.

Utilizou-se nicotina com 99,8% de pureza.

Os animais foram induzidos à anestesia geral pela administração intramuscular de ketamina (50mg/kg) e xilazina (10mg/kg)⁵.

Procedeu-se à marcação da área do retalho retangular que se estendeu desde o ângulo inferior das escápulas até 8cm para baixo, com largura de 4cm, e então deslocado e elevado o retalho, em seguida reposicionado em seu leito de origem e fixado por sutura com pontos simples e separados de nylon 5/0 monofilamentar.

Após a cirurgia, os animais retornaram para suas respectivas caixas, e foram observados até o 10º dia do pós-operatório, quando foram submetidos a eutanásia por inalação letal de éter sulfúrico.

Após a morte dos animais, foram coletados fragmentos de tecido na área de transição (necrose e tecido sadio), que foram imediatamente colocados em frascos com solução de formalina tamponada para fixação tecidual.

Foi aplicada a avaliação do fluxo sanguíneo em oito pontos previamente demarcados nos retalhos cutâneos. Para este propósito foi utilizado o fluxômetro por laser-Doppler. Este método usa tecnologia a laser, a qual é capaz de analisar aproximadamente 1,0 mm a 1,5 mm de profundidade na maioria dos tecidos biológicos. A análise é feita pela detecção do fluxo de células sanguíneas vermelhas, e mensurada por ml de sangue que flui em um minuto, dividido por 100 gramas de tecido (ml/min/100g).

A avaliação quantitativa do colágeno existente na linha de sutura do retalho cutâneo foi feita mediante uso da coloração histológica sirius-red, também conhecida como picrossirius.

Para leitura microscópica dessa coloração utilizou-se microscopia óptica com fonte de luz polarizada com 400 aumentos.

As imagens microscópicas foram captadas e transmitidas a um microcomputador, onde foram analisadas.

RESULTADOS

Houve uma variância do fluxo sanguíneo entre os grupos estudados, sobretudo nos pontos de avaliação mais

proximais (D1, D2, D3, E1, E2, E3), e quando se avaliaram os pontos mais distais do retalho cutâneo (D4, E4 e E3) foram detectadas diferenças estatísticas significativas. Quando se comparou o grupo controle com os grupos submetidos a exposição de dose alta de nicotina, observou-se uma diferença estatisticamente significativa nos pontos D4 e E3 ($p < 0,05$). Não foi encontrada significância estatística quando o grupo controle foi comparado aos grupos expostos a baixa dose de nicotina. No entanto, a correlação dos grupos expostos a alta e baixa dose de nicotina também se mostrou significativa ($p < 0,05$) no ponto D4. A comparação dos grupos sem interrupção da exposição de nicotina com os grupos com interrupção por 1 ou 2 semanas antes da cirurgia observou significância estatística no ponto E4 na comparação dos grupos D com o E e F ($p < 0,05$), havendo um aumento do fluxo sanguíneo nos 2 últimos grupos (Tabela 1, Figuras 1 e 2).

Quando se analisou a área total de formação de colágeno, o grupo controle e o grupo E foram os que tiveram as maiores áreas. Nos grupos expostos a altas doses de nicotina, esta formação foi menor, notadamente no grupo A, seguido pelos grupos B e C (Tabela 2, Figuras 3 a 5).

Quando se estudou o bordo distal dos retalhos, houve maior formação de colágeno maduro no grupo controle quando comparado aos demais, sendo esta diferença

estatisticamente significativa quando se comparou o controle com todos os demais grupos ($p < 0,001$), excetuando-se o grupo F. A taxa de formação de colágeno maduro foi crescente do grupo A até o F. Verificaram-se resultados significativos estatisticamente quando se compararam os grupos expostos a alta dose de nicotina com os de baixa dose ($p < 0,001$). Quando os grupos de baixa dose se compararam foi observada significância estatística entre os grupos D e E ($p = 0,046$) e D e F ($p = 0,019$) (Tabela 3, Figuras 6 a 10).

DISCUSSÃO

São poucos os estudos que abordam tempos de interrupção da nicotina em relação à vascularização e à cicatrização de retalhos. Este tempo é de extrema importância na prática diária da cirurgia plástica.

Embora este estudo tenha sido procedido em ratos, foi optado por um esquema que simulasse um fumante leve e um pesado a curto prazo de exposição à nicotina⁶.

Quanto à via de escolha para administração da droga, foi optado pela via subcutânea⁶.

Quanto à escolha do retalho, foi necessária a confecção de um retalho que se mostrasse isquêmico, permitindo a identificação dos efeitos da nicotina⁷.

Tabela 1 – Resultados da fluxometria a laser nos diferentes pontos estudados, de acordo com os diferentes grupos.

Grupo	D1	D2	D3	D4	E1	E2	E3	E4
Controle	5,37	4,87	4,33	3,12	6,34	6,00	5,37	3,84
A	5,93	5,10	3,72	2,33	6,49	4,19	3,06	2,19
B	5,49	4,59	4,18	2,25	4,17	5,82	2,72	3,29
C	4,26	4,36	1,96	1,03	4,06	4,97	3,17	2,60
D	7,33	4,61	5,09	2,65	6,33	5,60	3,41	0,56
E	6,09	6,40	4,32	4,18	6,16	6,35	4,68	3,86
F	3,81	3,49	2,95	3,02	4,28	3,51	2,74	2,48



Figura 1 – Resultado do fluxo sanguíneo de um dos pontos do retalho no monitor do fluxômetro a laser.

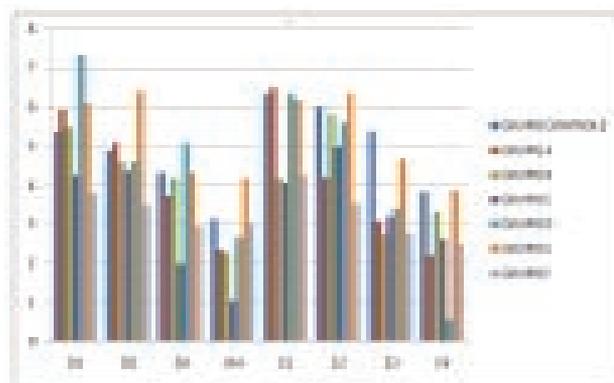


Figura 2 – Demonstração gráfica da fluxometria a laser nos 8 pontos estudados, de acordo com cada grupo.

Tabela 2 – Resultados do picosirius referentes à área total de formação de colágeno.

Grupo	Bordo Direito	Bordo Esquerdo	Bordo Inferior
Controle	718,15	766,21	882,78
A	431,40	505,15	646,31
B	645,12	637,15	892,28
C	717,96	616,0	795,21
D	573,5	771,31	845,46
E	872,34	870,40	918,37
F	737,93	700,87	518,03

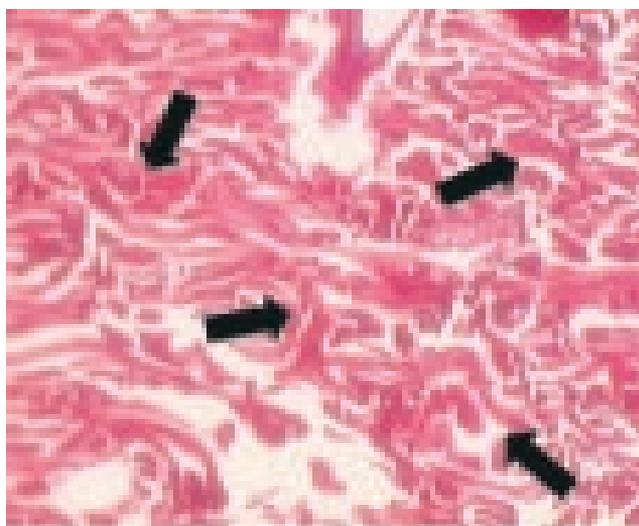


Figura 3 – Fotomicrografia de retalho cutâneo com formação de colágeno pouco denso. Peça do bordo direito do retalho cutâneo no 10º dia de pós-operatório, rato nº 9 do grupo A (coloração picosirius). Áreas de escassa formação de colágeno (setas).

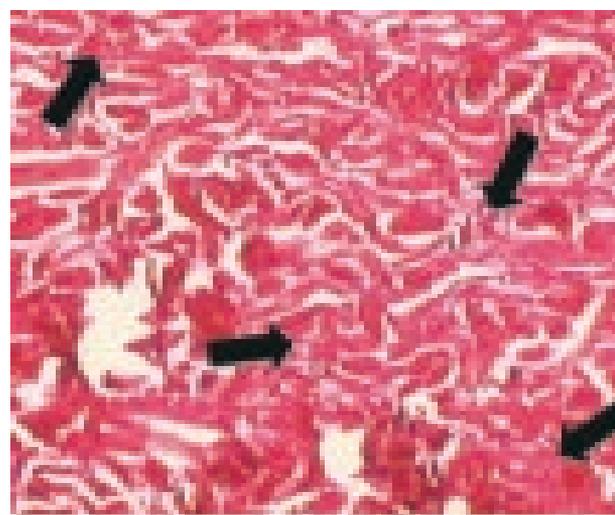


Figura 4 – Fotomicrografia de retalho cutâneo com formação de colágeno denso. Peça do bordo esquerdo do retalho cutâneo no 10º dia de pós-operatório, rato nº 7 do grupo controle (coloração picosirius). Áreas de densa formação de colágeno (setas).

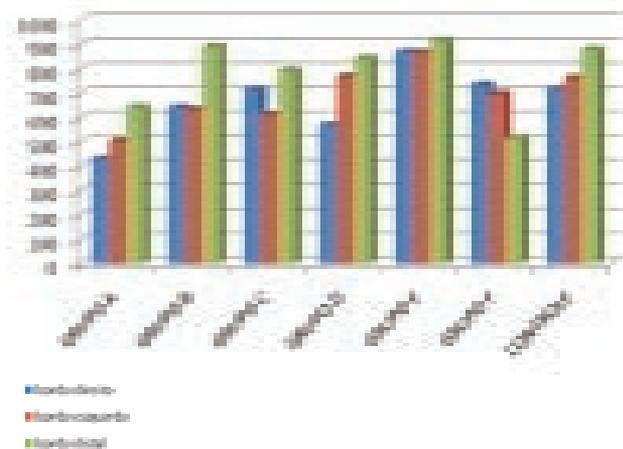


Figura 5 – Demonstração gráfica das médias de área total de formação de colágeno em cada um dos bordos do retalho cutâneo, de acordo com os diferentes grupos.

Sem lançar mão da fluxometria a laser, já havia sido mostrado que a nicotina induz uma vasoconstrição, diminuindo fluxo sanguíneo cutâneo em 30 a 40%⁸. Tais resultados foram ao encontro de outros já citados, que mostraram uma diminuição significativa do fluxo sanguíneo capilar, além de uma perfusão distal prejudicada em retalhos cutâneos de ratos expostos à nicotina⁴. Foi observada também vasoconstrição cutânea, além de diminuição da temperatura da pele em resposta à nicotina, fortalecendo e corroborando assim as leituras de fluxometria aqui encontradas⁹.

A fluxometria permite uma avaliação mais acurada da vascularização de retalhos, quantificando objetivamente, pela atribuição de um valor numérico, o fluxo sanguíneo em um determinado ponto, o que a torna um exame confiável e de grande importância na avaliação de retalhos cutâneos, diferindo significativamente no pós-operatório entre retalhos que viveram e que morreram, afirmando assim o valor do seu monitoramento¹⁰.

Tabela 3 – Diferenciação em colágeno maduro e imaturo entre os grupos.

Grupo	Bordo Direito		Bordo Esquerdo		Bordo Distal	
	Mad.	Imat.(%)	Mad.	Imat.(%)	Mad.	Imat.(%)
Controle	34,6	65,4	29,4	70,6	49,2	50,8
A	27,2	72,8	23,8	76,2	19,7	80,3
B	21,0	79,0	16,6	83,4	20,8	79,2
C	45,2	54,8	41,2	58,8	28,4	71,6
D	21,5	78,5	18,7	81,3	29,1	70,9
E	32,2	67,8	29,5	70,5	39,2	60,8
F	30,2	69,8	32,2	67,8	41,7	58,3



Figura 6 – Fotomicrografia do colágeno polarizado evidenciando grande densidade de colágeno imaturo. Peça do bordo distal do retalho cutâneo no 10º dia de pós-operatório, rato nº 18 do grupo B (coloração picrosírius – colágeno polarizado). Grande formação de colágeno imaturo em relação ao maduro (setas), constatada pela coloração verde-azulada.



Figura 7 – Fotomicrografia do colágeno polarizado com grande densidade de colágeno imaturo. Peça do bordo distal do retalho cutâneo no 10º dia de pós-operatório, rato nº 7 do grupo controle (coloração picrosírius – colágeno polarizado). Formação de colágeno maduro (setas), constatada pela tonalidade vermelho-alaranjada.

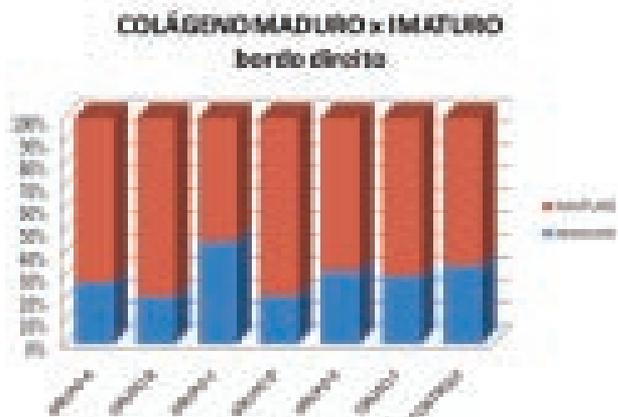


Figura 8 – Demonstração gráfica da formação de colágeno maduro e imaturo no bordo direito do retalho cutâneo, de acordo com os diferentes grupos.



Figura 9 – Demonstração gráfica da formação de colágeno maduro e imaturo no bordo esquerdo do retalho cutâneo, de acordo com os diferentes grupos.

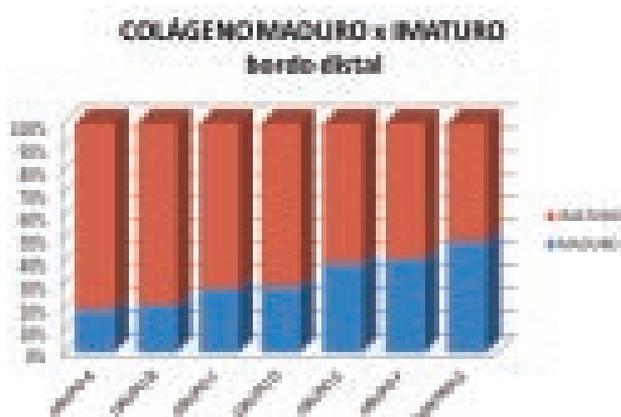


Figura 10 – Demonstração gráfica da formação de colágeno maduro e imaturo no bordo distal do retalho cutâneo, de acordo com os diferentes grupos.

A explicação para a síntese deficiente de colágeno nos ratos expostos à nicotina era de que os retalhos isquêmicos, decorrentes da exposição à nicotina no presente estudo, geravam tensões que só permitiam a divisão celular do fibroblasto, já que uma tensão maior era requerida para síntese de colágeno. Diversos outros autores reiteraram tais observações^{11,12}.

CONCLUSÃO

A fluxometria a laser se mostrou diminuída nos pontos mais distais de avaliação dos retalhos dos ratos expostos à alta dose de nicotina, o mesmo não sendo verificado no grupo de baixa dose. A interrupção da droga, seja por 1 ou 2 semanas, não alterou as medidas fluxométricas no grupo de alta dose, porém no de baixa dose houve uma melhora no fluxo sanguíneo.

A proporção de colágeno maduro para imaturo foi menor à medida que a dose de nicotina aumentou e à medida que o

tempo de exposição à droga foi maior e sem interrupção, só se verificando interferência desta última nos grupos de baixa dose e não havendo diferenciação entre 1 ou 2 semanas.

REFERÊNCIAS

1. Mosely LH, Finseth F, Goody M. Nicotine and its effect in wound healing. *Plast Reconstr Surg.* 1978;61(4):570-5.
2. Kaufman T, Eichenlaub EH, Levin M, Hurwitz DJ, Klain M. Tobacco smoking: impairment of experimental flap survival. *Ann Plast Surg.* 1984;13(6):468-72
3. Craig S, Rees TD. The effects of smoking on experimental skin flaps in hamsters. *Plast Reconstr Surg.* 1985;75(6):842-6
4. Forrest CR, Xu N, Pang CY. Evidence for nicotine-induced skin flap ischemic necrosis in the pig. *Can J Physiol Pharmacol.* 1994;72(1):30-8.
5. Bacelar Júnior JCS. Avaliação da ação das drogas hidrato de cloral, cetamina/xilazina e tiopental sódico na anestesia em ratos [Dissertação de Mestrado]. Curitiba: Instituto de Pesquisa Médicas, Faculdade Evangélica de Medicina do Paraná;1999. 49p.
6. 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.
7. 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;35:177-82.
8. Richardson D, Morton R, Howard J. Effects of chronic nicotine administration on RBC velocity in mesenteric capillaries of the rat. *Blood Vessels.* 1977;14(5):318-24.
9. van Adrichem LN, Hovius SE, van Strik R, van der Meulen JC. Acute effects of cigarette smoking on microcirculation of the thumb. *Br J Plast Surg.* 1992;45(1):9-11.
10. van Adrichem LN, Hoegen R, Hovius SE, Kort WJ, van Strik R, Vuzevski VD, et al. The effect of cigarette smoking on the survival of free vascularized and pedicled epigastric flaps in the rat. *Plast Reconstr Surg.* 1996;97(1):86-96.
11. Medeiros AC, Rocha KFB, Dantas Filho AM, Aires Neto T, Azevêdo IM. Lesões pulmonares provocadas pela nicotina por via subcutânea em ratos. *Acta Cir Bras.* 2003;18(suppl. 1):24-7.
12. Kivisaari J, Vihersaari T, Renvall S, Niinikoski J. Energy metabolism of experimental wounds at various oxygen environments. *Ann Surg.* 1975;181(6):823-8.

Correspondência para:

Rowilson C. Melo
Rua Comendador Roseira, 164, ap 23 – Prado Velho – Curitiba, PR – CEP 80215-210
E-mail: rowis106@hotmail.com