

RAFAEL MARTINS DE SOUZA

**EFEITOS DOS INIBIDORES DA 5-FOSFODIESTERASE NA
VIABILIDADE E CICATRIZAÇÃO DE RETALHOS
RANDÔMICOS DE PELE**

Mestrado apresentado ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Orientador: Armando José
d'Acampora, Ph.D.

Coorientador: Sandro Melim Sgroot,
M.Sc.

**Florianópolis - SC
2019**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Souza, Rafael Martins de
Efeitos dos inibidores da 5-fosfodiesterase na
viabilidade e cicatrização de retalhos randômicos de
pele / Rafael Martins de Souza ; orientador,
Armando José d'Acampora, coorientador, Sandro Melim
Sgroot, 2019.
83 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas-Novo,
Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Ciências Médicas-Novo. 2. cicatrização,
retalho, sildenafil. 3. tadalafil, 5
fosfodiesterase. 4. óxido nítrico, vascularização. 5.
úlceras, celularidade. I. d'Acampora, Armando José .
II. Sgroot, Sandro Melim . III. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação
em Ciências Médicas-Novo. IV. Título.

RAFAEL MARTINS DE SOUZA

**Efeitos dos inibidores da 5-fosfodiesterase na viabilidade e cicatrização
de retalhos randômicos de pele**

Esta dissertação foi submetida ao processo de avaliação pela Banca Examinadora para obtenção do título de:

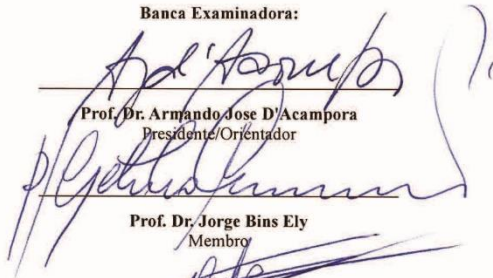
MESTRE EM CIÊNCIAS MÉDICAS

E aprovada em 11 de fevereiro de 2019, atendendo as normas da legislação vigente da Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Área de Concentração: **Investigação Biomédica**.

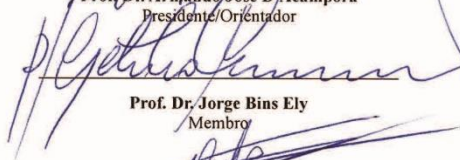


Prof. Dr. Getúlio Rodrigues de Oliveira Filho
Coordenador do Programa

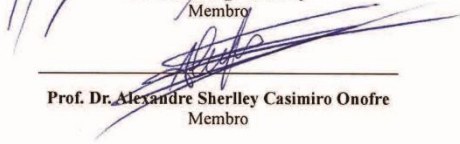
Banca Examinadora:



Prof. Dr. Armando Jose D'Acampora
Presidente/Orientador



Prof. Dr. Jorge Bins Ely
Membro



Prof. Dr. Alexandre Sherley Casimiro Onofre
Membro

Florianópolis, 2019

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Doutor Armando d'Acampora, pela confiança, orientação e ajuda durante todo o Mestrado. Seu rigor e conhecimento ajudaram a elevar o nível desta pesquisa.

Ao meu coorientador, Professor Mestre Sandro Merlin Sgroot, pela dedicação no transcorrer do experimento e dissertação desta pesquisa. Inúmeras foram as trocas de e-mails e cafés para organização deste material. Ao nobre amigo, externo minha admiração não apenas pelo grande auxílio prestado, mas pelo profissional e pessoa que conheci.

Ao Professor Geraldo Bernardes, pela paciência e auxílio durante a realização dos procedimentos experimentais na Técnica Operatória e Cirurgia Experimental (TOCE).

À Dra. Gabriela Funchal e Dra. Flávia Novaes, pelo auxílio na análise histológica das peças cirúrgicas. Quero aqui enfatizar, a recepção da Dra. Gabriela Funchal, que desinteressadamente me emprestou sua enorme experiência e norteou o início das avaliações histológicas.

À minha irmã, Renata Martins de Souza, meu espelho desde a juventude, e a primeira pesquisadora que vi em ação no âmbito de minha família.

À minha mãe, Maria de Lourdes Martins de Souza, pelo carinho e paciência de sempre. Seu incentivo e dedicação me fizeram chegar até aqui.

Ao meu pai, Carlos Alberto de Souza, que me ensinou o valor da honestidade, do trabalho e do estudo. Cada passo que dei em minha vida sempre busquei sua aprovação, hoje acredito que não será diferente.

À minha mulher, amiga e companheira, Laila Arioli Cheade Souza, pela acolhida diária, parceria e por acreditar em meus sonhos. Sei que não é fácil, mas perseveramos juntos e esta vitória é nossa.

RESUMO

Introdução: O processo de cicatrização de retalhos randômicos de pele é complexo e depende de diversos fatores. Dentre as principais causas para a falência deste processo estão as vasculares. Visando como desfecho principal o sucesso na viabilidade desses retalhos, muitas drogas têm sido estudadas na tentativa de ter um papel adjuvante no processo. **Objetivo:** Estudar os efeitos da administração oral do sildenafil e tadalafil sobre a cinética da cicatrização e a viabilidade em um modelo de retallo cutâneo em ratos *Wistar*. **Método:** 66 ratos *Wistar* foram distribuídos em 3 grupos. Após ato anestésico, houve a perda de 4 animais (2 do grupo sildenafil e 2 do grupo tadalafil), consistindo-se o procedimento de 62 repetições cirúrgicas: controle (22 animais), sildenafil (20 animais) e tadalafil (20 animais). Metade dos animais de cada grupo foi observado até 7 dias e a outra metade até 14 dias, após os períodos citados, foram obtidas amostras histológicas após o óbito por desfecho. Essas amostras histológicas foram avaliadas e os dados submetidos a Anova (vascularização) e a Kruskal Wallis (crosta, úlcera, tecido viável abaixo da úlcera e celularidade), considerando um nível de significância de 5%. **Resultados:** Foi verificado, nos grupos tratados, o aumento da vascularização em 7 e 14 dias, diminuição do tamanho da úlcera de 7 para 14 dias e do aumento do influxo de polimorfonucleares em 7 dias, com significância estatística. Os dados nos mostraram ainda uma redução do tamanho da crosta no grupo tadalafil e um aumento do tecido viável abaixo da crosta no grupo sildenafil, no período de 7 para 14 dias, ambos com significância. **Conclusão:** A utilização do sildenafil e do tadalafil como drogas adjuvantes a viabilidade de retalhos de pele demonstrou resultados positivos segundo o estudo. Novas aplicações clínicas vêm surgindo no arsenal terapêutico dessas drogas, porém novos estudos são necessários para solidificar esta utilização e desvendar outras alterações de parâmetros ainda pouco estudados como a celularidade.

Palavras-chave: cicatrização, retallo, sildenafil, tadalafil, 5-fosfodiesterase, óxido nítrico, vascularização, úlcera, celularidade.

SUMMARY

Introduction: The healing process of random skin flaps is complex and depends on several factors. Among the main causes for the failure of this process are the vascular causes. Aiming at the main success outcome in the viability of these flaps, many drugs have been studied as adjuvants to this process. **Objective:** To study the effects of oral administration of sildenafil and tadalafil on the kinetics of healing and viability in a skin flap model in Wistar rats. **Method:** 66 Wistar rats were divided into 3 groups. After the anesthetic procedure, 4 animals (2 of the sildenafil group and 2 of the tadalafil group) were lost. The procedure consisted of 62 surgical replicates: control (22 animals), sildenafil (20 animals) and tadalafil (20 animals).. Half of the animals in each group were observed up to 7 days and the other half up to 14 days, and in the mentioned dates, histological samples were obtained after death by outcome. These histological samples were evaluated and the data submitted and ANOVA (vascularization) and Kruskal Wallis (crust, ulcer, viable tissue under the ulcer and cellularity), considering a level of significance of 5%. **Results:** Increased vascularity was observed in 7 and 14 days, a decrease in ulcer size from 7 to 14 days and a decrease in increase of polymorphonuclear cells in 7 days in the groups treated with statistical significance. The data also showed a reduction in the size of the crust in the tadalafil group and an increase of the viable tissue below the crust in the sildenafil group, in the period from 7 to 14 days, both with significance. **Conclusion:** The use of sildenafil and tadalafil as adjuvant drugs on viability of skin flaps demonstrated positive results according to our study. New clinical applications have been emerging in the therapeutic arsenal of these drugs. However, new studies are needed to solidify this use and to uncover other changes in parameters that have not yet been studied, such as cellularity.

Key words: healing, flap, sildenafil, tadalafil, 5-phosphodiesterase, nitric oxide, vascularization, ulcer, cellularity.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Divisão e metodologia empregada em cada grupo.	30
Quadro 2 - Inflamação graduada, conforme intensidade em discreta, moderada e acentuada.	34
Quadro 3 – Segmento do retalho utilizado para avaliação histológica..	35
Quadro 4 - Medida do tecido viável da crosta até a fáscia muscular. ...	36
Quadro 5 – Metodologia utilizada para a coleta de dados histológicos.	37
Quadro 6 - Fotos dos retalhos em campo azul padrão e em transiluminação dos grupos C - controle, S - sildenafil, T – tadalafil - em 7 e 14 dias.....	40
Quadro 7 - Padrões histológicos típicos para a variável vascularização encontrados nos diferentes grupos de estudo. (Coloração H&E, magnificação 400X).	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados das variáveis de estudo sumarizados quanto a natureza da distribuição e testes estatísticos aplicados.....	46
--	----

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Distribuição dos grupos em 7 e 14 dias, segundo avaliação em porcentagens de polimorfonucleares.	49
Gráfico 2 - Distribuição dos grupos em 7 e 14 dias, segundo a avaliação em porcentagens de mononucleares.	51
Gráfico 3 - Distribuição dos grupos em 7 e 14 dias, segundo mediana do tamanho da úlcera.....	53
Gráfico 4 - Distribuição dos grupos em 7 e 14 dias, segundo mediana das porcentagens da extensão da crosta em relação a extensão total do retalho.	55
Gráfico 5 - Distribuição dos grupos em 7 e 14 dias, segundo mediana do tecido viável logo abaixo da crosta até a fáscia muscular na porção mais profunda da úlcera.....	57
Gráfico 6 - Distribuição dos grupos em 7 e 14 dias, segundo média da vascularização.	59

LISTA DE SIGLAS

NO	Óxido Nítrico
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial
GMPc	Monofosfato Cíclico de Guanosina
PDE5	5 Fosfodiesterase
TOCE	Técnica Operatória e Cirurgia Experimental
MIA	Morte Indolor Assistida
COX-2	Ciclooxigenase Tipo 2
HPF	Campo de Alta Potência
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CEUA	Comissão de Ética para Utilização de Animais
UNISUL	Universidade do Sul de Santa Catarina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. JUSTIFICATIVA	25
3. OBJETIVOS	27
3.1 OBJETIVO GERAL	27
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
4. MÉTODOS	29
4.1 AMOSTRA	29
4.1.1 Critérios de inclusão	29
4.1.2 Critérios de exclusão	29
4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	30
4.3 PROCEDIMENTO OPERATÓRIO	30
4.3.1 Anestesia	30
4.3.2 Técnica cirúrgica	31
4.3.3 Cuidados pós-operatórios	32
4.4 MORTE INDOLOR ASSISTIDA (MIA)	32
4.5 MÉTODO DE PROCESSAMENTO E ANÁLISE DE DADOS ...	32
4.5.1 Análise microscópica	33
4.5.2 Análise estatística	37
4.6 ASPECTOS ÉTICOS	38
5. RESULTADOS	39
5.1 AVALIAÇÃO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO – POLIMORFONUCLEARES E MONONUCLEARES EM AMOSTRAS DE TECIDO DOS DIFERENTES GRUPOS DE ESTUDO NO PÓS- OPERATÓRIO	48
5.2 AVALIAÇÃO DO TAMANHO DA ÚLCERA EM AMOSTRAS DE TECIDO DOS DIFERENTES GRUPOS DE ESTUDO NO PÓS- OPERATÓRIO	52
5.3 AVALIAÇÃO DO TAMANHO DA CROSTA EM AMOSTRAS DE TECIDO DOS DIFERENTES GRUPOS DE ESTUDO NO PÓS- OPERATÓRIO	54
5.4 AVALIAÇÃO DA ESPESSURA DO TECIDO VIÁVEL ABAIXO DA ÚLCERA ATÉ A FÁSCIA MUSCULAR	56

5.5 AVALIAÇÃO DO GRAU DE NEOVASCULARIZAÇÃO EM AMOSTRAS DE TECIDO DOS DIFERENTES GRUPOS DE ESTUDO NO PÓS-OPERATÓRIO.....	58
6. DISCUSSÃO.....	61
7. CONCLUSÃO.....	69
REFERÊNCIAS.....	71
APÊNDICE.....	77
APÊNDICE A – REGISTRO NA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.	78

1. INTRODUÇÃO

A cicatrização de feridas é um processo complexo e organizado em diversas etapas. A lesão tecidual desencadeia uma cascata de eventos para reestabelecer a integridade e função perdidas¹. Os estágios agudos da cicatrização são descritos como inflamação, proliferação e remodelação^{2,3}.

Após a lesão inicial, ocorre a fase inflamatória, cujo objetivo é remover o tecido desvitalizado e impedir a infecção invasiva. Posteriormente, na fase proliferativa, há uma tendência ao equilíbrio entre a formação cicatricial e regeneração tecidual. Finalmente, como último estágio da cicatrização, ocorre a mais longa e a menos compreendida etapa, a remodelação, cujo objetivo é otimizar a força e a integridade estrutural da ferida⁴⁻⁶.

Um dos eventos críticos da cicatrização é a angiogênese, a qual é essencial para o reestabelecimento do fluxo sanguíneo e do suporte de oxigênio para o tecido lesado⁷.

Os inibidores da 5-fosfodiesterase, por meio de sua ação sobre o óxido nítrico (NO)⁸, têm efeitos benéficos na angiogênese, proliferação endotelial, remodelação e melhora da oferta de oxigênio na cicatrização⁹⁻¹⁴.

Entretanto, também se tem atribuído a eles a potencialização do processo de coagulação¹⁵, regulação da vasodilatação¹⁶, depuração dos componentes do estresse oxidativo¹⁷ e até mesmo alguma atividade antimicrobiana¹⁸.

Um retalho é uma unidade de tecido que pode ser transferido de um local doador para um receptor, mantendo, durante o processo, a sua irrigação sanguínea¹⁹. Apesar da tentativa de transferência de tecidos sem danos ao suprimento sanguíneo, o retalho pode apresentar sinais de má perfusão e congestão venosa pela secção de estruturas vasculares. Já não bastasse a complexidade do processo cicatricial, os retalhos, pelas alterações inerentes a transferência tecidual, passam por uma fase crucial à sua viabilidade.

Na tentativa de melhorar a cicatrização de feridas e a sobrevida dos retalhos, vários recursos terapêuticos auxiliares foram realizados, como a autonomização de retalhos²⁰, utilização tópica de fitoterápicos (como o *Coronopus didymus* – Mastruz)²¹, estudos sobre os efeitos da quercetina (flavonóide)²², a utilização intramuscular de cetorolaco²³, corticoesteróides e carnitina²⁴, oxigênio terapia hiperbárica²⁵, pentoxafilina²⁶, buflomedil²⁷ e, até mesmo, a utilização de um inibidor da fosfodiesterase (citrato de sildenafil, ou sildenafil, nome comercial

Viagra® , Pfizer) associado ou não ao fator de crescimento endotelial (VEGF) e com cola de fibrina²⁸⁻³². No entanto, a resposta sistêmica a esses tratamentos pode estar associada a efeitos adversos como hipotensão, amnésia, distúrbios visuais, enxaquecas e, inclusive, acidentes vasculares³³.

O sildenafil, um agente que melhora o efeito vasodilatador do óxido nítrico (NO) por meio do monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), que é um nucleotídeo cíclico derivado da guanosina trifosfato (GTP), foi inicialmente desenvolvido como anti-hipertensivo³⁴. Devido ao seu inesperado efeito colateral de promoção da ereção peniana, em 1998, o sildenafil se tornou o primeiro inibidor da fosfodiesterase tipo 5 (PDE5) no mercado para tratamento da disfunção erétil³⁵. Mais de 750.000 médicos realizaram prescrições para mais de 23 milhões de homens nos primeiros 7 anos de sua introdução no mercado³⁶.

O sildenafil, já utilizado em suas indicações clássicas que são disfunção sexual e a hipertensão pulmonar pelo seu efeito vasodilatador, vem sendo investigado quanto a outros benefícios provenientes desta vasodilatação.

Dentre esses, podem citar os estudos sobre a melhora da viabilidade de retalhos, de anastomoses colônicas, das úlceras de pressão, das fraturas, das anastomoses microvasculares, da lesão musculoesquelética e da cicatrização³⁷⁻⁴⁸. Os efeitos principais do sildenafil, já bem descritos em modelos animais, são o antiplaquetário, melhora das ações do óxido nítrico e benefícios na microcirculação durante a cicatrização³⁴.

Farsaei *et al*⁴³, após estudo sobre a utilização tópica de sildenafil a 10% em pacientes de UTI com úlceras grau I e II sem sinais de infecção, relataram uma melhor cobertura da área em relação aos controles.

Em estudo experimental realizado com 72 ratos testando a utilização de sildenafil, administrado por sonda orogástrica (gavagem) na dose de 10mg/kg, o seu efeito na cicatrização secundária mostrou uma queda do tempo nesse processo e mais rápida epitelização no grupo que utilizou a droga⁴¹.

Derici e colaboradores⁴² avaliaram a cicatrização de feridas associadas ao uso de sildenafil via oral na dose de 10mg/kg em modelos animais e encontraram um aumento da força tênsil, da inflamação aguda e da neovascularização estatisticamente significativa no grupo estudo.

Em contrapartida, em 2015, Arslantas *et al* associaram o uso do sildenafil via oral em ratos a uma redução da reepitelização, neovascularização, granulação e número de células inflamatórias⁴⁸.

Quanto ao uso de sildenafil associado a retalhos, em estudo realizado em porcos, submetidos a retalho microcirúrgico grande dorsal e uma única dose de sildenafil oral 6 horas após a revascularização, mostrou, por meio da análise de *doppler*, melhora do volume de fluxo e facilitou o restabelecimento do fluxo diastólico dos retalhos nos animais submetidos ao tratamento com a droga em questão⁴⁷.

Em 2004, estudo realizado em ratos recebendo sildenafil via oral na dose de 3, 10 ou 20 mg/kg/dia, mostrou relação entre a dose dependente da droga com a viabilidade dos retalhos realizados³⁰.

Hart e colaboradores²⁹, utilizando a via de administração intraperitoneal e uma dose de 9 mg/kg/dia de sildenafil por 7 dias em ratos, observaram uma queda da taxa de necrose no grupo caso, sugerindo uma maior ação da droga no período pós-operatório imediato.

Em estudo realizado nos Estados Unidos, foi encontrada uma taxa de necrose e complicações dos retalhos faciais em tabagistas menores do que a descrita na literatura quando foi associado ao uso de sildenafil. O estudo citado, apesar de levantar uma hipótese para futuras pesquisas, não permite associações pela deficiência de padronização metodológica, pequena população estudada e ausência de grupo controle⁴⁵.

Gao *et al*⁴⁶, em 2015, investigaram a utilização de sildenafil e nitro-amino-metil-L-arginina em retalhos perfurantes e concluíram, por meio de angiografia e histologia, que nos animais, em uso exclusivo de sildenafil, ocorreu uma maior dilatação dos vasos nas “zonas de choque” (áreas de comunicação entre regiões perfurantes distintas).

Porém, em estudo realizado por Barral e colaboradores³⁸, testando a aplicação subdérmica do sildenafil em ratos, ocorreu uma maior área de necrose e menor tendência a granulação do grupo tratado.

Apesar da quantidade de trabalhos e estudos envolvendo o sildenafil – a mais estudada dentre todas as drogas desta classe até o presente momento quanto a viabilidade de retalhos - algumas características farmacológicas indicam que o tadalafil seria a droga com maior aplicabilidade nos retalhos randômicos de pele. Dentre os inibidores da 5-fosfodiesterase há em ordem crescente de meia vida o sildenafil (4 horas), vardenafil (4-5 horas), udenafil (12 horas) e tadalafil (17,5 horas). Essa meia vida prolongada do tadalafil (tadalafila, ou tadalafil, nome comercial Cialis®, Eli Lilly) garantiria um efeito mais duradouro sem o inconveniente e efeitos de várias tomadas⁴⁹.

Em 2008, estudo experimental conduzido com o uso de tadalafil por 7 dias em ratos indicou uma diminuição da área de necrose dos retalhos de pele em dorso. Verificou ainda uma vasodilatação das

“*choque vessels*” por angiografia. Ambos resultados alcançaram significância estatística⁴⁹.

Em estudo realizado na Universidade do Centro Médico de Maryland - Baltimore, investigou-se o uso de tadalafil em diferentes doses (10 e 20 mg/kg) em comparação com controle. Os resultados encontrados indicavam um aumento da sobrevida dos retalhos de pele com ambas as dosagens, porém sem significância estatística⁵⁰.

Kayiran *et al*⁵¹, avaliando a utilização do tadalafil em retalhos epigástricos em ratos, submetem alguns grupos a períodos de isquemia do retalho com posterior reperfusão. Os achados apontam para uma redução significativa tanto dos marcadores de inflamação quanto da necrose dos retalhos com a utilização deste inibidor da 5-fosfodiesterase.

Kaya e colaboradores⁵², em 2014, conduziram estudo avaliando o uso de sildenafil, tadalafil e vardenafil em retalhos randômicos de pele em modelos animais – ratos - por 3 dias com seguimento por 7 dias. Na verificação por doppler, não percebeu melhora no fluxo sanguíneo com o uso das referidas drogas. Já na avaliação da taxa de necrose, houve uma tendência a redução com o uso dos inibidores da 5-fosfodiesterase sem alcançar significância estatística.

Estudos vêm sendo realizados no intuito de esclarecer os reais efeitos dos inibidores da 5-fosfodiesterase sobre a cicatrização de feridas e viabilidade de retalhos. Conquanto, o sildenafil permanece como a droga de maior interesse desta classe, outras como o tadalafil vem sendo estudadas com relativo sucesso, porém, todas carecendo de maiores estudos devido aos resultados controversos e variadas metodologias⁴⁹⁻⁵³.

A variedade metodológica presente hoje na literatura, avaliou diversas vias de administração da droga (via oral, subdérmica, tópica)²⁸⁻³², associação a outras substâncias (como o VEGF)³¹, períodos variados de observação (geralmente 7 dias)²⁸⁻³², utilização de vários métodos para avaliação de resultados (como análise histológica, fotográfica e por *doppler fluxometria*).

Nenhum dos estudos obtidos na literatura pesquisada objetivou uma análise histológica de retalhos por período de até 14 dias em grupos caso e controle para as drogas em estudo (sildenafil, a mais estudada atualmente; tadalafil, a com maior meia vida), realizando assim uma percepção mais fidedigna do retalho no período crucial para sua viabilidade, fato que ocorre na prática clínica em humanos.

2. JUSTIFICATIVA

A cicatrização é compreendida por uma complexidade de etapas e fatores ainda não completamente entendidos. Somado ao complicado processo cicatricial, os retalhos apresentam uma situação ainda mais delicada devido às alterações que ocorrem pela transferência tecidual.

Assim, meios auxiliares a cicatrização de retalhos são estudados há anos na tentativa de melhorar os resultados da viabilidade tecidual.

O sildenafil é uma droga com comprovados benefícios na vasodilatação, dentre outras funções já citadas, e, por isso, necessita de maiores estudos sobre suas funções e reais benefícios à cicatrização. O tadalafil por pertencer a mesma classe, possuir efeitos similares e com meia vida prolongada, merece especial atenção como potencial adjuvante da cicatrização.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar os efeitos da administração oral do sildenafil e tadalafil sobre a cinética da cicatrização e a viabilidade em um modelo de retalho cutâneo em ratos *Wistar*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Descrever a resposta inflamatória aguda e de reparo tecidual frente à administração das drogas em modelo animal nos períodos de 07 e 14 dias.
2. Avaliar microscopicamente a viabilidade do retalho cutâneo durante os períodos pré-estabelecidos de observação do estudo.
3. Descrever o efeito da administração das drogas na microcirculação do retalho, avaliando a presença de tecido necrótico e viável durante os períodos pré-estabelecidos de observação do estudo.

4. MÉTODOS

4.1 AMOSTRA

O cálculo para a obtenção do tamanho amostral foi baseado em estudos prévios^{28,32,38} e baseado no cálculo da amostra para comparação de hipóteses, que servem aos estudos experimentais, segundo a fórmula (ARANGO, 2009):

$$n/\text{grupo}: [(Z\alpha : 2 + Z\beta)2p^* (1-p^*)^2] : 2\delta$$

$$\text{onde: } p^* = (p_0 + p_1)/2, \text{ e } \delta (\text{delta}) = (p_0 + p_1)$$

E considerando-se os seguintes valores:

$$Z\alpha (\text{alfa}) = 1,96;$$

$$Z\beta (\text{beta}) = 0,84;$$

P_0 : 1,0 e p_1 : 0,5. Isso é, arbitrando-se uma redução do efeito de 50% no grupo experimental, em relação ao grupo controle.

O modelo de cálculo supracitado fornece um valor entre 10-15 unidades experimentais por grupo de observação/tratamento (nos períodos de 07 e 14 dias), sendo arbitrado o valor de 50% (um total de 15 animais) como margem de perda amostral decorrente do ato anestésico e/ou perdas de seguimento (óbito decorrente de causas diversas após o período de 24 horas do pós-operatório).

Um estudo piloto incluindo 15 animais foi realizado para padronização da técnica operatória (curva de padrão aprendizagem técnica no modelo) e das análises histológicas, bioquímicas e de quantificação de colágeno.

4.1.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos no estudo animais submetidos aos procedimentos e drogas descritas posteriormente nos grupos selecionados não contento critérios de exclusão.

4.1.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo animais que evoluíram para óbito durante qualquer fase do experimento. Em adição, foram observados e respeitados os *endpoints*, ou seja, situação que caracteriza a retirada/exclusão de uma unidade experimental da amostra após o início

das observações, visando a diminuição do distresse, sofrimento ou desconforto via tratamento ou eutanásia antes da morte por desfecho.

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O estudo teve delineamento experimental randomizado em modelo animal. Foram selecionados 22 ratos da raça Wistar em cada grupo (n=66), machos, idade de 60 dias, com peso entre 350 e 400 gramas. Durante o procedimento anestésico, houve uma perda de 4 ratos (2 do grupo sildenafil e 2 do grupo tadalafil).

Os animais foram distribuídos em 3 grupos, conforme descrito em tabela a seguir. No grupo S – sildenafil, o citrato de sildenafil foi administrado por meio de solução por sonda orogástrica – gavagem - na dose de 10 mg/kg por animal, iniciando logo após o procedimento cirúrgico e repetindo de 24/24 horas. No grupo T – tadalafil, o tadalafil foi administrado através de solução por sonda orogástrica na dose de 10 mg/kg por animal, iniciando logo após o procedimento cirúrgico e repetindo de 24/24 horas. Mesma intervenção foi realizada no grupo C – controle, porém a solução foi privada das drogas em estudo.

Quadro 1 – Divisão e metodologia empregada em cada grupo.

Grupo	Método utilizado (tamanho do retalho / utilização do sildenafil -10mg/kg/animal / tamanho da amostra – n)
Grupo C (n=22)	2x6cm sem administração de droga
Grupo S (n=22)	2x6cm com administração de 10 mg/kg/peso (sildenafil)
Grupo T (n=22)	2x6cm com administração de 10 mg/kg/peso (tadalafil)

Os períodos de análise escolhidos foram 7 e 14 dias, sendo que cada grupo foi medicado diariamente até o fim do experimento. Assim como a maioria dos estudos, optou-se pela análise no sétimo dia por fortes evidências apontando uma ação importante nos 3 primeiros dias do período cicatricial²⁹. Porém, diferente de todos os trabalhos encontrados, escolheu-se por manter metade dos animais de cada grupo medicados até 14 dias, pois este período é vital à viabilidade de retalhos randômicos e por representar melhor a etapa chamada de proliferativa⁵.

4.3 PROCEDIMENTO OPERATÓRIO

4.3.1 Anestesia

Para a anestesia geral, foi adotado o protocolo do Laboratório de

Técnica Operatória e Cirurgia Experimental (TOCE) da Universidade do Sul Catarinense (UNISUL), Campus Pedra Branca (apêndice A), com acompanhamento de profissional habilitado (médico veterinário).

A anestesia foi realizada por meio da administração de uma solução aquosa a 5% de cloridrato de Cetamina S+ e uma solução aquosa a 2% de cloridrato de xilazina, nas doses de 75 mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente, administrada pela via intramuscular profunda na face interna do membro traseiro esquerdo do animal (quadríceps femoral).⁵⁴

O plano anestésico cirúrgico ideal foi obtido considerando-se o animal anestesiado após a perda do reflexo córneo-palpebral e/ou da não exibição de qualquer reação motora frente ao pinçamento do coxim adiposo plantar do *membrum thoracicum*^{55,56}.

4.3.2 Técnica cirúrgica

Após atingirem o plano anestésico, os animais foram posicionados em decúbito ventral em placas de madeira de 30cm x 35cm e fixados com barbantes nas patas dianteiras (*membrum thoracicum*) e traseiras (*membrum pelvinum*). Posteriormente à epilação/antisepsia, a área retangular (grupo C, S e T = 2cm X 6cm) foi marcada longitudinalmente com caneta própria para marcação de pele utilizadas convencionalmente em cirurgias plásticas, tendo como ápice a parte escapular superior e a coluna como marco central.

A escolha do retalho de tamanho de 2cm X 6cm deveu-se a uma pesquisa anterior deste grupo de estudo em que foi constatada a variabilidade da necrose em função da extensão do retalho⁵⁷. Após a análise estatística, confirmou-se a hipótese de que quando preservada a mesma largura de base cranial, portanto quanto mais longo o retalho, maior a sua área de necrose ($p=0,000$). No citado estudo foram avaliados retalhos de 2cm de largura e 2, 3 e 4cm de extensão. Nos ratos com maior taxa de necrose, ou seja, com maior área de retalho, alcançou-se uma área de necrose de 3,51cm². Opta-se, por isso, por aumentar a extensão do retalho de pele para 2cm X 6cm para igualar ou aumentar a chance do desfecho de interesse – a necrose⁵⁷.

As marcações foram incisadas com bisturi de lâmina número 15 e a pele do retalho foi descolada da musculatura dorsal e logo após reposicionada sobre o leito receptor. Em seguida, foi realizada sutura com pontos simples com náilon 4.0 distando 0,5cm cada ponto (Mononylon®, Ethicon, São Paulo, Brasil) para fixar o retalho cutâneo na sua posição original.

4.3.3 Cuidados pós-operatórios

Após a recuperação anestésica, os animais permaneceram no Laboratório de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental (TOCE), mantidos em temperatura ambiente, fluxo de ar contínuo, livre de barulho e estresse, obedecendo os ciclos dia e noite naturais. Os animais também foram colocados em gaiolas individuais numeradas, dispostas em prateleiras com igual distância da fonte luminosa com alimentação do tipo ração *Nuvilab Cr-1* e água *ad libitum*.

O protocolo de acompanhamento pós-operatório (apêndice B) foi feito diariamente até o momento da morte indolor assistida (MIA).

Para analgesia, após procedimento cirúrgico, foi adicionado dipirona à água de beber, analgésico simples que não causa reações gastrointestinais nos animais de laboratório e não possui o efeito de “confusão” sobre a cascata da coagulação – assim como possuem os anti-inflamatórios não esteroidais. Esse fármaco foi utilizado na dose aproximada de 150 a 600mg/Kg via oral, levando em consideração a ingesta hídrica média por peso e por espécie, durante os 5 a 7 dias pós-operatórios.

Todos os dias, duas vezes por dia, os animais foram examinados, registrando a ocorrência de febre e de infecção da incisão. Caso identificado qualquer sinal de sofrimento grave, o veterinário interrompeu a investigação e os animais foram enviados para MIA.

4.4 MORTE INDOLOR ASSISTIDA (MIA)

Metade dos animais de cada grupo no 7º dia e outra metade no 14º dia, após levantamento de dados, foram submetidos morte indolor assistida. Essa ocorreu mediante o aprofundamento de plano anestésico, conforme descrito no item procedimento operatório/anestesia, seguido da aplicação de 5 mililitros de Cloreto de Potássio a 19,1% por via intracardíaca. Mesmo procedimento foi realizado com os animais considerando os *endpoints*. As carcaças, devidamente acondicionadas, foram recolhidas pela empresa que mantém convênio com a Unisul – Universidade do Sul de Santa Catarina – para coleta de matéria orgânica.

4.5 MÉTODO DE PROCESSAMENTO E ANÁLISE DE DADOS

No 7º dia pós-operatório, metade dos animais de cada grupo foram anestesiados e fixados em posição de pronação. O retalho foi fotografado em campo padrão de fundo azul (com pelagem do animal voltada para a

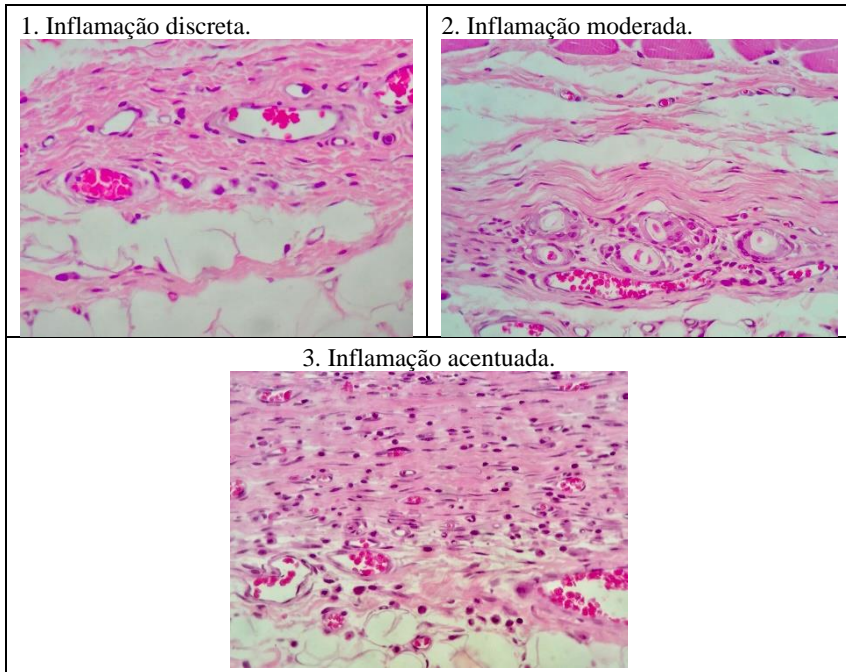
câmera) e através de transiluminação (pelagem do animal voltada para a fonte luminosa), com distância padrão de 60 centímetros, mesmo ISO (número que identifica a sensibilidade do sensor a luz em câmeras), por câmera digital (Canon T3i) sendo os arquivos foram salvos em formato JPEG. Após as fotografias, amostras histológicas foram coletadas, sendo compreendidas de uma faixa central representativa de toda extensão do retalho, de aproximadamente 2mm no centro do retalho, e em sua maior dimensão (quadro 3). No 14º dia de pós-operatório, o mesmo procedimento foi realizado com o grupo de animais em observação até o 14º dia.

4.5.1 Análise microscópica

As amostras coletadas foram imediatamente fixadas em formalina 10%, submetidas à processamento histológico e embebidas em parafina. Foram obtidos cortes histológicos, corados pela hematoxilina e eosina (H&E). Todas as amostras foram avaliadas por apenas um patologista e o estudo teve desenho duplo cego. Os ratos foram numerados em ordem aleatória e medicados pelo autor do estudo com o veículo e as drogas em três frascos também numerados em ordem aleatória. Os parâmetros avaliados no estudo histopatológico para a caracterização do processo inflamatório foram: neovascularização, inflamação e ulceração.

Quanto ao processo inflamatório, foi realizada a avaliação em porcentagem de mononucleares *versus* polimorfonucleares por meio da estimativa, em três campos de 400x contíguos na junção proximal (na porção distal, a presença variável da necrose poderia influir qualitativamente a presente análise) (quadro 2).

Quadro 2 - Inflamação graduada, conforme intensidade em discreta, moderada e acentuada.

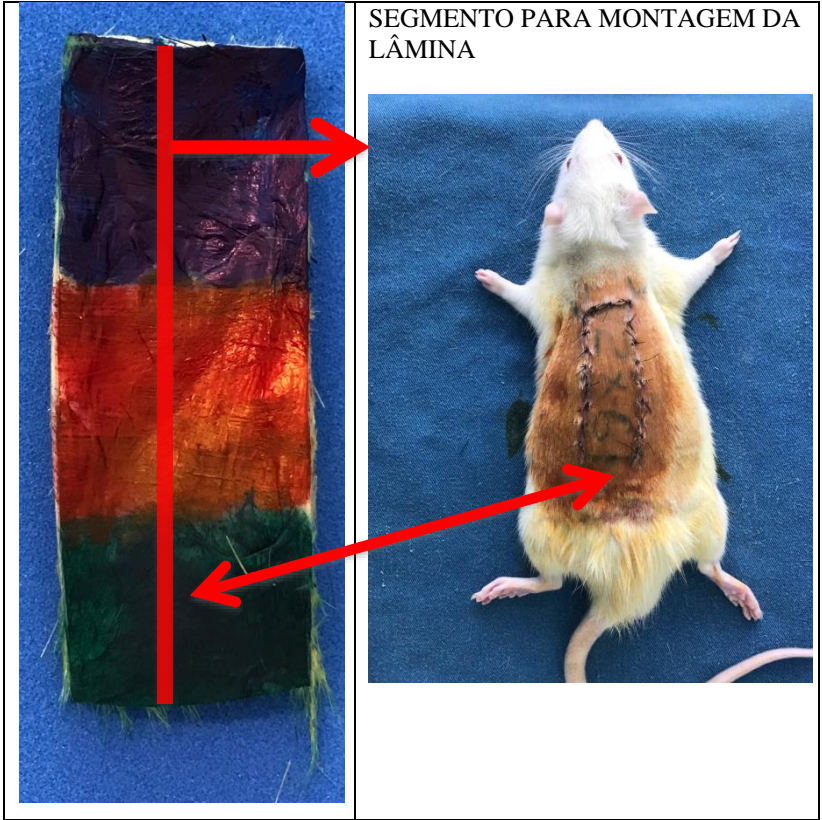


Já a neovascularização foi avaliada pela contagem de *lúmens* vasculares em três campos de 400x contíguos na junção proximal (pelo mesmo motivo da variável inflamação, não se optou pela porção distal).

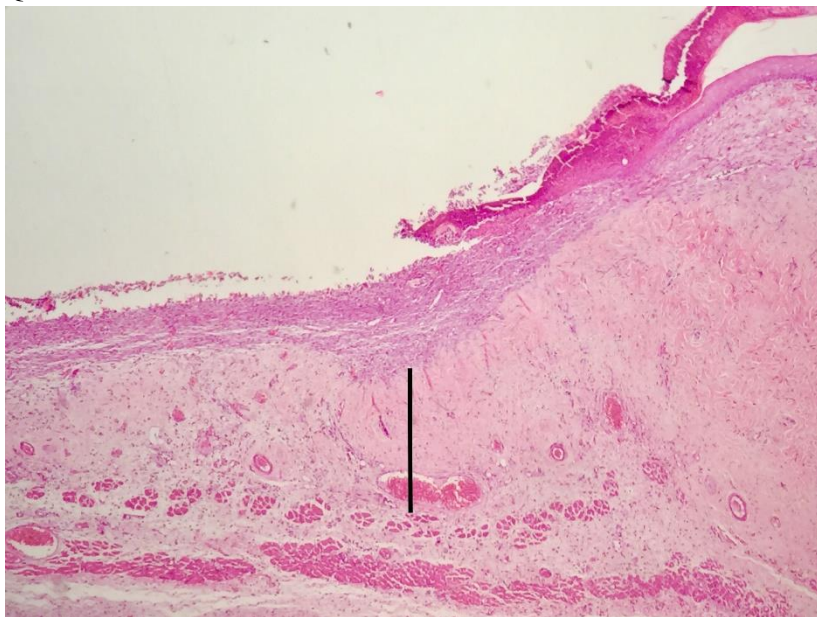
Na variável tamanho da úlcera, tamanho da crosta e espessura de tecido viável abaixo da crosta, as medidas foram realizadas na porção média do retalho em sua maior dimensão (Quadro 3). Na variável tamanho da úlcera e tamanho da crosta, foram mensuradas em centímetros, respectivamente, o tamanho da úlcera verdadeira – cruenta – abaixo da crosta e o tamanho da crosta. Já na variável espessura do tecido viável abaixo da úlcera, a medida foi realizada, também em centímetros, entre o fundo da úlcera (porção mais profunda em toda a extensão do retalho) e o tecido muscular esquelético subjacente (Quadro 3 e 4).

O Quadro 5 mostra de forma resumida a metodologia utilizada, de maneira resumida, para coleta de dados histológicos.

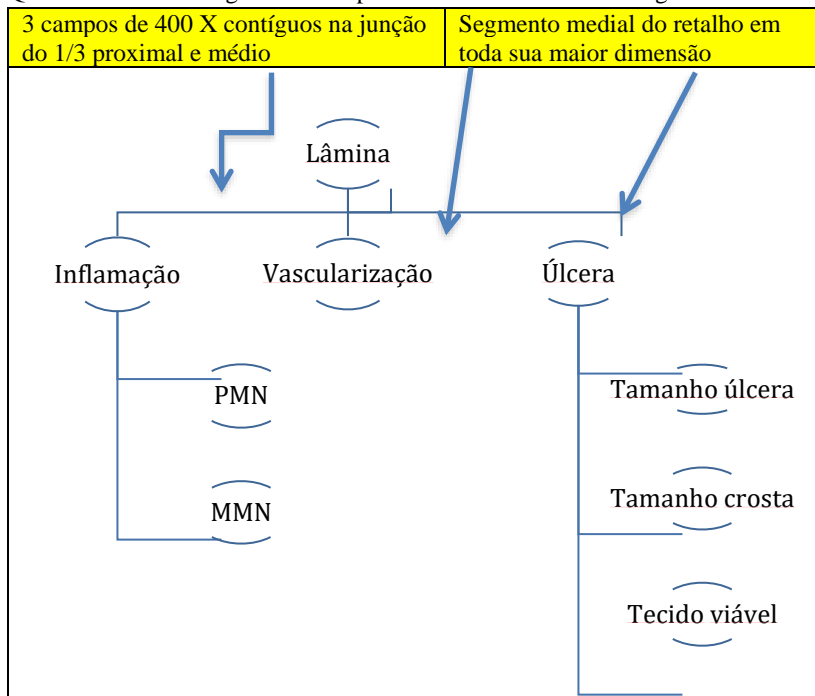
Quadro 3 – Segmento do retalho utilizado para avaliação histológica.



Quadro 4 - Medida do tecido viável da crosta até a fáscia muscular.



Quadro 5 – Metodologia utilizada para a coleta de dados histológicos.



4.5.2 Análise estatística

Para a análise estatística, foram utilizadas tabelas de contingência para associar os grupos de ratos às seguintes variáveis: vascularização, infiltrado inflamatório e solução de continuidade - úlcera.

Para isso, foi utilizado os recursos do programa estatístico SPSS, versão 17. Após a aplicação do teste de Levene, optou-se por Anova para avaliação da variável vascularização. Quanto as variáveis crosta, tamanho da úlcera, tecido viável entre a úlcera e a fáscia e avaliação em porcentagem de polimorfonucleares e mononucleados utilizou-se Kruskal Wallis.

Em todos os testes estatísticos realizados, foi considerado um nível de significância de 5%⁵⁸. Dessa forma, são consideradas associações estatisticamente significativas aquelas cujo valor p foi inferior a 0,05.

4.6 ASPECTOS ÉTICOS

O estudo foi realizado tendo como base os princípios e diretrizes estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA, pela Diretiva 2010/63EU de 22 de setembro de 2010 do Parlamento Europeu e do Conselho de Proteção dos Animais para Utilização em Propostas Científicas e em total concordância com a Lei Federal no 11.794 de 08 de outubro de 2008.


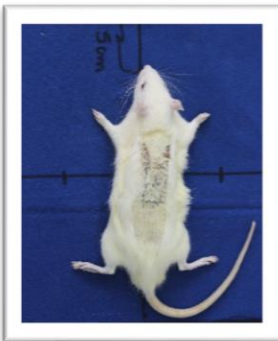




O projeto foi submetido à análise da Comissão de Ética para Utilização de Animais – CEUA (Resolução CONSUN 46/2009), da Universidade do Sul de Santa Catarina – UNISUL, sendo que o experimento só foi iniciado após a liberação do parecer consubstanciado. O Projeto foi aprovado na CEUA/UNISUL – 16.016.5,01.IV.


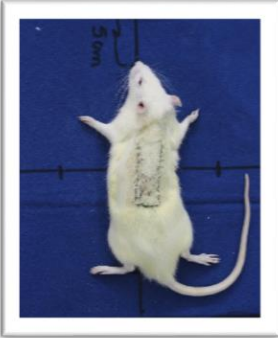

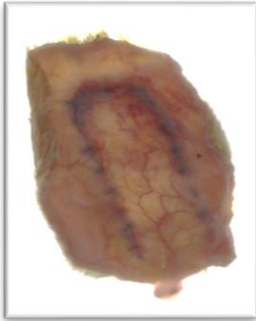
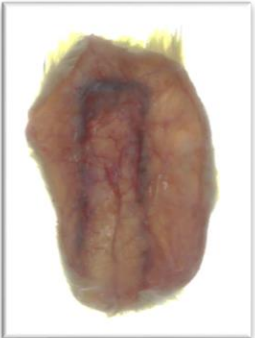

5. RESULTADOS

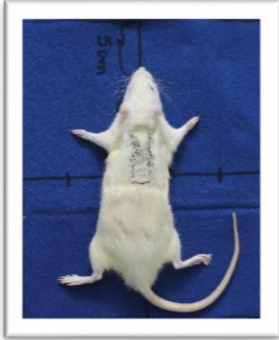
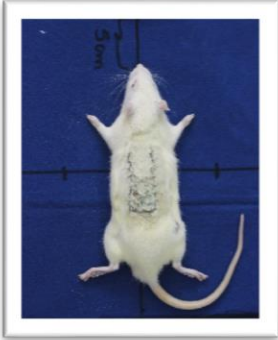




Durante o período de execução do presente estudo foi verificado o óbito de quatro animais, casualmente distribuídos na sequência operatória, em decorrência do ato anestésico. O procedimento cirúrgico foi composto por 62 repetições experimentais (N=62), distribuídas aleatoriamente nos seguintes grupos: 22 ratos no grupo controle (C07 e C14), 20 ratos no grupo sildenafil (S07 e S14) e 20 ratos no grupo tadalafil (T07 e T14). A morte por desfecho foi determinada visando a análise das variáveis de estudo nos períodos do sétimo e décimo quarto dia do pós-operatório. Em nenhum animal dos diferentes grupos de estudo foi observado complicação referente ao procedimento operatório ou frente à administração dos fármacos.

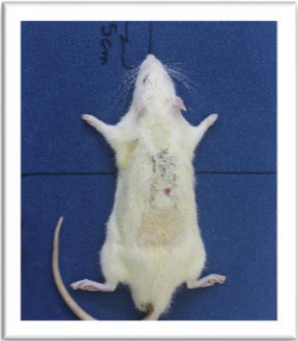

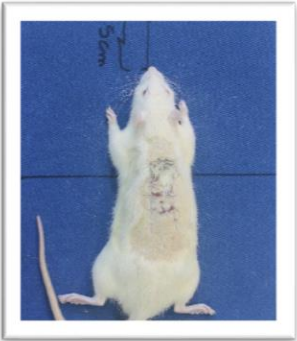
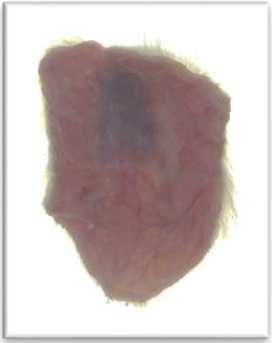
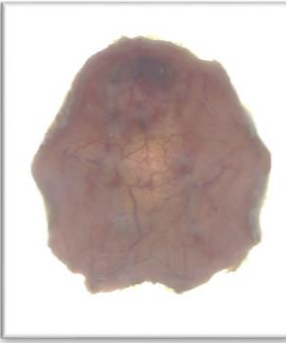
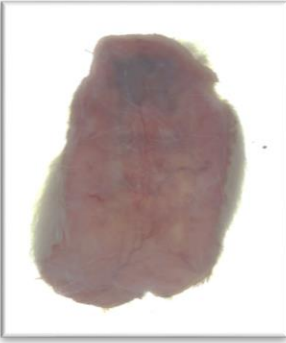
Apesar de não utilizarmos fotografias para validação estatística, por acreditar que a análise totalmente histológica confere maior fidedignidade aos nossos dados, o quadro abaixo (Quadro 6), demonstra alguns casos, registrados macroscopicamente, do grupo C, S e T nos períodos de 7 e 14 dias. Como já citado, as fotos foram realizadas em campo azul padrão e através de transiluminação.



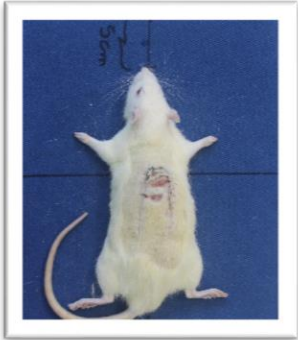

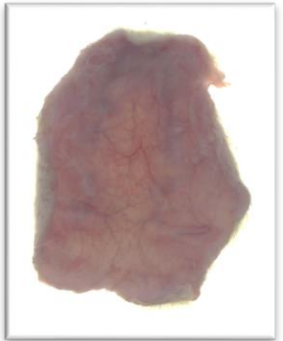
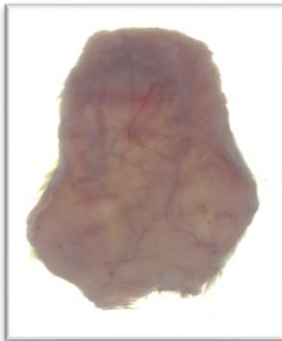
Quadro 6 - Fotos dos retalhos em campo azul padrão e em transiluminação dos grupos C - controle, S - sildenafil, T - tadalafil - em 7 e 14 dias.




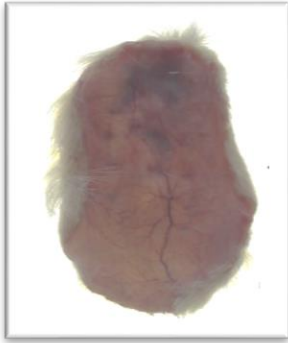

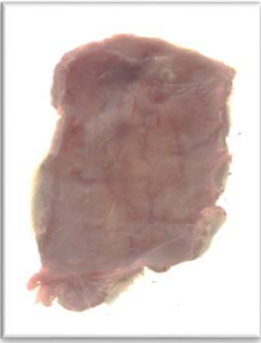
	C7	S7	T7
Foto padrão			
Trans-iluminação			

	C7	S7	T7
Foto padrão	 A dorsal view photograph of a white mouse (C7) against a blue background. The mouse is held by its tail, and its body is centered. A vertical scale marker is visible on the left side of the image.	 A dorsal view photograph of a white mouse (S7) against a blue background. The mouse is held by its tail, and its body is centered. A vertical scale marker is visible on the left side of the image.	 A dorsal view photograph of a white mouse (T7) against a blue background. The mouse is held by its tail, and its body is centered. A vertical scale marker is visible on the left side of the image.
Trans-iluminação	 A transillumination photograph of the mouse C7, showing the internal organs and skeletal structure in a reddish-brown hue against a white background.	 A transillumination photograph of the mouse S7, showing the internal organs and skeletal structure in a reddish-brown hue against a white background.	 A transillumination photograph of the mouse T7, showing the internal organs and skeletal structure in a reddish-brown hue against a white background.

	C7	S7	T7
Foto padrão	 A dorsal view photograph of a white mouse (C7) on a blue background. A 5 cm scale bar is visible at the top left.	 A dorsal view photograph of a white mouse (S7) on a blue background. A 5 cm scale bar is visible at the top left.	 A dorsal view photograph of a white mouse (T7) on a blue background. A 5 cm scale bar is visible at the top left.
Trans-iluminação	 A transillumination image of mouse C7, showing a reddish-brown, irregularly shaped area with some yellowish highlights.	 A transillumination image of mouse S7, showing a reddish-brown, irregularly shaped area with some yellowish highlights.	 A transillumination image of mouse T7, showing a reddish-brown, irregularly shaped area with some yellowish highlights.

	C14	S14	T14
Foto padrão	 A dorsal view of a white mouse (C14) against a blue background. A handwritten '5cm' scale bar is visible at the top left of the image.	 A dorsal view of a white mouse (S14) against a blue background. A handwritten '5cm' scale bar is visible at the top left of the image.	 A dorsal view of a white mouse (T14) against a blue background. A handwritten '5cm' scale bar is visible at the top left of the image.
Trans-iluminação	 A transillumination image of mouse C14, showing a reddish-brown, irregularly shaped area with some darker spots.	 A transillumination image of mouse S14, showing a reddish-brown, irregularly shaped area with a prominent network of blood vessels.	 A transillumination image of mouse T14, showing a reddish-brown, irregularly shaped area with a prominent network of blood vessels.

	C14	S14	T14
Foto padrão	 A dorsal view of a white mouse (C14) on a blue background. The mouse is held by its tail. There is a small, dark, irregular lesion on its back, located between the shoulder blades. The word "5cm" is written vertically on the blue background to the left of the mouse's head.	 A dorsal view of a white mouse (S14) on a blue background. The mouse is held by its tail. There is a small, dark, irregular lesion on its back, located between the shoulder blades. The word "5cm" is written vertically on the blue background to the left of the mouse's head.	 A dorsal view of a white mouse (T14) on a blue background. The mouse is held by its tail. There is a small, dark, irregular lesion on its back, located between the shoulder blades. The word "5cm" is written vertically on the blue background to the left of the mouse's head.
Trans-iluminação	 A transillumination image of the mouse C14, showing the internal organs and the dark lesion on the back. The lesion appears as a dark, irregular shape against the lighter, translucent background of the mouse's body.	 A transillumination image of the mouse S14, showing the internal organs and the dark lesion on the back. The lesion appears as a dark, irregular shape against the lighter, translucent background of the mouse's body.	 A transillumination image of the mouse T14, showing the internal organs and the dark lesion on the back. The lesion appears as a dark, irregular shape against the lighter, translucent background of the mouse's body.

	C14	S14	T14
Foto padrão	 A photograph of a white mouse, specimen C14, lying on its back on a blue surface. The mouse is facing upwards, and its tail is visible on the left side. A small black mark with the number '50m' is visible on the blue background above the mouse's head.	 A photograph of a white mouse, specimen S14, lying on its back on a blue surface. The mouse is facing upwards, and its tail is visible on the left side. A small black mark with the number '50m' is visible on the blue background above the mouse's head.	 A photograph of a white mouse, specimen T14, lying on its back on a blue surface. The mouse is facing upwards, and its tail is visible on the left side. A small black mark with the number '37' is visible on the blue background above the mouse's head.
Trans-iluminação	 A transillumination image of mouse C14, showing the internal organs and skeletal structure in a reddish-brown hue against a white background.	 A transillumination image of mouse S14, showing the internal organs and skeletal structure in a reddish-brown hue against a white background.	 A transillumination image of mouse T14, showing the internal organs and skeletal structure in a reddish-brown hue against a white background.

As variáveis histológicas avaliadas estatisticamente neste estudo foram sumarizadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Resultados das variáveis de estudo sumarizadas quanto a natureza da distribuição e testes estatísticos aplicados.

Grupo PMN	7 dias de tratamento				14 dias de tratamento			
	n.º	Mediana	Mínimo	Máximo	n.º	Mediana	Mínimo	Máximo
Controle	11	35% ¹	5%	70%	11	5% ²	0%	30%
Sildenafil	10	52,5% ³	15%	85%	10	10% ⁴	5%	55%
Tadalafil	10	45% ⁵	30%	70%	10	20% ⁶	5%	50%

Teste Kruskal-Wallis $P=0,000019$; pós Hoc análise de diferenças significantes ($P<0,05$) entre:(1) com (2)(3)(5); (2) com (1)(3)(5)(6); (3) com (1)(2)(4)(6); (4) com (3)(5); (5) com (1)(2)(4)(6); e (6) com (2)(3)(5). PMN = polimorfonucleares.

Grupo MMN	7 dias de tratamento				14 dias de tratamento			
	n.º	Mediana	Mínimo	Máximo	n.º	Mediana	Mínimo	Máximo
Controle	11	65% ¹	30%	95%	11	95% ²	70%	100%
Sildenafil	10	47,5% ³	15%	85%	10	90% ⁴	45%	95%
Tadalafil	10	55% ⁵	30%	70%	10	80% ⁶	50%	95%

Teste Kruskal-Wallis $P=0,000019$; pós Hoc análise de diferenças significantes ($P<0,05$) entre:(1) com (2)(3)(5); (2) com (1)(3)(5)(6); (3) com (1)(2)(4)(6); (4) com (3)(5); (5) com (1)(2)(4)(6); e (6) com (2)(3)(5). MMN = monomorfonucleares.

Grupo Tamanho úlcera	7 Dias de tratamento				14 Dias de tratamento			
	n.º	Mediana	Mínimo	Máximo	n.º	Mediana	Mínimo	Máximo
Controle	11	0,91 ¹	0,00	3,50	11	1,10 ²	0,14	2,40
Sildenafil	10	1,60 ³	1,10	3,00	10	0,50 ⁴	0,12	1,80
Tadalafil	10	1,85 ⁵	0,30	3,50	10	0,49 ⁶	0,00	2,80

Teste Kruskal-Wallis $P=0,00745$; pós Hoc análise de diferenças significantes ($P<0,05$) entre: (1) com (3)(5); (2) com nenhum; (3) com (1)(4)(6); (4) com (3)(5); (5) com (1)(4)(6); (6) com (3)(5).

Grupo Crosta úlcera	7 dias de tratamento				14 dias de tratamento			
	n.º	Mediana	Mínimo	Máximo	n.º	Mediana	Mínimo	Máximo
Controle	11	2,6 ¹	0,5	5,1	11	2,8 ²	2,0	3,5
Sildenafil	10	3,1 ³	1,2	4,7	10	2,4 ⁴	1,3	3,8
Tadalafil	10	4,1 ⁵	2,2	5,6	10	2,5 ⁶	0,9	4,5

Teste Kruskal-Wallis $P=0,026749$; pós Hoc análise de diferenças significantes ($P<0,05$) entre: (1) com (5); (2) com (5); (3)(5); (4) com (5); (5) com (1)(2)(3)(4)(6); (6) com (5).

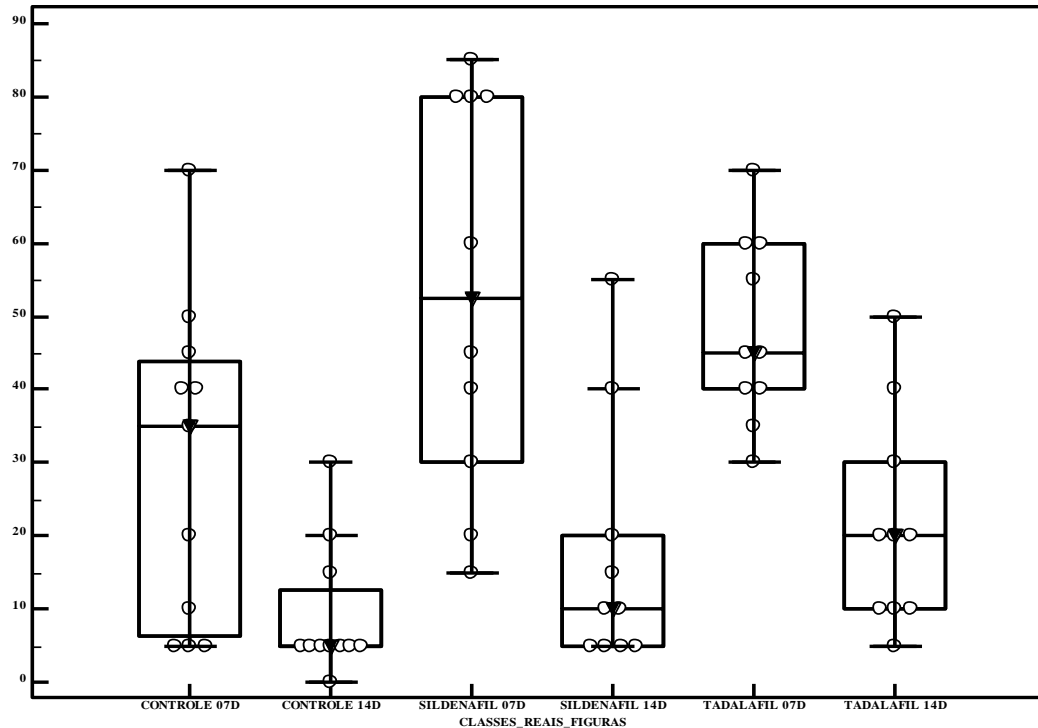
Grupo	7 dias de tratamento				14 dias de tratamento				
	Espeçura Tecido viável	n.º	Mediana	Mínimo	Máximo	n.º	Mediana	Mínimo	Máximo
Controle		11	0,00 ¹	0,00	3,00	11	0,40 ²	0,10	1,50
Sildenafil		10	0,00 ³	0,00	0,40	10	0,50 ⁴	0,00	1,10
Tadalafil		10	0,15 ⁵	0,00	3,00	10	0,40 ⁶	0,00	1,30

Teste Kruskal-Wallis $P=0,037634$; pós Hoc análise de diferenças significantes ($P<0,05$) entre: (1) com nenhum; (2) com (3); (3) com (2)(4)(6); (4) com (3)(5); (5) com nenhum; (6) com (3).

5.1 AVALIAÇÃO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO – POLIMORFONUCLEARES E MONONUCLEARES EM AMOSTRAS DE TECIDO DOS DIFERENTES GRUPOS DE ESTUDO NO PÓS-OPERATÓRIO

Na representação do Gráfico 1 é expressa as medianas das porcentagens de polimorfonucleares observadas a microscopia óptica (Hematoxilina & Eosina, magnificação 400 vezes) nos diferentes grupos de estudo. Os resultados das medianas desta variável, aos 7 dias pós-operatórios, aferidos nas amostras de tecido nos grupos controle, sildenafil e tadalafil foram 35,00 (IIQ = 6,0 – 44%), 52,50 (IIQ = 30 – 80%) e 45,00 (IIQ = 40 – 60%), respectivamente, com validação estatística das diferenças entre os grupos Controle e Tratado (sildenafil ou tadalafil). No 14º dia pós-operatório, em contrapartida, observou-se uma redução nos valores aferidos das medianas para 5,00 (IIQ = 5,0 – 12%) no grupo Controle, 10,00 (IIQ = 5,0 – 20%) no grupo sildenafil e 20,00 (IIQ = 10 – 30%) no grupo tadalafil, traduzindo um perfil cinético de celularidade compatível com a normalidade na transição das fases inflamatória para proliferativa do reparo tecidual, concomitante a ausência de sinais de infecção do sítio cirúrgico. Um padrão de variação intrínseca (intra-grupo) foi verificado ($p < 0,01$) nos diferentes grupos do estudo durante o último período de observação, embora somente a administração de tadalafil tenha implementado diferença estatisticamente significativa frente ao tratamento Controle. Não houve validação da diferença entre as medianas nos grupos tratados com as drogas ($P > 0,05$).

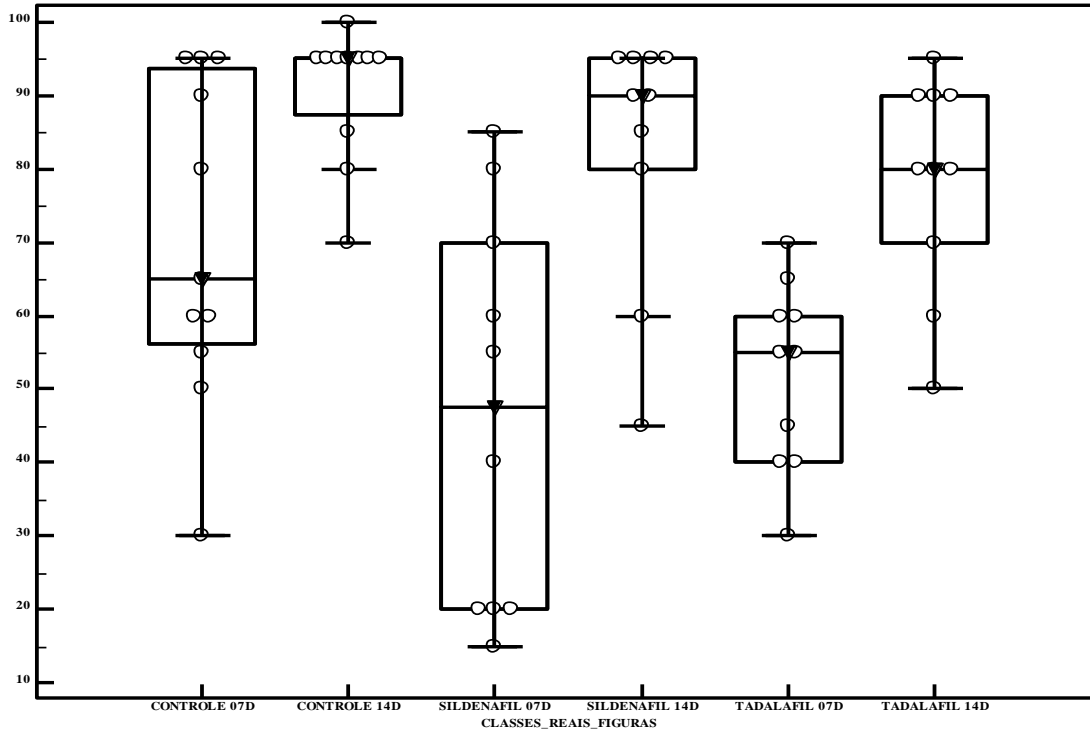
Gráfico 1 - Distribuição dos grupos em 7 e 14 dias segundo avaliação em porcentagens de polimorfonucleares.



Legenda: Distribuição em GRUPOS (1) = Controle 7 dias; (2) = Controle 14 dias; (3) = Sildenafil 7 dias; (4) = Sildenafil 14 dias; (5) = Tadalafil 7 dias; (6) = Tadalafil 14 dias. Círculos vazios mostram os casos observados, medianas são indicadas com cabeça de seta invertida preenchida.

A representação do Gráfico 2 apresenta as medianas das porcentagens de mononucleares observadas a microscopia óptica nos diferentes grupos de estudo. Os valores das medianas desta variável aferidas nos grupos controle, sildenafil e tadalafil no 7º dia após o procedimento foram de 65% (IIQ = 56 – 94%), 47,5% (IIQ = 20 – 70%) e 55% (IIQ = 40 – 60%), respectivamente. Após 14 dias de evolução do processo inflamatório e de reparo tecidual, as unidades experimentais do grupo Controle apresentaram uma mediana de 95% (IIQ = 88 – 95%), comparativamente ao grupo sildenafil com 90% (IIQ = 80 – 95%) e ao grupo tadalafil de 80% (IIQ = 70 – 90%). Neste cenário, observou-se um aumento considerável desta população celular específica nos distintos períodos de observação, condizentes com a cinética do reparo tecidual, inclusive verificando-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e tratado (sildenafil e tadalafil) aos 7 dias pós-operatórios. Aos 14 dias, em contrapartida, foram observadas diferenças estatísticas significativa apenas entre os grupos controle e tadalafil. O padrão de variação intrínseca (intra-grupo) foi validado estatisticamente ($p < 0,01$) em todos os diferentes grupos do estudo, em ambos os períodos de observação (7 e 14 dias).

Gráfico 2 - Distribuição dos grupos em 7 e 14 dias segundo a avaliação em porcentagens de mononucleares.

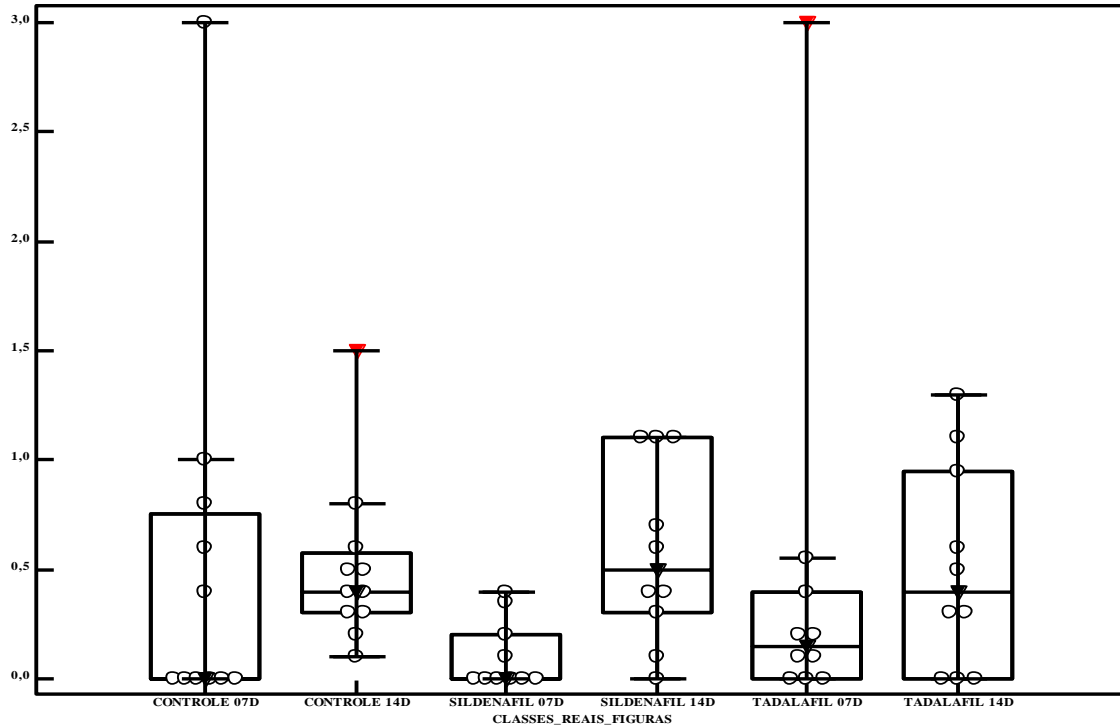


Legenda: Distribuição em GRUPOS (1) = Controle 7 dias; (2) = Controle 14 dias; (3) = Sildenafil 7 dias; (4) = Sildenafil 14 dias; (5) = Tadalafil 7 dias; (6) = Tadalafil 14 dias. Círculos vazios mostram os casos observados, medianas são indicadas com cabeça de seta invertida preenchida.

5.2 AVALIAÇÃO DO TAMANHO DA ÚLCERA EM AMOSTRAS DE TECIDO DOS DIFERENTES GRUPOS DE ESTUDO NO PÓS-OPERATÓRIO

O Gráfico 3 descreve o padrão da extensão da região ulcerada verdadeira (tecido cruento) sob a crosta tecidual visível. Na representação gráfica, observa-se que, aos 7 dias pós-operatórios, a mediana do grupo controle apresentou o valor de 0,91cm (IIQ = 0,13 – 2,40), frente a 1,6cm (IIQ = 1,20 – 2,20) e 1,85cm (IIQ = 1,32 – 3,10) nos grupos sildenafil e tadalafil, respectivamente. Comparando o período de observação de 14 dias, o grupo Controle apresentou mediana de 1,1cm (IIQ = 0,60 – 1,48), frente aos respectivos valores de 0,50cm (IIQ = 0,38 – 1,00) e 0,49cm (IIQ = 0,36 – 0,95) nos grupos sildenafil e tadalafil. Neste contexto, foi observado que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos Controle e tratados no período de observação de 7 dias, embora a diminuição de tamanho da úlcera, com validação estatística ($p = 0,007$ intra-grupos e inter-grupos), aos 14 dias tenha sido observada apenas entre os tratamentos com sildenafil ou tadalafil. Vale ressaltar que nas unidades experimentais do grupo não tratado observou-se um aumento no tamanho da úlcera, mas sem alcançar significância estatística nos respectivos valores.

Gráfico 3 - Distribuição dos grupos em 7 e 14 dias segundo mediana do tamanho da úlcera.

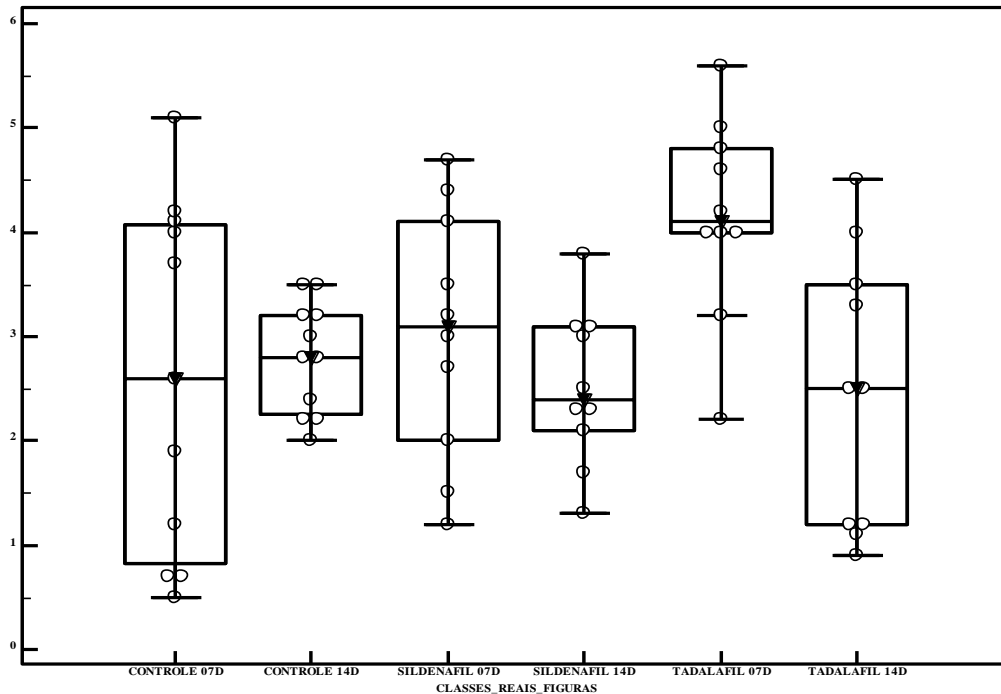


Legenda: Distribuição em GRUPOS (1) = Controle 7 dias; (2) = Controle 14 dias; (3) = Sildenafil 7 dias; (4) = Sildenafil 14 dias; (5) = Tadalafil 7 dias; (6) = Tadalafil 14 dias. Círculos vazios mostram os casos observados, médias são indicadas com cabeça de seta invertida preenchida.

5.3 AVALIAÇÃO DO TAMANHO DA CROSTA EM AMOSTRAS DE TECIDO DOS DIFERENTES GRUPOS DE ESTUDO NO PÓS-OPERATÓRIO

O Gráfico 4 descreve os resultados da observação da crosta tecidual, expressos pela mensuração do seu comprimento (pela extensão da linha média do retalho) encontrados nos diferentes períodos de observação nos grupos de ratos tratados, comparativamente aqueles não tratados no presente estudo. As medianas das crostas observadas nos grupos controle, sildenafil e tadalafil foram de 2,6cm (IIQ = 0,8 – 4,1), 3,1cm (IIQ = 2,0 – 4,1) e 4,1cm (IIQ = 4,0 – 4,8), respectivamente, no período de 7 dias após o procedimento. Em contrapartida, no período de observação de 14 dias, o grupo controle apresentou mediana de 2,8cm (IIQ = 2,25 – 3,2), frente aos valores dos grupos sildenafil de 2,4cm (IIQ = 2,1 – 3,1), e tadalafil de 2,5cm (IIQ = 1,2 – 3,5). Fato que demonstra um efeito de redução no comprimento da crosta durante a evolução do processo de reparo tecidual nos grupos tratados com inibidores da 5-fosfodiesterase, embora com validação estatística ($p = 0,009$) somente no grupo tadalafil.

Gráfico 4 - Distribuição dos grupos em 7 e 14 dias segundo mediana das porcentagens da extensão da crosta em relação a extensão total do retalho.

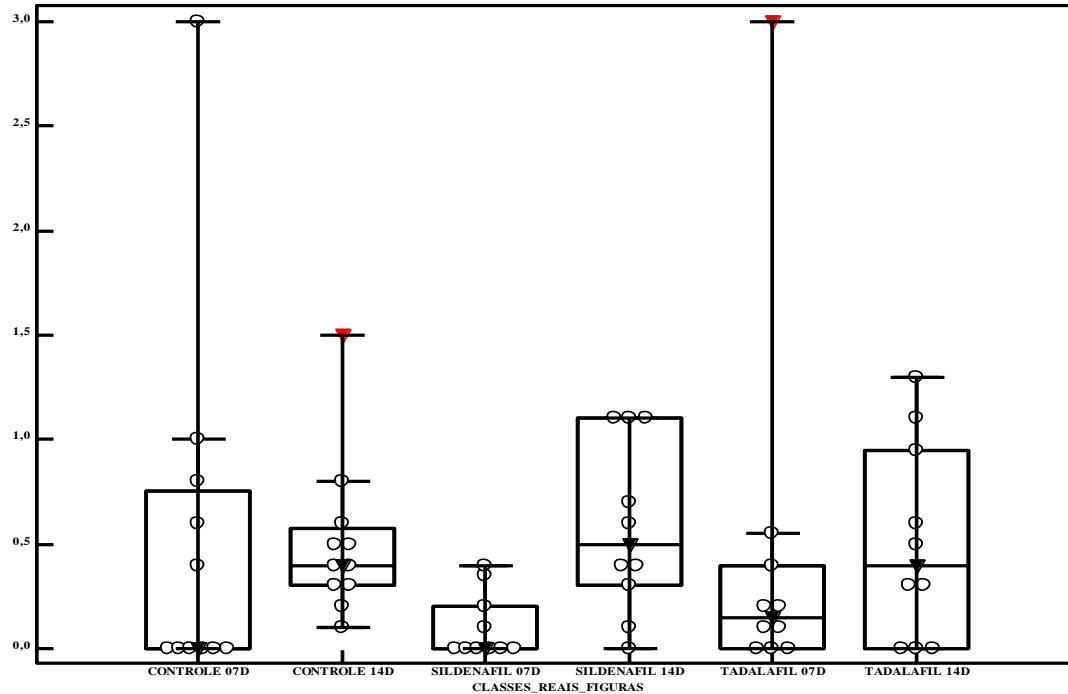


Legenda: Distribuição em GRUPOS (1) = Controle 7 dias; (2) = Controle 14 dias; (3) = Sildenafil 7 dias; (4) = Sildenafil 14 dias; (5) = Tadalafil 7 dias; (6) = Tadalafil 14 dias. Círculos vazios mostram os casos observados, médias são indicadas com cabeça de seta invertida preenchida.

5.4 AVALIAÇÃO DA ESPESSURA DO TECIDO VIÁVEL ABAIXO DA ÚLCERA ATÉ A FÁSCIA MUSCULAR

Na representação do Gráfico 5 é expressa a espessura do tecido viável sob a crosta da ferida até a fáscia muscular, na porção mais profunda da úlcera nos diferentes grupos de estudo. As medianas desta variável aferidas nos grupos controle, sildenafil e tadalafil no 7º dia após o procedimento foram de 0,0mm (IIQ = 0,00 – 0,75), 0,0mm (IIQ = 0,00 – 0,20) e 0,1mm ± (IIQ = 0,00 – 0,40), respectivamente. Após 14 dias de evolução do processo inflamatório e de reparo tecidual, as unidades experimentais do grupo controle apresentaram uma mediana de 0,4mm ± (IIQ = 0,30 – 0,58), comparativamente ao grupo sildenafil com 0,5mm (IIQ = 0,30 – 1,10) e ao grupo tadalafil de 0,4mm (IIQ = 0,00 – 0,95). Observa-se que houve evolução na espessura do tecido viável nos diferentes grupos de estudo no decorrer dos dias pós-operatórios, condizente com o reparo tecidual, embora apenas o grupo tratado com sildenafil tenha apresentado validação estatística intra-grupo desta variável ($p = 0,038$).

Gráfico 5 - Distribuição dos grupos em 7 e 14 dias segundo mediana do tecido viável logo abaixo da crosta até a fáscia muscular, na porção mais profunda da úlcera.

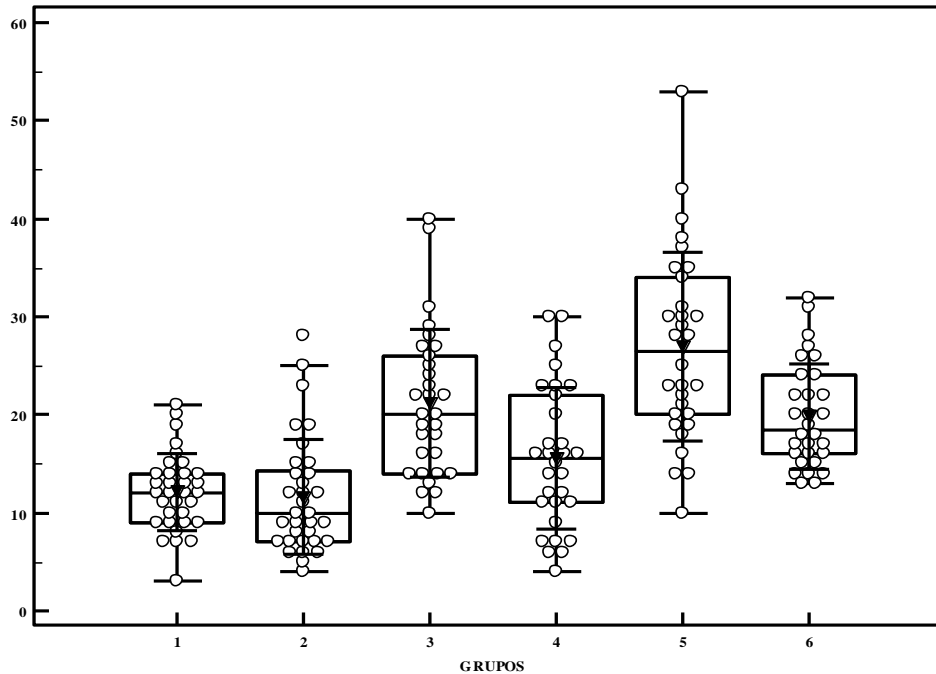


Legenda: Distribuição em GRUPOS (1) = Controle 7 dias; (2) = Controle 14 dias; (3) = Sildenafil 7 dias; (4) = Sildenafil 14 dias; (5) = Tadalafil 7 dias; (6) = Tadalafil 14 dias. Círculos vazios mostram os casos observados, médias são indicadas com cabeça de seta invertida preenchida.

5.5 AVALIAÇÃO DO GRAU DE NEOVASCULARIZAÇÃO EM AMOSTRAS DE TECIDO DOS DIFERENTES GRUPOS DE ESTUDO NO PÓS-OPERATÓRIO.

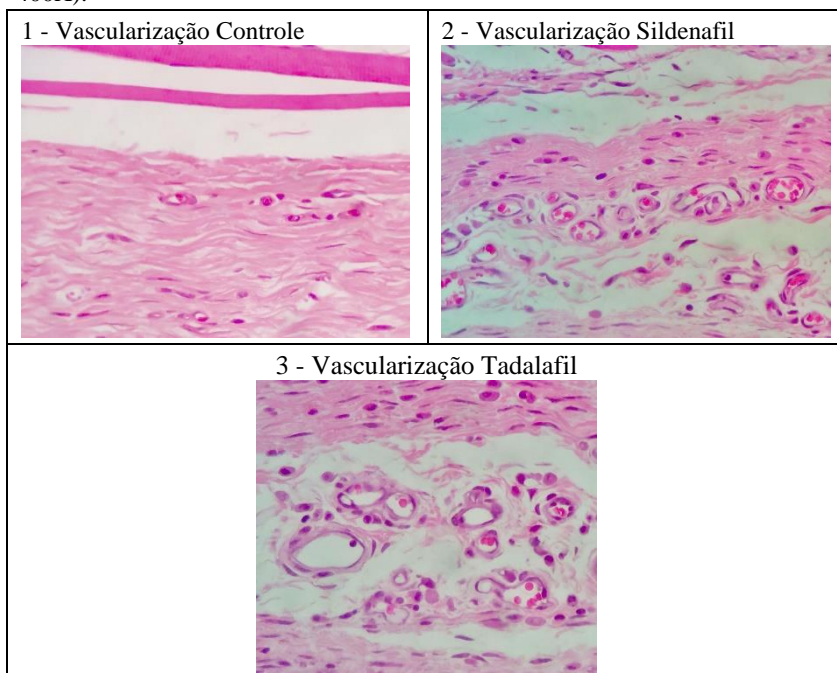
O Gráfico 6 descreve o padrão da variável *Vascularização*, apresentando as diferenças em relação à contagem do número de lúmens entre os diferentes períodos de observação nos ratos tratados, comparativamente aqueles não tratados. Enquanto as médias dos valores do número de lúmens vasculares nas amostras de tecido aos 7 dias após o procedimento cirúrgico nos grupos controle, sildenafil e tadalafil foram de $11,4196 \pm 3,92$, $19,9129 \pm 7,54$ e $25,2461 \pm 9,68$, respectivamente, no 14º dia pós-operatório estes valores passaram para $10,3668 \pm 5,90$ no grupo controle, $13,7915 \pm 7,29$ no grupo sildenafil e $19,2121 \pm 5,36$ no grupo tadalafil. Neste contexto, foi verificado que os achados apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p = 0,001$), nos distintos períodos de observação, entre os grupos controle e experimental. A comparação entre os tratamentos também indicou validação estatística ($p = 0,001$) para as diferenças das médias da referida variável entre o 7º e 14º dias pós-operatórios. O *Quadro 4*, por sua vez, ilustra a histologia típica de cada grupo exemplificando a variável vascularização.

Gráfico 6 - Distribuição dos grupos em 7 e 14 dias segundo média da vascularização.



Legenda: Distribuição em GRUPOS (1) = Controle 7 dias; (2) = Controle 14 dias; (3) = Sildenafil 7 dias; (4) = Sildenafil 14 dias; (5) = Tadalafil 7 dias; (6) = Tadalafil 14 dias. Círculos vazios mostram os casos observados, médias são indicadas com cabeça de seta invertida preenchida e barras de erros indicam +/- 1 desvio padrão. ANOVA $P < 0,001$; Post Hoc análise de diferenças significantes ($P < 0,05$ com teste de Student-Newman-Keuls) entre: (1) com (3)(5)(6); (2) com (3)(4)(5)(6); (3) com (1)(2)(4)(5); (4) com (2)(3)(5)(6); (5) com (1)(2)(3)(4)(6); e (6) com (1)(2)(4)(5).

Quadro 7 - Padrões histológicos típicos para a variável vascularização encontrados nos diferentes grupos de estudo. (Coloração H&E, magnificação 400X).



6. DISCUSSÃO

O processo cicatricial desperta muito interesse entre os pesquisadores e por este motivo continua sendo tema de muitos estudos. Acelerar a recuperação e diminuir a morbidade traumática, diminui custos e dias de internação. Não apenas a reparação local, mas mediadores inflamatórios aparecem como peças fundamentais deste “quebra-cabeça”^{2,3,5-13,21-26}.

A inflamação é uma reação que visa a defesa do organismo a agentes nocivos e corpos estranhos, agindo por meio de resposta celular e humoral, com implicações celulares, vasculares e teciduais. Esse processo que leva inicialmente a uma vasodilatação, influxo celular e de fluidos, pode ser prejudicial ao local se sua ação se perpetuar cronicamente². No caso de retalhos de pele, a evolução desse processo é essencial para viabilidade do mesmo e sucesso do tratamento^{2,3,5-13,21-26}.

O conceito de retalho sofreu alterações e acréscimos na medida em que aumentou seu conhecimento fisiológico e anatômico, possibilitando variações e aperfeiçoamentos. Até a denominação retalho cutâneo, que era uma redundância, deixou de sê-lo posto que, atualmente, há retalhos que não envolvem a pele. A definição de que retalhos, são segmentos de tecido mobilizados para outros locais (área receptora), mantendo conexões vasculares ou neurovasculares com seu local de origem (área doadora), também já não é completamente verdadeira porque, nos retalhos microcirúrgicos, essas conexões são interrompidas, pelo menos durante algum tempo.⁵⁹

Uma nova definição, considerada temporária devido às alterações frequentes de conceitos sobre este assunto, poderia ser: "Retalhos são segmentos corporais, de tamanho e espessura variáveis, compostos de um ou mais tecidos, que são levados a outros locais, na proximidade ou a distância e que dependem, para sua sobrevivência, de circulação arteriovenosa fornecida por seus locais de origem ou de destino."⁵⁹

Entre a Primeira Guerra Mundial (1914-1918), quando as bases da Cirurgia Plástica Reconstitutiva foram criadas, até a década de 1960, os retalhos eram planejados com base na proporção comprimento/largura. Essa proporção variava com a região anatômica, de maneira empírica, sem o real conhecimento do porquê de algumas regiões possibilitarem retalhos mais longos e mais seguros¹⁹.

Enquanto retalhos locais ou de vizinhança eram feitos com certa tranquilidade, baseados nessa proporção, os retalhos a distância tinham rígidas limitações. Para vencê-las, Gillies⁶⁰, na Inglaterra, e Filatov⁶¹, na Rússia, criaram os retalhos tubulares que constituíram um grande avanço

para a época. Analisados sob os conhecimentos atuais, percebe-se que vários tubos bem-sucedidos estavam situados sobre eixos vasculares, o que lhes garantia a nutrição, embora os cirurgiões não conhecessem o conceito de retalho axial.

Retalhos randômicos de pele são frequentemente utilizados em reconstruções e cobertura de feridas. Ressecções com objetivo de tratamento oncológico, úlceras de decúbito e traumas frequentemente causam perda de pele e tecido subcutâneo, resultando em defeitos estéticos e funcionais. O resultado da deficiência da barreira de pele pode levar a infecções ou perda de tecidos adicionais. Além do prejuízo ao paciente, essas feridas oneram o sistema e são um importante problema de saúde pública^{29,50}.

A extensão do retalho é limitada muitas vezes pela perfusão do mesmo, principalmente em sua porção distal. Uma perda parcial ou total desse retalho permanece como um problema muito importante nas cirurgias reconstrutivas. A necrose total do retalho é rara, mas causa grande aumento de morbidade quando ocorre²⁸.

Neste sentido, diversas medicações estudadas mostram efeitos positivos sobre a cicatrização e viabilidade de retalhos. Dentre essas drogas, os inibidores da 5 fosfodiesterase aparecem como fortes “candidatos” a atuar nesta etiopatogenia, até mesmo pelo seu mecanismo de ação^{1,14}.

No presente trabalho, foi realizado um estudo experimental investigando o efeito dos inibidores da fosfodiesterase (sildenafil e taladafil) na cicatrização e viabilidade de retalhos randômicos de pele observando a inflamação, tamanho e evolução da crosta, úlcera, tecido viável abaixo da úlcera e vascularização local. Apesar de termos coletado fotos e dados macroscópicos, todas as variáveis avaliadas foram mensuradas pela microscopia, tentando atingir maior fidelidade dos resultados apresentados.

As fosfodiesterases ocupam um papel central na regulação do tônus da musculatura lisa e controlam uma grande variedade de processos e funções fisiológicas. Essas enzimas foram subdivididas quanto sua função e estrutura e onze delas já foram identificadas³⁰.

Os receptores da 5 fosfodiesterase (PDE-5) estão distribuídos pelo músculo liso vascular, intestino, coração, plaquetas, placenta e condrócitos. Especificamente os inibidores da PDE-5 inativam a metabolização do monofosfato cíclico de guanosina (GMPC). O acúmulo de GMPC promove um relaxamento da musculatura lisa e consecutivamente um aumento do fluxo sanguíneo em órgãos alvo³⁰.

Os inibidores da PDE-5 são classicamente utilizados para disfunção erétil e hipertensão pulmonar, mas foram testados neste estudo quanto sua ação sobre retalhos randômicos de pele. Dentre esta classe de fármacos utilizamos o sildenafil - por ter sido o primeiro da classe a ser comercializado e pela maior experiência com a medicação³⁶ - e o tadalafil - por ter a maior meia vida dentre todos inibidores da 5-fosfodiesterase⁴⁹.

A grande maioria dos estudos experimentais apresentaram doses de 3 a 20 mg/kg/dia de sildenafil e tadalafil por diversas vias de administração. Estudos que testaram diferentes doses de sildenafil e tadalafil, têm em sua grande maioria, a dose de 10 mg/kg/dia como ponto de convergência em quase todos^{29,30,31,49,50}.

Em estudo realizado por Sarifakioglu⁴⁹, em que o sildenafil foi administrado pela via oral na dose de 3, 10 e 20/mg/kg, sugeriu um possível efeito dose dependente com melhora da viabilidade do retalho com o aumento progressivo da dose³⁸. Quanto as vias de administração, apesar da grande variedade testada em estudos, a via oral é a mais utilizada na prática clínica para essas medicações.

No momento em que uma lesão tecidual ocorre, uma cascata de eventos interdependentes, que visam a reparação local, é disparada. Como etapa inicial da fase reativa (inflamatória) do reparo tecidual, observa-se a hiperemia e a vasodilatação (gatilho inflamatório), com posterior ativação da cascata de coagulação, objetivando a delimitação do sítio do trauma e minimizando a eventual perda sanguínea. Estas alterações no microambiente tissular traumatizado, em conjuntura à mudança fenotípica na superfície das células endoteliais pela expressão de moléculas adesivas, somadas a concomitante diminuição na força de arrasto (velocidade e fluxo sanguíneo) no lúmen vascular, favorecem à diapedese dos glóbulos brancos: a primeira linha de defesa celular é recrutada, visando o desbridamento e o combate da infecção – os polimorfonucleares (PMNs). A segunda linha de defesa e reparo teciduais, por sua vez, é representada pelos mononucleares (MNs), notadamente os macrófagos e suas subpopulações: classicamente ativado, de reparo e regulador, descrevendo a cinética fisiológica normal da cicatrização de feridas cutâneas. Durante todo o processo de reparo tecidual, esses dois perfis celulares PMNs e MNs, os quais representam de maneira nominal e genérica tantos outros sub-tipos de células de defesa, sofrem alterações de natureza quantitativa no transcorrer das fases da cicatrização. Exemplificando, a transição do perfil celular observada na etapa aguda/inicial da cicatrização pode não apenas determinar seu desfecho, como também sua duração: pacientes com permanência prolongada de polimorfonucleares na ferida, neste contexto, apresentam cicatrização

prolongada (persistência da fase inflamatória), podendo desenvolver complicações traduzidas em feridas crônicas^{2,5,6}.

A análise do resultado das porcentagens de polimorfonucleares (PMN) *versus* monomorfonucleares (MMN) no período de 7 dias e 14 dias tem suas bases na farmacocinética da classe de drogas em questão. Com a vasodilatação, ocorre um aumento de polimorfonucleares na fase aguda^{2,5,6}. Os inibidores da fosfodiesterase 5 potencializam este efeito vasodilatador e, por isso, provavelmente aumentariam o influxo no período inicial. Com a evolução do processo e diminuição das citocinas inflamatórias de fase aguda, o que se observa é a diminuição dos PMN. Choi⁶² *et al*, em estudo comparando o uso de alprosdil – prostaglandina E1 - e sildenafil (20 mg/Kg/dia, via enteral) para viabilidade de retalhos de pele com acompanhamento por 7 dias em ratos, sugeriram um menor influxo de neutrófilos nos grupos que utilizaram o sildenafil, porém sem significância estatística. Em estudo publicado em 2010, em que foram avaliados os efeitos do tadalafil (5mg/kg/dia, por 4 dias, via oral) na cicatrização de anastomoses isquêmicas de intestino delgado de ratos, o tadalafil demonstrou um aumento da pressão de ruptura intestinal e da concentração de hidroxiprolina na anastomose normal e isquêmica, entretanto durante a análise histológica, não houve diferenças entre os grupos quanto a infiltração inflamatória, vascularização e deposição de colágeno na anastomose⁶³.

Em estudo realizado no Japão avaliando dor pélvica crônica e inflamação prostática em modelos animais com prostatite autoimune experimental, verificou-se após tratamento com tadalafil 2mg/kg por 41 dias e posterior análise histológica que o grupo tratado apresentou um menor invasão de células inflamatórias nos ácinos e estroma prostático do lóbulo ventral (significante estatisticamente quando levado em consideração o escore glandular, não o estromal) e significante supressão da dor pélvica⁶⁴.

Apesar de não apresentar perspectiva de comparação, alguns estudos clínicos buscam a elucidação da alteração de mecanismos celulares advindos dos efeitos dessas drogas. Um desses exemplo, é um estudo em andamento – fase IIa - publicado nos Estados Unidos em 2015 foi avaliada a farmacocinética e tolerabilidade do sildenafil oral em adultos com fibrose cística. Após 6 semanas de tratamento, por meio da determinação da atividade da elastase no escarro - proteinase produzida por PMN ativados e responsável pela migração de neutrófilos - demonstrou-se uma redução da atividade inflamatória em vias aéreas de indivíduos com fibrose cística leve a moderada⁶⁵. No presente estudo, os dados encontrados corroboram com a farmacocinética da classe de drogas

em estudo. Supõe-se que pela vasodilatação, em 7 dias, o grupo tratado (sildenafil e tadalafil) apresentou aumento do influxo de polimorfonucleares em relação ao controle com significância estatística, já em 14 dias apenas o controle e o tadalafil tiveram diferença com significância estatística – talvez pela meia vida mais prolongada do tadalafil.

Quando há um sofrimento de tecido viável, por fatores vasculares ou não, uma solução de continuidade no local afetado pode ocorrer. O risco é maior quando se leva em consideração a situação especial de retalhos radômicos de pele. As principais causas que levam ao sofrimento de retalhos têm origem vascular – venosa ou arterial. As formas de avaliar a evolução, a recuperação e os danos causados pela reperfusão passam pela análise da ferida^{29,38,50,51}.

Quando se leva em consideração a progressão dessa solução de continuidade, a observação de sua evolução no decorrer do tempo tem importância fundamental para se avaliar os resultados do tratamento. Objetivando tornar os dados mais fidedignos, a mensuração microscópica desta região foi realizada no presente estudo.

Como se percebe, os resultados apontam para uma redução da região ulcerada nos grupos tratamento, redução do tamanho da crosta no grupo tadalafil e aumento da espessura de tecido viável abaixo da crosta no grupo sildenafil com significância estatística. Dados esses que apontam para uma melhor evolução do retalho e redução da necrose nos períodos estudados quando avaliados aspectos microscópicos nos grupos submetidos a tratamento (sildenafil e tadalafil) em relação ao grupo controle. Nenhum dos estudos revisados avalia a redução da crosta, da região ulcerada ou a espessura do tecido viável na porção mais profunda da úlcera nos períodos avaliados, até porque nenhum dos estudos avalia um período maior que 7 dias de administração da droga, viabilidade do retalho e análise histológica.

Ayyildiz e colaboradores²⁸, em estudo experimental, demonstraram diminuição da taxa de necrose macroscópica no grupo tratado com sildenafil via oral e injetável, com significância estatística. Em estudo realizado por Tsai³¹ *et al* em 2008, após comparação do uso do VEGF e sildenafil, observou-se que a diminuição da taxa de necrose do retalho em ratos vista com o tratamento combinado das drogas e em uso exclusivo do sildenafil foi similar. Os autores sugeriram que a melhora da viabilidade dos retalhos se devia exclusivamente ao uso do sildenafil.

Kayiran e colaboradores⁵¹, em estudo experimental testando os efeitos do tadalafil via enteral em retalhos de pele submetidos a reperfusão tecidual, demonstraram uma queda da taxa de necrose e dos efeitos

deletérios aferidos por meio de marcadores bioquímicos – nitrito, myeloperoidase e malondialdehide.

Em estudo publicado em 2008, os efeitos do tadalafil foram avaliados em retalhos axiais, demonstrando uma redução macroscópica da necrose significativa estatisticamente em análise histológica no dia 7 pós cirúrgico, após 3 dias de tratamento injetável em modelos animais. Observou-se também, por meio da angiografia, uma vasodilatação da *choke vessels* entre os angiossomos adjacentes⁴⁹.

Kaya *et al*⁵² avaliaram o efeito do sildenafil, tadalafil e vardenafil na viabilidade de retalhos de pele 3X9cm em ratos após 3 dias de administração da droga nas doses de 10mg/kg/dia. Observou-se que a taxa de necrose dos grupos tratados era menor que a do grupo controle, mas sem significância estatística entre os grupos.

Em 2011, Barral e colaboradores³⁸, após o uso de sildenafil subdérmico na dose de 0,5mg/kg/dia por 3 dias em ratos, encontraram, em sua análise macroscópica, um aumento na necrose dos retalhos do grupo submetido ao tratamento com sildenafil.

Em um organismo adulto, sob condições normais, a angiogênese só ocorre no ciclo reprodutivo das fêmeas (no útero, com a formação do endométrio, e nos ovários, na formação do corpo lúteo). Dessa forma, a rede vascular se mantém quiescente, porém apresentando a capacidade de iniciar a angiogênese, principalmente durante a cicatrização⁶⁶.

Em resposta à lesão tecidual, a angiogênese é processo dinâmico, finamente regulado por sinais presentes tanto no soro quanto na matriz extracelular local⁶⁷. Durante o processo cicatricial, a formação de novos vasos sanguíneos torna-se necessária para a formação do novo tecido de granulação, correspondendo às células dos vasos sanguíneos a cerca de 60% do tecido de reparo⁶⁸.

O suprimento sanguíneo local é essencial para todo o processo cicatricial. Esta variável foi a que motivou o estudo inicialmente. Pelo mecanismo de ação apresentado por esta classe de drogas^{1,3,14,39,43,44}, se esperava um efeito positivo em alguma fase do processo cicatricial. O aporte sanguíneo, não apenas é necessário para fornecer suprimento a ferida em recuperação como também é o responsável por levar, até o sítio de reparo, as primeiras células de reparação e defesa^{2,5,6}.

Quanto a vascularização, o efeito esperado dos inibidores da 5-fosfodiesterase sobre os retalhos foi observado com aumento dos lúmens vasculares nos grupos tratados, principalmente com tadalafil, que tem maior meia vida desta classe de drogas. Avaliando as peças histológicas, pode-se concluir objetivamente que em todos os grupos, houve superestimativa do valor de *lúmens* vasculares, sendo que o mesmo plano

pode pegar o mesmo vaso diversas vezes dependendo do seu trajeto. Porém como relatado, este efeito foi observado em todos os grupos não alterando a comparação intergrupos.

Ayyildiz *et al*²⁸, em estudo experimental avaliando a administração via oral de sildenafil 1mg/kg/dia, administração subdérmica no pedículo de 0,5mg/kg/dia e o grupo controle por 7 dias após confecção do retalho de pele em ratos, sugeriram um aumento da neovascularização, porém sem uma avaliação estatística dos achados histológicos.

Em estudo publicado em 2004, foi utilizada a cola de fibrina como meio de “*delivery*” (entrega) para o sildenafil que foi aplicado localmente sob o retalho e após 7 dias foram avaliadas as peças histológicas. Houve um aumento da densidade microvascular significante estatisticamente entre os grupos experimentais tratados com a droga em estudo³².

Já em estudo publicado em 2008, comparando o efeito do sildenafil e do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) combinados ou não, houve apenas aumento da densidade vascular longitudinal no grupo tratado com VEGF, mas sem significância³¹. Estudo realizado na Universidade Federal de Minas Gerais demonstrou uma tendência a formação de menos tecido de granulação no grupo em uso de sildenafil subdérmico, aplicado no ato cirúrgico e 48 horas após fracionados em 9 pontos no retalho, em comparação com o controle³⁸.

Referente aos achados deste estudo a cinética das referidas drogas pode efetivamente alterar a cicatrização e viabilidade de retalhos de pele em modelos animais através de fatores vasculares, celulares e possivelmente humorais. A compreensão destes mecanismos pode esclarecer não apenas novas e efetivas funções a esta classe de medicamentos, como pode ajudar a elucidar melhor o processo cicatricial.

7. CONCLUSÃO

A utilização de inibidores da 5-fosfodiesterase (sildenafil e taladafil) na viabilidade de retalhos randômicos de pele em modelos animais foi avaliada neste trabalho. Os resultados obtidos demonstraram um aumento da vascularização em 7 e 14 dias, diminuição do tamanho da úlcera de 7 para 14 dias e do aumento do influxo de polimorfonucleares em 7 dias nos grupos tratados com significância estatística. Os dados mostraram ainda uma redução do tamanho da crosta no grupo taladafil e um aumento do tecido viável abaixo da crosta no grupo sildenafil, no período de 7 para 14 dias, ambos com significância.

Assim, além dos resultados demonstrarem uma melhora na cicatrização e viabilidade de retalhos de pele em modelos animais, as evidências demonstradas nos períodos estudados abrem “portas” para novas pesquisas e aprofundamento da farmacocinética “*in vivo*” das drogas estudadas.

REFERÊNCIAS

1. Tas A, Atasoy N, Ozbek H, Aslan L, Yuksel H, Ceylan E, Dagoglu G. The effects of sildenafil citrate (Viagra) in the early phase of healing process in open wounds in dogs. *Acta Vet Brno* 2003; 72:273-277.
2. Diegelmann RF, Evans MC. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front Biosci* 2004; 9:283-289
3. Kamer E, Unalp HR, Tarcan E, Diniz G, Atahan K, Ortac R, Onal MA. Effect of hyaluronic acid-carboxymethylcellulose adhesion barrier on wound healing: an experimental study. *Wounds* 2008; 20(10):265-272
4. Grabb e Smith. *Cirurgia plástica*. 6ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.
5. Balbino CA, Pereira LM, Curi R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Braz J Pharm Sci* 2005; 41(1): 27-51.
6. Broughton G, Janis JE, Attinger CE. Wound healing: an overview. *Plastic and reconstructive surgery* 2005; 117(7S): 1e-S.
7. Ziche M, Morbidelli L. Nitric oxide and angiogenesis. *J Neurooncol* 2000; 50:139-48.
8. Colombo G, Colombo MDHP, Schiavon LL, D'Acampora AJ. Phosphodiesterase 5 as target for adipose tissue disorders. *Nitric Oxide* 2013; 35:186-92.
9. Cooke JP, Losordo DW. Nitric oxide and angiogenesis. *Circulation* 2002; 105:2133-5.
10. Stallmeyer B, Kämpfer H, Kolb N, Pfeilschifter J, Frank S. The function of nitric oxide in wound repair: inhibition of inducible nitric oxide-synthase severely impairs wound reepithelialization. *J Invest Dermatol* 1999; 113:1090-8.
11. Schwentker A, Vodovotz Y, Weller R, Billiar TR. Nitric oxide and wound repair: role of cytokines? *Nitric Oxide* 2002; 7:1-10.
12. Nakamura H, Herzenberg LA, Bai J, Araya S, Kondo N, Nishinaka Y, Herzenberg LA, Ydoi J. Circulating thioredoxin suppresses lipopolysaccharide-induced neutrophil chemotaxis. *Proceedings of National Academy of Sciences* 2001; 98(26):15143-8.

13. Seiter D. Maggots, honey, and...sildenafil? *Nursing* 2012 Jan;42(1):67-8. doi: 10.1097/01.NURSE.0000406511.73769.4d. PubMed PMID: 22157841.
14. Salcido RS. Viagra and wound healing: the NO connection. *Adv Skin Wound Care*. 2008 Mar; 21(3):106, 108-9.
15. Chung AW, Radomski A, Alonso-Escolano D, Jurasz P, Stewart MW, Malinski T, Radomski MW. Platelet-leukocyte aggregation induced by PAR agonists: regulation by nitric oxide and matrix metalloproteinases. *Br J Pharmacol* 2004;143:845–55.
16. Furchgott RF. The discovery of endothelium-derived relaxing factor and its importance in the identification of nitric oxide. *JAMA* 1996;276:1186–8.
17. Soneja A, Drews M, Malinski T. Role of nitric oxide, nitroxidative and oxidative stress in wound healing. *Pharmacol Rep* 2005;57:108–19.
18. Weller R, Ormerod AD, Hobson RP, Benjamin NJ. A randomized trial of acidified nitrite cream in the treatment of tinea pedis. *J Am Acad Dermatol* 1998;38:559–63.
19. Mélega. *Cirurgia plástica, fundamentos e arte*. 1ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.
20. Payement G, Cariou JL, Arcila M, Arrouvel C, Banzet P. Arterial phenomenon of autonomization of vascularized island flaps reviewed by expansion of the vascular pedicle. An experimental study in the rat. *Ann Chir Plast Esthet*. 1994;39(6):779-84.
21. Nitz AC, Bins-Ely J, d'Acampora AJ, Tames DR, Corrêa ML. Estudo morfológico na cicatrização de feridas cutâneas em ratos utilizando *Coronopus didymus* e *Calendula officinalis*. *Arq Catarin Med*. 2006; 35(4):74-9
22. D'Acampora AJ, Tramonte R, Bürger D, Bürger PJ. Efeitos da quercetina na cicatrização de ferida cirúrgica contaminada em ratos Wistar, *Arquivos Catarinenses de Medicina* 2007;36(1):69-75.
23. Davis RE, Cohen JI, Robinson JE, Urban SL, Cook TA. Ketorolac (Toradol) and acute random-pattern skin flap survival in rat. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1995;121(6):673-7.
24. Kargi E, Deren O, Babuccu O, Hosnuter M, Erdogan B. Dual synergistic effect: the effect of dexamethasone plus carnitine on

- skin flap survival. *Ann Plast Surg* 2004;53(5):488-91.
25. Thackham JA, McElwain DL, Long RJ. The use of hyperbaric oxygen therapy to treat chronic wounds: A review. *Wound Repair Regen* 2008;16(3):321-30.
 26. Isken T, Serdaroglu I, Ozgentas E. The effects of the pentoxifylline on survival of the skin flaps in streptozotocin-diabetic rats. *Ann Plast Surg* 2009;62(4):446-50.
 27. Mauad RJ Jr, Shimizu MH, Mauad T, de Tolosa EM. Buflomedil and pentoxifylline in the viability of dorsal cutaneous flaps of rats treated with nicotine. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2006;59:387-92.
 28. Ayyildiz A, Uysal A, Koçer U, Karaaslan O, Huri E, Germiyanoglu C, Caydere M. Effect of sildenafil citrate on viability of flaps: an experimental study in rats. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 2005;39(4):204-8.
 29. Hart K, Baur D, Hodam J, Lesoon-Wood L, Parham M, Keith K, Vazquez R, Ager E, Pizarro J. Short- and long term effects of sildenafil on skin flap survival in rats. *Laryngoscope* 2006;116(4):522-8.
 30. Sarifakioglu N, Gokrem S, Ates L, Akbuga UB, Aslan G. The influence of sildenafil on random skin flap survival in rats: an experimental study. *Br J Plast Surg* 2004;57:769-72.
 31. Tsai JW, Ayubi FS, Hart KL, Baur DA, Parham MA, Moon JK, Vazquez R, Chasen AB, Zhang Z, Pizarro JM. Evaluation of the effect of sildenafil and vascular endothelium growth factor combination treatment on skin flap survival in rats. *Aesthetic Plast Surg* 2008;32(4):624-31.
 32. Ulusoy MG, Uysal A, Koçer U, Karaaslan O, Cruzdan SS, Ayyildiz A, Ustün H. Improved flap viability with site-specific delivery of sildenafil citrate using fibrin glue. *Ann Plast Surg* 2005;55(3):292-6.
 33. Uthayathas S, Karuppagounder SS, Thrash BM, Parameshwaran K, Suppiramaniam V, Dhanasekaran M. Versatile effects of sildenafil: recent pharmacological applications. *Pharmacol Repts* 2007;59:150-63.
 34. Webb DJ, Freestone S, Allen MJ, Muirhead GJ. Sildenafil citrate

- and blood-pressure-lowering drugs: results of drug interaction studies with an organic nitrate and a calcium antagonist. *Am J Cardiol* 1999;83(5):21-28.
35. Boolell M, Gepi-Attee S, Gingell J, Allen M. Sildenafil, a novel effective oral therapy for male erectile dysfunction. *Br J Urol* 1996;78(2):257-261.
 36. Jackson G, Gillies H, Osterloh I. Past, present, and future: a 7-year update of Viagra (sildenafil citrate). *Int J Clin Pract* 2005;59(6):680-691.
 37. Filippin LI, Cuevas MJ, Lima E, Marroni NP, Gonzalez-Gallego J, Xavier RM. Nitric oxide regulates the repair of injured skeletal muscle. *Nitric Oxide* 2011; 24(1):43-49.
 38. Barral SM, Araujo ID, Vidigal PV, Mayrink CA, Araujo AD, Costa PR. Effects of sildenafil on the viability of random skin flaps. *Acta Cir Bras* 2011;26(4):314-319.
 39. Ayten R, Cetinkaya Z, Girgin M, Ozercan I, Ustundag B, Aygen E. The effects of intraperitoneal sildenafil administration on healing of left colonic anastomoses and intra-abdominal adhesion formation in the presence of intra-abdominal infection. *Diseases of the colon and rectum* 2008;51(12):1837-1841.
 40. Histing T, Marciniak K, Scheuer C, Garcia P, Holstein JH, Klein M, Matthys R, Pohlemann T, Menger MD. Sildenafil accelerates fracture healing in mice. *J Orthop Res* 2011; 29(6):867-873.
 41. Cakmak E, Karasoy Yesilada A, Sevim KZ, Sumer O, Tatlidede HS, Sakiz D. Effect of sildenafil citrate on secondary healing in full thickness skin defects in experiment. *Bratisl Lek Listy* 2014;115(5):267-71. PubMed PMID: 25174056.
 42. Dericic H, Kamer E, Unalp HR, Diniz G, Bozdog AD, Tansug T, Ortac R, Erbil Y. Effect of sildenafil on wound healing: an experimental study. *Langenbecks Arch Surg* 2010;395(6):713-718.
 43. Farsaei S, Khalili H, Farboud ES, Khazaeipour Z. Sildenafil in the treatment of pressure ulcer: a randomised clinical trial. *Int Wound J* 2013 Jun 4; doi: 10.1111/iwj.12104
 44. Pingarr.n-Mart.n L, Arias-Gallo LJ. Sildenafil effect on prevention of thrombosis after microsurgical anastomosis: experimental rat model of thrombotic suture. *Oral Maxillofac Surg* 2013; 18(1):53-

58

45. Pfaff M, Shah A, Steinbacher D. Does phosphodiesterase inhibition lessen facial flap necrosis in tobacco cigarette users? *Facial Plast Surg* 2014. Feb;30(1):84-90. doi: 10.1055/s-0033-1363758. Epub 2014 Jan 31. PubMed PMID: 24488644.
46. Gao ZM, Lin DM, Wang Y, Li JJ, Chen S, Gao WY. Role of the NO/cGMP pathway in postoperative vasodilation in perforator flaps. *J Reconstr Microsurg* 2015 Feb;31(2):107-12. doi: 10.1055/s-0034-1384663. Epub 2015 Jan 20. PubMed PMID: 25602485.
47. Gravvanis A, Papalois A, Delikonstantinou I, Pentilas N, Zogogiannis I, Tsoutsos D, Karakitsos D. Changes in arterial blood flow of free flaps after the administration of sildenafil in swine. *Microsurgery* 2011;31(6):465-471.
48. Arslantas R, Arslantaş MK. Adverse Effect of Sildenafil on Healing Ischemic Wounds: Results of an In vivo Study. *Ostomy/wound management* 2015;61(9):32-37.
49. Oh M, Chang H, Minn KW. The Effects of Tadalafil on Axial-Pattern Skin Flap Survival in Rats. *Dermatologic Surgery* 2008;34(5):626-630.
50. Brewer MB, Stump AL, Holton LH, Janes LE, Silverman RP, Singh DP. Effects of systemic tadalafil on skin flap survival in rats. *Eplasty* 12 (2012): e45.
51. Kayiran O, Cuzdan SS, Uysal A, Kocer U. Tadalafil significantly reduces ischemia reperfusion injury in skin island flaps. *Indian journal of plastic surgery* 2013;46(1): 75.
52. Kaya B, Çerkez C, Isilgan SE, Gokturk H, Ygman Z, Serel S, Can B, Ergun H. Comparison of the effects of systemic sildenafil, tadalafil, and vardenafil treatments on skin flap survival in rats. *Journal of plastic surgery and hand surgery* 2015.
53. Farsaie S, Khalill H, Karlmzadeh I, Dashti-Khavidaki S. An old drug for a new application: potential benefits of sildenafil in wound healing. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences* 2012;15(4):483-498.
54. Damy SB, Camargo RS, Chammas R, Figueiredo LFP. Aspectos fundamentais da experimentação animal-aplicações em cirurgia experimental. *Rev Assoc Med Bras* 2010;56(1): 103-11.

55. Massone F. Anestesiologia Veterinária: Farmacologia e Técnicas. 5a ed. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2008.
56. Sirois M. Medicina de Animais de Laboratório: Princípios e procedimentos. São Paulo: Editora Roca, 2007.
57. Santin AD, d'Acampora AJ. Análise da área viável de retalho cutâneo randomizado: estudo em ratos. Trabalho de conclusão do curso de Medicina, 2011.
58. Triola MF. Introdução à estatística. 7 ed. Rio de Janeiro: LTC Editora, 1998.
59. Franco T, Franco D. Fisiologia e Classificação. <http://lacipufmg.com.br/wp-content/uploads/2017/05/RETALHOS.pdf>.
60. Gillies HD. The Plastic Surgery of the Face. Oxford Medical Publications, 1920.
61. Filatov VP. Plastie à tige ronde. Vestnik Oftal, 1917;34:149.
62. Choi JA, Lee KC, Kim MS, Kim SK. Comparison of Prostaglandin E1 and Sildenafil Citrate Administration on Skin Flap Survival in Rats. Archives of craniofacial surgery 2015; 16(2): 73-79.
63. Kaya Y, Coskun T, Ayhan S, Kara E, Sakarya A, Var A. The effect of tadalafil on anastomotic healing in ischemic small intestine in rats. Surgery today 2010; 40(6), 555-560.
64. Okamoto K, Kurita M, Yamaguchi H, Numakura Y, Oka M. Effect of tadalafil on chronic pelvic pain and prostatic inflammation in a rat model of experimental autoimmune prostatitis. The Prostate 2018; 1-7.
65. Taylor-Cousar JL, Wiley C, Felton LA, St Clair C, Jones M, Curran-Everett D, Poch K, Nichols DP, Solomon GM, Saavedra MT, Accurso FJ, Nick JA. Pharmacokinetics and tolerability of oral sildenafil in adults with cystic fibrosis lung disease. Journal of Cystic Fibrosis 2015; 14(2), 228-236.
66. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. Nature. 1997;386:671-4.
67. Folkman J, D'Amore PA. Blood vessel formation: what is its molecular basis? Cell. 1996;87:1153-5.
68. Arnold F, West DC. Angiogenesis in wound healing. Pharmacol Ther. 1991;52:407-22.

APÊNDICE

APÊNDICE A – REGISTRO NA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.



UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA/UNISUL

Palhoça, 23 de fevereiro de 2017
Registro na CEUA (código):16.016.5.01.IV

Ao Pesquisador/Professor(a): Armando José d'Acampora


Prezado(a),

Vimos por meio deste, certificar que a proposta de estudo e/ou projeto de pesquisa intitulada "Efeitos do sildenafil na viabilidade e cicatrização de retalhos randômicos de pele", registrada com o nº16.016.5.01.IV, sob a responsabilidade de Armando José d'Acampora - que envolve a manutenção ou utilização de modelos animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) desta Instituição, em reunião de 23/02.

A CEUA/UNISUL tem por finalidade cumprir e fazer cumprir, no âmbito da UNISUL e nos limites de suas atribuições, os dispostos na legislação Federal aplicável à criação, manutenção e a utilização de animais em atividades de ensino e de pesquisa, realizadas pelos corpos docente, discente e técnico-administrativo da UNISUL e pesquisadores de outras instituições, caracterizando-se a sua atuação como educativa, consultiva, de assessoria e fiscalização nas questões relativas à matéria, sob os aspectos: I - Ético; II - Legal: enquadramento na legislação vigente.

Gostaríamos de salientar que, embora aprovado, qualquer alteração dos procedimentos e metodologias que houver durante a realização do projeto em questão, deverá ser informada imediatamente à Comissão.

Atenciosamente,



Prof. Sandro Melim Sgrott
Coordenador da Comissão



UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA/UNISUL

Palhoça, 23 de fevereiro de 2017

CERTIFICADO

Em consonância à Orientação Técnica nº 08, de 16 de março de 2016, do CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), certificamos que a proposta de estudo e/ou projeto de pesquisa intitulada “Efeitos do sildenafil na viabilidade e cicatrização de retalhos randômicos de pele”, registrada com o nº 16.016.5.01, sob a responsabilidade de Armando José d'Acampora - que envolve a manutenção ou utilização de modelos animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo CONCEA, e foi **aprovado** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), desta Instituição, em reunião de 23/02.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/07/2016 a 01/12/2017
Espécie/linhagem/raça	<i>Rattus nervogicus albinus</i> , linhagem <i>Wister</i>
No de animais	60
Peso/Idade	90 dias/ 300g
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina UFSC

Prof. Sandro Melim Sgrott
Coordenador da Comissão



UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA/UNISUL

PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROJETO DE PESQUISA1) **PROCOLO Nº:** 16.016.5.01.IV**TÍTULO DO PROJETO:** EFEITOS DO SILDENAFIL E TADALAFIL NA VIABILIDADE E CICATRIZAÇÃO DE RETALHOS RANDÔMICOS DE PELE.2) **PESQUISADOR RESPONSÁVEL:** PROF. ARMANDO JOSÉ D'ACAMPORA3) **ORIENTADO(S):**4) **AUTOR (ES):** POSSUI COLABORADORES, VER 1ª versão do Formulário Unificado.5) **LOCAL DE REALIZAÇÃO:** TÉCNICA OPRATÓRIA E FUNDAMENTOS DA CIRURGIA6) **PROJETO FINANCIADO COM FOMENTO EXTERNO:** Sim Não7) **DATA DO PARECER:** 23.02.20178) **SUMÁRIO DO PROJETO:**

Descrito na 1ª versão do Formulário Unificado.

9) **OBJETIVOS DO PROJETO:**

Sofreu alteração com ampliação de grupos experimentais. Ver anexo a carta de Submissão de Emenda.

10) **ITENS METODOLÓGICOS E ÉTICOS:****Título** Adequado Inadequado

Comentários: Existe clareza no enunciado e coerência com a proposta do projeto.



UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA/UNISUL

Introdução Adequado Inadequado

Não se aplica. Descrita na 1a versão do Formulário Unificado.

Justificativa Adequados Inadequado

- Não se aplica. Descrita na 1a versão do Formulário Unificado.

Objetivos Adequadas Inadequado

- Os autores justificam a ampliação do estudo para comparação de mais 4 grupos experimentais.

Cronograma para execução da pesquisa Adequado Inadequado

Os autores detalham as ações a serem executadas em relação ao tempo previsto! As atividades envolvendo animais previstas com esta emenda estão em acordo com o cronograma previsto na 1a versão do Formulário Unificado.

Orçamento e fonte financiadora Adequados Inadequado

Descritos na 1a versão do Formulário Unificado.

Referências Bibliográficas Adequadas Inadequado

Adequadas ao tema. Pertinentes e recentes.

11) INFORMAÇÕES RELATIVAS AOS ANIMAIS:**Grau de severidade:** Brando Médio Elevado**Espécie:** Ratos Wistar**Número Amostral**60
animais**Redução Amostral:** Sim Não

Número amostral embasado em cálculo estatístico apropriado.

Substituição de Metodologia: Sim Não*Se achar necessário, justifique e sugira uma nova metodologia:*

Comentários:



UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA/UNISUL

Não se aplica.

Aprimoramento da Metodologia: Sim Não

Se achar necessário, justifique e sugira aprimoramentos da metodologia:

Não se aplica!

Acomodação e manutenção dos animais: Adequado Inadequado

Se achar inadequado cite abaixo as melhorias necessárias:

Adequadas, conforme descrito 1a versão do Formulário Unificado.

Manipulação dos animais: Adequado Inadequado

Se achar inadequado cite abaixo as melhorias necessárias:

Comentários:

De acordo com legislação vigente, conforme descrito 1a versão do Formulário Unificado.

Analgesia dos animais (se aplicável): Adequado Inadequado

Se achar inadequado cite abaixo as melhorias necessárias com analgésico

substituto:

Comentários:

De acordo com legislação vigente, conforme descrito 1a versão do Formulário Unificado.

Anestesia dos animais (se aplicável): Adequado Inadequado

Se achar inadequado cite abaixo as melhorias necessárias com anestésico

substituto:

Comentários: De acordo com legislação vigente, conforme descrito 1a versão do Formulário Unificado.

Eutanásia dos animais (se aplicável): Adequado Inadequado

Se achar inadequado cite abaixo as melhorias necessárias com metodologia

substituta:

Comentários: De acordo com legislação vigente, conforme descrito 1a versão do Formulário Unificado.



UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA/UNISUL

12) O PROJETO ESTÁ ADEQUADO À LEGISLAÇÃO VIGENTE:

Adequado Inadequado

Comentários:

Estudo bem redigido e delineado!

13) RECOMENDAÇÃO:

- Aprovado
 Com Pendência
 Não aprovado
 Retirado

Comentários gerais sobre o projeto:

Emenda obedece parâmetros da legislação vigente.

Legislação:

Resolução CONSUN/UNISUL nº 46/2009, de 25/11/2009.

Resolução nº 714, de 20/06/2002 – Conselho Federal de Medicina Veterinária

Lei nº 11.794, de 8/10/2008

DBCA, do CONCEA, 2016.