

EFEITO DA TERAPIA HIPERBÁRICA EM MODELO EXPERIMENTAL DE RETALHO CUTÂNEO EM RATOS COM CONGESTÃO VENOSA OU ISQUEMIA ARTERIAL

EFFECT OF HYPERBARIC THERAPY IN EXPERIMENTAL CUTANEOUS RETAIL MODEL IN RATS WITH VENOUS CONGESTION OR ARTERIAL ISCHEMIA

EFFECTO DE LA TERAPIA HIPERBÁRICA EN MODELO EXPERIMENTAL DE RETRATO CUTÂNEO EN RATOS CON CONGESTIÓN VENOSA O ISQUEMIA ARTERIAL

Eduardo Rogério Malaquias Chagas*, João Victor Sprioli Martins**, Giovanna Bredariol**

Resumo

Introdução: A utilização de tecido autólogo em reconstruções mamárias tem sido cada vez mais difundida, principalmente devido aos resultados estéticos melhores e mais duradouros; porém fatores de risco como: diabetes, tabagismo e obesidade acabam complicando este tipo de reconstrução. **Objetivo:** Avaliar a angiogênese tanto no modelo animal de isquemia arterial como no modelo animal de congestão venosa após a utilização de terapia hiperbárica no retalho cutâneo da parede abdominal de ratos. **Material:** Utilizamos o modelo animal para demonstrar o efeito da terapia hiperbárica na recuperação das áreas de necrose tecidual tanto no modelo de isquemia arterial quanto de congestão venosa. Os ratos foram divididos em 3 grupos e os resultados comparados. **Resultados:** Ficou demonstrado que a utilização de terapia hiperbárica permite a diminuição da área de necrose tecidual, principalmente no grupo com congestão venosa. Contudo, não está claro qual mecanismo permite que a terapia hiperbárica apresente melhores resultados no grupo com congestão venosa. **Conclusão:** Há necessidade de pesquisar novos marcadores teciduais para avaliar a resposta tecidual à adaptação ao microambiente com hipoxia e o efeito da terapia hiperbárica nesta situação.

Palavras-chave: Terapia hiperbárica. Isquemia arterial. Congestão venosa. Modelo animal.

Abstract

Introduction: The use of autologous tissue in breast reconstruction has been increasingly widespread, mainly due to better and more durable aesthetic results; but risk factors such as diabetes, smoking and obesity complicate this type of reconstruction. **Objective:** To evaluate angiogenesis in animal models of arterial ischemia and venous congestion after the use of hyperbaric therapy in the skin flap of the abdominal wall of rats. **Material:** We used the animal model to demonstrate the effect of hyperbaric therapy on the recovery of areas of tissue necrosis in arterial ischemia and venous congestion. The rats were divided into 3 groups and the results compared. **Results:** It has been demonstrated that the use of hyperbaric therapy allows the reduction of the area of tissue necrosis, especially in the group with venous congestion. However, it is not clear which mechanism allows hyperbaric therapy to show better results in the group with venous congestion. **Discussion:** It is not clear which mechanism allows hyperbaric therapy to present better results in the group with venous congestion. **Conclusion:** There is a need to investigate new tissue markers to evaluate the tissue response to adaptation to the hypoxic microenvironment and the effect of hyperbaric therapy in this situation.

Keywords: Hyperbaric therapy. Arterial ischemia. Venous congestion. Animal model.

Resumen

Introducción: La utilización de tejido autólogo en reconstrucciones de las mamas ha sido cada vez más difundida, principalmente debido a los resultados estéticos mejores y más duraderos; pero factores de riesgo como: diabetes, tabaquismo y obesidad acaban complicando este tipo de reconstrucción. **Objetivo:** Evaluar la angiogénesis tanto en el modelo animal de isquemia arterial como en el modelo animal de congestión venosa después del uso de terapia hiperbárica en el colgajo de piel de la pared abdominal de ratas. **Material:** Utilizamos el modelo animal para demostrar el efecto de la terapia hiperbárica en la recuperación de las áreas de necrosis tisular tanto en el modelo de isquemia arterial y de congestión venosa. Los ratones fueron divididos en 3 grupos y los resultados comparados. **Resultados:** Se ha demostrado que la utilización de terapia hiperbárica permite la disminución del área de necrosis tisular, principalmente en el grupo con congestión venosa. Sin embargo, no está claro qué mecanismo permite que la terapia hiperbárica muestre mejores resultados en el grupo con congestión venosa. **Conclusión:** Hay necesidad de investigar nuevos marcadores teciduales para evaluar la respuesta tisular a la adaptación al microambiente con hipoxia y el efecto de la terapia hiperbárica en esta situación.

Palabras clave: Terapia hiperbárica. Isquemia arterial. Congestión venosa. Modelo animal.

*Professor doutor da disciplina de Ginecologia do curso de Medicina do Centro Universitário Padre Albino (UNIFIPA), Catanduva-SP. Contato: eduardormchagas@gmail.com

**Acadêmicos do curso de Medicina do Centro Universitário Padre Albino (UNIFIPA), Catanduva-SP, Brasil.

Projeto desenvolvido no Laboratório de Investigação Médica junto ao Biotério do curso de Medicina do Centro Universitário Padre Albino (UNIFIPA), Catanduva-SP, Brasil.

INTRODUÇÃO

A transferência microcirúrgica de retalho cutâneo tem se tornado a técnica padrão na reconstrução mamária com retalhos autólogos. Esta técnica permite reconstruir uma mama com aparência mais natural, com consistência e permanência do resultado estético mais duradouro. Entretanto, complicações relacionadas a isquemia e a congestão venosa como necrose gordurosa e perda parcial do retalho acontecem em até 28% dos casos, independente da técnica empregada¹. Esta taxa de complicação é ainda maior se levarmos em consideração as pacientes com fatores de risco que incluem obesidade, tabagismo, diabetes e cicatrizes abdominais. Há um enorme interesse em desenvolver estratégias para aumentar o suprimento sanguíneo e melhorar as taxas de sucesso neste tipo de cirurgia. Inúmeros estudos com modelo animal sugerem que o uso de terapia hiperbárica pode aumentar a sobrevivência destes retalhos².

O mecanismo de ação da terapia hiperbárica permite elevar a pressão parcial de oxigênio em todos os tecidos. O efeito terapêutico mecânico da terapia hiperbárica faz com que haja redução dos espaços que contêm gases no corpo, principalmente na trama vascular. Quando o oxigênio é respirado a duas atmosferas causa vasoconstrição com redução de até 20% do fluxo sanguíneo nos músculos, levando a um aumento da tensão de oxigênio nos outros tecidos, atingindo valores de 250-300 mmHg quando a terapia hiperbárica é aplicada. A pressão parcial de O₂ normal é de 30-40 mmHg, no ambiente de isquemia os níveis de oxigênio caem abaixo de 30mmHg, estimulando o recrutamento de fibroblastos e leucócitos. A terapia hiperbárica acelera o recrutamento de fibroblastos e a síntese de colágeno permitindo o substrato para o rápido desenvolvimento da trama de capilares³.

O mecanismo de ação da terapia hiperbárica permite elevar a pressão parcial de oxigênio em todos os tecidos. O efeito terapêutico mecânico da terapia hiperbárica faz com que haja redução dos espaços que contêm gases no corpo, principalmente na trama vascular. Quando o oxigênio é respirado a duas atmosferas causa vasoconstrição com redução de até 20% do fluxo sanguíneo nos músculos, levando a um aumento da tensão de oxigênio nos outros tecidos, atingindo valores de 250-300 mmHg quando a terapia hiperbárica é aplicada. A pressão parcial de O₂ normal é de 30-40 mmHg, no ambiente de isquemia os níveis de oxigênio caem abaixo de 30mmHg, estimulando o recrutamento de fibroblastos e leucócitos. A terapia hiperbárica acelera o recrutamento de fibroblastos e a síntese de colágeno permitindo o substrato para o rápido desenvolvimento da trama de capilares³.

OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi avaliar a angiogênese tanto no modelo animal de isquemia arterial como no modelo animal de congestão venosa após a utilização de terapia hiperbárica no retalho cutâneo da parede abdominal de ratos.

MATERIAL E MÉTODO

Utilizamos 16 ratos Sprague-Dawley machos, adultos, com peso entre 300g a 500g, saudáveis, provenientes do biotério do Centro Universitário Padre Albino (UNIFIPA). Os animais permaneceram no biotério em gaiolas de polipropileno padrão, mantidos em temperatura e umidade constantes a 24 graus Celsius, em ciclo circadiano claro/escuro de 12H controlado eletronicamente, com livre acesso a água e ração própria para ratos.

A anestesia foi realizada com ketamina 100 mg/kg e xylazina 35 mg/kg intraperitoneal. O rato foi considerado anestesiado quando este se apresentava imóvel ao manuseio e houve perda do reflexo corneano, mas com frequência e amplitude respiratórias normais. Mantemos o plano anestésico com sistema aberto durante o procedimento. O peso corpóreo foi determinado em gramas após a anestesia no primeiro dia do experimento, através de balança eletrônica de precisão modelo AS20000.

Todos os animais foram submetidos a tricotomia da parede abdominal com máquina de tricotomia, seguida de limpeza local com sabão neutro líquido e água corrente e posterior secagem com gaze. Em seguida foram posicionados na prancheta cirúrgica com fita adesiva em decúbito dorsal, mantendo-se os membros em extensão.

Com auxílio de marcador permanente foi desenhado um retalho abdominal cutâneo na forma de U invertido com a técnica descrita por Matsumoto et al.⁴, com os seguintes limites: o limite do U invertido foi a intersecção da linha mediana vertical (entre o apêndice xifóide e o pubis) com a linha mediana horizontal; as extremidades do U invertido estão localizadas no pubis, medindo 1 cm cada (Figura 1).

Figura 1 – Desenho do flap

Os animais foram divididos em 3 grupos: grupo controle (4 ratos), grupo isquemia arterial (8 ratos), grupo congestão venosa (8 ratos).

Após a antisepsia local com solução aquosa de clorexedine, o retalho previamente marcado foi incisado com bisturi de lâmina 15 e elevado até à fáscia do músculo reto abdominal, mantendo-se preservadas a artéria e veia epigástrica inferior de cada lado. A ferida operatória foi mantida aberta em todos os ratos. Toda a dissecação foi realizada com auxílio de lupa de aumento modelo ZEISS (EyeMag Pro 5X).

A analgesia pós-operatória foi realizada em todos os grupos com a administração de meloxicam 30 mg/Kg via oral 1X/d, por 5 dias.

Figura 2 – Flap no pós-operatório

No grupo isquemia arterial foi realizado o mesmo procedimento cirúrgico que o descrito no grupo controle, com exceção de que a artéria epigástrica inferior do lado esquerdo foi ligada com fio mononylon 10-0 mantendo-se todos os outros vasos intactos.

Com a finalidade de bloquear qualquer suprimento sanguíneo dos tecidos adjacentes, foi colocado, antes da sutura, um pedaço de filme de poliuretano como método de barreira entre o retalho e o músculo reto abdominal.

O retalho foi imediatamente recolocado em sua posição original e suturado com pontos simples com fio inabsorvível mononylon 5-0 com distância de 5 mm entre os pontos, para melhor avaliar as áreas de necrose. A ferida operatória foi mantida aberta em todos os ratos.

No grupo congestão venosa foi realizado o mesmo procedimento cirúrgico que o descrito no grupo controle, com exceção de que a veia epigástrica inferior do lado esquerdo foi ligada com fio mononylon 10-0 (Ethicon, GA, USA), mantendo-se todos os outros vasos intactos.

Com a finalidade de bloquear qualquer suprimento sanguíneo dos tecidos adjacentes, foi colocado, antes da sutura, um pedaço de filme de poliuretano como método de barreira entre o retalho e o músculo reto abdominal.

O retalho foi imediatamente recolocado em sua posição original e suturado com pontos simples com fio inabsorvível mononylon 5-0 com distância de 5 mm entre os pontos, para melhor avaliar as áreas de necrose.

A ferida operatória foi mantida aberta em todos os ratos (Figura 2).

Os ratos dos grupo isquemia e congestão foram submetidos ao protocolo estendido de terapia hiperbárica através da câmara hiperbárica experimental EcoBar 400 (Orbital).

Os ratos foram submetidos a terapia hiperbárica (15 min de pressurização, seguido de 60 min a 2,5 atmosfera absoluta - ATA - com 100% O₂, seguido de 15min de despressurização) por 4 dias consecutivos. Durante a exposição à terapia hiperbárica, a concentração de oxigênio [O₂] e de gás carbônico [CO₂] foi continuamente monitorizada mantendo-se > 98% e < 0,03%, respectivamente.

A primeira sessão de terapia hiperbárica ocorreu uma hora após o procedimento cirúrgico. Repetimos a segunda sessão 8 horas após a primeira no mesmo dia. Nos outros três dias consecutivos, repetimos os horários das sessões do dia da cirurgia.

No quinto dia, o rato foi anestesiado e realizamos a avaliação do retalho cutâneo: cor, turgor e elasticidade. Todos os retalhos foram fotografados. Através do *software* ImageJ a extensão da área de necrose de cada retalho foi calculada.

Os ratos foram sacrificados no quinto dia do experimento com dose letal de anestésico inalatório.

Todo o retalho cutâneo foi retirado e fixado em solução tamponada de formaldeído a 10%, incluído em parafina após 24h de fixação e corado com hematoxilina-eosina (HE) para avaliação histológica convencional.

O teste exato de Fischer foi utilizado para detectar a associação entre a isquemia arterial e congestão venosa com a área de necrose, terapia hiperbárica. O *software* STATA versão 14 foi utilizado para as análises estatísticas mencionadas. A significância utilizada foi para $p < 0,05$.

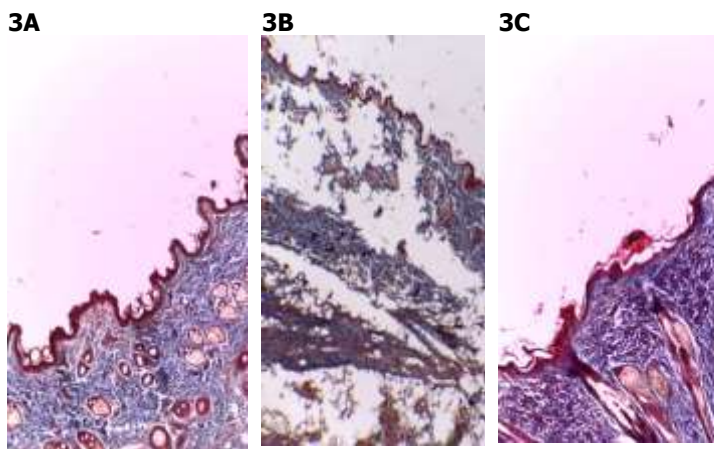
RESULTADOS

Após a análise de todo o material histológico já processado e corado com HE, ficou evidente que as áreas de necrose tecidual diferiram nos grupos isquemia e congestão. Nos animais que tiveram o vaso arterial ligado a terapia hiperbárica não reduziu a área de tecido necrótico, quando comparada à área de necrose no grupo de congestão venosa, onde o efeito da terapia hiperbárica mostrou-se maior (Figuras 3A, 3B e 3C).

O grupo controle não sofreu terapia hiperbárica e por isso teve as maiores áreas de necrose tecidual.

Apesar do tamanho da amostra, foi possível demonstrar com significância estatística o efeito da terapia hiperbárica nos 2 grupos.

Figura 3 – (A) Grupo controle. **(B)** Grupo isquemia. **(C)** Grupo congestão.



DISCUSSÃO

Inúmeros trabalhos têm defendido o uso da terapia hiperbárica como alternativa importante no resgate de tecidos que sofrem com isquemia arterial, porém este foi o primeiro estudo que avaliou o uso da terapia hiperbárica também na congestão venosa^{5,6}. É evidente que a maioria das perdas teciduais nas cirurgias reconstrutivas ocorre por falta de suprimento arterial, mas a congestão venosa é um grande fator complicador, aumentando, além das taxas de necrose, também as taxas de infecção tecidual. Demonstrar que a terapia hiperbárica pode ter um efeito benéfico na recuperação de tecidos tanto com isquemia quanto com a congestão abre um caminho importante para novas pesquisas e identificação de novos marcadores de isquemia e congestão, mas principalmente para a adoção da terapia hiperbárica como modalidade de tratamento interessante como resgate para estas situações⁷.

CONCLUSÃO

Faltam mais estudos para identificar possíveis mediadores ou facilitadores para a resposta à terapia hiperbárica. O *hypoxia-inducible factor 1-alpha* (HIF-1 α) é considerado o principal regulador transcricional da resposta celular e de desenvolvimento à hipoxia e pode, por exemplo, ser um destes elementos-chave na complexa maquinaria celular de resposta ao ambiente de hipoxia.

REFERÊNCIAS

- Serletti JM, Fosnot J, Nelson JA, Disa JJ, Bucky LP. Breast reconstruction after breast cancer. *Plast Reconstr Surg.* 2011; 127(6):124e-35e.
- Pugh CW, Ratcliffe PJ. New horizons in hypoxia signaling pathways. *Exp Cell Res.* 2017; 356(2):116-21.
- Al-Liethy IM, Hanafy AA, Abdel-AAL M, Zaki B. The effect of an extended protocol of hyperbaric oxygen therapy (HBO) on the rat TRAM flap model. *Egypt J Plast Reconstr Surg.* 2007; 31(1):7-13.
- Matsumoto NM, Aoki M, Nakao J, Peng WX, Takami Y, Umezawa H, et al. Experimental rat skin flap model that distinguishes between venous congestion and arterial ischemia: the reverse U-shaped bipediced superficial inferior epigastric artery and venous system flap. *Plast Reconstr Surg.* 2017; 139(1):79e-84e.
- Dragu A, Schnürer S, Surmann-Schmitt C, Unglaub F, Kneser U, Horch RE. Expression of HIF-1 in ischemia and reperfusion in human microsurgical free muscle tissue transfer. *Plast Reconstr Surg.* 2011; 127(6):2293-300.
- Majumder S, Ilayaraja M, Seerapu HR, Sinha S, Siamwala JH, Chatterjee S. Chick embryo partial ischemia model: a new approach to study ischemia ex vivo. *PLoS One.* 2010; 5(5):e10524.
- Ozgentas HE, Shenaq S, Spira M. Development of a TRAM flap model in the rat and study of vascular dominance. *Plast Reconstr Surg.* 1994; 94(7):1012-7.