



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE CIRURGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS MÉDICO-  
CIRÚRGICAS**

**JOAO MAMEDE SOARES BRAGA**

**EFEITO DO BEVACIZUMABE NA VIABILIDADE DE RETALHO INGUINAL LIVRE  
EM RATOS**

**FORTALEZA**

**2019**

JOAO MAMEDE SOARES BRAGA

**EFEITO DO BEVACIZUMABE NA VIABILIDADE DE RETALHO INGUINAL LIVRE  
EM RATOS**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Médico Cirúrgicas, do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Médico Cirúrgicas.

Orientador(a): Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes

Co-orientador: Prof. Dr. Francisco Vagnaldo Fachine Jamaru

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

B1e BRAGA, JOAO MAMEDE.  
EFEITO DO BEVACIZUMABE NA VIABILIDADE DE RETALHO INGUINAL LIVRE EM  
RATOS / JOAO MAMEDE BRAGA. – 2019.  
65 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médico-Cirúrgicas, Fortaleza, 2019.  
Orientação: Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes.  
Coorientação: Prof. Dr. Francisco Vagnaldo Fechine Jamaru.

1. Bevacizumabe. 2. Retalho inguinal livre. 3. Ratos Wistar. I. Título.

CDD 617

---

JOAO MAMEDE SOARES BRAGA

**EFEITO DO BEVACIZUMABE NA VIABILIDADE DE RETALHO INGUINAL LIVRE  
EM RATOS**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Médico Cirúrgicas, do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Médico Cirúrgicas.

Aprovada em: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / 2019

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Conceição Aparecida Dornelas  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr Charles Jean Gomes de Mesquita  
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Aos meus pais Jorge Montenegro Braga e Silvia Mamede, pelo modelo ético-profissional e apoio incondicional.

Aos meus irmãos Pedro Mamede Braga e André Mamede Braga, pelo companheirismo.

## **AGRADECIMENTOS**

A conclusão da presente dissertação seria impossível sem a participação e ajuda das seguintes pessoas. Em primeiro lugar, agradeço ao Prof. Dr. MANOEL ODORICO DE MORAES pelo voto de confiança, apoio na estruturação e coordenação da pesquisa, sempre disponível para ajudar na resolução dos inúmeros obstáculos.

Ao Prof. Dr. FRANCISCO VAGNALDO FECHINE JAMACARU pelo incessante interesse em implementar o ensino e a pesquisa dentro da Universidade Federal do Ceará e do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos, pelo apoio e tutoria constante em todas as fases de elaboração dessa dissertação.

Às funcionárias MARIA LUCIENE VIEIRA DE OLIVEIRA e MAGDA MARIA GOMES FONTENELE pelo comprometimento e ajuda constante aos alunos da pós-graduação.

À Prof. Dra. ANA PAULA NEGREIROS e ao Prof. Dr. MARCUS DAVIS, por elaborarem com excelência a análise histológica do trabalho.

À doutoranda ANAMARIA FALCÃO, que foi fundamental na condução dos experimentos em animais. Ao funcionário Sr. BENTO FRANCISCO DE OLIVEIRA e ao Dr. WESLEY LYEVERTON CORREIA, sempre disponíveis, que me orientaram e deram acesso ao biotério para realização dos experimentos.

Aos acadêmicos do curso de medicina da UFC, GABRIEL PINHEIRO E LUCCAS ALMEIDA, por contribuírem ativamente na execução dos procedimentos.

Importante agradecer à minha esposa CINTIA FIGUEIREDO DE NORÕES BRITO, pessoa que admiro e que me torna a vida mais especial, que me faz evoluir sempre tentando ser uma pessoa melhor, para ela e para a vida.

Ao meu pai, JORGE MONTENEGRO BRAGA, pelo incentivo em momentos de dificuldade, por sempre ter me proporcionado uma boa educação e ótimos almoços.

Agradecer finalmente à minha mãe, SILVIA MAMEDE STUDART SOARES, pelas constantes orientações, sempre disponível para ajudar em todas as etapas de minha vida acadêmica.

“Assim como o caos tumultuado de uma tempestade traz uma chuva nutritiva que permite à vida florir, também nas coisas humanas tempos de progresso são precedidos por tempos de desordem. O sucesso vem para aqueles que conseguem sobreviver à crise.” (I Ching)

## RESUMO

**EFEITO DO BEVACIZUMABE NA VIABILIDADE DE RETALHO INGUINAL LIVRE EM RATOS. João Mamede Soares Braga. Orientador: Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Médico Cirúrgicas, do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, 2019.**

A incidência de casos de câncer é crescente no Brasil e no mundo. O Bevacizumabe (Avastin®, Genentech) é atualmente um dos fármacos antiangiogênicos mais utilizados no tratamento de algumas das neoplasias mais prevalentes, porém existem indícios de que pode causar significativa redução na taxa de sobrevivência dos retalhos. O presente estudo avalia os efeitos da administração de Bevacizumabe (BVZ) na viabilidade de retalhos inguinais livres em ratos. Vinte e nove ratos Wistar foram randomizados em três grupos: grupo Enxerto, submetido à enxertia de pele, recebeu administração intravenosa de Soro Fisiológico 0.9% (SF 0.9%) na semana anterior ao procedimento. Grupo Retalho-SF, onde foi realizado retalho inguinal livre, também recebendo administração intravenosa de SF 0.9% na semana anterior ao procedimento. O grupo Retalho-BVZ, submetido ao procedimento de retalho inguinal livre, recebeu administração intravenosa de Bevacizumabe, na semana anterior ao procedimento. Foram avaliados no 7º dia pós-operatório: área viável do retalho, teste de patência do pedículo vascular e análise histológica do tecido da pele do retalho e do pedículo vascular. A análise estatística foi realizada através do *software* GraphPad Prism versão 8.0, utilizando análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, para verificar diferenças entre os grupos aos pares e considerado estatisticamente significativo um valor  $P \leq 0,05$ . O grupo Enxerto apresentou menor percentual de área viável, 22,81% em relação ao grupo Retalho-SF (83,98%) ( $P < 0,0001$ ) e ao grupo Retalho-BVZ (60,50%) ( $P = 0,0048$ ). Em relação à patência do pedículo vascular, o grupo Retalho-BVZ apresentou menor resultado nos testes, 60% das artérias e 80% das veias estavam patentes. O grupo Retalho-SF apresentou 100% das artérias e 90% das veias patentes, porém a diferença entre os grupos não foi significativa; seja no segmento arterial ( $P = 0,0867$ ) ou venoso ( $P = 0,9999$ ). Em relação à análise histológica, houve ocorrência de necrose significativamente maior nos grupos Enxerto (87,50%) e Retalho-BVZ (60,00%), em relação ao grupo Retalho-SF (0%) ( $P = 0,0010$ ). A ocorrência de inflamação foi menor no grupo Retalho-SF (33,33%) em relação aos grupos Enxerto (87,5%) e Retalho-BVZ (70,00%), porém essa análise não atingiu significância ( $P = 0,0588$ ). Não houve diferenças significantes na ocorrência de hemorragia ou trombose intraluminal entre os grupos. A administração de BVZ provocou maior ocorrência de necrose no retalho, porém sem redução significativa do percentual de área viável ou da patência dos vasos do retalho.

**Palavras-chave:** Bevacizumabe. Retalho inguinal livre. Ratos.

.....

## ABSTRACT

**BEVACIZUMABE EFFECT ON SURVIVAL OF FREE GROIN FLAPS IN RATS. João Mamede Soares Braga. Advisor: Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes. Submitted to the Graduate Program *Stricto Sensu* in Surgical Medical Sciences, Surgery Department, Faculty of Medicine of the Federal University of Ceará, 2019.**

The incidence of cancer is increasing in Brazil and worldwide. Bevacizumab (Avastin®, Genentech) is currently among the most used drugs in the treatment of the most common tumors. However, there is evidence that it may cause a significant reduction in flap survival rate. The aim of this study is to evaluate the effect of Bevacizumab (BVZ) on the viability of free groin flaps in rats. Twenty-nine WISTAR rats were randomized to one of three different groups. The rats included in the Graft Group received intravascular saline solution preoperatively and were submitted to a full thickness skin graft in the groin area. The animals from Saline-Flap Group underwent a free groin flap receiving intravascular saline solution one week before. The animals from BVZ-Flap Group underwent free groin flap after having received intravascular administration of Bevacizumab one week before the procedure. The following variables were evaluated postoperatively: viable flap area, vascular pedicle patency tests and histological analysis of tissue from the flap and from the vascular pedicle. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism version 8.0 Software. Analysis of variance (ANOVA) was performed and Tukey test was applied to verify differences between groups in pairs. A  $P$  value  $\leq 0.05$  was considered statistically significant. The Graft group presented a lower percentage of viable area (22.81%) as compared to the Saline-Flap Group (83.98 %) ( $P < 0,0001$ ) and to the BVZ-Flap Group (60.50%) ( $P < 0,0048$ ). Regarding vascular pedicle patency, the BVZ-Flap group had lower results: 60% of the arteries and 80% of the veins were patent. The Saline-Flap Group presented patency in 100% of the arteries and 90% of the veins, but the difference between both groups was not significant either in arterial vessels ( $P = 0,0867$ ) or venous vessels ( $P = 0,9999$ ). Regarding the histological analysis, there was significantly higher necrosis in the Graft (87.50%) and Flap-BVZ (60.00%) groups, compared to the Flap-SF group (0%) ( $P = 0,0010$ ). The occurrence of inflammation was lower in the Saline-Flap Group (33.33%) compared to the Graft Group (87.5%) and BVZ-Flap Group (70.00%), but difference did not reach significance ( $P = 0.0588$ ).). There were no significant differences in the occurrence of hemorrhage or intraluminal thrombosis between the groups. The administration of BVZ caused a higher occurrence of flap necrosis, but did not significantly alter the percentage of viable area and vascular pedicle patency.

**Keywords:** Bevacizumab. Free groin flap. Rats.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Rato anestesiado, tricotomizado e marcação do retalho .....	24
Figura 2 - Identificação de vasos epigástricos superficiais .....	25
Figura 3 - Ligadura dos vasos femorais distalmente à emergência dos vasos epigástricos superficiais.....	25
Figura 4 - Retalho em continuidade com a porção proximal dos vasos femorais.....	26
Figura 5 - Clampeamento e secção dos vasos femorais .....	27
Figura 6 - Anastomose de artéria femoral .....	27
Figura 7 - Retalho suturado com pontos contínuos .....	28
Figura 8 - Rato utilizando colete protetor.....	29
Figura 9 - Mensuração da área do retalho área total do retalho .....	30
Figura 10 - Cálculo do tamanho em pixels da área total do retalho .....	31
Figura 11 - Mensuração e cálculo de percentual de retalho viável, retirando áreas de necrose e deiscência.....	31
Figura 12 - Regulação do tamanho da escala .....	34
Figura 13 - Seleção e mensuração do tamanho das camadas média e íntima .....	34
Figura 14 - Área de tecido viável, expressa em termos percentuais em função da área total do retalho ou enxerto, mensurada nos grupos Enxerto, Retalho-SF e Retalho-BVZ no dia 7. ....	37
Figura 15 - Evolução do retalho ou do enxerto de pele de animais dos grupos Enxerto, Retalho-BVZ e Retalho-SF durante a primeira semana pós-operatória. ....	38
Figura 16 - Teste de esvaziamento realizado na artéria do pedículo vascular dos grupos Retalho-SF e Retalho-BVZ no dia 7.....	39
Figura 17 - Teste de esvaziamento realizado na veia do pedículo vascular dos grupos Retalho-SF e Retalho-BVZ no dia 7. ....	39
Figura 18 - Teste de sangramento realizado na artéria do pedículo vascular dos grupos Retalho-SF e Retalho-BVZ no dia 7.....	41
Figura 19 - Teste de sangramento realizado na veia do pedículo vascular dos grupos Retalho-SF e Retalho-BVZ no dia 7. ....	41
Figura 20 - Grupo Retalho-SF, amostras evidenciando ausência de necrose e vasos pérvios .	43
Figura 21 - Grupo Retalho-BVZ, amostras evidenciando maior quantidade de necrose, infiltrados inflamatórios e vasos trombosados .....	44
Figura 22 - Grupo Enxerto, amostras evidenciando grande intensidade de necrose e infiltrados.....	44
Figura 23 - Avaliação do grau de necrose nos preparados histológicos do retalho ou enxerto dos grupos Enxerto, Retalho-SF e Retalho-BVZ. ....	45
Figura 24 - Avaliação da intensidade do infiltrado inflamatório nos preparados histológicos do retalho ou enxerto dos grupos.....	46
Figura 25 - Espessura, em micrômetros, da parede da artéria do pedículo vascular do retalho mensurada nos grupos Retalho-SF e Retalho-BVZ.....	49

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Área de tecido viável, expressa em termos percentuais em função da área total do retalho ou enxerto, mensurada nos grupos Enxerto, Retalho-SF e Retalho-BVZ no dia 7.....	37
Tabela 2 - Teste de esvaziamento realizado na artéria e na veia do pedículo vascular dos grupos Retalho-SF e Retalho-BVZ no dia 7.....	40
Tabela 3 - Teste de sangramento realizado na artéria e na veia do pedículo vascular dos grupos Retalho-SF e Retalho-BVZ no dia 7.....	42
Tabela 4 - Avaliação da intensidade da necrose e da inflamação nos preparados histológicos do retalho ou enxerto dos grupos Enxerto, Retalho-SF e Retalho-BVZ.....	46
Tabela 5 - Ocorrência de necrose nos preparados histológicos do retalho ou enxerto dos grupos Enxerto, Retalho-SF e Retalho-BVZ.....	47
Tabela 6 - Ocorrência de inflamação nos preparados histológicos do retalho ou enxerto dos grupos Enxerto, Retalho-SF e Retalho-BVZ.....	47
Tabela 7 - Ocorrência de hemorragia nos preparados histológicos do retalho ou enxerto dos grupos Enxerto, Retalho-SF e Retalho-BVZ.....	48
Tabela 8 - Ocorrência de trombose intraluminal nos vasos do pedículo vascular do retalho dos grupos Retalho-SF e Retalho-BVZ.....	48
Tabela 9 - Espessura, em micrômetros, da parede da artéria do pedículo vascular do retalho mensurada nos grupos Retalho-SF e Retalho-BVZ.....	49

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>BVZ</b>	Bevacizumabe
<b>CEUA</b>	Comitê de Ética e Pesquisa Animal
<b>COBEA</b>	Colegio Brasileiro de Experimentação Animal
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>FCP</b>	Fator de Crescimento Placentário
<b>H&amp;E</b>	Hematoxilina e Eosina
<b>NPDM</b>	Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos
<b>SBCAL/COBEA</b>	Sociedade Brasileira da Ciência em Animais de Laboratório
<b>SF 0.9%</b>	Soro fisiológico 0.9%
<b>UFC</b>	Universidade Federal do Ceará
<b>VEGF</b>	<i>Vascular Endothelial Grow Factor</i>

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS .....	6
RESUMO.....	8
ABSTRACT .....	9
LISTA DE ILUSTRAÇÕES .....	10
LISTA DE TABELAS.....	11
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	12
SUMÁRIO.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	11
1.1 Retalhos .....	11
1.2 Angiogênese e cicatrização .....	14
1.3 Agentes antiangiogênicos .....	16
1.4 Relevância e justificativa.....	19
2 OBJETIVOS.....	21
2.1 Objetivo geral .....	21
2.2 Objetivos específicos.....	21
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1 Aspectos éticos .....	22
3.2 Animais.....	22
3.3 Local do estudo.....	22
3.4 Desenho do estudo.....	23
3.5 Técnica cirúrgica do retalho inguinal livre.....	24
3.6 Fármaco avaliado.....	29
3.7 Avaliação da viabilidade do retalho .....	29
3.7.1 Análise macroscópica .....	30
3.7.2 Análise Histológica.....	32
3.9 Análise Estatística.....	35
4 RESULTADOS .....	36
4.1 Avaliação da viabilidade do retalho .....	36
4.1.1 Cálculo de área tecidual viável.....	36
4.1.2 Testes de patência .....	38
4.2 Análise histologica .....	42
4.2.1 Análise histológica da pele do retalho ou enxerto .....	42
4.2.2 Análise histológica de segmento do pedículo vascular contendo anastomose .....	48
5 DISCUSSÃO.....	50
6 CONCLUSÃO.....	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	56
7. APÊNDICES E ANEXOS.....	63
A) Anexo A: CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA AO USO DE ANIMAIS .....	63

## 1 INTRODUÇÃO

A pele humana é considerada o maior órgão do corpo humano e reúne diversas funções importantes, entre elas: regulação da homeostase, sensibilidade e função de membrana semipermeável a substâncias tóxicas e micro-organismos. Devemos pensar na pele como um invólucro, que envolve diversas estruturas anatômicas importantes (tendões, vasos, nervos e articulações) e que necessita manter suas características de elasticidade e não aderência a planos anatômicos profundos para que tenhamos uma boa função dos membros (GEISSLER; SLADE, 2011).

Uma lesão que resulta em perda de segmento de pele, acometendo sua espessura total, desencadeia um processo de retração cicatricial, que causa limitação de amplitude de movimento, essencial em diversas áreas do corpo. Para evitar esses efeitos deletérios da cicatrização por segunda intenção, o tratamento de defeitos cutâneos geralmente é realizado com o fechamento primário, quando possível, ou com a utilização de pele “importada” de outra região (GEISSLER; SLADE, 2011; BLONDEEL *et al.*, 2013).

A enxertia de pele é a cirurgia mais realizada para transferir tecido saudável de outra área do corpo para a área lesionada, porém o enxerto sobrevive de forma precária, nutrido apenas pelo transudato da ferida. Converse e colaboradores chamavam esse tipo de nutrição de “circulação plasmática” (CONVERSE; UHLSCHMID; BALLANTYNE, 1969). Então, qualquer substância que funcione como barreira entre o leito da ferida e o enxerto de pele pode levar à perda do enxerto, um evento frequente quando há, por exemplo, hematoma no leito da ferida (CONVERSE; UHLSCHMID; BALLANTYNE, 1969).

Devido a essa nutrição precária, o enxerto de pele deve ser colocado em leito com suprimento sanguíneo adequado para realizar sua revascularização, o que frequentemente não acontece em situações de exposição óssea, de cartilagem ou tendão na ferida. Essas e outras situações, como a necessidade de abordagem cirúrgica posterior no local da lesão, demandam uma cobertura de pele de melhor qualidade, com mais elasticidade, sendo então indicada a cobertura cutânea com retalhos (GEISSLER; SLADE, 2011).

### 1.1 Retalhos

O retalho é composto pela pele com uma variada quantidade de tecido associado, utilizada para cobertura cutânea, diferencia-se, porém, do enxerto de pele por receber seu suprimento sanguíneo por outra fonte que não a do tecido sobre o qual é colocado. A parte do

retalho que fornece a vascularização é denominada pedículo vascular (GEISSLER; SLADE, 2011).

A cobertura cutânea é uma área historicamente desafiadora para a cirurgia reconstrutiva, um dos primeiros relatos da utilização de retalho para reparo de lesão mutilante em nariz é atribuída ao cirurgião indiano Susruta, cerca de seis séculos antes de Cristo (a.C). Outra descrição histórica e mais recente da utilização do retalho cutâneo em cirurgia reconstrutiva é a do italiano Gaspare Tagliacozzi, que utilizou retalho de pele do braço para reconstrução nasal há cerca quatro séculos (BLONDEEL *et al.*, 2013; MASQUELET; ALAIN, 2013).

Durante milênios todos os retalhos utilizados eram o que hoje classificamos de retalhos cutâneos randomizados, ou aleatórios: retalhos levantados sem prévio estudo da vascularização subjacente, supridos pelo plexo vascular subdermal. Durante confecção de retalhos randomizados, o cirurgião necessita manter-se atento à relação entre comprimento e largura da base do tecido do retalho, geralmente mantendo uma proporção segura de 1:1, para evitar necrose tecidual nas suas margens (WEI; MARDINI, 2009; GEISSLER; SLADE, 2011; MASQUELET; ALAIN, 2013).

A quebra do dogma da necessidade de manutenção dessa relação de comprimento e largura da base do retalho foi realizada por Milton (1970), que provou que a viabilidade do retalho estava relacionada diretamente com o padrão de vascularização subjacente ao tecido levantado. Essa revolução no planejamento dos retalhos cutâneos levou McGregor e Morgan (1973) a descreverem os retalhos axiais. Os retalhos axiais são planejados em determinadas áreas do corpo humano onde estudos prévios confirmaram a trajetória de determinados vasos, permitindo transposição de grande quantidade de tecido, respeitando, não mais uma relação de comprimento e largura, mas apenas o fato de que a base do retalho incluía esses vasos (MCGREGOR; MORGAN, 1973; WEI; MARDINI, 2009; GEISSLER; SLADE, 2011; MASQUELET; ALAIN, 2013).

O avanço na compreensão da vascularização dos retalhos foi acompanhado paralelamente pelo desenvolvimento e aprimoramento da microcirurgia vascular, técnica que permite anastomose de vasos de cerca de 1 mm, com o auxílio do microscópio (TAMAI, 2009; STEEL; COPE, 2015).

A história da microcirurgia vascular remonta ao século XVI, com a descrição de ligaduras e sutura vasculares em lesões decorrentes de batalhas em guerras. Diversos autores destacaram-se no final do século XIX por realizarem bem sucedidas anastomoses vasculares em humanos. Um grande avanço na cirurgia vascular, porém, aconteceu em 1902, quando

Alexis Carrel publicou sua metodologia de triangulação do vaso para anastomose término-terminal. Essa técnica, ainda hoje utilizada, impulsionou a pesquisa no campo de transplante de órgãos, rendendo ao autor o prêmio Nobel em 1912 (CARREL, 1902; TAMAI, 2009; STEEL; COPE, 2015).

A capacidade de controlar a formação de coágulos sanguíneos também foi essencial para o desenvolvimento da microcirurgia vascular. A Heparina foi descoberta em 1916, sendo um dos fármacos mais antigos ainda amplamente utilizados. (TAMAI, 2009)

A inovação final para fundação da microcirurgia vascular moderna foi a introdução do microscópio no campo cirúrgico, por Nysten em 1921. Inicialmente esses microscópios eram monoculares, utilizados em cirurgias otológicas, porém em poucos anos foram fabricados os microscópios binoculares, acompanhados pelo desenvolvimento de instrumental microcirúrgico e fios de sutura delicados, de melhor qualidade. A evolução da microcirurgia vascular resultou em avanços em diversos campos da medicina: cirurgia plástica, cirurgia da mão, neurocirurgia, cirurgia reconstrutiva (TAMAI, 2009; STEEL; COPE, 2015).

Diversos estudos sobre reimplante de extremidades amputadas seguiram impulsionando a pesquisa no campo da microcirurgia, na década de 1960 (MALT; MCKHANN, 1964; KOMATSU; TAMAI, 1968; COBBETT, 1969).

Daniel e Taylor (1973) combinaram técnicas microcirúrgicas com conceitos sobre a vascularização dos retalhos axiais, transferindo com sucesso um retalho inguinal de padrão axial para outra área do corpo. Foi realizada a secção dos vasos responsáveis pela nutrição do retalho inguinal e esses vasos foram anastomosados em vasos receptores da perna do paciente, definindo o que chamamos de retalhos livres ou microcirúrgicos.

A microcirurgia reconstrutiva revolucionou o tratamento de lesões traumáticas complexas. Lesões antes consideradas irreparáveis passaram a ser tratadas em um único estágio, com transferência de diferentes tipos de tecidos de uma área doadora sadia para o local acometido. Diferentes estratégias de reconstrução tornaram-se então disponíveis, promovendo melhora dos resultados funcionais e diminuição das indicações de amputação de membros (WEI; MARDINI, 2009).

Artigos subsequentes confirmaram um crescimento rápido e contínuo de uma variedade de retalhos livres, combinando uma variedade de tecidos, principalmente no membro superior. Atualmente, todo tecido com sistema arteriovenoso apropriado pode ser transferido como um retalho, combinado ou não com outros elementos. Por exemplos, estão descritos retalhos de pele, fáscia, tecido muscular, ósseo, nervoso, entre outros (WEI;

MARDINI, 2009; GEISSLER; SLADE, 2011; MASQUELET; ALAIN, 2013; BRIAN BOYD; F. JONES, 2015).

Diversos fatores são associados a complicações no pós-operatório de retalhos microcirúrgicos: idade do paciente, comorbidades, tabagismo e técnica cirúrgica (WEI; MARDINI, 2009; BLONDEEL *et al.*, 2013). Um estudo multicêntrico envolvendo 493 retalhos em 23 diferentes unidades evidenciou entre os principais fatores adversos à sobrevivência do retalho o uso de radioterapia no pré-operatório e o uso de retalhos musculares com enxerto de pele (KHOURI *et al.*, 1998).

Estudos retrospectivos apontam diabetes, doença renal crônica, e principalmente um tempo operatório prolongado como fatores de risco para a falha do retalho. O uso de anticoagulantes parece não diminuir os riscos de perda do retalho, podendo até aumentar a incidência de hematoma, dependendo da dose utilizada (KROLL *et al.*, 1995; CHANG *et al.*, 2016; ISHIMARU *et al.*, 2016; SANATI-MEHRIZY *et al.*, 2016; OFFODILE *et al.*, 2017).

O Bevacizumabe (BVZ) tem sido implicado em complicações relacionadas à cicatrização de feridas e formação de hematoma, porém, após revisão de literatura, não foram constatados estudos sobre seu efeito na viabilidade de retalhos livres; em humanos ou em animais (THORNTON *et al.*, 2006; SHARMA; MARCUS, 2013; BODNAR, 2014).

## **1.2 Angiogênese e cicatrização**

A angiogênese é um processo fisiológico normal, regulado pelo balanço entre fatores proangiogênicos e antiangiogênicos, que resulta em crescimento de novos vasos a partir de vasos preexistentes (RISAU, 1997; SAMANT; SHEVDE, 2011; STEPHENSON *et al.*, 2013). A vasculogênese, por outro lado, é definida como formação de vasos de grande calibre, na vida embrionária. Esses vasos originam-se da diferenciação dos angioblastos, precursores mesodérmicos (RISAU, 1997; SAMANT; SHEVDE, 2011).

O processo de angiogênese ocorre fisiologicamente durante períodos de crescimento tecidual, reparo tecidual ou durante o ciclo reprodutivo, porém é fundamental também ao crescimento e metástase tumoral (RISAU, 1997; SAMANT; SHEVDE, 2011; STEPHENSON *et al.*, 2013; CHELLAPPAN *et al.*, 2018).

Diversas outras condições, além das neoplasias, alteram esse processo de regulação fisiológica da angiogênese, levando a uma proliferação descontrolada da rede vascular. Endometriose, doenças inflamatórias intestinais, artrite reumatoide, hemangiomas infantis e a obesidade são alguns exemplos (POLVERINI, 2002; CARMELIET, 2005).

A angiogênese é rigorosamente regulada por inúmeros fatores pró e antiangiogênicos. Diversos fatores de crescimento, citocinas e outras proteínas são classificados como proangiogênicos e, geralmente, a agressividade da célula tumoral está diretamente relacionada a uma alta expressão desses fatores (SAMANT; SHEVDE, 2011; CHELLAPPAN *et al.*, 2018).

Entre os agentes proangiogênicos, um dos mais dominantes na cicatrização das feridas é o VEGF-A. Ele, além de regular positivamente a angiogênese, atua aumentando a permeabilidade vascular, o que contribui para o edema da ferida. Em mamíferos, a família VEGF (*Vascular Endothelial Grow Factor*) é composta por 6 membros: VEGF-A,B,C,D, E e pelo fator de crescimento placentário. A lesão celular e a hipóxia são fortes indutores do VEGF, que parece ser crítico para a angiogênese, principalmente entre o quarto e sétimo dia de formação do tecido de granulação (TONNESEN; FENG; CLARK, 2000; DIPIETRO, 2016).

Podemos classificar dois principais subtipos da angiogênese: angiogênese por brotamento e por intussuscepção. A angiogênese por brotamento é um processo mais lento, onde as células endoteliais proliferam na direção do estímulo, degradando matriz extracelular e formando um novo vaso. A angiogênese por intussuscepção é um processo mais rápido, que envolve a divisão de um capilar em dois, através da ampliação do seu lúmen e posterior formação de um septo (RISAU, 1997; SAMANT; SHEVDE, 2011).

A cicatrização de feridas não seria possível sem a angiogênese. O tecido de reparo que surge no leito da ferida, geralmente por volta do quarto dia após a lesão, é composto em cerca de 60% por novos capilares, sendo denominado de tecido de granulação. Esse termo foi criado justamente devido ao aspecto granular causado pelos novos vasos, quando analisados em microscópio. Um suprimento sanguíneo abundante é essencial para suprir a demanda metabólica na ferida (ARNOLD; WEST, 1992; TONNESEN; FENG; CLARK, 2000; DIPIETRO, 2016).

Os vasos sanguíneos, macrófagos e os fibroblastos são os principais protagonistas do reparo tecidual, possuindo uma interdependência biológica. O macrófago é fonte contínua de citocinas, que estimulam fibroplasia e angiogênese, o fibroblasto constrói uma nova matriz extracelular que oferece suporte ao crescimento celular, enquanto os vasos sanguíneos são responsáveis pelo aporte de oxigênio e nutrientes para manutenção do metabolismo celular (TONNESEN; FENG; CLARK, 2000).

Durante o período de cicatrização há um rápido e robusto crescimento do leito vascular, com uma grande concentração de capilares, porém, durante a fase de remodelação

da cicatriz, a maioria dos novos capilares vai paulatinamente sendo reduzida. O resultado final da pele cicatrizada é de uma densidade vascular similar ao da pele normal (DIPIETRO, 2016).

A real necessidade de uma abundância de novos capilares para cicatrização foi recentemente questionada por alguns estudos recentes, que avaliam a cicatrização de feridas na mucosa oral e na pele de fetos. A angiogênese na ferida frequentemente é correlacionada com o nível de resposta inflamatória, porque essa resposta produz larga quantidade de fatores proangiogênicos. A cicatrização na pele fetal e mucosa oral costuma acontecer rapidamente e com pouca formação de tecido cicatricial, supostamente por serem locais de baixa resposta inflamatória (DIPIETRO, 2016).

### **1.3 Agentes antiangiogênicos**

O químico alemão Paul Ehrlich foi quem cunhou o termo quimioterapia no início do ano 1900, interessado em desenvolver medicamentos para tratar câncer e doenças infecciosas. Realizou experimentos em animais e documentou resultados que impulsionaram o desenvolvimento dos fármacos antitumorais (DEVITA; CHU, 2008).

Em 1917 o gás mostarda foi introduzido como arma química na Primeira Guerra Mundial e, a partir da observação de suas propriedades citotóxicas sobre a medula óssea e linfonodos, originaram-se diversos estudos que culminaram no desenvolvimento dos primeiros agentes alquilantes (DEVITA; CHU, 2008; AKULAPALLI, 2009; KLANL; AHMAD; MASOOD, 2016).

Diversos quimioterápicos foram desenvolvidos desde a introdução do Nitrogênio Mostarda como primeiro agente alquilante, em 1942, porém surgiram importantes limitações no uso desses fármacos. Entre as principais limitações estavam a baixa seletividade dos medicamentos, que atacavam, além das células cancerosas, as células saudáveis do indivíduo, e o desenvolvimento de resistência aos quimioterápicos após seu uso frequente (AKULAPALLI, 2009; KLANL; AHMAD; MASOOD, 2016). Devido os múltiplos efeitos colaterais, até o ano de 1960, o tratamento do câncer consistia basicamente em radioterapia e cirurgia. Porém atingiu-se um platô de baixa taxa de cura, de cerca de 30% na época, tornando-se clara então a necessidade da associação de terapia quimioterápica ao tratamento (DEVITA; CHU, 2008; AKULAPALLI, 2009).

A procura por fármacos mais efetivos no combate às células tumorais e menos nocivos às células saudáveis levou ao desenvolvimento de novas classes terapêuticas como a imunoterapia, os inibidores de fatores de crescimento e os inibidores da angiogênese

(AKULAPALLI, 2009; KLANL; AHMAD; MASOOD, 2016). Folkman foi fundamental no reconhecimento da relação entre o crescimento tumoral e angiogênese, em 1970, dando impulso à pesquisa de agentes antiangiogênicos como opção de tratamento do câncer (FOLKMAN, 1971).

Posteriormente, fármacos antiangiogênicos se tornaram também uma opção terapêutica para tratamento de doenças oculares, como a degeneração macular relacionada à idade, intrinsecamente relacionada a angiogênese (VAN WIJNGAARDEN; COSTER; WILLIAMS, 2005). JAMACARU (2006) desenvolveu com sucesso, na Universidade Federal do Ceará (UFC), um modelo animal de angiogênese corneana inflamatória e um programa de computador para quantificá-la, através da obtenção de imagens digitais.

A hipótese de FOLKMAN (1971) era de que o crescimento tumoral era dependente da angiogênese, que o crescimento do tumor além de 2 mm demandava formação de novos vasos, para suprir a necessidade de oxigênio e nutrientes. Logo, sem a neovascularização o crescimento tumoral iria cessar por volta dos 2-3 mm, entrando em modo quiescente.

FOLKMAN (1971) chegou a essa conclusão a partir da observação do crescimento tumoral, que geralmente se dava de modo abrupto, após longos períodos em um estado não vascularizado, latente. Esse novo conceito implicava a existência de moduladores biológicos da angiogênese, levando, nas três décadas seguintes, a uma intensa pesquisa sobre ativadores e inibidores da angiogênese. Finalmente, na década de 1980, Napoleone Ferrara *et al* purificaram o fator de crescimento endotelial (VEGF-A) (FERRARA; HENZEL, 1989). Surpreendentemente o mesmo polipeptídeo havia sido previamente isolado por Harold Dvorak *et al* e nomeado de Fator de Permeabilidade Vascular (SENGER *et al.*, 1983).

O VEGF foi implicado como uma das principais proteínas secretada pelo tumor com a finalidade de estimular o tecido endotelial adjacente a formar novos vasos, permitindo que o tumor mude da fase latente para a fase invasiva e metastática. O VEGF é composto por uma família de proteínas: VEGF-A,B,C,D,E e fator de crescimento placentário (FCP). O VEGF-C e VEGF-D estão envolvidos com proliferação de vasos linfáticos, enquanto o VEGF-A,B,C e E estão relacionados à angiogênese (SAMANT; SHEVDE, 2011; CHELLAPPAN *et al.*, 2018).

A expressão, disponibilidade e atividade do VEGF-A, um dos mais potentes fatores proangiogênicos, é modulada por diversos mecanismos: mediadores inflamatórios, hipóxia, força mecânica de cisalhamento e alongamento da célula, fatores de transcrição, mas também pelos oncogenes (HO; KUO, 2007).

Conseqüentemente, os principais fármacos antiangiogênicos encontrados no mercado atuam inibindo o VEGF (VAN WIJNGAARDEN; COSTER; WILLIAMS, 2005).

O Bevacizumabe (Avastin®, Genentech) é um anticorpo monoclonal recombinante Anti-VEGF, amplamente utilizado no tratamento de câncer metastático colorretal, de pulmão, rins e glioblastoma (GORDON *et al.*, 2009; SHARMA; MARCUS, 2013).

Avastin®, nome comercial do Bevacizumabe (BVZ), é um anticorpo humanizado, produzido por tecnologia de DNA recombinante em ovário de *hamster* chinês. Esse fármaco possui regiões estruturais humanas (cerca de 93%), com regiões ligantes de antígeno de um anticorpo murino humanizado (cerca de 7%). A sequência proteica murina atua ligando-se seletivamente ao VEGF-A, impedindo a sua ligação com seus receptores de tirosina quinase (VEGFR-1 e 2) e conseqüentemente evitando o início da cascata angiogênica no tumor (SAMANT; SHEVDE, 2011; CHELLAPPAN *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2018). Os efeitos dessa inibição do VEGF são, principalmente, bloqueio do crescimento de novos vasos, supressão de sinais autócrinos anti-apoptóticos e modificação do fluxo sanguíneo para o tumor, aumentando o aporte e eficácia de agentes quimioterápicos (CHELLAPPAN *et al.*, 2018).

Os tumores frequentemente secretam fatores proangiogênicos que geram uma proliferação anormal de vasos sanguíneos e alteram o microambiente tumoral. Os vasos anômalos formados, apesar de serem competentes para nutrir as células tumorais, apresentam anomalias que dificultam a chegada de fármacos quimioterápicos ao microambiente tumoral, além de favorecerem a metástase tumoral. Entre as principais alterações patológicas desses vasos, destacam-se: o aumento da permeabilidade vascular, alteração de fluxo sanguíneo, ausência de vasos linfáticos e a elevação da pressão intersticial. O tratamento com BVZ foi capaz de recompor a anatomia vascular tumoral, eliminando vasos anômalos, remodelando os vasos remanescentes e tornando-os mais eficientes (FUKUMURA; JAIN, 2007).

O Bevacizumabe foi o primeiro inibidor de angiogênese aprovado pelo FDA, em 2004, inicialmente para tratamento de câncer metastático colorretal. Posteriormente, mostrou-se mais eficaz quando associado com outros agentes quimioterápicos, passando a ser usado, em combinação com o 5-fluoracil, para tratamento de câncer de mama, de pulmão, de ovário e glioblastoma (SAMANT; SHEVDE, 2011; CHELLAPPAN *et al.*, 2018).

Alguns efeitos adversos foram associados ao uso de Avastin®: eventos tromboembólicos, proteinúria, insuficiência cardíaca congestiva, hemorragias, perfuração gastrointestinal, hemoptise, sendo que a hipertensão se destaca como efeito adverso mais comum (CHELLAPPAN *et al.*, 2018). Esse fármaco também é implicado em complicações na

cicatrização de feridas: deiscência de feridas, equimoses, sangramento prolongado e infecções. Alguns pacientes apresentam esses efeitos adversos mesmo seguindo a recomendação de aguardar um período de 28 dias após cirurgia para reiniciar administração do Bevacizumabe (THORNTON *et al.*, 2006; SHARMA; MARCUS, 2013).

#### **1.4 Relevância e justificativa**

O câncer é considerado um grave problema de saúde pública, importante causa de morbidade e mortalidade mundial, no ano de 2018 foram diagnosticado 18 milhões de novos casos, com nove milhões de mortes relacionadas à doença (BRAY *et al.*, 2018). O pulmão, a próstata, cólon e reto são os locais mais frequentemente acometidos no homem, enquanto nas mulheres o câncer de mama, colorretal e pulmão são os mais comuns (STEWART; WILD, 2014; MCGUIRE, 2015).

O câncer é a segunda causa de morte no mundo, perdendo apenas para doenças cardiovasculares, nos Estados Unidos da América (EUA) estima-se que metade dos homens e um terço das mulheres desenvolverão câncer durante sua vida (AKULAPALLI, 2009). A estimativa para esse ano, nos EUA, é de cerca de 1 milhão e 700 mil novos casos e 600 mil mortes relacionadas à doença (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2019).

A GLOBOCAN estimou que em 2018 mais de um milhão de novos casos de câncer foram diagnosticados na América Central e América do Sul, ocorrendo cerca de 600.000 mortes relacionadas à doença (BRAY *et al.*, 2018).

A epidemiologia do câncer no Brasil acompanha os dados internacionais, tivemos diagnóstico de cerca de 600.000 novos casos em 2018, estando entre os tumores mais comuns os de próstata, mama, cólon e reto e pulmão (GUERRA *et al.*, ; INCA, 2017).

O Bevacizumabe (Avastin®, Genentech) é atualmente um dos fármacos Anti-VEGF mais utilizados no tratamento de algumas das neoplasias mais prevalentes: câncer colorretal, de pulmão, rins e glioblastoma (GORDON *et al.*, 2009; SHARMA; MARCUS, 2013).

Esse fármaco é associado a complicações relacionadas à cicatrização de feridas e sangramento em sítio cirúrgico, entre elas, deiscência de ferida, hérnias incisionais, eventos tromboembólicos, rash cutâneo, perfuração gastrointestinal e infecções (THORNTON *et al.*, 2006; SHARMA; MARCUS, 2013; BODNAR, 2014).

Devido ao alto índice de complicações relacionadas à cicatrização da ferida, existem recomendações de suspensão do uso do medicamento no perioperatório dos pacientes. Não se sabe exatamente o período ideal de suspensão dos fármacos antiangiogênicos, mas geralmente

se recomenda suspendê-los cerca de 30 dias antes da data do procedimento, iniciando-os novamente somente após completa cicatrização da ferida operatória (THORNTON *et al.*, 2006; BODNAR, 2014).

O cirurgião com uma frequência cada vez maior irá se deparar com a necessidade de realizar uma cirurgia reconstrutiva de urgência ou reimplante de algum membro amputado, em um paciente que faz uso de fármacos antiangiogênicos. Nesses casos não há tempo para seguir o protocolo de suspensão do medicamento e posterior agendamento da cirurgia. O crescimento dos números de casos de câncer diagnosticados anualmente e a popularização dos medicamentos antiangiogênicos somente aumenta a probabilidade desse paciente necessitar de procedimento microcirúrgico de urgência.

Revisão de literatura não indica relação entre o uso de fármaco antiangiogênico e taxa de sobrevivência de retalhos microcirúrgicos livres em humanos. Essa relação foi estudada em modelo animal, mas em retalhos ao acaso, DOBRYANSKY *et al.*(2004) concluíram que o uso da endostatina (inibidor da angiogênese) em camundongos causou uma diminuição estatisticamente significativa na taxa de sobrevivência de retalhos randômicos.

É importante avaliar a influência do uso de medicamentos antiangiogênicos nos resultados de cirurgias plásticas, pois existem indícios de que podem causar significativa diminuição na taxa de sobrevivência dos retalhos. O presente estudo visa a avaliar o efeito da administração de Bevacizumabe na viabilidade de retalhos inguiniais livres em ratos.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

.

Investigar a influência de Bevacizumabe (BVZ) na viabilidade de retalhos inguinais livres em ratos.

### **2.2 Objetivos específicos**

Avaliar o efeito do fármaco antiangiogênico no percentual de tecido viável de retalhos inguinais livres em ratos e na patência do seu pedículo vascular.

Avaliar histologicamente as alterações induzidas pelo Bevacizumabe no tecido de pele do retalho e do pedículo vascular.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Aspectos éticos**

O presente estudo experimental foi realizado com animais de laboratório e de acordo com as Normas Internacionais para a Pesquisa Biomédica em Animais (1990) e com a Lei Federal no. 6.638, de 08 de maio de 1979. Ratos Wistar do biotério do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) foram operados nas salas de cirurgia do próprio biotério e as amostras foram processadas e analisadas no laboratório de histologia do NPDM.

Os animais foram manipulados de acordo com os princípios éticos na experimentação animal estabelecidos pela Sociedade Brasileira da Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA), com esforços para reduzir o número de animais utilizados.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa Animal (CEUA) da Universidade Federal do Ceará com o número de protocolo 126/2016 na reunião de 28 de março de 2017, conforme declaração com parecer favorável no anexo 1.

#### **3.2 Animais**

Utilizaram-se 37 ratos WISTAR, machos, albinos, adultos, pesando entre 207 e 391 gramas, provenientes do Biotério do NPDM. Os ratos foram alojados em gaiolas coletivas com capacidade para até quatro animais adultos, mantidos em ambiente climatizado, em ciclo claro/escuro de 12 horas e com oferta de água e alimento *ad libitum*. Aguardou-se um período de adaptação ao biotério de pelo menos sete dias, onde os animais foram examinados externamente para exclusão de doenças.

#### **3.3 Local do estudo**

O estudo foi inteiramente realizado nas dependências do biotério, laboratório de farmacologia pré-clínica e laboratório de histologia do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM), da UFC.

### 3.4 Desenho do estudo

O estudo realizado é de caráter experimental randomizado com análise comparativa da viabilidade de um retalho livre e de enxerto de pele nos seguintes grupos:

- Grupo Enxerto: Grupo submetido à enxertia de pele, recebendo infusão intravenosa de 0,5mL de Soro Fisiológico 0,9% (SF 0.9%) na semana anterior ao procedimento
- Grupo Retalho-SF: Grupo controle, realizado procedimento de retalho inguinal livre, após infusão intravenosa de 0,5mL de SF 0,9%, na semana anterior ao procedimento.
- Grupo Retalho-BVZ: Recebeu infusão intravenosa de 0,5mL do fármaco Bevacizumabe (BVZ) diluído em SF 0,9%, na semana anterior ao procedimento de retalho inguinal livre, calculando-se a dose de 5mg de fármaco por kg de peso.

A alocação dos animais nos grupos foi realizada de modo randomizado por assistentes de pesquisa, numerando aleatoriamente os ratos em quantidades iguais nos três diferentes grupos. Em caso de perdas de animais em determinados grupos, realizou-se nova randomização para substituí-las.

Os tratamentos foram administrados por via intravenosa, na veia lateral da cauda, por profissional com experiência em aplicação de medicação intravenosa em ratos. Sete dias após infusão de fármaco antiangiogênico ou de SF 0.9%, os ratos foram submetidos a procedimento de confecção de retalho inguinal livre ou enxerto de pele.

Os animais foram avaliados pós-operatoriamente quanto à viabilidade do retalho no pós-operatório imediato, nomeado dia 0, no dia 2 de pós-operatório, e finalmente no dia 7. Fotografias padronizadas foram obtidas, além da observação visual da coloração da pele e do seu turgor nesses três dias. Os animais foram novamente anestesiados no dia 7, o pedículo vascular foi explorado para constatação de patência, procedimento somente possível nos grupos Retalho-SF e Retalho-BVZ. Após a constatação da patência dos vasos, os animais foram sacrificados e amostras de tecido da pele do retalho e do tecido vascular foram colhidas para análise histológica. Os animais do grupo Enxerto tiveram apenas a pele enxertada colhida para análise histológica, no dia 7, pois não foram realizadas anastomoses nesse grupo.

### 3.5 Técnica cirúrgica do retalho inguinal livre

O procedimento cirúrgico se inicia com anestesia dos ratos com injeção intraperitoneal da associação de Cetamina (80 mg/kg) e Xilazina (10 mg/kg). Após anestesia, são realizadas: tricotomia da região inguinal do rato e antissepsia com solução alcoólica de digluconato de clorexidina 0.5%. A marcação do retalho é realizada com tamanho de aproximadamente 3 cm x 3 cm, centrado nos vasos femorais (Figura 1). A base do retalho é assinalada com uma seta para posterior sutura em sua posição original.

Figura 1 - Rato anestesiado, tricotomizado e marcação do retalho



Fonte: Elaborada pelo autor.

A incisão circular da pele, na porção média da coxa, abrangendo pele e tecido subcutâneo é então feita com bisturi lâmina 15. Através de auxílio de microscópio cirúrgico (D.F Vasconcellos M90, D.F Vasconcellos S.A, São Paulo - SP), com magnificação de 10x, identificamos os vasos epigástricos superficiais, que suprem o retalho (Figura 2).

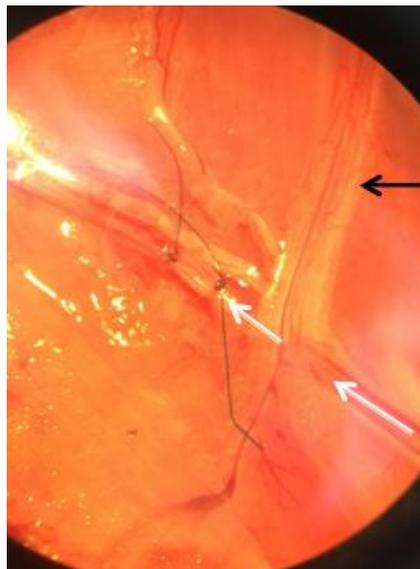
Figura 2 - Identificação de vasos epigástricos superficiais



Fonte: Elaborada pelo autor.

A dissecção dos vasos femorais é concluída, com sua dupla ligadura e secção distal aos vasos epigástricos superficiais (Figura 3). Tesouras de dissecção são utilizadas para liberá-lo da fáscia muscular subjacente.

Figura 3 - Ligadura dos vasos femorais distalmente à emergência dos vasos epigástricos superficiais.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Seta preta: vasos epigástricos superficiais. Setas brancas: vasos femorais e direção do fluxo sanguíneo.

A ligadura de ramos colaterais é realizada, deixando o retalho conectado apenas aos vasos epigástricos superficiais em continuidade com porção proximal dos vasos femorais (Figura 4).

Figura 4 - Retalho em continuidade com a porção proximal dos vasos femorais.

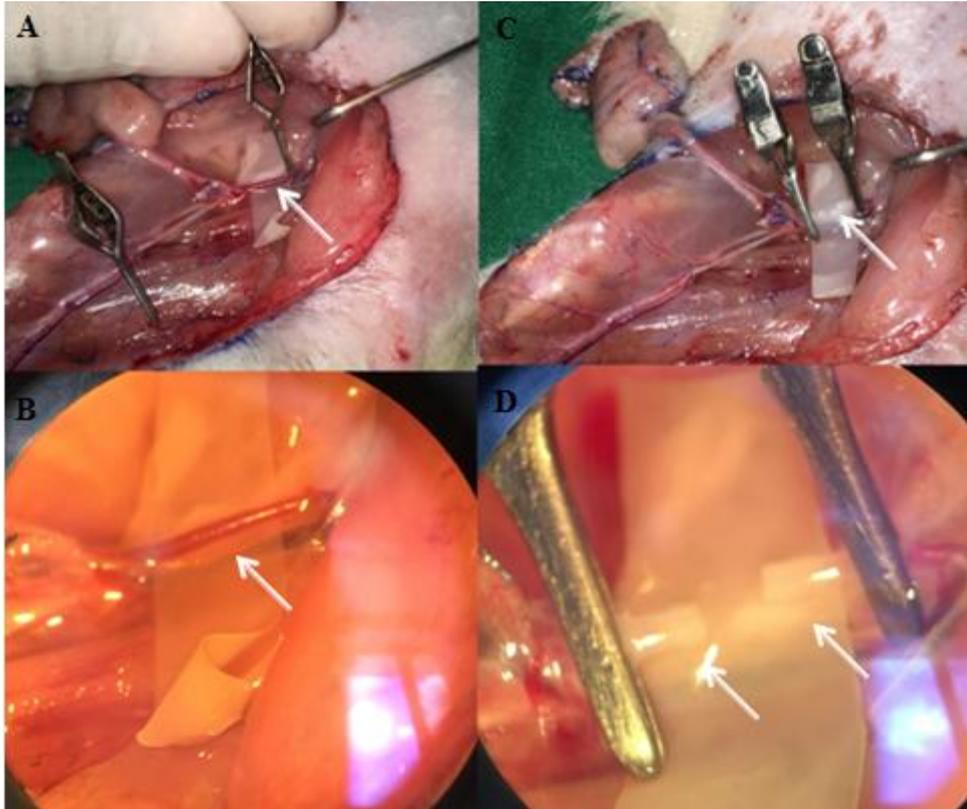


Fonte: Elaborada pelo autor.

Seta preta: vasos epigástricos superficiais. Setas brancas: vasos femorais.

O clampeamento do pedículo do retalho é então realizado, com sua posterior secção, no 1/3 médio da artéria e veia femoral, entre o ligamento inguinal e a emergência dos vasos epigástricos superficiais (Figura 5). Os lumens dos vasos são irrigados com solução heparinizada (3mL de heparina em 200mL de SF 0,9%) para remoção de eventuais coágulos ou impurezas.

Figura 5 - Clampeamento e secção dos vasos femorais

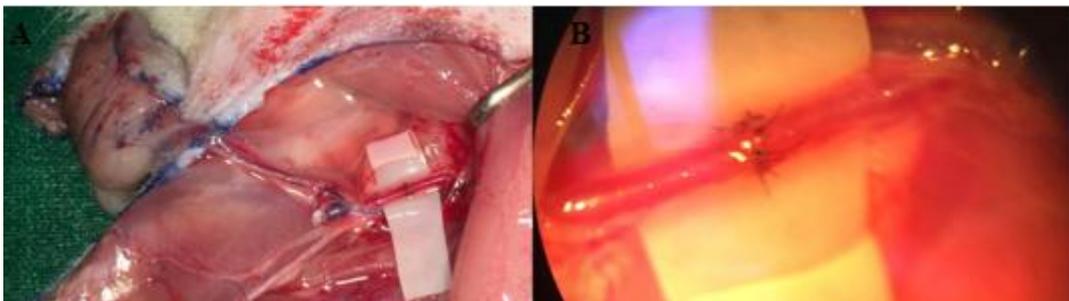


Fonte: Elaborada pelo autor.

Setas brancas: vasos femorais. (A,B) Isolamento da artéria femoral e posicionamento dos clampes. (C,D) Clampes posicionados e artéria femoral seccionada.

A magnificação do microscópio é então alterada para 16x. As anastomoses dos vasos são realizadas com sutura de pontos interrompidos, com nylon monofilamentar tamanho 10-0, inicialmente da artéria e posteriormente da veia femoral (Figura 6).

Figura 6 - Anastomose de artéria femoral



Fonte: Elaborada pelo autor.

(A) Artéria femoral após anastomose (B) Aumento de 16x.

Em uma parcela dos ratos a anastomose não foi realizada, com finalidade de comparação da viabilidade do tecido, através de nutrição por transudato da ferida e pele adjacente, grupo denominado Enxerto.

A perfusão do retalho era então avaliada, através de sua coloração e do sangramento de suas bordas. A coloração de um retalho bem perfundido é similar ao da pele adjacente (geralmente de cor rosa), quando existe insuficiência de fluxo arterial a pele tende a assumir uma coloração mais pálida. A pele apresenta coloração roxa ou azul quando existe deficiência de drenagem venosa, indicando comprometimento do segmento venoso do pedículo. O teste de patência de *Ackland* foi aplicado nos vasos, esvaziando um segmento de vaso distal à anastomose com o auxílio de duas pinças, a pinça proximal era solta e ocorria avaliação do fluxo sanguíneo através da anastomose, se houvesse fluxo satisfatório. Caso a perfusão do retalho estivesse comprometida, a anastomose responsável era identificada, realizada exérese do segmento da anastomose no vaso e o procedimento era realizado novamente. A sutura de pele era então realizada com pontos contínuos de Nylon monofilamentar 5-0 (Figura 7).

Figura 7 - Retalho suturado com pontos contínuos



Fonte: Elaborada pelo autor.

Após o procedimento cirúrgico, o animal foi isolado em gaiola privativa e vestido com colete protetor, preservando o retalho de uma possível canibalização. O colete protetor foi confeccionado com películas de radiografias, em modelo descrito por Westin e Heden. Ele

funciona através da limitação da flexão cervical do animal, impedindo o contato com a ferida operatória (WESTIN; HEDEN, 1988) (Figura 8).

Figura 8 - Rato utilizando colete protetor



Fonte: Elaborada pelo autor.

### 3.6 Fármaco avaliado

O Bevacizumabe (Avastin®, Genentech) foi utilizado na forma de frascos-ampola contendo 100mg de Bevacizumabe em 4mL, 25mg/mL. O medicamento foi diluído com SF 0.9% no dia de sua administração aos animais, calculando-se a dose de 5mg/kg de peso do rato.

### 3.7 Avaliação da viabilidade do retalho

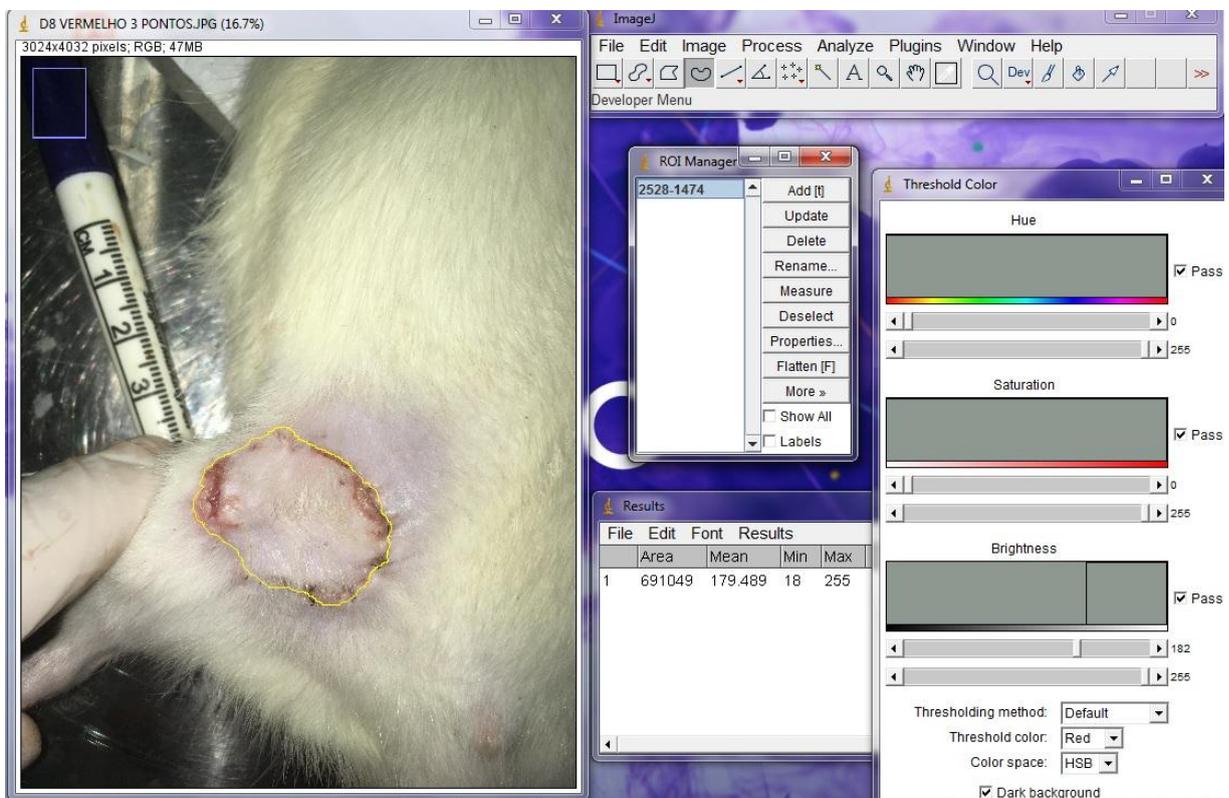
Os ratos foram avaliados nos dias 0, 2 e 7 para análise da viabilidade do retalho ou enxerto de pele. As avaliações foram divididas em análise macroscópica (realizada nos dias 0,2 e 7) e análise histológica (realizada no dia 7, após sacrifício do animal).

### 3.7.1 Análise macroscópica

Utilizou-se câmera fotográfica digital de alta resolução (12 megapixels) para obtenção de fotografias padronizadas que permitiram quantificação da área necrosada ou de deiscência, através de software em computador (Image J). (Figura 9-11)

As imagens do dia 7 foram escolhidas para análise. O software foi então utilizado para seleção manual, primeiramente da área total do retalho. (Figura 9)

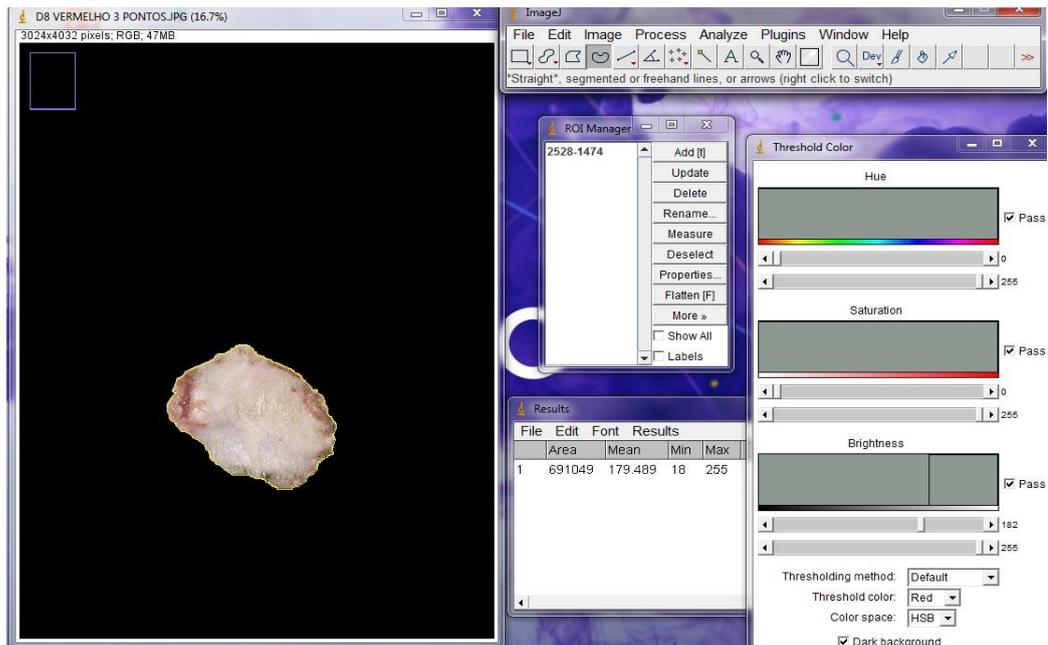
Figura 9 - Mensuração da área do retalho área total do retalho



Fonte: Elaborada pelo autor.

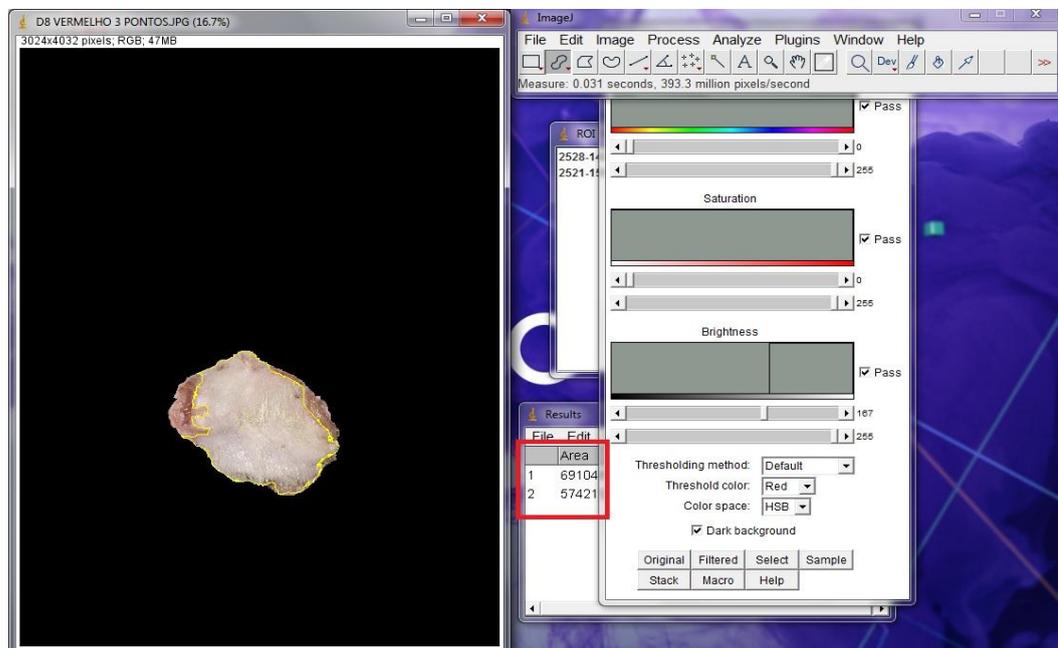
Após a seleção dessa área, foi realizado cálculo do seu tamanho em pixels (Figura 10) e foi realizada nova seleção manual, mas agora apenas da área considerada viável no retalho, retirando áreas vermelhas ou pretas, consideradas de deiscência ou necrose. (Figura 11) Após seleção das áreas brancas ou rosadas, consideradas viáveis, o cálculo dessa área foi estimado, também em pixels. A área viável foi dividida pela área total do retalho, resultando em percentual de sobrevivência do retalho. (Figura 11). As mensurações foram realizadas separadamente por dois assistentes de pesquisa, cegos para metodologia do estudo, e as médias das duas medidas foram analisadas.

Figura 10 - Cálculo do tamanho em pixels da área total do retalho



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 11 - Mensuração e cálculo de percentual de retalho viável, retirando áreas de necrose e deiscência



Fonte: Elaborada pelo autor.

A perfusão do retalho também foi analisada através de observação visual da coloração da pele e do seu turgor nesses três dias. A coloração rosa da pele do retalho ou enxerto é associada à boa perfusão. Os animais não foram anestesiados para obtenção das imagens no 2º

dia pós-operatório. Eles foram novamente anestesiados apenas no dia 7 e, após obtenção das fotografias padronizadas, o pedículo do retalho foi então abordado para avaliação das anastomoses. Realizou-se teste de esvaziamento (teste de *Ackland*) e foi realizada secção dos vasos, em região distal a anastomose, registrando-se a presença de sangramento nos vasos que estavam patentes. Após esse registro, foi realizada exérese de um segmento da artéria e da veia femoral que incluía a região de anastomose, para fins de análise histológica. Os animais do grupo Enxerto foram anestesiados e, após obtenção das fotografias, tiveram a pele do enxerto colhida para análise histológica.

### **3.7.2 Análise Histológica**

Os animais foram sacrificados no 7º dia após procedimento cirúrgico, com uma dose elevada de Cetamina (240mg/kg) e Xilazina (30mg/kg). A área do retalho e pequeno segmento incluindo a região da anastomose de artéria e veia femoral foram excisados e acondicionando em solução tamponada de formaldeído a 10%.

Os animais que foram submetidos ao procedimento de enxertia de pele, tiveram apenas a área de pele enxertada colhida. Os animais dos grupos Retalho-SF e Retalho-BVZ tiveram três peças colhidas: área de pele do retalho, segmento arterial da anastomose e segmento venoso da anastomose. Subsequentemente, as peças foram encaminhadas para processamento histológico, acondicionadas em blocos de parafina. Esforços foram realizados para acondicionar os vasos nos blocos em sentido vertical e realizar cortes axiais, para mensuração das camadas da parede vascular.

Os blocos foram cortados em cortes de cerca de 5 µm de espessura e fixados em lâminas histológicas, corados com hematoxilina e eosina (H&E) para avaliação microscópica.

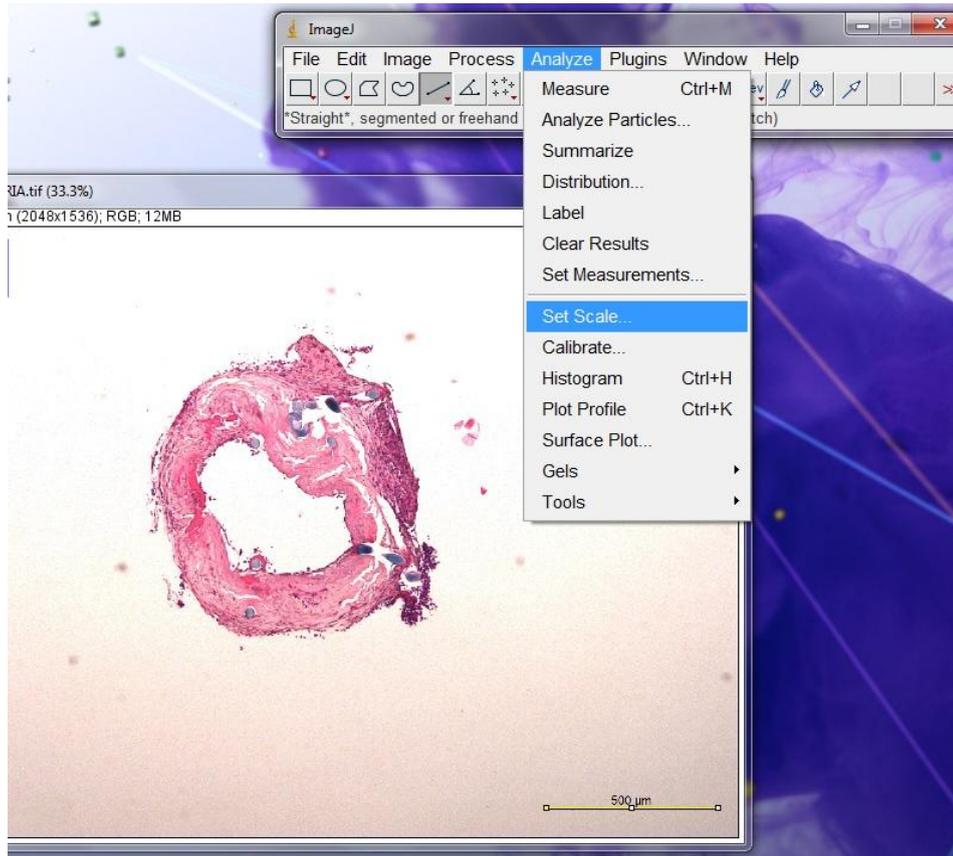
Os retalhos de pele tinham forma triangular, com pedículo em seu ângulo inferior. Foram realizados quatro cortes no tecido: zona do pedículo, zona intermediária, zona da derme profunda e zona da epiderme associada à derme superficial. Os cortes foram então analisados por patologista experiente, com método duplo-cego, classificando achados de necrose ou inflamação em: ausente, discreta, moderada e intensa. Os escores 0,1,2 e 3 foram então aplicados, respectivamente, para os achados de necrose ou inflamação classificados em: ausente, discreta, moderada e intensa. A presença de hemorragia foi classificada pelo patologista em presente ou ausente.

A análise dos vasos dos ratos submetidos à procedimento microcirúrgico (Grupos Retalho-SF e Retalho-BVZ) foi realizada por colaboradores com método duplo-cego.

Fotografias padronizadas das lâminas foram realizadas com câmera digital de alta resolução de microscópio e, através de software em computador (Image J), as camadas da parede vascular foram mensuradas. (Figuras 12 e 13)

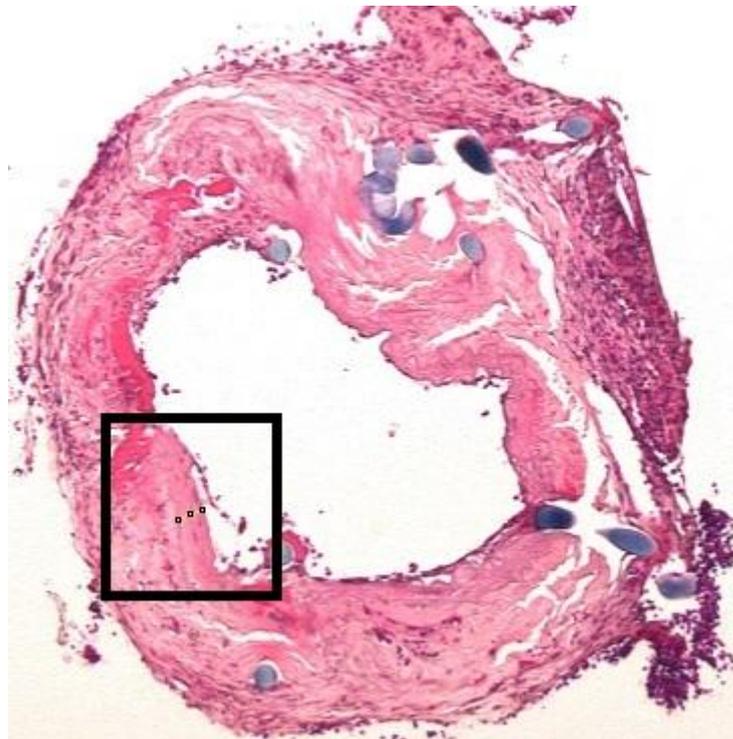
O software Image J foi inicialmente utilizado para calibrar sua escala, medindo e usando a régua adicionada à fotografia automaticamente pelo microscópio, no momento da captação da imagem das lâminas. A régua media 0.5mm ou 500 $\mu$ m. (Figura 12) A região mais uniforme da parede do vaso foi assinalada pelo patologista e realizou-se a medida, endereçando camadas íntima e média do segmento arterial. (Figura 13) Não foram realizadas mensurações no segmento venoso devido à extrema dificuldade de obter lâminas e imagens padronizadas desses vasos em cortes axiais, além da exiguidade de sua camada média.

Figura 12 - Regulação do tamanho da escala



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 13 - Seleção e mensuração do tamanho das camadas média e íntima



Fonte: Elaborada pelo autor.

### 3.9 Análise Estatística

As medidas da viabilidade do retalho e da espessura da artéria do pedículo vascular, por se tratarem de variáveis quantitativas, foram inicialmente analisadas pelo teste de Shapiro-Wilk para verificar a normalidade da distribuição. Como tal requisito foi constatado para ambas as variáveis, então, para a estatística descritiva, calcularam-se a média e o desvio padrão, bem como aplicaram-se métodos paramétricos para a estatística analítica. Comparações entre os grupos Enxerto, Retalho-SF e Retalho-BVZ em relação ao percentual de área de tecido viável foram feitas mediante o uso da análise de variância (ANOVA) para um fator de classificação, complementada pelo teste de comparações múltiplas de Tukey, para verificar diferenças entre os grupos aos pares. Para comparar os grupos Retalho-SF e Retalho-BVZ em relação à espessura da parede da artéria do pedículo vascular, utilizou-se o teste *t* para variáveis não emparelhadas, situação em que, além da significância estatística, determinaram-se, ainda, a diferença de médias e seu respectivo intervalo de confiança de 95%.

As variáveis ordinais, isto é, as medidas da intensidade de necrose e de inflamação nos preparados histológicos, foram expressas como mediana, intervalo interquartil e valores mínimo e máximo. Comparações entre os grupos Enxerto, Retalho-SF e Retalho-BVZ em relação a tais variáveis foram feitas por meio do teste de Kruskal-Wallis, complementado pelo teste de comparações múltiplas de Dunn, para verificar diferenças entre os grupos aos pares.

As variáveis categóricas, quais sejam a ocorrência, nos preparados histológicos, de necrose, inflamação e hemorragia nos retalhos ou enxertos e de trombose intraluminal no pedículo vascular, assim como os testes de esvaziamento e sangramento na artéria veia do pedículo, foram expressas como frequência absoluta e relativa. Tais variáveis foram analisadas pelo teste exato de Fisher e pelo teste qui-quadrado.

Em todas as análises, empregaram-se testes bicaudais, estabelecendo-se o nível de significância em 0,05 (5%), considerando-se, por conseguinte, como estatisticamente significante um valor *P* menor que 0,05. O *software* GraphPad Prism versão 8.0 (GraphPad Software, San Diego, California, USA) foi utilizado tanto para a realização dos procedimentos estatísticos como para a elaboração dos gráficos.

## **4 RESULTADOS**

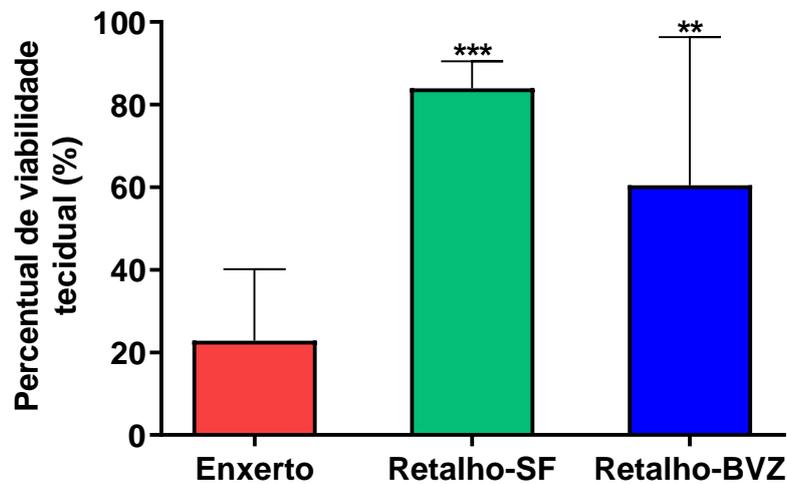
Inicialmente 30 animais foram operados, porém 7 animais desprenderam o colete protetor e canibalizaram o retalho, então foram retirados do estudo. Sete novos animais foram randomizados entre os grupos que sofreram perdas. Um animal do grupo Enxerto foi a óbito no pós-operatório imediato, possivelmente por complicações anestésicas ou hemorragia. Então, dos 29 animais restantes, dez pertenciam ao grupo Retalho-SF, dez ao grupo Retalho-BVZ e nove ao grupo Enxerto.

### **4.1 Avaliação da viabilidade do retalho**

#### ***4.1.1 Cálculo de área tecidual viável***

Foi constatada diferença estatisticamente significativa, após uso de análise de variância (ANOVA), entre o percentual de viabilidade tecidual dos grupos em que foram realizados retalhos e o grupo Enxerto. O grupo enxerto apresentou significativamente menor percentual de área de tecido viável, em relação aos dois outros grupos (média 22,81%  $\pm$ 17,33). O grupo Retalho-BVZ (média 60,50%  $\pm$  35,87) apresentou menor percentual de área de tecido viável em relação ao grupo Retalho-SF (média 83,98%  $\pm$  6,54), porém essa diferença não foi estatisticamente significativa, conforme constatamos na figura 14 e tabela 1.

Figura 14 - Área de tecido viável, expressa em termos percentuais em função da área total do retalho ou enxerto, mensurada nos grupos Enxerto, Retalho-SF e Retalho-BVZ no dia 7.



Fonte: Dados da pesquisa.

Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 9 animais do grupo Enxerto e 10 ratos dos grupos Retalho-SF e Retalho-BVZ. Comparações entre os três grupos de tratamento foram feitas mediante o uso da análise de variância (ANOVA) para um fator de classificação, complementada pelo teste de comparações múltiplas de Tukey, para verificar diferenças entre os grupos aos pares. Os símbolos \*\*\*( $P < 0,0001$ ) e \*\*( $P = 0,0048$ ) denotam diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo Enxerto.

Tabela 1 - Área de tecido viável, expressa em termos percentuais em função da área total do retalho ou enxerto, mensurada nos grupos Enxerto, Retalho-SF e Retalho-BVZ no dia 7.

Avaliação da viabilidade	Enxerto Média $\pm$ DP	Retalho-SF Média $\pm$ DP	Retalho-BVZ Média $\pm$ DP	Significância (ANOVA)
Área de tecido viável (%)	22,81 $\pm$ 17,33	83,98 $\pm$ 6,54 <sup>a</sup>	60,50 $\pm$ 35,87 <sup>b</sup>	<b>P &lt; 0,0001</b>

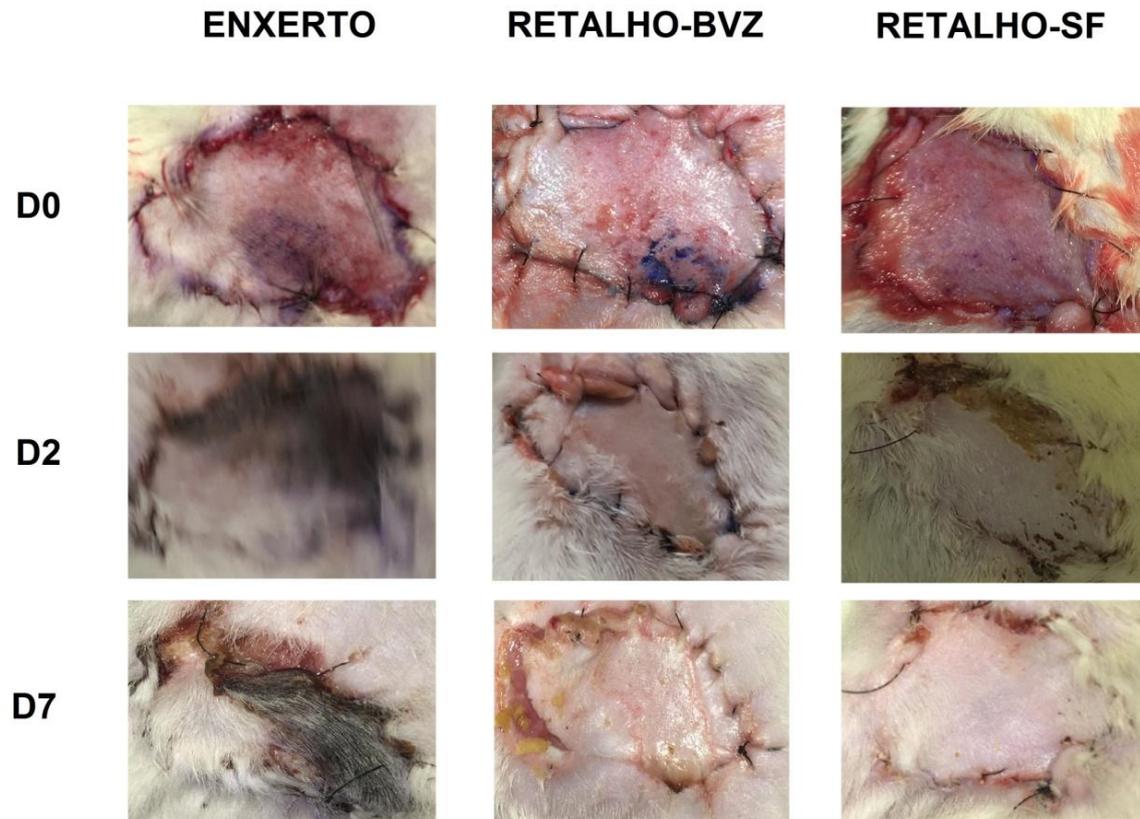
Fonte: Dados da pesquisa.

DP: desvio padrão; As letras <sup>a</sup>( $P < 0,0001$ ) e <sup>b</sup>( $P = 0,0048$ ) denotam diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo Enxerto (teste de Tukey).

Os dados correspondem à análise de 9 animais do grupo Enxerto e 10 ratos dos grupos Retalho-SF e Retalho-BVZ. Comparações entre os três grupos de tratamento foram feitas mediante o uso da análise de variância (ANOVA) para um fator de classificação, complementada pelo teste de comparações múltiplas de Tukey, para verificar diferenças entre os grupos aos pares. Constatou-se que o percentual de área de tecido viável verificado nos grupos Retalho-SF e Retalho-BVZ foi significativamente maior que o observado no grupo Enxerto.

A figura 15 revela a evolução da viabilidade do retalho ou do enxerto de pele de animais selecionados em cada um dos três grupos, nos dias 0,2 e 7.

Figura 15 - Evolução do retalho ou do enxerto de pele de animais dos grupos Enxerto, Retalho-BVZ e Retalho-SF durante a primeira semana pós-operatória.



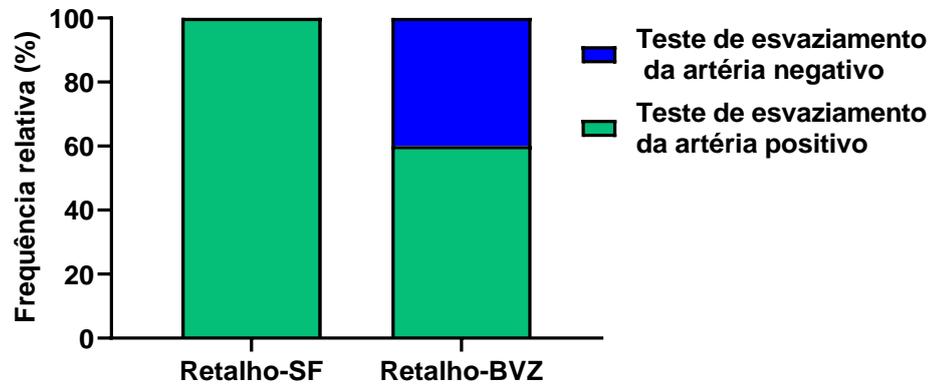
Fonte: Elaborada pelo autor.

(D0) Dia do procedimento. (D2) 2º dia pós-operatório. (D7) 7º dia pós-operatório

#### ***4.1.2 Testes de patência***

Conforme apresentando nas figuras 16, 17 e tabela 2, o teste de esvaziamento (teste de *Ackland*) foi positivo, evidenciando patência, em um percentual maior de artérias (100%) e veias (90%) dos animais do grupo Retalho-SF em relação ao grupo Retalho-BVZ, porém essa diferença não foi estatisticamente significativa.

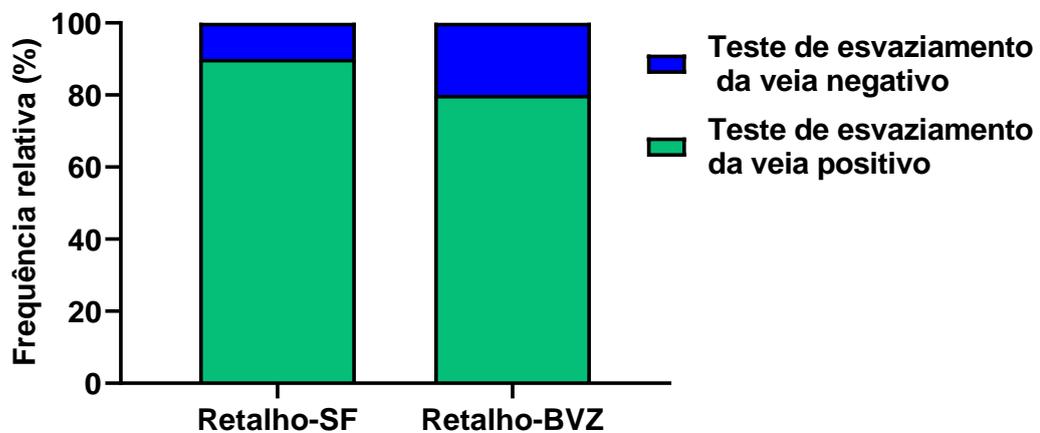
Figura 16 - Teste de esvaziamento realizado na artéria do pedículo vascular dos grupos Retalho-SF e Retalho-BVZ no dia 7.



Fonte: Dados da pesquisa.

Dados expressos como frequência relativa (percentual) de testes positivos e negativos verificados em 10 animais de ambos os grupos. O teste exato de Fisher foi usado para comparar os dois grupos em relação à positividade ou negatividade do teste. Não foi constatada diferença estatisticamente significativa entre os grupos Retalho-SF e Retalho-BVZ em relação à proporção de animais com teste de esvaziamento ( $P = 0,0867$ ).

Figura 17 - Teste de esvaziamento realizado na veia do pedículo vascular dos grupos Retalho-SF e Retalho-BVZ no dia 7.



Fonte: Dados da pesquisa.

Dados expressos como frequência relativa (percentual) de testes positivos e negativos verificados em 10 animais de ambos os grupos. O teste exato de Fisher foi usado para comparar os dois grupos em relação à positividade ou negatividade do teste. Não foi constatada diferença estatisticamente significativa entre os grupos Retalho-SF e Retalho-BVZ em relação à proporção de animais com teste de esvaziamento ( $P = 0,9999$ ).

Tabela 2 - Teste de esvaziamento realizado na artéria e na veia do pedículo vascular dos grupos Retalho-SF e Retalho-BVZ no dia 7.

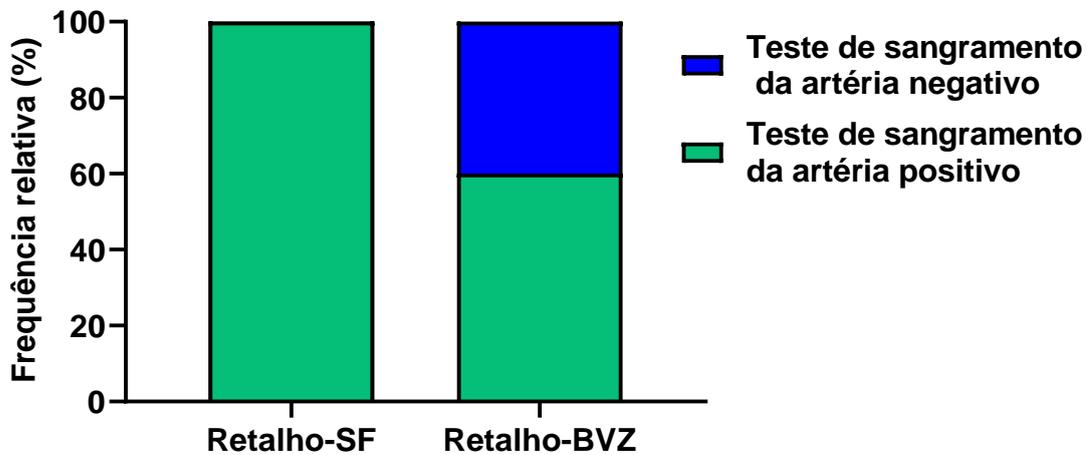
Teste de esvaziamento positivo	Retalho-SF n (%)	Retalho-BVZ n (%)	Significância (Teste de Fisher)
Artéria	10 (100,00%)	6 (60,00%)	P = 0,0867
Veia	9 (90,00%)	8 (80,00%)	P = 0,9999

Fonte: Dados da pesquisa.

Dados expressos como frequência absoluta e relativa (percentual) de testes positivos verificados em 10 animais de ambos os grupos. Para cada vaso, o teste exato de Fisher foi usado para comparar os dois grupos em relação à positividade do teste. Tanto para a artéria como para a veia, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos Retalho-SF e Retalho-BVZ em relação à proporção de animais com teste de esvaziamento positivo.

O teste de secção e observação de sangramento também confirmou um percentual menor de patência em artérias (60%) e veias (80%) do grupo Retalho-BVZ, porém sem diferença significativa (Figura 18,19 e tabela 3).

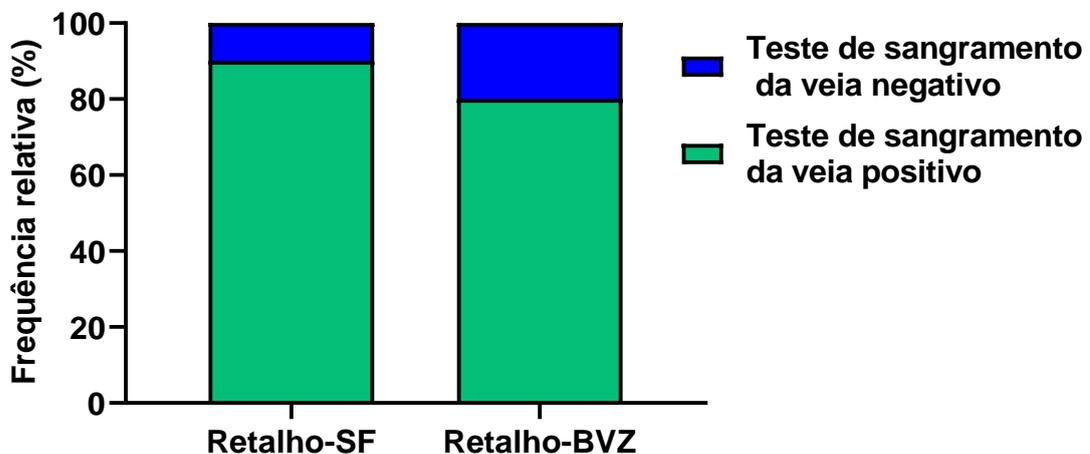
Figura 18 - Teste de sangramento realizado na artéria do pedículo vascular dos grupos Retalho-SF e Retalho-BVZ no dia 7.



Fonte: Dados da pesquisa.

Dados expressos como frequência relativa (percentual) de testes positivos e negativos verificados em 10 animais de ambos os grupos. O teste exato de Fisher foi usado para comparar os dois grupos em relação à positividade ou negatividade do teste. Não foi constatada diferença estatisticamente significativa entre os grupos Retalho-SF e Retalho-BVZ em relação à proporção de animais com teste de sangramento ( $P = 0,0867$ ).

Figura 19 - Teste de sangramento realizado na veia do pedículo vascular dos grupos Retalho-SF e Retalho-BVZ no dia 7.



Fonte: Dados da pesquisa.

Dados expressos como frequência relativa (percentual) de testes positivos e negativos verificados em 10 animais de ambos os grupos. O teste exato de Fisher foi usado para comparar os dois grupos em relação à positividade ou negatividade do teste. Não foi constatada diferença estatisticamente significativa entre os grupos Retalho-SF e Retalho-BVZ em relação à proporção de animais com teste de sangramento ( $P = 0,9999$ ).

Tabela 3 - Teste de sangramento realizado na artéria e na veia do pedículo vascular dos grupos Retalho-SF e Retalho-BVZ no dia 7.

Teste de sangramento positivo	Retalho-SF n (%)	Retalho-BVZ n (%)	Significância (Teste de Fisher)
Artéria	10 (100,00%)	6 (60,00%)	P = 0,0867
Veia	9 (90,00%)	8 (80,00%)	P = 0,9999

Fonte: Dados da pesquisa.

Dados expressos como frequência absoluta e relativa (percentual) de testes positivos verificados em 10 animais de ambos os grupos. Para cada vaso, o teste exato de Fisher foi usado para comparar os dois grupos em relação à positividade do teste. Tanto para a artéria como para a veia, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos Retalho-SF e Retalho-BVZ em relação à proporção de animais com teste de sangramento positivo.

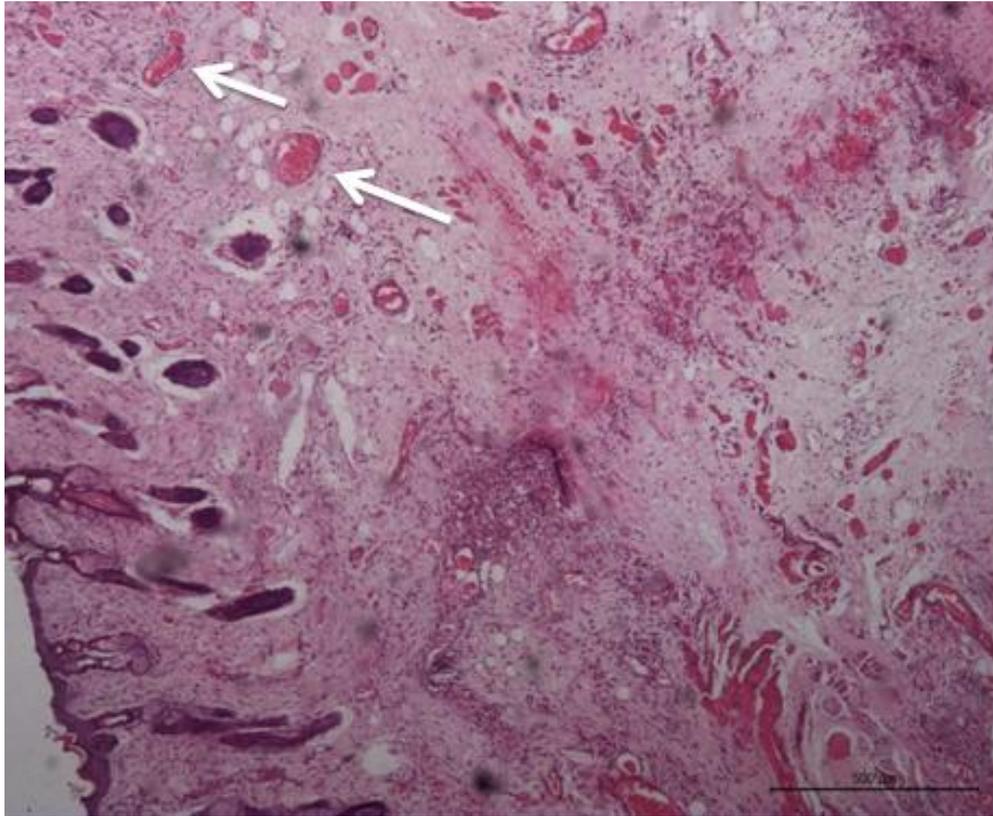
## 4.2 Análise histológica

### 4.2.1 Análise histológica da pele do retalho ou enxerto

Das 29 amostras colhidas, não foi possível realizar análise de duas amostras devido a problemas operacionais durante a coleta e confecção das lâminas, uma do grupo Enxerto e uma do grupo Retalho-SF. Restaram então 27 amostras: 10 amostras do grupo Retalho-BVZ, 9 amostras do grupo Retalho-SF e 8 amostras do grupo Enxerto.

As amostras da pele dos retalhos foram analisadas separadamente em quatro diferentes cortes (epiderme e derme, derme profunda, zona intermediária e pedículo vascular). O grupo Retalho-SF apresentou vasos pÉrvios e, na maior parte de suas amostras, ausência de necrose ou infiltrados inflamatÓrios (Figura 20).

Figura 20 - Grupo Retalho-SF, amostras evidenciando ausência de necrose e vasos pérvios

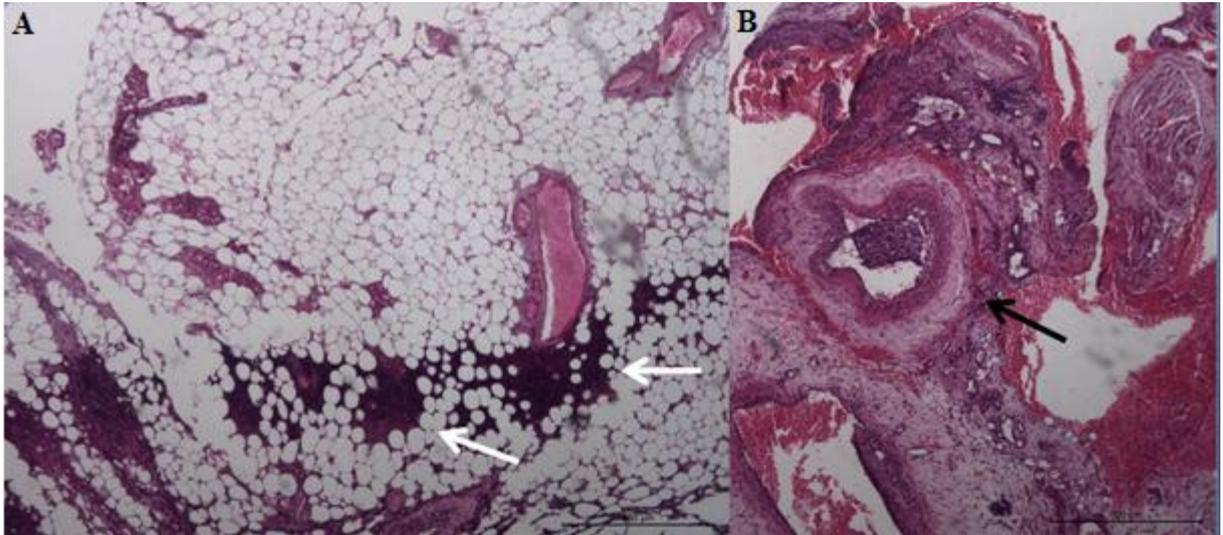


Fonte: Elaborada pelo autor.

Setas brancas: vasos pérvios. Hematoxilina e Eosina, 5x.

As amostras do grupo Retalho-BVZ indicavam alguns vasos trombosados e uma maior quantidade de focos de necrose, infiltrados inflamatrios difusos (Figura 21).

Figura 21 - Grupo Retalho-BVZ, amostras evidenciando maior quantidade de necrose, infiltrados inflamatórios e vasos trombosados

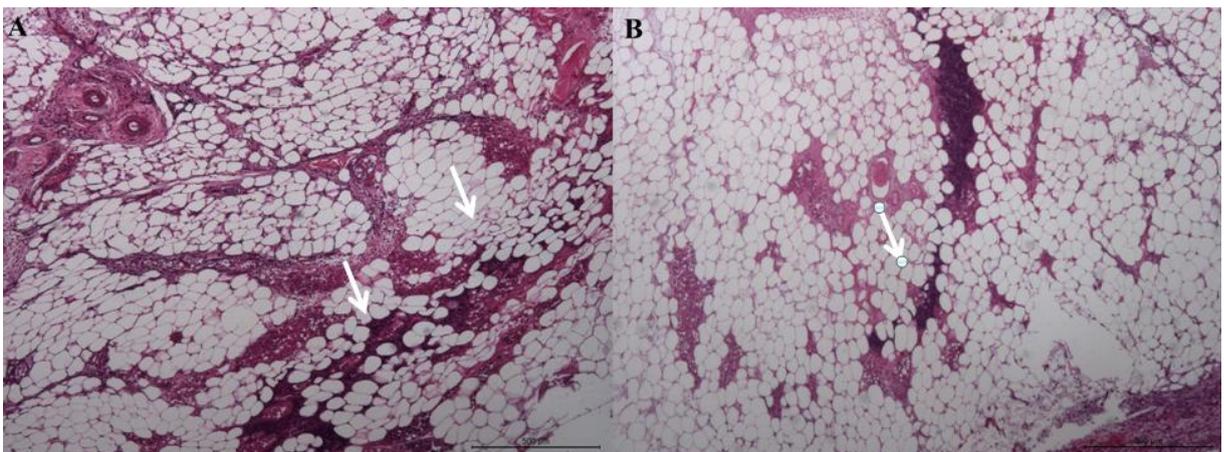


Fonte: Elaborada pelo autor.

(A) Setas brancas: Necrose. (B) Seta preta: Vaso trombosado. Hematoxilina e Eosina, 5x.

O grupo Enxerto apresentava maior intensidade de focos de necrose e infiltrados inflamatórios que os outros grupos, que geralmente se estendem por toda a profundidade dos cortes (Figura 22). Alguns vasos dos animais do grupo Enxerto também se revelaram trombosados.

Figura 22 - Grupo Enxerto, amostras evidenciando grande intensidade de necrose e infiltrados



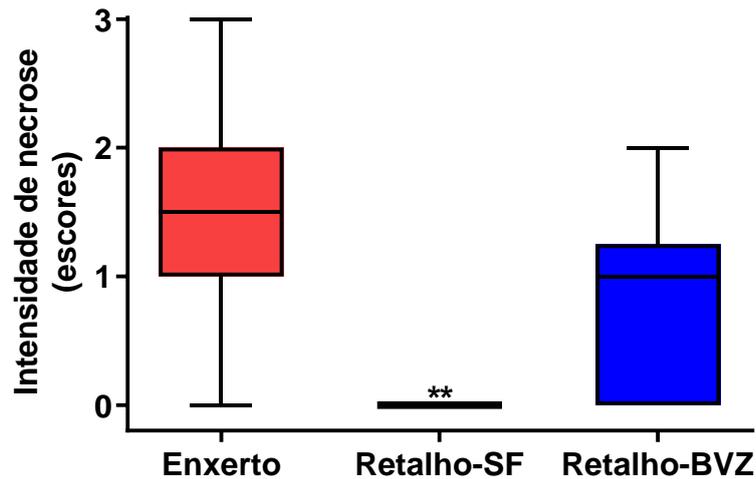
Fonte: Elaborada pelo autor.

(A,B) Setas brancas: Focos de necrose por diferentes cortes. Hematoxilina e Eosina, 5x.

A classificação da intensidade de necrose e infiltrados inflamatórios evidenciou maior intensidade de necrose e inflamação no grupo Enxerto, estatisticamente significativa em

relação ao grupo Retalho-SF (Figura 23 e 24). O grupo Retalho-BVZ apresentou uma maior mediana de intensidade de necrose e inflamação em relação ao grupo Retalho-SF, mas não significativamente maior (Tabela 4).

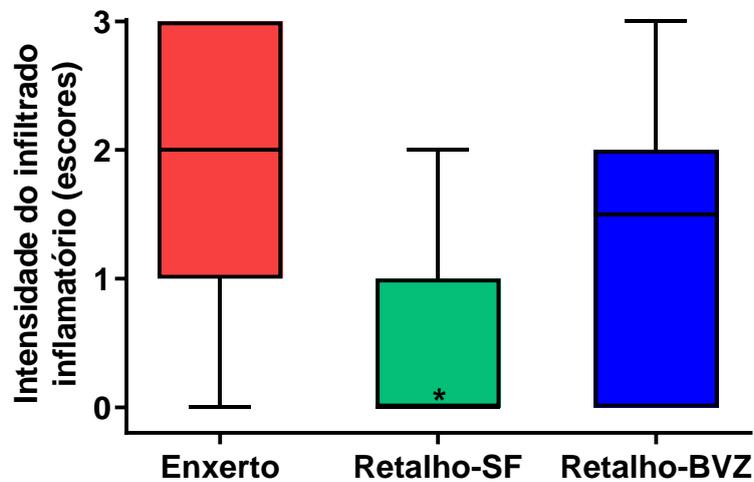
Figura 23 - Avaliação do grau de necrose nos preparados histológicos do retalho ou enxerto dos grupos Enxerto, Retalho-SF e Retalho-BVZ.



Fonte: Dados da pesquisa.

O grau de necrose foi quantificado em ausente, discreto, moderado e intenso, correspondendo aos escores 0, 1, 2 e 3, respectivamente. Dados expressos como mediana, intervalo interquartil e valores mínimo e máximo das observações realizadas em 8 animais do grupo Enxerto, 9 ratos do grupo Retalho-SF e 10 animais do grupo Retalho-BVZ. Comparações entre os três grupos de tratamento foram feitas mediante o uso do teste de Kruskal-Wallis, complementado pelo teste de comparações múltiplas de Dunn, para verificar diferenças entre os grupos aos pares. O símbolo \*\*( $P=0,0015$ ) denota diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Enxerto.

Figura 24 - Avaliação da intensidade do infiltrado inflamatório nos preparados histológicos do retalho ou enxerto dos grupos



Fonte: Dados da pesquisa.

A intensidade do infiltrado inflamatório foi quantificada em ausente, discreta, moderada e intensa, correspondendo aos escores 0, 1, 2 e 3, respectivamente. Dados expressos como mediana, intervalo interquartil e valores mínimo e máximo das observações realizadas em 8 animais do grupo Enxerto, 9 ratos do grupo Retalho-SF e 10 animais do grupo Retalho-BVZ. Comparações entre os três grupos de tratamento foram feitas mediante o uso do teste de Kruskal-Wallis, complementado pelo teste de comparações múltiplas de Dunn, para verificar diferenças entre os grupos aos pares. O símbolo \*( $P=0,0279$ ) denota diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Enxerto.

Tabela 4 - Avaliação da intensidade da necrose e da inflamação nos preparados histológicos do retalho ou enxerto dos grupos Enxerto, Retalho-SF e Retalho-BVZ

Parâmetro histológico	Enxerto Mediana (IIQ)	Retalho-SF Mediana (IIQ)	Retalho-BVZ Mediana (IIQ)	Significância (Teste de Kruskal-Wallis)
Intensidade da necrose	1,50 (1,00 a 2,00)	0,00 (0,00 a 0,00) <sup>a</sup>	1,00 (0,00 a 1,25)	<b>P = 0,0015</b>
Intensidade do infiltrado inflamatório	2,00 (1,00 a 3,00)	0,00 (0,00 a 1,00) <sup>b</sup>	1,50 (0,00 a 2,00)	<b>P = 0,0279</b>

Fonte: Dados da pesquisa.

IIQ: intervalo interquartil; As letras <sup>a</sup>( $P=0,0015$ ) e <sup>b</sup>( $P=0,0279$ ) denotam diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo Enxerto (teste de Dunn).

A intensidade da necrose e do infiltrado inflamatório foi quantificada em ausente, discreta, moderada e intensa, correspondendo aos escores 0, 1, 2 e 3, respectivamente. Os dados correspondem à análise de 8 animais do grupo Enxerto, 9 ratos do grupo Retalho-SF e 10 animais do grupo Retalho-BVZ. Comparações entre os três grupos de tratamento foram feitas mediante o uso do teste de Kruskal-Wallis, complementado pelo teste de comparações múltiplas de Dunn, para verificar diferenças entre os grupos aos pares. Constatou-se que, no grupo Retalho-SF, tanto a necrose como a inflamação foram menos intensas que no grupo Enxerto.

De acordo com Tabela 5, constata-se ocorrência de necrose significativamente maior nos grupos Enxerto e Retalho-BVZ, em relação ao grupo Retalho-SF. Observando Tabela 6, a

ocorrência de inflamação foi menor no grupo Retalho-SF em relação aos grupos Enxerto e Retalho-BVZ, porém com significância marginal ( $P=0,0588$ ).

Conforme tabela 7, não houve diferenças significantes na ocorrência de hemorragia dos três grupos.

Tabela 5 - Ocorrência de necrose nos preparados histológicos do retalho ou enxerto dos grupos Enxerto, Retalho-SF e Retalho-BVZ.

Grupo	Necrose		Total
	Presente	Ausente	
Enxerto	<b>7 (87,50%)</b>	1 (12,50%)	8 (100,00%)
Retalho-SF	<b>0 (0,00%)</b>	9 (100,00%)	9 (100,00%)
Retalho-BVZ	<b>6 (60,00%)</b>	4 (40,00%)	10 (100,00%)
Total	13	14	27

Fonte: Dados da pesquisa.

Dados expressos como frequência absoluta e relativa (percentual) das observações realizadas em 8 animais do grupo Enxerto, 9 ratos do grupo Retalho-SF e 10 animais do grupo Retalho-BVZ. O teste qui-quadrado foi usado para comparar os três grupos em relação à ocorrência de necrose. Constatou-se que a ocorrência de necrose nos preparados histológicos dos animais dos grupos Enxerto e Retalho-BVZ foi significativamente maior que nos ratos do grupo Retalho-SF ( $P = 0,0010$ ).

Tabela 6 - Ocorrência de inflamação nos preparados histológicos do retalho ou enxerto dos grupos Enxerto, Retalho-SF e Retalho-BVZ.

Grupo	Infiltrado inflamatório		Total
	Presente	Ausente	
Enxerto	7 (87,50%)	1 (12,50%)	8 (100,00%)
Retalho-SF	3 (33,33%)	6 (66,67%)	9 (100,00%)
Retalho-BVZ	7 (70,00%)	3 (30,00%)	10 (100,00%)
Total	17	10	27

Fonte: Dados da pesquisa.

Dados expressos como frequência absoluta e relativa (percentual) das observações realizadas em 8 animais do grupo Enxerto, 9 ratos do grupo Retalho-SF e 10 animais do grupo Retalho-BVZ. O teste qui-quadrado foi usado para comparar os três grupos em relação à ocorrência de inflamação. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os três grupos de tratamento em relação à ocorrência de inflamação. Todavia, as diferenças observadas podem ser consideradas marginalmente significantes ( $P=0,0588$ ).

Tabela 7 - Ocorrência de hemorragia nos preparados histológicos do retalho ou enxerto dos grupos Enxerto, Retalho-SF e Retalho-BVZ.

Grupo	Hemorragia		Total
	Presente	Ausente	
Enxerto	1 (12,50%)	7 (87,50%)	8 (100,00%)
Retalho-SF	2 (22,22%)	7 (77,78%)	9 (100,00%)
Retalho-BVZ	2 (20,00%)	8 (80,00%)	10 (100,00%)
<b>Total</b>	<b>5</b>	<b>22</b>	<b>27</b>

Fonte: Dados da pesquisa.

Dados expressos como frequência absoluta e relativa (percentual) das observações realizadas em 8 animais do grupo Enxerto, 9 ratos do grupo Retalho-SF e 10 animais do grupo Retalho-BVZ. O teste qui-quadrado foi usado para comparar os três grupos em relação à ocorrência de hemorragia. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os três grupos de tratamento em relação à ocorrência de hemorragia ( $P=0,8657$ ).

#### 4.2.2 Análise histológica de segmento do pedículo vascular contendo anastomose

Vinte amostras foram colhidas, não foi possível realizar análise de duas das amostras devido a problemas operacionais, durante a coleta e tentativa de confecção de corte axial dos vasos, uma do grupo Retalho-SF e uma do grupo Retalho-BVZ.

Não houve diferença estatística quando comparados os grupos Retalho-SF e Retalho-BVZ em relação à ocorrência de trombose intraluminal nos vasos do pedículo (Tabela 8). A mensuração das paredes das artérias dos diferentes grupos também não evidenciou diferença significativa (Figura 25 e Tabela 9).

Tabela 8 - Ocorrência de trombose intraluminal nos vasos do pedículo vascular do retalho dos grupos Retalho-SF e Retalho-BVZ.

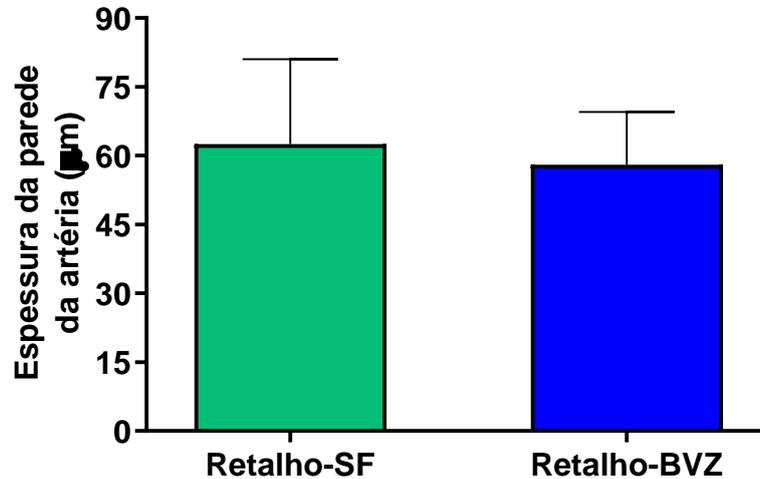
Grupo	Trombose intraluminal		Total
	Presente	Ausente	
Retalho-SF	3 (33,33%)	6 (66,67%)	9 (100,00%)
Retalho-BVZ	4 (44,44%)	5 (55,56%)	9 (100,00%)
<b>Total</b>	<b>7</b>	<b>11</b>	<b>18</b>

Fonte: Dados da pesquisa.

Dados expressos como frequência absoluta e relativa (percentual) das observações realizadas em 9 animais de ambos os grupos. O teste exato de Fisher foi usado para comparar os dois grupos em relação à ocorrência de trombose intraluminal. Não foi constatada diferença estatisticamente significativa entre os grupos Retalho-SF e

Retalho-BVZ em relação à proporção de animais que evoluíram com trombose intraluminal dos vasos do pedículo vascular do retalho ( $P = 0,9999$ ).

Figura 25 - Espessura, em micrômetros, da parede da artéria do pedículo vascular do retalho mensurada nos grupos Retalho-SF e Retalho-BVZ.



Fonte: Dados da pesquisa.

Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 9 animais de ambos os grupos. Comparações entre os dois grupos de tratamento foram feitas mediante o uso do teste *t* para dados não emparelhados. Não foi constatada diferença estatisticamente significativa entre os grupos Retalho-SF e Retalho-BVZ em relação à espessura da parede da artéria do pedículo vascular do retalho ( $P=0,5387$ ).

Tabela 9 - Espessura, em micrômetros, da parede da artéria do pedículo vascular do retalho mensurada nos grupos Retalho-SF e Retalho-BVZ.

Parâmetro	Retalho-SF Média ± DP (n=6)	Retalho-BVZ Média ± DP (n=6)	Diferença de médias	IC 95%	Significância (teste <i>t</i> )
Espessura da artéria do pedículo vascular	62,56 ± 18,47	58,00 ± 11,50	4,56	-10,82 a 19,93	$P = 0,5393$

DP: desvio padrão; IC 95%: intervalo de confiança de 95% da diferença de médias.

Fonte: Dados da pesquisa.

Os dados correspondem à análise de 9 animais de ambos os grupos. O teste *t* para dados não emparelhados foi usado para comparar os dois grupos de tratamento. Não foi constatada diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos em relação à espessura da parede da artéria do pedículo vascular do retalho.

## 5 DISCUSSÃO

Múltiplos estudos em modelos animais, geralmente em ratos, camundongos e coelhos, avaliam o efeito de fármacos antiangiogênicos na cicatrização de feridas. Esses fármacos inicialmente foram implicados por seus efeitos deletérios no fechamento de feridas, porém alguns estudos concluem que a inibição parcial da angiogênese pode reduzir a formação de tecido cicatricial, diminuindo incidência de cicatrizes hipertróficas e proporcionando melhores resultados cosméticos (TONNESEN; FENG; CLARK, 2000; DIPIETRO, 2016).

A literatura aponta diversos efeitos adversos do Bevacizumabe (BVZ) na cicatrização de feridas, entre os principais: equimose, sangramento, deiscência e infecção (THORNTON *et al.*, 2006; SHARMA; MARCUS, 2013). Porém, não se encontra, após revisão de literatura, pesquisa avaliando influência de BVZ em retalhos. Alguns estudos analisaram influência de fármacos antiangiogênicos em retalhos cutâneos randomizados, porém utilizaram a endostatina como inibidor da angiogênese (DOBRYANSKY *et al.*, 2004). No presente estudo, retalhos inguinais livres foram realizados em ratos, com o propósito de analisar a influência de BVZ na viabilidade desses retalhos e também seu efeito no pedículo vascular, na região da anastomose microvascular.

Diversos modelos de estudo de retalhos cutâneos em animais, geralmente ratos ou camundongos, estão descritos na literatura. Podemos classificá-los em retalhos randômicos, axiais ou livres. Os retalhos randômicos geralmente são confeccionados no dorso do animal, sem planejamento do retalho sobre trajeto de algum vaso específico, recebem sua vascularização apenas através da pele da base do retalho (DOBRYANSKY *et al.*, 2004; CHEN *et al.*, 2018). Os retalhos axiais são planejados sobre a trajetória de algum vaso específico, que é responsável pelo seu suprimento sanguíneo. Isola-se todo o retalho, mantendo-se, porém, sua conexão com o pedículo vascular. Os retalhos livres são levantados da mesma forma que os retalhos axiais, porém realiza-se secção temporária do pedículo vascular que supre o retalho e sua conexão aos vasos receptores. O retalho inguinal destaca-se na literatura em relação aos outros modelos de retalhos em animais, podendo ser confeccionado como um retalho axial ou livre. Ele é planejado sobre os vasos epigástricos superficiais e é amplamente difundido na literatura devido à sua anatomia constante e a fácil dissecação do seu pedículo vascular (KRYGER *et al.*, ; WERKER *et al.*, 1992; VAN ADRICHEM *et al.*, 1996; TØNSETH *et al.*, 2006; WALLMICHATH *et al.*, 2014). No presente estudo o retalho inguinal livre foi utilizado como modelo, transferindo o retalho para

os vasos femorais ipsilaterais, assim como CUNNINGHAM; SHONS, (1979); COOLEY; TADYCH; GOULD, (1990); VAN ADRICHEM *et al.* (1996) e DRAKE *et al.*(2000).

A literatura aponta grande divergência em relação à dosagem de BVZ utilizada em ratos. ACUN *et al.* (2018) concluíram que apenas uma dose de 2.5mg/kg de BVZ, administrada intraperitonealmente, foi suficiente para prevenir formação de adesões intraperitoneais. Outro estudo também comprovou eficácia da dose única de 2.5mg/kg intraperitoneal de BVZ na regressão de lesões endometrióticas peritoneais (SOYSAL *et al.*, 2014). Outros autores utilizaram doses de 2.5mg a 10mg/kg de BVZ por via intraperitoneal, repetindo a dose diariamente ou semanalmente (OZSOY *et al.*, 2017; ASLAN *et al.*, 2018). As divergências também acontecem quando a via de administração escolhida é a intravenosa: STEGMAYR *et al.* (2017) utilizaram doses mais altas, de 10 a 45mg/kg, enquanto THORN *et al.* (2012) utilizaram dose única de 1mg/kg. A dose utilizada nesse estudo foi única, de 5mg de BVZ por quilo de peso do animal, administrada por via intravenosa, mesma dose utilizada por SPERLING *et al.* (2012). Uma dose maior, em estudos futuros, pode tornar significativas algumas análises dos efeitos do BVZ em retalhos livres.

No presente estudo evidenciamos menor percentual de sobrevivência no tecido dos grupos Enxerto e grupo Retalho-BVZ, em relação ao grupo Retalho-SF. O percentual de “pega” do enxerto, denominação dada à área do enxerto que evolui sem necrose, quando realizada enxertia de pele total em humanos, é de cerca de 70-100% do tecido (LANDAU *et al.*, 2008; RAO; TILLO; DALAL, 2008; HARVEY; SMITH; PATTERSON, 2009). Porém esse percentual de sucesso não se reflete em modelos experimentais em ratos, que possuem um percentual de “pega” menor, de cerca de 20 a 30% de sobrevivência da área do enxerto. Essa menor taxa provavelmente se deve a dificuldade em manter os animais em repouso no pós-operatório (WERKER *et al.*, 1992; ZHANG *et al.*, 2008; ZOGRAFOU *et al.*, 2011). O achado do grupo Enxerto, de média de 22,81% de tecido viável corrobora com os estudos anteriormente citados (WERKER *et al.*, 1992; ZHANG *et al.*, 2008; ZOGRAFOU *et al.*, 2011). A média de 83,98% de área viável do grupo Retalho-SF também está de acordo com a literatura, onde a taxa de sobrevivência média da área do retalho inguinal livre varia de 75-90% da área (PARSA; SPIRA, 1979; VAN ADRICHEM *et al.*, 1996; CASAL *et al.*, 2017).

DOBRYANSKY *et al.* (2004) investigaram a influência da Endostatina na viabilidade de retalho randômico dorsal em camundogos. Vinte ratos foram divididos em grupo I, que recebeu Endostatina no pré-operatório, e grupo II, que recebeu SF 0.9% no pré-operatório, considerado grupo controle. O percentual de sobrevivência do retalho do grupo I no 9º dia pós-operatório foi de 20%, significativamente menor do que o grupo II- controle (100%). No

presente estudo o grupo tratado com BVZ no pré-operatório apresentou um menor percentual de área considerada viável, 60,50%, em relação ao grupo Retalho-SF (diferença não significativa). O efeito deletério do BVZ no retalho é aparentemente menor do que o causado pela Endostatina no estudo anterior (DOBRYANSKY *et al.*, 2004).

O presente estudo evidenciou patência coincidente entre o teste de esvaziamento (teste de *Ackland*) e o teste de sangramento no grupo do Retalho-SF: foi constatado patência em 100% das anastomoses arteriais e 90% de anastomoses venosas. Esses valores corroboram com os da literatura, onde evidenciamos patência em de cerca de 70 a 100% dos pedículos vasculares de retalhos inguinais livre (VAN ADRICHEM *et al.*, 1996; TØNSETH *et al.*, 2006; WALLMICHATH *et al.*, 2014). O grupo Retalho-BVZ apresentou menor patência do seu pedículo vascular no pós-operatório, os testes de esvaziamento e sangramento foram coincidentes, evidenciando patência em 60% das artérias e 80% das veias. Porém essa diferença não foi estatisticamente significante quando comparada ao grupo Retalho-SF. TØNSETH *et al.* (2006) desenvolveram um modelo de transferência do retalho inguinal livre para o dorso do rato, realizando a anastomose na veia jugular externa e artéria carótida. Esses autores também evidenciaram uma maior incidência de oclusão no segmento arterial do pedículo, com oclusão de 17% das anastomoses arteriais e 0% de oclusão venosa.

BALLESTÍN *et al.* (2018) realizaram retalhos inguinais livres em ratos Wistar para avaliar a influência de células-tronco de tecido adiposo embebidas em colágeno tipo I na sobrevivência desses retalhos, quando expostos a uma lesão por isquemia/reperfusão. Esses autores utilizaram o corante hematoxilina e eosina (H&E) para análise histológica de tecido da pele do retalho. A presença de necrose, edema e hemorragia foi estimada por patologista, cego, classificando-as em ausente, leve, moderada ou intensa. O estudo evidenciou um maior nível de infiltrado inflamatório e necrose no grupo que havia sido submetido a oito horas de isquemia (BALLESTÍN *et al.*, 2018). No presente estudo utilizamos técnica semelhante à de BALLESTÍN (2018) e constatou-se, através de análise de patologista cego para a metodologia do estudo, ocorrência de necrose significativamente maior nos grupos Enxerto e Retalho-BVZ. Observou-se também ocorrência de inflamação maior nos grupos Enxerto e Retalho-BVZ, essa análise, porém, não atingiu significância ( $P=0,0588$ ).

A coloração H&E é amplamente utilizada na avaliação histológica de retalhos cutâneos ou musculares em ratos, devido a seu fácil manuseio e baixo custo (KRYGER *et al.*, ; DEMIR *et al.*, 2006; BALLESTÍN *et al.*, 2018). Porém, DOBRYANSKY *et al.* (2004) realizaram contagem vascular em retalhos de ratos, através de reação imuno-histoquímica com anticorpo anti-CD31, verificando uma menor densidade vascular no grupo tratado com

Endostatina (diferença não significativa). Uma limitação do presente estudo foi a não realização de análise histológica por imuno-histoquímica devido ao alto custo dos anticorpos.

DEMIR *et al.* (2006) investigaram o efeito da torção do pedículo vascular na viabilidade de retalhos cutâneos em ratos, dividindo-os em quatro diferentes grupos, em ordem crescente de aumento de rotação do pedículo. Os autores utilizaram coloração H&E para analisar cortes axiais do pedículo vascular, verificando uma maior formação de trombo nos grupos cujos pedículos foram submetidos a uma rotação de 180° e 270°. O presente estudo realizou análise semelhante de segmentos arteriais do pedículo vascular contendo a anastomose microvascular. O patologista, cego para metodologia, realizou análise da ocorrência de trombose intraluminal e foi realizada aferição das camadas média e íntima dos vasos em cortes axiais. A espessura da camada íntima pode variar por influência de fármacos, trauma ou alteração do fluxo sanguíneo local. Esses dados, porém, não evidenciaram diferença significativa entre os grupos Retalho-SF e Retalho-BVZ. O segmento venoso do pedículo não foi analisado, devido à dificuldade em acondicionar esse tecido maleável em orientação vertical nos blocos de parafina, para realizar cortes axiais adequados.

Uma limitação desse estudo, realizado em ratos Wistar, é que envolve o sacrifício do animal no 7º dia pós-operatório. Então, por motivos éticos, deve-se limitar a quantidade de animais utilizados para o mínimo necessário para se chegar a uma avaliação estatística confiável. Isso pode ter evitado que algumas análises atingissem significância estatística. As vantagens da utilização desse modelo é a de utilização de um animal de porte favorável ao manuseio, elevada resistência à infecção e trauma cirúrgico, além de ser um modelo difundido na literatura, facilitando análises comparativas (WERKER *et al.*, 1992; DEMIR *et al.*, 2006; TØNSETH *et al.*, 2006; WALLMICHATH *et al.*, 2014).

Outras limitações desse estudo, além da quantidade restrita de animais e da ausência de análise histológica por imunohistoquímica, foram as seguintes: indisponibilidade de equipamento específico para aferição da perfusão do retalho (fluxometria por Laser Doppler), utilização de dose única de BVZ de 5mg/kg. Estudos futuros com quantidades maiores de animais e doses mais elevadas podem tornar algumas análises significantes.

Em suma, o BVZ causa uma maior ocorrência de necrose e inflamação em retalhos inguinais livres em ratos, porém não há redução significativa do percentual de área viável dos retalhos e da patência do pedículo vascular. Esses dados podem embasar decisões relacionadas à indicação de procedimentos cirúrgicos de urgência em pacientes que fazem o uso desse fármaco. Mais estudos, porém, são necessários, para confirmar os resultados

observados e para estimar um período seguro de suspensão de BVZ, antes e após a realização desse tipo de procedimento.

## **6 CONCLUSÃO**

A administração prévia de Bevacizumabe não afetou negativamente a viabilidade de retalhos inguinais livres em ratos. Não causou diferença significativa no percentual de área viável do retalho ou na incidência de trombose arterial e venosa.

O Bevacizumabe provocou uma maior ocorrência de achados histológicos de necrose na pele dos retalhos dos animais.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACUN, G. et al. The effect of single-dose intraperitoneal bevacizumab on peritoneal adhesion formation. **Revista de Investigacion Clinica**, v. 70, n. 6, p. 279–284, 2018.
- AKULAPALLI, S. History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. **J Cancer Sci Ther**, v. 1, n. 2, p. 1–4, 2009.
- ARNOLD, F.; WEST, D. C. Angiogenesis in wound healing. **Pharmac. Ther.**, v. 52, p. 407–422, 1992.
- ASLAN, A. et al. Prophylactic Bevacizumab May Mitigate Radiation Injury: An Experimental Study. **World Neurosurgery**, v. 116, p. e791–e800, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.wneu.2018.05.094>>.
- BALLESTÍN, A. et al. Adipose-Derived Stem Cells Ameliorate Ischemia-Reperfusion Injury in a Rat Skin Free Flap Model. **Journal of Reconstructive Microsurgery**, 2018.
- BLONDEEL, P. N. et al. **Perforator flaps : anatomy, technique & clinical applications**. [s.l.] Quality Medical Pub, 2013.
- BODNAR, R. J. Anti-Angiogenic Drugs: Involvement in Cutaneous Side Effects and Wound-Healing Complication. **Advances in Wound Care**, v. 3, n. 10, p. 635–46, 2014.
- BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, 2018.
- BRIAN BOYD, J.; F. JONES, N. **Operative Microsurgery**. [s.l.] McGraw-Hill Education, 2015.
- CARMELIET, P. **Angiogenesis in life, disease and medicine** *Nature*, 2005. .
- CARREL, A. La technique opératoire des anastomoses vasculaires et la transplantation des viscères. **Lyon médical**, v. 98, p. 859–863, 1902. Disponível em: <<https://www.semanticscholar.org/paper/La-technique-operatoire-des-anastomoses-vasculaires-Carrel/30d674adf775317d28e9c6d57238c2fbd3c1ba6b>>. Acesso em: 21 jul. 2019.
- CASAL, D. et al. A Model of Free Tissue Transfer: The Rat Epigastric Free Flap. **Journal of Visualized Experiments**, n. 119, p. 14–16, 2017.

CHANG, E. I. et al. Comprehensive Evaluation of Risk Factors and Management of Impending Flap Loss in 2138 Breast Free Flaps. **Annals of Plastic Surgery**, v. 77, n. 1, p. 67–71, jul. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25003429>>. Acesso em: 22 maio. 2019.

CHELLAPPAN, D. K. et al. The role of bevacizumab on tumour angiogenesis and in the management of gynaecological cancers: A review. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 102, n. March, p. 1127–1144, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.03.061>>.

CHEN, T. et al. Effects of curculigoside A on random skin flap survival in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 834, p. 281–287, 2018.

COBBETT, J. R. Free digital transfer. Report of a case of transfer of a great toe to replace an amputated thumb. **The Journal of bone and joint surgery. British volume**, v. 51, n. 4, p. 677–9, nov. 1969. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5371970>>. Acesso em: 19 maio. 2019.

CONVERSE, J. M.; UHLSCHMID, G. K.; BALLANTYNE, D. L. “Plasmatic circulation” in skin grafts. **Plastic and Reconstructive Surgery**, 1969.

COOLEY, B. C.; TADYCH, K. L.; GOULD, J. S. Perfusion of free flaps with heparinized whole blood during ischemic storage. **Journal of Reconstructive Microsurgery**, 1990.

CUNNINGHAM, B. L.; SHONS, A. R. Free flap transfers in rats using an irradiated recipient site. **British Journal of Plastic Surgery**, 1979.

DEMIR, A. et al. The effect of twisting on perforator flap viability: An experimental study in rats. **Annals of Plastic Surgery**, v. 56, n. 2, p. 186–189, 2006.

DEVITA, V. T. J.; CHU, E. A History of Cancer Chemotherapy. **Cancer Research**, v. 68, n. 21, p. 8643–8653, 2008.

DIPIETRO, L. A. Angiogenesis and wound repair: when enough is enough. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 100, n. 5, p. 979–984, 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1189/jlb.4MR0316-102R>>.

DOBRYANSKY, M. et al. Endostatin inhibits ischemia-induced neovascularization and increases ischemic tissue loss. **Annals of plastic surgery**, v. 52, n. 5, p. 512–518; discussion 518, 2004.

DRAKE, D. B. et al. Thrombogenic effects of a nonthrombin-based fibrin sealant compared with thrombin-based fibrin sealant on microvenous anastomoses in a rat model. **Annals of Plastic Surgery**, 2000.

FERRARA, N.; HENZEL, W. J. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 1989.

FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. **N Engl J Med**, v. 285, n. 21, p. 1182–1186, 1971.

FUKUMURA, D.; JAIN, R. K. Tumor microvasculature and microenvironment: Targets for anti-angiogenesis and normalization. **Microvascular Research**, v. 74, n. 2–3, p. 72–84, 2007.

GEISSLER, W. B.; SLADE, J. F. **Green's Operative Hand Surgery**. [s.l.: s.n.]

GORDON, C. R. et al. REVIEW ARTICLE A Review on Bevacizumab and Surgical Wound Healing. v. 62, n. 6, p. 707–709, 2009.

GUERRA, M. R. et al. Risco de câncer no Brasil : tendências e estudos epidemiológicos mais recentes The risk of cancer in Brazil : tendencies and recent epidemiologic studies. v. 51, n. 3, p. 227–234, [s.d.]

HARVEY, I.; SMITH, S.; PATTERSON, I. The use of quilted full thickness skin grafts in the lower limb - reliable results with early mobilization. **Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery**, 2009.

HO, Q. T.; KUO, C. J. Vascular endothelial growth factor: Biology and therapeutic applications. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 39, n. 7–8, p. 1349–1357, 2007.

INCA. **Estimativa 2018. Incidência de câncer no Brasil**. [s.l.: s.n.]

ISHIMARU, M. et al. Risk Factors for Free Flap Failure in 2,846 Patients With Head and Neck Cancer: A National Database Study in Japan. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 74, n. 6, p. 1265–1270, jun. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26851310>>. Acesso em: 22 maio. 2019.

JAMACARU, F. V. F. Quantificação De Angiogênese Corneana in Vivo Através De Processamento De Imagens Digitais. p. 243, 2006.

KHOURI, R. K. et al. A prospective study of microvascular free-flap surgery and outcome. **Plastic and Reconstructive Surgery**, 1998.

KLANL, M. H.; AHMAD, M.; MASOOD, M. I. Through Chemotherapy : a Historical Review. n. 10, 2016.

KOMATSU, S.; TAMAI, S. Successful replantation of a completely cut-off thumb: Case report. **Plastic and Reconstructive Surgery**, 1968.

KROLL, S. S. et al. Anticoagulants and hematomas in free flap surgery. **Plastic and reconstructive surgery**, v. 96, n. 3, p. 643–7, set. 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7543686>>. Acesso em: 22 maio. 2019.

KRYGER, Z. et al. **Effects of VEGF administration following ischemia on survival of the gracilis muscle flap in the rat.**, [s.d.].

LANDAU, A. G. et al. Full-thickness skin grafts: Maximizing graft take using negative pressure dressings to prepare the graft bed. **Annals of Plastic Surgery**, 2008.

MALT, R. A.; MCKHANN, C. F. Replantation of Severed Arms. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, 1964.

MASQUELET, A.; ALAIN, G. **An Atlas of Flaps of the Musculoskeletal System.** [s.l: s.n.]

MCGREGOR, I. A.; MORGAN, G. Axial and random pattern flaps. **British Journal of Plastic Surgery**, 1973.

MCGUIRE, S. World Cancer Report 2014 . Geneva , Switzerland : World Health Organization , International Agency for Research on Cancer , WHO Press , 2015. p. 16–17, 2015.

OFFODILE, A. C. et al. Impact of increasing operative time on the incidence of early failure and complications following free tissue transfer? A risk factor analysis of 2,008 patients from the ACS-NSQIP database. **Microsurgery**, v. 37, n. 1, p. 12–20, jan. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25752264>>. Acesso em: 22 maio. 2019.

OZSOY, Z. et al. Effect of bevacizumab on acetic acid–induced ulcerative colitis in rats. **Journal of Surgical Research**, v. 216, p. 191–200, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jss.2017.05.011>>.

PARSA, F. D.; SPIRA, M. Evaluation of anastomotic techniques in the experimental transfer of free skin flaps. **Plastic and Reconstructive Surgery**, 1979.

POLVERINI, P. J. Angiogenesis in health and disease: insights into basic mechanisms and therapeutic opportunities. **Journal of dental education**, 2002.

RAO, K.; TILLO, O.; DALAL, M. Full thickness skin graft cover for lower limb defects following excision of cutaneous lesions. **Dermatology Online Journal**, 2008.

RISAU, W. Mechanisms of angiogenesis. **Nature**, v. 386, n. 6626, p. 671–4, 1997.  
Disponível em: <10.1038/386671a0>.

SAMANT, R. S.; SHEVDE, L. A. Recent Advances in Anti-Angiogenic Therapy of Cancer. **Oncotarget**, v. 2, n. 2, p. 122–134, 2011. Disponível em:  
<www.impactjournals.com/oncotarget>.

SANATI-MEHRIZY, P. et al. Risk Factors Leading to Free Flap Failure. **Journal of Craniofacial Surgery**, v. 27, n. 8, p. 1956–1964, nov. 2016. Disponível em:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28005734>. Acesso em: 22 maio. 2019.

SENGER, D. R. et al. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. **Science**, 1983.

SHARMA, K.; MARCUS, J. R. Bevacizumab and Wound-Healing Complications. **Annals of Plastic Surgery**, v. 71, n. 4, p. 434–440, 2013. Disponível em:  
<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00000637-201310000-00026>.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2019 (US statistics). **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 69, n. 1, p. 7–34, 2019. Disponível em:  
<http://doi.wiley.com/10.3322/caac.21551>.

SOYSAL, D. et al. A novel angiogenesis inhibitor bevacizumab induces apoptosis in the rat endometriosis model. **Balkan Journal of Medical Genetics**, v. 17, n. 2, p. 73–80, 2014.

SPERLING, J. et al. Hepatic arterial infusion of bevacizumab in combination with oxaliplatin reduces tumor growth in a rat model of colorectal liver metastases. **Clinical and Experimental Metastasis**, v. 29, n. 2, p. 91–99, 2012.

STEEL, B. J.; COPE, M. R. A brief history of vascularized free flaps in the oral and maxillofacial region. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 73, n. 4, p. 786.e1-786.e11, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joms.2014.12.005>.

STEGMAYR, C. et al. Influence of bevacizumab on blood-brain barrier permeability and O-(2-18F-Fluoroethyl)-L-tyrosine uptake in rat gliomas. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 58, n.

5, p. 700–705, 2017.

STEPHENSON, J. A. et al. Tumour Angiogenesis: A Growth Area—From John Hunter to Judah Folkman and Beyond. **Journal of Cancer Research**, v. 2013, p. 1–6, 2013.

STEWART, B. W.; WILD, C. P. **World Cancer Report 2014**. [s.l: s.n.]

TAMAI, S. History of microsurgery. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 124, n. 6s, p. 282e–294e, 2009.

THORN, M. et al. Embryo-Fetal Transfer of Bevacizumab (Avastin) in the Rat Over the Course of Gestation and the Impact of Neonatal Fc Receptor (FcRn) Binding. **Birth Defects Research Part B - Developmental and Reproductive Toxicology**, v. 95, n. 5, p. 363–375, 2012.

THORNTON, A. D. et al. Angiogenesis inhibition with bevacizumab and the surgical management of colorectal cancer. **British Journal of Surgery**, v. 93, n. 12, p. 1456–1463, 2006.

TONNESEN, M. G.; FENG, X.; CLARK, R. A. F. Angiogenesis in wound healing. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, 2000.

TØNSETH, K. A. et al. Free SIEA-flap transposition in a rat model with preservation of the limb circulation. **European Journal of Plastic Surgery**, v. 29, n. 3, p. 123–126, 2006.

VAN ADRICHEM, L. N. A. et al. The effect of cigarette smoking on the survival of free vascularized and pedicled epigastric flaps in the rat. **Plastic and Reconstructive Surgery**, 1996.

VAN WIJNGAARDEN, P.; COSTER, D. J.; WILLIAMS, K. A. Inhibitors of ocular neovascularization: promises and potential problems. **JAMA : the journal of the American Medical Association**, v. 293, n. 12, p. 1509–1513, 2005. Disponível em: <papers://346b7a39-b9bf-4d02-9150-a7329d4930bc/Paper/p73>.

WALLMICHATH, J. et al. The free groin flap in the rat: A model for improving microsurgical skills and for microvascular perfusion studies. **Journal of Plastic Surgery and Hand Surgery**, v. 48, n. 3, p. 191–196, 2014.

WEI, F. C.; MARDINI, S. **Flaps and Reconstructive Surgery**. [s.l: s.n.]

WERKER, P. M. N. et al. Survival characteristics of the epigastric free flap in DA-rats. **Microsurgery**, v. 13, n. 2, p. 67–71, 1992.

WESTIN, M.; HEDEN, P. Calcitonin gene-related peptide delays the no-reflow phenomenon in the rat island flap. **Annals of Plastic Surgery**, 1988.

ZHANG, F. et al. Improvement of full-thickness skin graft survival by application of vascular endothelial growth factor in rats. **Annals of Plastic Surgery**, v. 60, n. 5, p. 589–593, 2008.

ZHANG, J. et al. Monitoring antiangiogenesis of bevacizumab in zebrafish. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 12, p. 2423–2430, 2018.

ZOGRAFOU, A. et al. Improvement of skin-graft survival after autologous transplantation of adipose-derived stem cells in rats. **Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery**, v. 64, n. 12, p. 1647–1656, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjps.2011.07.009>>.

## 7. APÊNDICES E ANEXOS

### A) Anexo A: CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA AO USO DE ANIMAIS



Universidade Federal do Ceará  
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA  
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo  
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE

*Dados Gerais*

**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto intitulado “EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE CETUXIMABE E BEVACIZUMABE NA ANGIOGÊNESE DE RETALHO INGUINAL LIVRE EM RATOS.”, protocolo nº126/2016, sob-responsabilidade da Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de nº8 de outubro de 2008, do Decreto 6899 de 15de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFC) da Universidade Federal do Ceará, em reunião em 28 de março de 2017.

Vigência do projeto	02/03/2015 a 28/12/2018
Espécie/Linhagem	Rato heterogênico
Nº de Animais	56
Peso/Idade	300-350g – 5-6 meses
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central da UFC

Fortaleza, 30 de março de 2017

*Alexandre Havt Bindá*  
Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá  
Coordenador do CEUA - UFC

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**ALEXANDRE HAVT BINDÁ**  
COORDENADOR DA COMISSÃO DE ÉTICA E DO USO COM  
ANIMAIS - CEUA/UFC - MATRÍCULA SIAPE: 166602