

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUACÃO EM CIÊNCIAS

MÉDICAS: CIRURGIA

**ESTUDO COMPARATIVO DO EFEITO DE  
SILDENAFIL E TADALAFIL NA SOBREVIVÊNCIA  
DE RETALHOS CUTÂNEOS EM RATOS**

CARLOS FRANCISCO JUNGBLUT

Orientador: Prof. Dr. João Luis Ellera Gomes

Dissertação de mestrado

Porto Alegre, Brasil, 2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUACÃO EM CIÊNCIAS

MÉDICAS: CIRURGIA

**ESTUDO COMPARATIVO DO EFEITO DE  
SILDENAFIL E TADALAFIL NA SOBREVIVÊNCIA  
DE RETALHOS CUTÂNEOS EM RATOS**

CARLOS FRANCISCO JUNGBLUT

Orientador: Prof. Dr. João Luis Ellera Gomes

Dissertação de mestrado

Porto Alegre, Brasil, 2009

**J95e** Jungblut, Carlos Francisco

Estudo comparativo do efeito de sildenafil e tadalafil na sobrevivência de retalhos cutâneos em ratos / Carlos Francisco Jungblut ; orient. João Luis Ellera Gomes. – 2009.  
98 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Cirurgia. Porto Alegre, BR-RS, 2009.

1. Retalhos cirúrgicos 2. Preservação de tecido 3. Nucleotídeo cíclico fosfodiesterase do tipo 5 4. Inibidores de fosfodiesterase I. Gomes, João Luiz Ellera II. Título.

NLM: WO 610

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

## AGRADECIMENTOS

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho e, em especial:

Aos funcionários do Centro de Pesquisas, especialmente enfermeira Marta e veterinária Fabíola, e ao colega Thiago Bujes, que em muito contribuíram para a realização deste trabalho.

As fontes financiadoras que tornaram este estudo possível – CAPES, coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior; FIPE, fundo de incentivo a pesquisa e pós-graduação (HCPA).

Ao Serviço de Patologia, sem o qual este trabalho não seria possível.

Ao Serviço de Ortopedia e Traumatologia, que abriu as portas para minha formação, sendo fonte de contínuo crescimento.

Ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre e a Universidade Federal do Rio Grande do Sul, aos quais devo muito e onde tenho imenso orgulho de ter feito minha formação.

Ao meu orientador, Prof Dr João Luiz Ellera Gomes, um modelo que sigo de seriedade e correção, capacidade e, acima de tudo, curiosidade. Uma busca contagiante pelo novo, pesquisador em sua essência.

A minha família, razão da minha vida.

## ÍNDICE

Lista de abreviaturas	6
Resumo	7
Abstract	9
Introdução	10
Revisão da literatura	11
Justificativa do estudo	17
Objetivo	18
Aspectos éticos	19
Análise estatística	20
Local de realização do estudo	21
Delineamento	22
Variáveis estudadas	23
Materiais e Métodos	24
Resultados	27
Discussão	29
Conclusão	32
Referências	33
Anexo 1 figuras e tabelas	35
Anexo 2 artigo	36
Anexo 3 artigo em inglês	37

## LISTA DE ABREVIATURAS (Siglas e abreviaturas usadas neste trabalho)

ANOVA	Análise de Variância
cGMP	guadenosina monofosfato cíclico
CO <sub>2</sub>	dióxido de carbono
g	gramas
GC	guanilato ciclase
h	horas
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Kg	Kilogramas
Mg	miligramas
PDE	fosfodiesterase
SPSS	<i>Statistical Package for Social Sciences</i>

## RESUMO

Muitos pesquisadores têm procurado alternativas farmacológicas para diminuir a necrose em retalhos cutâneos isquêmicos. Nesta linha, tem ganho espaço a investigação dos inibidores da fosfodiesterase 5. Com uso difundido no tratamento da disfunção erétil, suas características farmacológicas e perfil de segurança permitem acreditar que possam ser usados também para este fim, de modo que testamos as drogas sildenafil e tadalafil. Esta última apresenta maior seletividade pela enzima fosfodiesterase 5 em relação a sildenafil, alterando o perfil de efeitos adversos, e tem como diferenciação uma maior meia vida. Neste trabalho foram operados 45 ratos Wistar submetidos a procedimento cirúrgico de retalho cutâneo dorsal medindo 10 x 2 cm, de base cefálica, conforme proposto por McFarlane, e divididos em 3 grupos de 15 que receberam os tratamentos por gavagem (administração por sondagem intragástrica). Para os ratos do grupo A foi administrado sildenafil 10 mg/kg/dose diluído em água destilada, formando 1 ml de solução, 12/12h; no grupo B foi administrado tadalafil 10 mg/kg/dose – solução de 1 ml - 1x dia, seguido por 1 ml de água destilada 12h após; no grupo C (grupo controle) foi administrado água destilada 1 ml 12/12h. Todos receberam doses administradas por gavagem (intra-gástrico) com duração de 7 dias, após o que os animais foram sacrificados em câmara de CO<sub>2</sub> e as peças submetidas a análise. Resultados: No momento da retirada das peças, sob medição direta na linha média, o percentual médio de necrose foi 41,8% (0-95,9%), sendo no grupo A 42,3% (23,2-68,1%), no grupo B 39,5% (0-56,1%) e no grupo C 43,5% (0-95,9%) (p=0,861); Na medição da linha média por anátomo-patologia, a necrose percentual média foi 44,6% (0-76%), sendo no grupo A 50,4% (29,3-76,3%), no grupo B 36,1% (0-64,8%) e no grupo C 47,3% (0-64,7%) (p=0,06). Os resultados foram então avaliados pela medição do percentual de área necrótica sobre área total das peças em

imagens digitalizadas. O percentual de necrose médio foi 40,4% (0-69%), no grupo A 40,4% (22-69%), no grupo B 43,4% (0-54%) e no grupo C 46,5% (0-65%) ( $p=0,10$ ). Os resultados não demonstraram diferença consistente entre os grupos. Conclusão: Não ficou evidenciado efeito dos fármacos sildenafil e tadalafil em diminuir a necrose cutânea no modelo proposto.



## ABSTRACT

Several authors have been looking for a way of how to lessen cutaneous flap necrosis. Phosphodiesterase 5 inhibitors, currently marked for treatment of erectile dysfunction, are a group of drugs with pharmacologic characteristics and profile of safety that makes it an alternative for that. Sildenafil and tadalafil were tested in this study. The last one has more specificity for phosphodiesterase 5, what gives a different profile of adverse effects, and does have a longer mid-life. For this propose, 45 Wistar rat were used and a McFarlane cephalic based flap was designed on the dorsum of the rat (10 x 2 cm). Rats were divided into 3 groups of 15 each one. Group A received sildenafil 10 mg/kg/dose 12/12h; group B received tadalafil 10 mg/kg/dose at morning and 1 ml of water at night (12 hours after); group C (control group) received water 1 ml 12/12 h. Drug administration was made by gavage (intra gastric), during 7 days long. After that, rats were sacrificed in a CO2 cam and flaps were taken for posterior analysis. Results: When flaps were taken, results of midline necrosis percent under direct view were: mean 41.8% (0-95.9), group A 42.3% (23.2-68.1%), group B 39.5% (0-56.1%), group C 43.5% (0-95.9%) (p=0.861); In anatomo-pathologic results, the mean percent necrosis was 44.6% (0-76%), and on group A 50.4% (29.3-76.3%), group B 36.1% (0-64.8%), group C 47.3% (0-64.7%) (p=0.06). Digital images of the flaps were analyzed by the ratio necrotic area/total area. Mean necrotic percent was 40.4% (0-69%), and on group A 40.4% (22-69%), on group B 43.4% (0-54%), on group C 46.5% (0-65%) (p=0.10). Results didn't show consistent difference between groups. Conclusion: The use of sildenafil or tadalafil was not effective for treatment of ischemic flap on this model of research.

## INTRODUÇÃO

Lesões cutâneas são causa freqüente de indicação cirúrgica no atendimento do paciente traumatizado, podendo estar associadas a lesões complexas, como fratura exposta e lesões de partes moles.

Para os casos em que as perdas cutâneas são muito grandes para um fechamento primário, em que há exposição de estruturas nobres ou quando as características da região não permitem o uso de enxerto de pele, exigindo uma cobertura de melhor qualidade, pode-se optar pela técnica cirúrgica de retalho cutâneo para cobertura. O retalho recebe nutrição de seu pedículo, axial ou randômico, peninsular ou em ilha. Como ponto comum, tem-se a preocupação com a vascularização do retalho, especialmente no que se refere aos pontos mais distantes do seu pedículo. Para isso, são controlados diversos fatores, como os relacionados com a execução da técnica cirúrgica, evitando dano tecidual ao retalho ou seu pedículo e a formação de hematoma sob o mesmo, além dos cuidados locais no pós-operatório.

Apesar dos cuidados, pode ocorrer sofrimento vascular e conseqüente perda parcial ou completa do retalho. Para estas situações, inúmeras tentativas já foram feitas visando obter diminuição do risco de necrose, com uma gama variada de medicamentos (anticoagulantes, vasodilatadores, simpaticolíticos,...), câmara hiperbária, ondas de choque - mas com uso clínico de resultados duvidosos. Deste modo, o conhecimento e a pesquisa de novo arsenal terapêutico nesta linha encontram caminho para uso clínico e ampla aplicabilidade em cirurgia reconstrutiva.

## REVISÃO DA LITERATURA

### Tratamento do retalho isquêmico

As complicações relacionadas a necrose de retalhos cutâneos têm motivado inúmeras pesquisas para tratamento destas condições. O tratamento cutâneo com Dimethylsulfoxide foi aplicado por Adamnson[1] na década de 60, sugerindo melhora clínica com seu uso. Barisoni[2] apresentou em 1969 resultados com uso de thymoxamine, um bloqueador alfa-adrenergico, avaliando a vascularização de retalhos e, em 1979, Finseth[3] mostrou seus resultados com uso de isoxsuprine, um vasodilatador. Com o crescimento da pesquisa nesta área, ganhou espaço uma gama variada de investigações experimentais, principalmente em ratos, coelhos e suínos, testando o uso de diversas classes de medicamentos. Simpaticolíticos foram estudados com objetivo de melhora da circulação sanguínea em retalhos, destacando-se estudos com phenoxybenzamine, propranolol, reserpina e guanethidine[4]. Quanto as drogas que alteram a capacidade de coagulação, destacam-se heparina[5-7] e pentoxifilline que, assim como depleção protéica e anemia[4] provocadas em animais de laboratório, ratos e coelhos, respectivamente, apresentaram melhora na perfusão de retalhos. Dextran[4, 8], que atua como expansor e antiagregante plaquetário, tem encontrado aplicação na prática clínica em alguns protocolos. Alterar a viscosidade sanguínea parece melhorar a perfusão em retalhos, embora provocar anemia e depleção protéica não pareçam tornar-se consistentes como forma de tratamento. Dipirona e ácido acetil salicílico têm resultados positivos em alguns estudos[6, 9, 10], embora sem comprovação clínica em humanos. Corticoterapia[11] também foi aplicada como forma de aumentar a tolerabilidade do retalho à isquemia, com resultados duvidosos. Uso de terapia hiperbárica tem apresentado resultados positivos[12-14], mas ainda não é um

método de fácil acesso na prática clínica. O uso de vasodilatadores também já foi pesquisado. Com resultados variados, os nitratos, assim como dimethylsulfoxide, histamina, hidralazina e isoxsuprine não têm aplicação usual na prática clínica[4, 15-18]. As pesquisas são variadas, incluem muitas substâncias em testes e não seguem os mesmos parâmetros. Torna-se muito difícil separar deste grupo aquelas substâncias que podem realmente ser desenvolvidas para aplicação clínica.

### Inibidores fosfodiesterase 5

Estudos recentes têm apontado como nova linha de pesquisa o uso de inibidores da fosfodiesterase (PDE) para melhorar a perfusão sangüínea em zonas com sofrimento vascular, reduzindo o efeito deletério da vasoconstrição local, o que teria aplicação direta para cirurgias de retalhos cutâneos. Inibidores da fosfodiesterase desempenham um importante papel na regulação de muitas funções fisiológicas, incluindo agregação plaquetária, relaxamento da musculatura lisa, homeostasia, resposta imune e contratilidade cardíaca e, ao que indicam as pesquisas[19-21], com segurança de uso. Entre as PDE, a Fosfodiesterase 5 (PDE 5) é altamente específica para guadenosina monofosfato cíclico (cGMP) e é particularmente abundante na musculatura lisa, incluindo a do sistema vascular. Quando o óxido nítrico é liberado das células endoteliais, ele se difunde nas células da musculatura lisa cobrindo a microvasculatura. Ele então se liga a enzima guanilato ciclase (GC), resultando em sua ativação e subsequente formação de cGMP, que por sua vez promove fosforilação da proteína contrátil miosina do músculo liso, levando ao relaxamento da miosina e dilatação do vaso sangüíneo. Inibidores da PDE 5 impedem a desfosforilação da miosina, assim permitindo que este mecanismo de vasodilatação dure mais tempo. O óxido nítrico induz vasodilatação, inibe agregação plaquetária, promove angiogênese e se mostrou efetivo na sobrevivência de retalhos em pesquisas com animais[18]. Sua aplicação

clínica, entretanto, ficou comprometida em função de seus efeitos hipotensivos. Os inibidores da PDE 5 são altamente específicos para suas células alvo, de modo que produziram menos efeitos sistêmicos mas obtendo resultados satisfatórios no que se refere a melhoria do fluxo sanguíneo no retalho.

Neste estudo procuramos demonstrar os efeitos de sildenafil e tadalafil para este fim, medicamentos já com uso clínico corrente para o tratamento de disfunção erétil, e comparar seus resultados entre si e com um grupo controle. Sildenafil, o mais antigo destes fármacos, já com ampla experiência de uso para tratamento de disfunção erétil, foi motivo de outras pesquisas na área, com resultados que apontam favoravelmente para sua aplicação na salvação e viabilidade de retalhos em sofrimento, de modo que a comparação com grupo placebo procura fornecer validade aos resultados e comparar o resultado de pesquisas em outros centros com a nossa realidade. A comparação com tadalafil visou testar este medicamento para este fim, pois conta com maior meia-vida e variações na ação sobre a fosfodiesterase, pela maior especificidade pela PDE5, permitindo assim um efeito favorável mesmo com maior intervalo entre as doses.[22]

Nesta linha, o primeiro trabalho foi publicado em literatura indexada no ano de 2004 [23], abordando o efeito de sildenafil na sobrevivência de retalhos cutâneos randômicos em ratos sprague-dawley machos. A escolha do modelo de retalho recaiu sobre uma variação do proposto por McFarlane [24], com base caudal e medindo 8,0 x 2,5 cm, feitos após tricotomia local com aparelho elétrico. A droga foi aplicada por via enteral com tubo de alimentação e 3 doses diferentes (3 mg/kg 1xdia, 10 mg/kg 1xdia, 10 mg/kg 2xdia) e comparados com um grupo controle que não recebeu a medicação. Os resultados foram obtidos por medição da área necrótica sobre a área total a partir de fotografias das peças retiradas no dia 7 do experimento. Os resultados apresentados

demonstram diminuição da necrose com o uso do medicamento com efeito dose dependente e com significância estatística. Além disso, neste trabalho o modelo de retalho mostrou-se confiável e previsível, permitindo uma variabilidade intra-grupos pequena no que se refere a necrose tecidual.

O segundo trabalho foi publicado em 2005[25] abordando o uso de sildenafil em ratos fêmeas Wistar. Foi escolhido como modelo o retalho de McFarlane[24] modificado com base caudal e submetido a tricotomia, medindo 6,0 x 2,0 cm. Além de um grupo controle e um grupo que recebeu o medicamento por sondagem orogástrica (1 mg/kg 1x/dia), houve também um grupo que recebeu a medicação localmente, na metade da dose (0,5 mg/kg 1x/dia). O resultado foi obtido pela medição de área necrótica nas peças retiradas ao sétimo dia, calculada com auxílio do programa AutoCAD, medida a partir de digitalização de imagens do retalho. Os resultados foram consistentes, com diminuição significativa da necrose pelo uso da medicação, mais marcadamente pelo uso tópico, obtendo significância estatística.

Ainda em 2005, outra pesquisa testou o uso local de sildenafil associado à cola de fibrina[26]. Com o uso de ratos Wistar, o modelo escolhido foi McFarlane[24] clássico (base cranial) medindo 6,0 x 2,0 cm. Além dos grupos controle, foram incluídos 2 grupos tratamento, em um deles os ratos recebiam a dose de 2,5 mg diluídos em 0,5 ml de cola de fibrina no transoperatório e, no outro, a dose de 10 mg de sildenafil diluídos em 0,5 ml de cola de fibrina, também no transoperatório. Não foram feitas doses adicionais do fármaco. No sétimo dia os ratos foram sacrificados e as peças fotografadas, com os resultados obtidos pela medição da área necrótica percentual com auxílio do programa AutoCAD. A análise dos resultados mostrou diminuição da área necrótica nos grupos com uso de sildenafil em relação aos grupos usados como controle, além de aumento da densidade vascular, obtendo significância estatística. A

variabilidade de necrose intra-grupos também chamou a atenção, demonstrando um modelo previsível de retalho.

Em 2006, foi apresentado os resultados de uma pesquisa por Pizarro JM et al (Dwight David Eisenhower Army Medical Center)[27] avaliando o efeito do sildenafil (intra-peritoneal, 09 mg/kg, 1xdia) ao longo da primeira semana. O modelo aplicado de retalho com McFarlane[24] modificado, neste caso medindo 10,0 x 3,0 (base distal) em ratos sprague-dawley machos foi mantido, mas diferentemente dos demais estudos até então, foi utilizada medição com imagem ortogonal espectral polarizada, além de fotografias dos retalhos e medição da área pelo programa imageJ. Ambos foram medidos nos dias 1, 3, 5 e 7 pós-operatório. Foi observado um efeito mais marcado do medicamento nos dias 1 e 3, com redução das diferenças entre os grupos nos dias 5 e 7. Embora a imagem ortogonal espectral polarizada apresentasse diferença estatisticamente significativa no dia 7 entre os grupos sildenafil e placebo, a análise das imagens digitalizadas neste dia, levando em conta toda a área afetada por sofrimento vascular, não demonstrou diferença entre os grupos. O autor sugere para novas pesquisas associar medicamentos que potencializem a angiogênese, visando promover resultados mais duradouros na sobrevivência dos retalhos cutâneos.

Em 2008 foi publicado um artigo, também com a participação de Pizarro JM (Dwight David Eisenhower Army Medical Center), avaliando o efeito de sildenafil associado a fator de crescimento vascular endotelial[28]. O retalho utilizado foi McFarlane[24] modificado (base caudal, 10,0 x 3,0 cm) em ratos sprague-dawley machos. Além de grupos controles, avaliou também grupos individualizados sendo um com uso de sildenafil apenas (10 mg/kg, intra-peritoneal, 1xdia), um com fator de crescimento vascular endotelial (dose única trans-operatória, 4 ug, subdérmico) e um grupo com os dois tratamentos simultaneamente. Os resultados foram avaliados nos dias

3 e 7, através de imagem espectral ortogonal polarizada e densidade vascular por microscopia. Através de análise estatística ANOVA (unilateral) foi encontrada significância estatística em favor dos grupos que fizeram uso de sildenafil (isolado ou associado ao fator de crescimento vascular endotelial) quanto a variável área afetada. Não houve diferença neste estudo quanto a densidade vascular entre os grupos.

Em maio de 2008 aparece a primeira pesquisa nesta linha com uso de tadalafil[22]. O modelo de retalho em ratos sprague-dawley machos foi uma modificação paramediana do retalho de McFarlane[24], com base distal, mantendo a artéria ilíaca circunflexa profunda íntegra, medindo 9,0 x 2,0 cm. O grupo tratamento recebeu 10 mg/kg/dia de tadalafil, subdérmico na metade distal do flap, por 3 dias. No dia 7, os ratos foram sacrificados e os resultados obtidos a partir de imagem digitalizada dos retalhos (AutoCAD) e de angiografia. Foi encontrada diminuição da necrose no grupo tratado com tadalafil em relação ao grupo controle, com significância estatística ( $p=0,001$ ).



## JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Maximizar a sobrevivência de retalhos cutâneos é de extrema importância na cirurgia reconstrutiva. A isquemia com conseqüente necrose tecidual pode levar a resultados insatisfatórios, com possibilidade de seqüelas funcionais e estéticas, prolongada internação e realização de múltiplos procedimentos.

A inclusão no arsenal terapêutico de um medicamento eficaz em salvar retalhos cutâneos isquêmicos seria de grande valia na prática clínica. A variedade de estudos nesta linha vem a corroborar esta idéia, e o uso recente de inibidores da enzima fosfodiesterase tem ganho importância também para esta linha de tratamento. As pesquisas com sildenafil[23, 25-28] apontam resultados promissores, assim como o trabalho de Myungjune OH et al, com uso de Tadalafil[22]. Não encontramos na literatura indexada estudo comparativo entre estas drogas, com potencial para demonstrar vantagem de resultado na diminuição de necrose tecidual de retalhos cutâneos entre estes fármacos e comparativamente a um grupo controle, o que motivou a realização deste trabalho científico.

## OBJETIVO

Demonstrar a eficácia de tadalafil e sildenafil em diminuir necrose tecidual em tecido isquêmico de retalhos cutâneos em ratos.

## ASPECTOS ÉTICOS:

A realização deste estudo foi aprovada junto ao grupo de pesquisa e pós-graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, protocolo 08497. Foram priorizados os cuidados para menor sofrimento dos animais desde sua captação, realização do ato cirúrgico, cuidados pós-operatórios, administração dos medicamentos e sacrifício dos mesmos. Usada apenas a quantidade de animais indicada como suficiente para encontrar as diferença esperada entre os grupos.

Não há conflitos de interesse na realização deste estudo.

## ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizado cálculo do tamanho da amostra baseado nos achados publicados na literatura indexada[19, 22, 23, 26-28] e com auxílio da equipe de estatística do grupo de pesquisa e pós-graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Com os resultados de anatomopatologia disponíveis, os dados foram analisados usando o programa estatístico *SPSS Windows* versão 12.02 (*Statistical Package for Social Sciences*). As variáveis contínuas foram expressas em médias com o respectivo desvio padrão, comparadas com o teste t *Student* e Análise de Variância (ANOVA), considerados significativos achados a partir de significância  $p < 0.05$  e clinicamente relevantes diferenças maiores que 10% entre os grupos.

## LOCAL DE REALIZAÇÃO DO ESTUDO

O estudo foi realizado no Centro de Pesquisas. Unidade de Experimentação Animal, do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e seus resultados avaliados no Serviço de Patologia deste hospital.

## DELINEAMENTO

Estudo experimental, cego, randomizado e controlado.

## VARIÁVEIS ESTUDADAS

Peso

Comprimento retalhos

Largura retalhos

Percentual de necrose sob visualização direta

Percentual de necrose sob visualização anátomo-patológica

Percentual de área necrótica sob medição digital

Mortalidade

## MATERIAIS E MÉTODOS

Foram selecionados 45 ratos Wistar, machos, com cerca de 60 dias de vida, peso médio de 299,5g (248g-356g) (figura 1) mantidos em isolamento padrão de 15 dias. Passado este período foram randomicamente selecionados em 3 grupos (A, B, C), quando receberam a primeira dose do tratamento respectivo por gavagem[29], ou seja, administração da solução diretamente ao nível do estômago do animal com uso de seringa e agulha rígida, própria para o procedimento, com controle da dose aplicada, sendo os animais encaminhados então para o procedimento cirúrgico. Foram anestesiados com ketamina e xilazina intraperitoneal, imobilizados em decúbito ventral e submetidos a tricotomia na zona dorsal do tronco. Posteriormente, o cirurgião, cegado, desenhava os limites do retalho cutâneo de base proximal. Em seguida foi aplicada anestesia local com bupivacaína 0,5 mg/ml circunferencialmente fora da zona de cirurgia, como forma de analgesia. Foi elevado então um retalho com dissecação cuidadosa, técnica estéril, promovendo elevação completa do retalho em 3 lados de 10 x 2 cm, mantendo base proximal (cefálica) junto ao ângulo inferior das escápulas, no plano formado por tecido areolar frouxo entre a fáscia profunda muscular e a camada superficial *panicullus carnosus*, conforme descrito no modelo proposto por McFarlane[24](FIG.2A-2C). Uma vez reposicionado em seu leito, o retalho foi então suturado com mononylon 3.0 por pontos individualizados e o rato encaminhado para uma caixa individual com alimentação ad libitum e controle de iluminação e temperatura. Os animais já divididos eram mantidos isolados para evitar lesões por canibalismo ou atividades de sociabilização normais entre eles.

As doses subseqüentes dos medicamentos também foram administradas por gavagem.



Sildenafil foi obtido através de apresentação comercial de nome Viagra (Labs. Pfizer Ltda) ; Tadalafil através de apresentação comercial de nome Ciális (Eli Lilly do Brasil Ltda).

O preparo das doses foi feito no momento da aplicação. O medicamento era triturado com auxílio de um pilão e uma cuba de cerâmica, próprias para o procedimento, diluído em água destilada em proporção que permitisse o fracionamento e a aplicação de aproximadamente 1 ml de solução para cada animal, conforme o peso. Feita a diluição, a solução era misturada para evitar sedimentação do medicamento e aspirada em seringas para serem administradas pelo método de gavage, supracitado.

Para o grupo A, a diluição de sildenafil 10 mg/kg/dose diluído em água destilada era aplicada na forma de 1 ml de solução de 12/12h. Para o grupo B, a diluição de tadalafil 10mg/kg diluído em água destilada era aplicada na forma de 1 ml de solução pela manhã e água destilada 1 ml 12 horas após. Para o grupo C (grupo controle) foi aplicado água destilada, 1 ml, de 12/12h. Deste modo, todos os animais de experimento receberam a dose de 1 ml de suas respectiva solução a cada 12 horas, pelo método de gavage, por 7 dias.

Completados 7 dias de evolução pós-operatória, os ratos foram sacrificados em câmara de CO<sub>2</sub> e os retalhos imediatamente retirados e medidos quanto a largura, comprimento e distância da base do retalho até o início da necrose (figura 3A-C). Em seguida, foram fotografados. As imagens digitalizadas foram submetidas a avaliação computadorizada com auxílio do programa AutoCad 2008 (*versão B.51.0*) para medição de área, com o que se obteve a medição da proporção constituída pela área necrótica de cada peça em relação a sua área total (proporção). As peças foram então armazenadas em solução de formol tamponado para subsequente avaliação anatomopatológica por

meio de coloração de hematoxilina-eosina. O exame microscópico foi realizado em amostras retiradas da secção longitudinal de cada retalho a partir da linha média, com o que se mediu o ponto em que iniciava-se a necrose a partir da base dos retalhos.

## RESULTADOS

Ao final do dia 7, quando houve o sacrifício dos animais, a zona de necrose já estava delimitada. Todos os animais sobreviveram ao uso dos fármacos ao longo de sete dias. A medida da largura, do comprimento e da necrose das peças sob visualização direta, no momento da retirada das mesmas, apresentou os seguintes resultados (tabela 1): comprimento médio 10,4 (9,3-16) cm, largura média 1,7 (1,1-2,0) cm, necrose média de 4,4 (0-10) cm. Quando estratificado por grupos, a necrose média distribuiu-se assim (tabela 2): grupo A 4,4 (0-9,3) cm, grupo B 4,9 (2,3-1) cm, grupo C 4,0 (0-7,3) cm (figura 4). As peças foram então fotografadas para posterior análise e armazenadas em formol, submetidas ao exame anatomopatológico com subsequente medição da necrose por este método, sendo achados os seguintes resultados (tabela 3): necrose média 4,0 (0-7,4), necrose média no grupo A 4,3 (0-6,0) cm, necrose média no grupo B 4,6 (2,7-7,4), necrose média no grupo C 3,3 (0-5,7) (Figura 5). Foi realizada análise controlando os resultados de necrose medida sob visualização direta pelo peso e tamanho das peças quanto ao comprimento e a largura e também foi realizada análise controlando os resultados de necrose sob medição microscópica pelo peso e tamanho das peças quanto ao comprimento e a largura. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos em nenhuma das medidas, ( $p>0,05$ ).

As imagens fotografadas foram encaminhadas para análise com auxílio do programa AutoCAD (versão b.51.0), com o que foi medida a relação entre a área necrótica e a área total para cada um dos retalhos. Os resultados encontrados foram (tabela 4): Necrose percentual média 40,4 % (0-69%), necrose percentual média grupo A 46,5 % (0-65%), necrose percentual média grupo B 40,4% (22-69%), necrose percentual média grupo C 34,4 % (0-54%) (Figura 6).

Os resultados obtidos para as variáveis proporção de necrose na linha média sob visualização direta, linha média ao exame microscópico e áreas necrótica/área total nas imagens digitalizadas foram então submetidos ao controle estatístico para o peso de cada rato, com o que não houve alteração significativa, ou seja, permaneceu sem encontrar diferença com significância estatística entre os grupos.

## DISCUSSÃO

Embora a pesquisa de tratamentos visando o controle da necrose tecidual tenha percorrido um longo caminho, ainda há muitas perguntas sem resposta. A análise dos resultados encontrados nesta pesquisa remete a inúmeros questionamentos, que vão desde a escolha do melhor método até a interpretação dos achados na literatura para responder a pergunta mote deste trabalho – os inibidores da fosfodiesterase V são benéficos para diminuir a necrose tecidual cutânea?

A fundamentação teórica é consistente. Sildenafil e tadalafil são potentes inibidores da fosfodiesterase V (PDE V) e, por esse efeito, explicam-se os principais achados de sua ação. Óxido nítrico ativa a enzima guanilato ciclase e subsequentemente forma guanidina monofosfato cíclico (GMPc), que por sua vez promove relaxamento da musculatura lisa e vasodilatação secundária. A enzima fosfodiesterase V promove desativação do GMPc, diminuindo assim a ação do óxido nítrico. Neste ponto entra o efeito dos inibidores da fosfodiesterase V, bloqueando a desativação do GMPc e aumentando a ação do óxido nítrico para vasodilatação. A PVE V também atua sobre agregação plaquetária, sugerindo que sildenafil e tadalafil possam diminuí-la. Estes efeitos, em teoria, podem colaborar na sobrevivência de retalhos cutâneos em sofrimento.

Nos trabalhos publicados na literatura indexada há tendência demonstrando efeito positivo dos inibidores da fosfodiesterase V em diminuir a necrose tecidual em ratos [22, 23, 25-27]. Como regra, a análise dos resultados foi feita com as peças no sétimo dia de lesão, com o que se acharia uma delimitação adequada da área necrótica. Em um dos trabalhos[27], entretanto, foi feita análise seqüencial dos retalhos, nos dias 1, 3, 5 e 7. Este trabalho deixou claro um efeito de menor impacto no sétimo dia de

avaliação, sugerindo melhora inicial que poderia não ser sustentada a longo prazo ou, por outro lado, que poderia ser melhorada agregando algum fator que favorecesse a angiogênese. O mesmo grupo de pesquisa testou em seguida a associação com fator de crescimento vascular endotelial, sem notar melhora satisfatória relacionada ao uso deste[28].

Outro detalhe que chama a atenção é a boa resposta com o modelo de McFarlane [24] em todos os trabalhos publicados sobre sildenafil e tadalafil. Na literatura há muitas discussões envolvendo este modelo[24, 30-37]. As principais dificuldades com seu uso são a localização de pontos fixos para marcar os limites dos retalhos, controle da vascularização axial (e não randômica) pela entrada de vasos tanto caudal como cefalicamente (McFarlane ou McFarlane reverso) e nutrição do retalho por capilarização, como se fora um enxerto de pele. Por tais motivos há uma constante busca por novos modelos mais regulares, consistentes e, portanto, confiáveis. Os trabalhos sobre sildenafil e tadalafil que usaram este modelo, entretanto, apresentaram retalhos com resultados confiáveis; tanto nos grupos experimento como nos grupos controle, houve pequena variação intragrupos ( $< 5\%$ ) e diferenças puderam ser encontradas, ou seja, mesmo que o benefício obtido pelo uso do fármaco seja eventualmente pequeno, a consistência do método permitiu que fosse demonstrada diferença estatística entre os grupos.

Em nossa pesquisa este achado, entretanto, não se repetiu. Embora tenha havido uma tendência em favor do tratamento (necrose percentual tadalafil  $<$  necrose percentual sildenafil  $<$  necrose percentual controle) naquele que foi nosso principal método de aferição dos resultados (medição da área necrótica), não foi encontrada diferença estatística entre os grupos. Nos resultados obtidos a partir de medição anatomopatológica (necrose tadalafil  $<$  necrose controle  $<$  necrose sildenafil) também

não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, sendo os resultados obtidos com uso de sildenafil ainda inferiores os obtidos no próprio grupo controle.

Em nossa opinião, estes achados podem ser explicados principalmente por dois fatores. Em primeiro lugar, devemos considerar o tamanho do efeito provocado pela medicação. Na medida em que se procura alternativas para tratar um problema clínico (necrose tecidual) por vezes podem ser achados métodos que tragam algum benefício, mas não com o tamanho de ação desejado. Assim, devemos levar em consideração que não é importante apenas a existência do efeito benéfico, mas também o seu tamanho, para que seus eventuais riscos sejam justificados no uso. Em segundo lugar, deve-se ter em mente que muitas vezes trabalhos bem elaborados mas sem resultados positivos não alcançam publicação em revista indexada, o que nos remete ao viés de publicação.

No que se refere ao modelo de retalho cutâneo proposto por McFarlane para pesquisa experimental em ratos, entendemos que o mesmo não se mostrou confiável neste estudo, uma vez que encontramos grande variabilidade no percentual de necrose cutânea entre animais de um mesmo grupo, de modo que devemos também caminhar na busca por um modelo reprodutível e confiável para aplicar nas pesquisas em nosso meio.

Como consequência, a busca por uma alternativa terapêutica visando melhora dos resultados de necrose cutânea deve seguir, ficando como caminhos a busca por um modelo mais confiável para pesquisa animal e a pesquisa de novas alternativas, seguras, confiáveis e eficazes, para o tratamento da necrose cutânea.

## CONCLUSÃO

Este estudo não demonstrou haver benefício com o uso de sildenafil ou tadalafil no que se refere a prevenção de necrose em retalhos cutâneos em ratos. Este resultado pode dever-se a real inexistência de benefício por parte das drogas testadas ou por um efeito pequeno, não capaz de ser demonstrado com o poder deste trabalho. Deste modo, entendemos que deve-se prosseguir com a pesquisa nesta linha, buscando alternativas seguras e eficazes para a prevenção e o tratamento da necrose cutânea.



## REFERENCIAS

1. Adamson, J.E., et al., *The effects of dimethyl sulfoxide on the experimental pedicle flap: a preliminary report*. *Plast Reconstr Surg*, 1966. **37**(2): p. 105-10.
2. Barisoni, D.M. and N. Veall, *Effect of thymoxamine on circulation in skin flaps and in denervated skin*. *Lancet*, 1969. **1**(7591): p. 400-1.
3. Finseth, F., *Clinical salvage of three failing skin flaps by treatment with a vasodilator drug*. *Plast Reconstr Surg*, 1979. **63**(3): p. 304-8.
4. Kerrigan, C.L. and R.K. Daniel, *Pharmacologic treatment of the failing skin flap*. *Plast Reconstr Surg*, 1982. **70**(5): p. 541-9.
5. Miyawaki, T., et al., *The effect of low-molecular-weight heparin in the survival of a rabbit congested skin flap*. *Plast Reconstr Surg*, 2002. **109**(6): p. 1994-9.
6. Shalom, A., T. Friedman, and M. Westreich, *Effect of aspirin and heparin on random skin flap survival in rats*. *Dermatol Surg*, 2008. **34**(6): p. 785-90; discussion 790.
7. Wray, R.C., Jr. and V.L. Young, *Drug treatment and flap survival*. *Plast Reconstr Surg*, 1984. **73**(6): p. 939-42.
8. Scholz, T. and G.R. Evans, *Impact of hypertonic and hyperoncotic saline solutions on ischemia-reperfusion injury in free flaps*. *Plast Reconstr Surg*, 2008. **122**(1): p. 85-94.
9. Ergun, H., et al., *The effect of dipyron on survival of skin flaps*. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*, 2001. **35**(1): p. 19-22.
10. Shalom, A., T. Friedman, and M. Westreich, *The effect of postoperative aspirin on random pattern flaps in rats*. *Am Surg*, 2007. **73**(11): p. 1126-8.
11. Kargi, E., et al., *Dual synergistic effect: the effect of dexamethasone plus carnitine on skin flap survival*. *Ann Plast Surg*, 2004. **53**(5): p. 488-91.
12. Esclamado, R.M., W.F. Larrabee, Jr., and G.E. Zel, *Efficacy of steroids and hyperbaric oxygen on survival of dorsal skin flaps in rats*. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 1990. **102**(1): p. 41-4.
13. Kindwall, E.P., L.J. Gottlieb, and D.L. Larson, *Hyperbaric oxygen therapy in plastic surgery: a review article*. *Plast Reconstr Surg*, 1991. **88**(5): p. 898-908.
14. Ulkur, E., et al., *The effect of hyperbaric oxygen therapy on the delay procedure*. *Plast Reconstr Surg*, 2007. **119**(1): p. 86-94.
15. Davis, R.E., et al., *Comparison of topical anti-ischemic agents in the salvage of failing random-pattern skin flaps in rats*. *Arch Facial Plast Surg*, 1999. **1**(1): p. 27-32.
16. Nichter, L.S., M.W. Sobieski, and M.T. Edgerton, *Efficacy of topical nitroglycerin for random-pattern skin-flap salvage*. *Plast Reconstr Surg*, 1985. **75**(6): p. 847-52.
17. Rohrich, R.J., G.W. Cherry, and M. Spira, *Enhancement of skin-flap survival using nitroglycerin ointment*. *Plast Reconstr Surg*, 1984. **73**(6): p. 943-8.
18. Um, S.C., et al., *Involvement of nitric oxide in survival of random pattern skin flap*. *Plast Reconstr Surg*, 1998. **101**(3): p. 785-92.
19. Conti, C.R., C.J. Pepine, and M. Sweeney, *Efficacy and safety of sildenafil citrate in the treatment of erectile dysfunction in patients with ischemic heart disease*. *Am J Cardiol*, 1999. **83**(5A): p. 29C-34C.
20. Ghofrani, H.A., et al., *Differences in hemodynamic and oxygenation responses to three different phosphodiesterase-5 inhibitors in patients with pulmonary*

- arterial hypertension: a randomized prospective study.* J Am Coll Cardiol, 2004. **44**(7): p. 1488-96.
21. Wallis, R.M., et al., *Tissue distribution of phosphodiesterase families and the effects of sildenafil on tissue cyclic nucleotides, platelet function, and the contractile responses of trabeculae carneae and aortic rings in vitro.* Am J Cardiol, 1999. **83**(5A): p. 3C-12C.
  22. Oh, M., H. Chang, and K.W. Minn, *The effects of tadalafil on axial-pattern skin flap survival in rats.* Dermatol Surg, 2008. **34**(5): p. 626-30; discussion 630.
  23. Sarifakioglu, N., et al., *The influence of sildenafil on random skin flap survival in rats: an experimental study.* Br J Plast Surg, 2004. **57**(8): p. 769-72.
  24. McFarlane, R.M., G. Deyoung, and R.A. Henry, *The Design of a Pedicle Flap in the Rat to Study Necrosis and Its Prevention.* Plast Reconstr Surg, 1965. **35**: p. 177-82.
  25. Ayyildiz, A., et al., *Effect of sildenafil citrate on viability of flaps: an experimental study in rats.* Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg, 2005. **39**(4): p. 204-8.
  26. Ulusoy, M.G., et al., *Improved flap viability with site-specific delivery of sildenafil citrate using fibrin glue.* Ann Plast Surg, 2005. **55**(3): p. 292-6.
  27. Hart, K., et al., *Short- and long-term effects of sildenafil on skin flap survival in rats.* Laryngoscope, 2006. **116**(4): p. 522-8.
  28. Tsai, J.W., et al., *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): p. 624-31.
  29. Ökva, K., *Refinements for Intragastric Gavage in Rats.* Scand. J. Lab. Anim. Sci., 2006. **33**(4): p. 243-252.
  30. Hurn, I.L., et al., *Standardization of the dorsal rat flap model.* Ann Plast Surg, 1983. **11**(3): p. 210-3.
  31. Hammond, D.C., et al., *The dorsal skin-flap model in the rat: factors influencing survival.* Plast Reconstr Surg, 1993. **91**(2): p. 316-21.
  32. Milton, S.H., *Pedicled skin-flaps: the fallacy of the length: width ratio.* Br J Surg, 1970. **57**(7): p. 502-8.
  33. Hosnuter, M., et al., *An ameliorated skin flap model in rats for experimental research.* J Plast Reconstr Aesthet Surg, 2006. **59**(3): p. 299-303.
  34. Syed, S.A., et al., *A new experimental model: the vascular pedicle cutaneous flap over the dorsal aspect (flank and hip) of the rat.* Br J Plast Surg, 1992. **45**(1): p. 23-5.
  35. Ahmed, S.S., et al., *A new experimental model: the vascular pedicled cutaneous flap over the mid-dorsum of the rat.* Ann Plast Surg, 1997. **39**(5): p. 495-9.
  36. Ozcan, G., S. Shenaq, and M. Spira, *A new flap model in the rat.* Ann Plast Surg, 1991. **27**(4): p. 332-8.
  37. Akyurek, M., et al., *A new flap model in the rat: the pectoral skin flap.* Ann Plast Surg, 1999. **42**(2): p. 185-92.

## ANEXO 1 TABELAS E FIGURAS

Tabela 1 Características dos animais estudados e das peças (retalhos cutâneos) em cada um dos métodos de aferição dos resultados

Animal	Grupo	Peso (gramas)	Comprimento dos retalhos (milímetros)	Largura dos retalhos (milímetros)	Necrose dos retalhos sob visão direta (milímetros)	Percentual de Necrose nos retalhos (%)	Necrose sob exame anátomo-patológico (milímetros)	Percentual de Necrose sob exame anátomo-patológico (%)	Percentual de Necrose sob medição das imagens digitalizadas (%)
1	C	318	95	20	38	40	32	35	38
2	B	294	120	20	51	43	37	39	28
3	A	299	99	20	23	23	45	48	22
4	C	307	94	19	53	56	54	59	61
5	B	306	98	19	42	43	27	30	45
6	A	298	96	18	33	34	44	49	36
7	C	312	100	20	33	33	60	64	37
8	B	298	100	17	44	44	35	36	39
9	A	317	100	19	34	34	34	38	29
10	C	289	96	18	57	59	54	61	56
11	B	273	98	17	48	49	43	48	42
12	A	287	97	20	45	46	49	54	32
13	C	248	100	18	9	9	39	39	31
14	B	277	97	18	31	32	28	30	41
15	A	298	100	19	39	39	60	67	44
16	C	285	93	19	16	17	59	63	62
17	B	266	100	17	38	38	7	7	34
18	A	283	120	16	70	58	27	29	51
19	C	302	140	12	93	66	56	57	58
20	B	356	95	16	45	47	38	40	39
21	A	328	96	17	54	56	74	76	55
22	C	301	97	17	93	96	48	54	60
23	B	316	94	17	49	52	21	23	41
24	A	344	100	17	32	32	30	31	36
25	C	307	95	19	52	55	60	64	65
26	B	309	100	17	33	33	30	33	41
27	A	317	120	18	70	58	52	60	47
28	C	307	100	20	90	90	0	0	0
29	B	306	106	16	51	48	40	41	43
30	A	291	96	15	28	29	56	64	24
31	C	301	100	11	24	24	19	20	48
32	B	269	100	19	26	26	57	65	0
33	A	292	105	12	30	29	48	48	44
34	C	270	99	16	0	0	39	44	52
35	B	284	95	18	30	32	39	41	30
36	A	278	160	19	99	62	34	37	40
37	C	299	97	17	60	62	29	33	60
38	B	289	100	16	50	50	49	54	41
39	A	316	100	18	36	36	43	47	38
40	C	279	94	18	0	0	44	65	23
41	B	411	130	18	73	56	51	53	54
42	A	277	160	17	109	68	62	67	69
43	C	322	110	18	50	45	46	50	46
44	B	324	100	20	0	0	0	0	0
45	A	334	100	20	30	30	33	39	40
Média		301,9	104,3	17,6	44,7	41,8	41	44,6	40,4
Mínimo-máximo		248-411	93-160	11-20	0-109	0-95,9	0-74	0-76,3	0-69

Tabela 2: Distribuição dos resultados de necrose medida por visualização direta entre os grupos (p=0,69)

grupo	Número de animais	Média (milímetros)	Mínimo-máximo (milímetros)	Erro padrão	Desvio padrão	Intervalo de confiança
A	15	48,8	23-109	6,9	26,6	34,1-63,5
B	15	40,7	0-73	4,1	16,1	31,8-49,7
C	15	44,5	0-93	8,2	31,6	27,0-62,0

Tabela 3: Distribuição dos resultados de necrose medida por anátomo-patologia entre os grupos (p=0,079)

grupo	Número de animais	Média (milímetros)	Mínimo-máximo (milímetros)	Erro padrão	Desvio padrão	Intervalo de confiança
A	15	46,1	27-74	3,4	13,3	38,7-53,4
B	15	33,5	0-57	4,0	15,5	24,9-42,0
C	15	42,6	0-6	4,4	17,0	33,2-52,0

Tabela 4: Distribuição dos resultados do percentual de área necrótica/área total (p=0,10)

grupo	Número de animais	Média (milímetros)	Mínimo-máximo (milímetros)	Erro padrão	Desvio padrão	Intervalo de confiança
A	15	40,4	22-69	3,1	12,1	33,7-47,0
B	15	34,5	0-54	3,9	15,2	26,0-42,9
C	15	46,5	0-65	4,6	17,9	36,6-56,4



Figura 2A. Rato anestesiado, com marcação baseada em template a partir do ângulo inferior das escápulas, 10 x 2 cm.

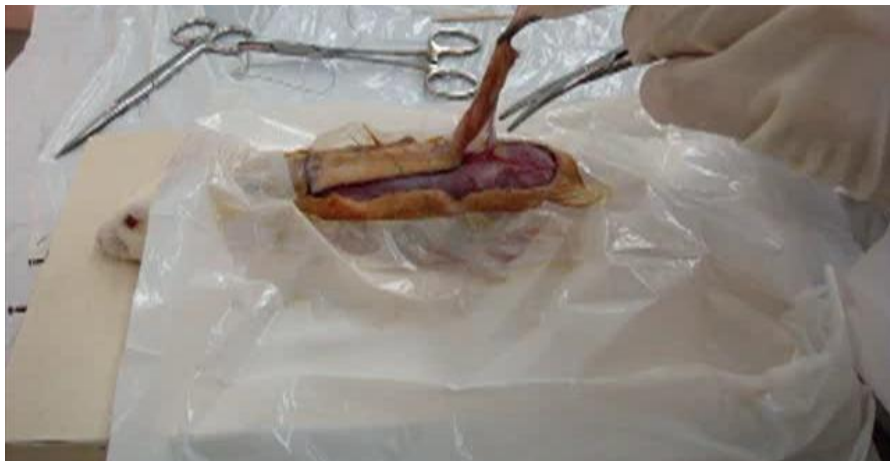


Figura 2B. Retalho em elevação. Base cefálica, dissecado em tecido areolar frouxo, superficialmente a fáscia muscular e profundamente ao *Panicullus carnosus*.



Figura 2C. Retalho elevado, será suturado novamente ao seu leito com mononylon 3.0

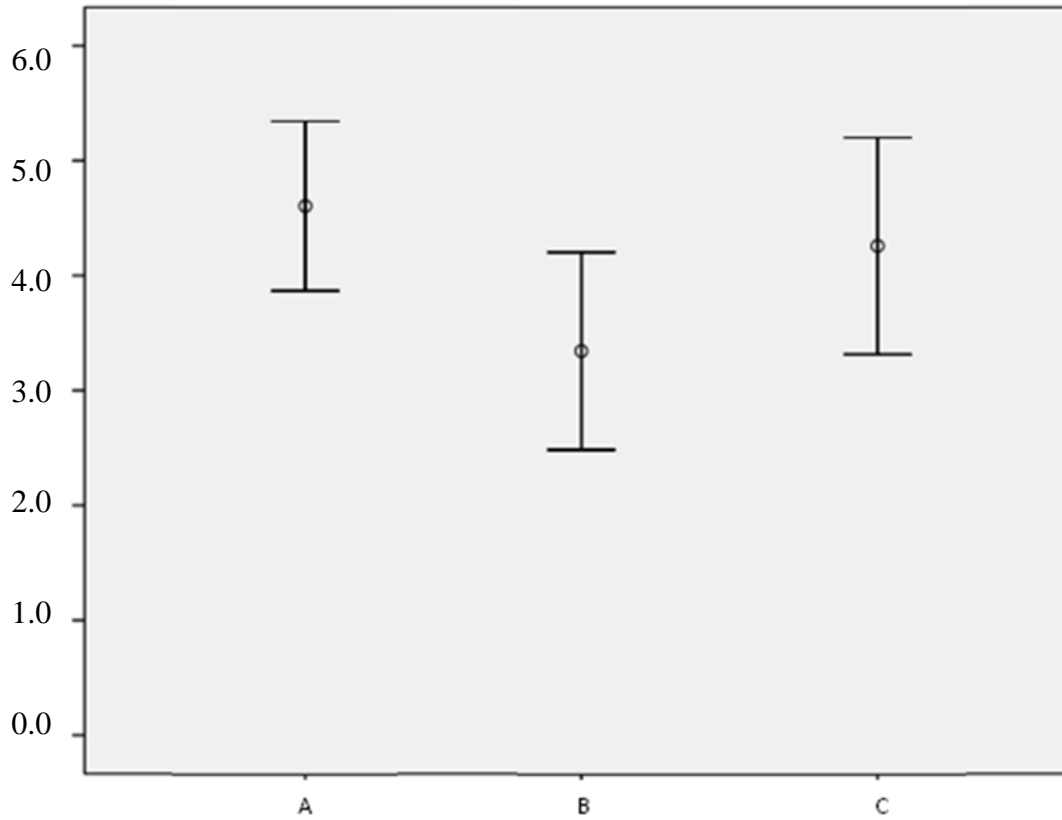


Figura 5: gráfico representando o intervalo de confiança de necrose (em centímetros) para os resultados obtidos pelo exame de microscopia (anátomo-patológico)



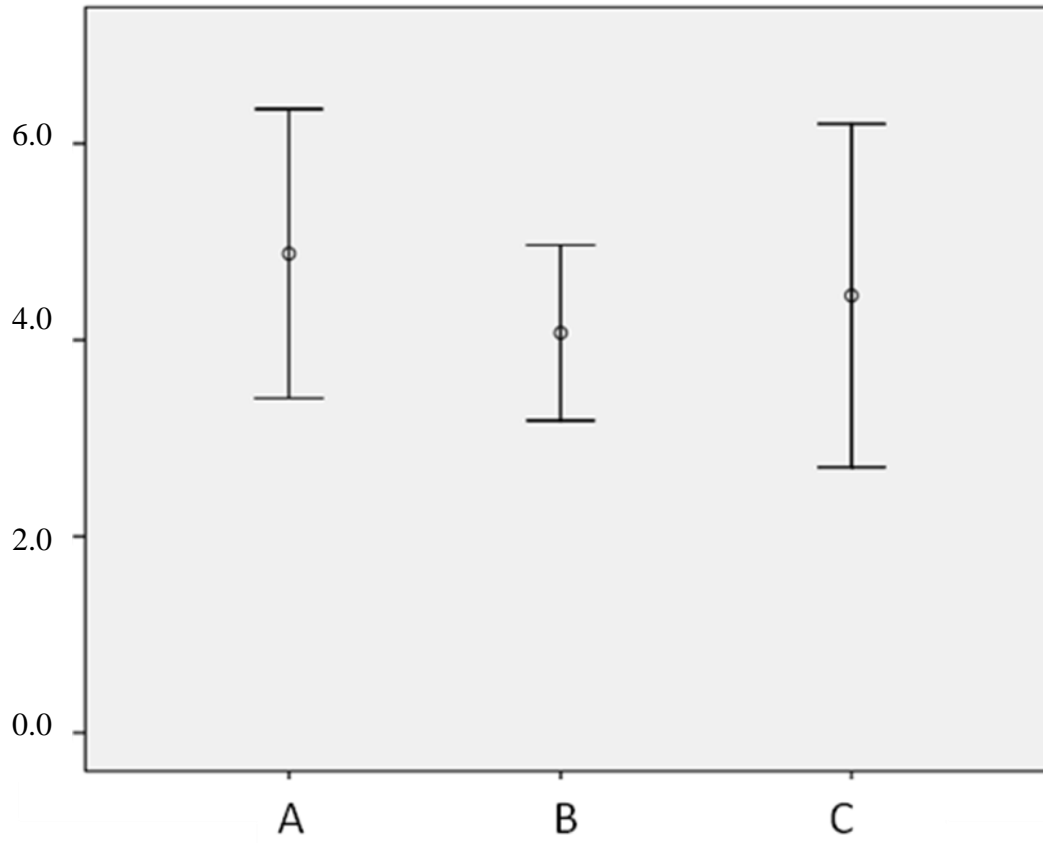


Figura 4: gráfico representando o intervalo de confiança de necrose (em centímetros) para os resultados obtidos pela medição por visualização direta

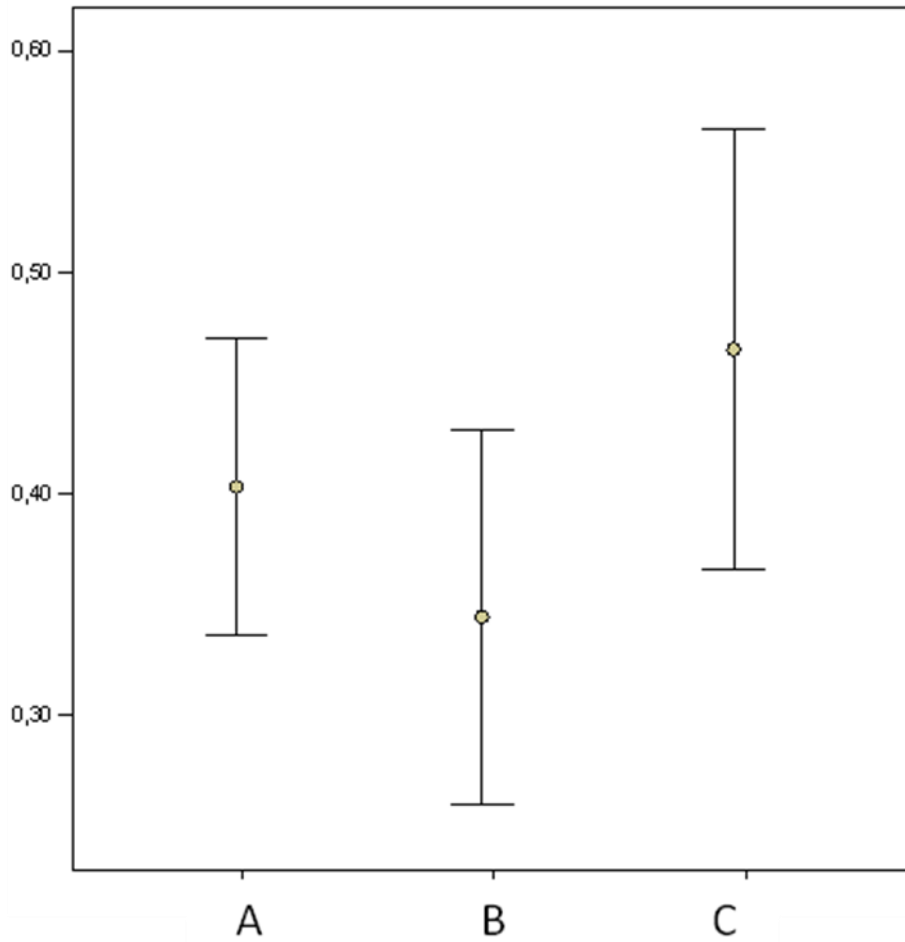


Figura 6: gráfico representando o intervalo de confiança para percentual de área necrótica (relação área necrótica/área total) para os resultados obtidos pela medição das imagens digitalizadas.

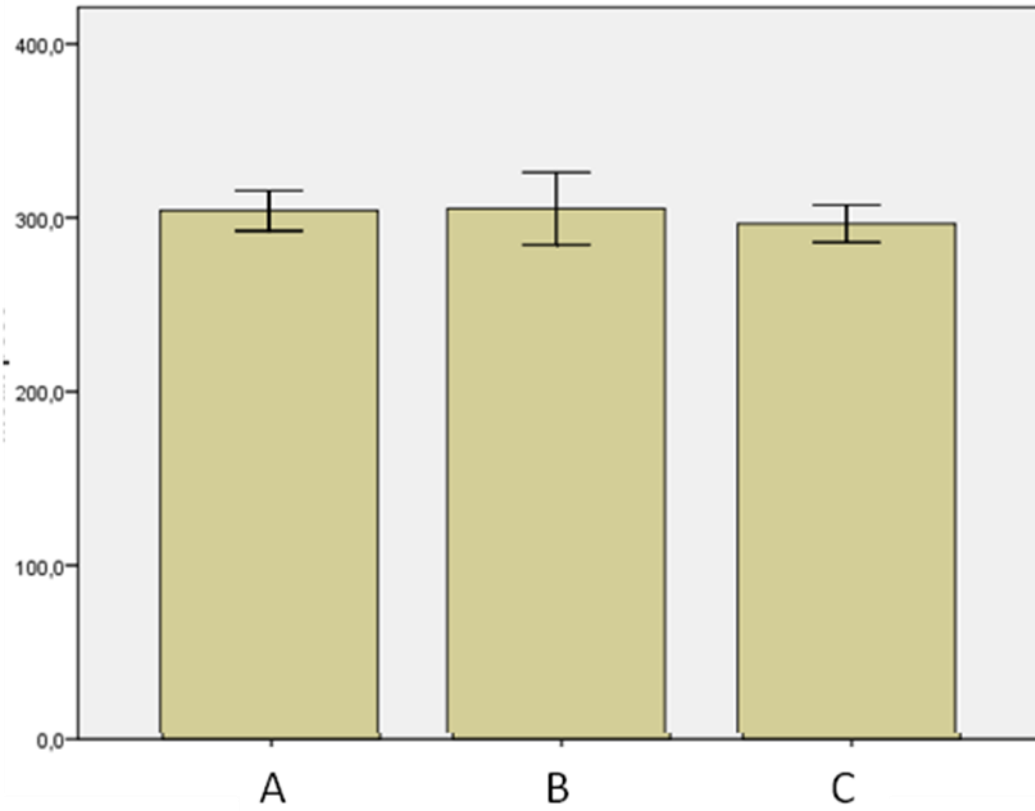


Figura 1: gráfico de barras usado para apresentar o peso médio (gramas) dos ratos em cada grupo com o respectivo intervalo de confiança



Figura 3A: Rato após o sacrifício, antes da retirada do retalho. A base do retalho é cranial, onde vê-se coloração rosada. No ápice, coloração escurecida, sugestivo de necrose.



Figura 3B: Retalho já retirada do animal, foi medido quanto a largura, comprimento e necrose na linha média, sendo posteriormente fotografado e armazenado em formol tamponado. Base a direita da imagem, ápice a esquerda.



Figura 3C: amostra de retalho onde não ocorreu necrose; base a direita da imagem, ápice a esquerda.

## ANEXO 2 - ARTIGO

### Artigo científico

Estudo comparativo do efeito de sildenafil e tadalafil na sobrevivência de retalhos cutâneos em ratos

Autores: Carlos Francisco Jungblut, João Luiz Ellera Gomes.

Co-autores: Thiago Farias Bujes, Jane Maria Ulbrich Kulczynski.

### RESUMO

Para pesquisar se há efeito benéfico dos fármacos sildenafil e tadalafil sobre retalhos cutâneos isquêmicos, foram operados 45 ratos Wistar submetidos a procedimento cirúrgico de retalho cutâneo dorsal medindo 10 x 2 cm, de base cefálica, conforme proposto por McFarlane, e divididos em 3 grupos de 15 que receberam por 7 dias os tratamentos por gavagem (administração por sondagem intra-gástrica). Para os ratos do grupo A foi administrado sildenafil 10 mg/kg/dose diluído em água destilada, formando 1 ml de solução, 12/12h; no grupo B foi administrado tadalafil 10 mg/kg/dose – solução de 1 ml - 1x dia, seguido por 1 ml de água destilada 12h após; no grupo C (grupo controle) foi administrado água destilada 1 ml 12/12h. Os animais foram então sacrificados em câmara de CO<sub>2</sub> e as peças submetidas a análise. Resultados: No momento da retirada das peças, sob medição direta na linha média, o percentual médio de necrose foi 41,8% (0-95,9%), sendo no grupo A 42,3% (23,2-68,1%), no grupo B 39,5% (0-56,1%) e no grupo C 43,5% (0-95,9%) (p=0,861); Na medição da linha média por anátomo-patologia, a necrose percentual média foi 44,6% (0-76%), sendo no grupo A 50,4% (29,3-76,3%), no grupo B 36,1% (0-64,8%) e no grupo C 47,3% (0-64,7%)



( $p=0,06$ ). Os resultados foram então avaliados pela medição do percentual de área necrótica sobre área total das peças em imagens digitalizadas. O percentual de necrose médio foi 40,4% (0-69%), no grupo A 40,4% (22-69%), no grupo B 43,4% (0-54%) e no grupo C 46,5% (0-65%) ( $p=0,10$ ). Os resultados não demonstraram diferença entre os grupos ( $p>0,05$ ). Conclusão: Não ficou evidenciado efeito dos fármacos sildenafil e tadalafil em diminuir a necrose cutânea no modelo proposto.

#### ABSTRACT

Aiming at the detection of beneficial effects of sildenafil or tadalafil on protecting ischemic flaps, 45 Wistar rats were subjected to a McFarlane cephalic based flap designed on the dorsum of each rat (10 x 2 cm). Rats were divided into 3 groups of 15 rats each. Group A received 10 mg/kg/dose of sildenafil, 12/12h; group B received 10 mg/kg/dose of tadalafil in the morning and 1 ml of water in the evening (12 hours afterwards); group C (control group) received 1 ml of water, 12/12 h. Drug administration was made by gavage (intra gastric), over a seven day period. After that, rats were sacrificed in a CO<sub>2</sub> chamber and flaps were taken for posterior analysis. Results: midline necrosis percent under direct view were: mean 41.8% (0-95.9%), group A 42.3% (23.2-68.1%), group B 39.5% (0-56.1%), group C 43.5% (0-95.9%) ( $p=0,861$ ); In the anatomic-pathological results, the mean percent necrosis was 44.6% (0-76%), and for group A 50.4% (29.3-76.3%), group B 36.1% (0-64.8%), group C 47.3% (0-64.7%) ( $p=0,06$ ). Digital images of the flaps were analyzed by the ratio necrotic area/total area. Mean necrotic percentile was 40.4% (0-69%), and for group A 40.4% (22-69%), group B 43.4% (0-54%), group C 46.5% (0-65%) ( $p=0.10$ ). Results didn't show consistent difference among groups. Conclusion: The use of enteral



sildenafil or tadalafil was not effective in the treatment of ischemic flap in the current investigation.

## INTRODUÇÃO

Lesões cutâneas são causa freqüente de indicação cirúrgica no atendimento do paciente traumatizado, podendo estar associadas a lesões complexas, como fratura exposta e lesões de partes moles.

Para os casos em que as perdas cutâneas são muito grandes para um fechamento primário, em que há exposição de estruturas nobres ou quando as características da região não permitem o uso de enxerto de pele, exigindo uma cobertura de melhor qualidade, pode-se optar pela técnica cirúrgica de retalho cutâneo para cobertura. O retalho recebe nutrição de seu pedículo, axial ou randômico, peninsular ou em ilha. Como ponto comum, tem-se a preocupação com a vascularização do retalho, especialmente no que se refere aos pontos mais distantes do seu pedículo. Para isso, são controlados diversos fatores, como os relacionados com a execução da técnica cirúrgica, evitando dano tecidual ao retalho ou seu pedículo e a formação de hematoma sob o mesmo, além dos cuidados locais no pós-operatório.

Apesar dos cuidados, pode ocorrer sofrimento vascular e conseqüente perda parcial ou completa do retalho. Para estas situações, inúmeras tentativas já foram feitas visando obter diminuição do risco de necrose, com uma gama variada de medicamentos (anticoagulantes, vasodilatadores, simpaticolíticos,...), câmara hiperbária, ondas de choque - mas com uso clínico de resultados duvidosos. Deste modo, o conhecimento e a

pesquisa de novo arsenal terapêutico nesta linha encontram caminho para uso clínico e ampla aplicabilidade em cirurgia reconstrutiva.

## REVISÃO DA LITERATURA

### Tratamento do retalho isquêmico

As complicações relacionadas a necrose de retalhos cutâneos têm motivado inúmeras pesquisas para tratamento destas condições. O tratamento cutâneo com Dimethylsulfoxide foi aplicado por Adamnson[1] na década de 60, sugerindo melhora clínica com seu uso. Barisoni[2] apresentou em 1969 resultados com uso de thymoxamine, um bloqueador alfa-adrenergico, avaliando a vascularização de retalhos e, em 1979, Finseth[3] mostrou seus resultados com uso de isoxsuprine, um vasodilatador. Com o crescimento da pesquisa nesta área, ganhou espaço uma gama variada de investigações experimentais, principalmente em ratos, coelhos e suínos, testando o uso de diversas classes de medicamentos. Simpaticolíticos foram estudados com objetivo de melhora da circulação sanguínea em retalhos, destacando-se a pesquisa de phenoxybenzamine, propranolol, reserpina e guanethidine[4]. Quanto as drogas que alteram a capacidade de coagulação, destacam-se heparina[5-7] e pentoxifilline que, assim como depleção protéica e anemia [4]provocadas em animais de laboratório, ratos e coelhos, respectivamente, apresentaram melhora na perfusão de retalhos. Dextran[4, 8], que atua como expansor e antiagregante plaquetário, tem encontrado aplicação na prática clínica em alguns protocolos. Alterar a viscosidade sanguínea parece melhorar a perfusão em retalhos, embora provocar anemia e depleção protéica não pareçam tornar-

se consistentes como forma de tratamento. Dipirona e ácido acetil salicílico têm resultados positivos em alguns estudos[6, 9, 10], embora sem comprovação clínica em humanos. Corticoterapia[11] também foi aplicada como forma de aumentar a tolerabilidade do retalho à isquemia, com resultados duvidosos. Uso de terapia hiperbárica tem apresentado resultados positivos[12-14], mas ainda não é um método de fácil acesso na prática clínica. O uso de vasodilatadores também já foi pesquisado. Com resultados variados, os nitratos, assim como dimethylsulfoxide, histamina, hidralazina e isoxsuprine não têm aplicação usual na prática clínica[4, 15-18]. As pesquisas são variadas, incluem muitas substâncias em testes e não seguem os mesmos parâmetros. Torna-se muito difícil separar deste grupo aquelas substâncias que podem realmente ser desenvolvidas para aplicação clínica.

#### Inibidores fosfodiesterase 5

Estudos recentes têm apontado como nova linha de pesquisa o uso de inibidores da fosfodiesterase (PDE) para melhorar a perfusão sanguínea em zonas com sofrimento vascular, reduzindo o efeito deletério da vasoconstrição local, o que teria aplicação direta para cirurgias de retalhos cutâneos. Inibidores da fosfodiesterase desempenham um importante papel na regulação de muitas funções fisiológicas, incluindo agregação plaquetária, relaxamento da musculatura lisa, homeostasia, resposta imune e contratilidade cardíaca e, ao que indicam as pesquisas[19-21], com segurança de uso. Entre as PDE, a Fosfodiesterase 5 (PDE 5) é altamente específica para guadenosina monofosfato cíclico (cGMP) e é particularmente abundante na musculatura lisa, incluindo a do sistema vascular. Quando o óxido nítrico é liberado das células endoteliais, ele se difunde nas células da musculatura lisa cobrindo a microvasculatura. Ele então se liga a enzima guanilato ciclase (GC), resultando em sua ativação e subsequente formação de cGMP, que por sua vez promove fosforilação da proteína

contrátil miosina do músculo liso, levando ao relaxamento da miosina e dilatação do vaso sanguíneo. Inibidores da PDE 5 impedem a desfosforilação da miosina, assim permitindo que este mecanismo de vasodilatação dure mais tempo. O óxido nítrico induz vasodilatação, inibe agregação plaquetária, promove angiogênese e se mostrou efetivo na sobrevivência de retalhos em pesquisas com animais[18]. Sua aplicação clínica, entretanto, ficou comprometida em função de seus efeitos hipotensivos. Os inibidores da PDE 5 são altamente específicos para suas células alvo, de modo que produziram menos efeitos sistêmicos mas obtendo resultados satisfatórios no que se refere a melhoria do fluxo sanguíneo no retalho[21-28].

Neste estudo procuramos demonstrar os efeitos dos medicamentos usados na prática clínica com efeito de ação por inibição da fosfodiesterase 5, sildenafil e tadalafil, comparando seus resultados entre si e com um grupo controle. Sildenafil, o mais antigo destes fármacos, já com ampla experiência de uso para tratamento de disfunção erétil, foi motivo de outras pesquisas na área[23-28], com resultados que apontam favoravelmente para sua aplicação na salvação e viabilidade de retalhos em sofrimento, de modo que a comparação com grupo placebo procura fornecer validade aos resultados e comparar o resultado de pesquisas em outros centros com a nossa realidade. A comparação com tadalafil visou testar este medicamento para este fim, pois conta com maior meia-vida (permitindo maior intervalo entre as doses) e variações na ação sobre a fosfodiesterase, pela maior especificidade pela PDE5[28].

## OBJETIVO

Demonstrar a eficácia de tadalafil e sildenafil em diminuir necrose tecidual em tecido isquêmico de retalhos cutâneos em ratos.

## ASPECTOS ÉTICOS:

A realização deste estudo foi aprovada junto ao grupo de pesquisa e pós-graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, protocolo 08497. Foram priorizados os cuidados para menor sofrimento dos animais desde sua captação, realização do ato cirúrgico, cuidados pós-operatórios, administração dos medicamentos e sacrifício dos mesmos. Usada apenas a quantidade de animais indicada como suficiente para encontrar a diferença esperada entre os grupos.

Não há conflitos de interesse na realização deste estudo.

## ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizado cálculo do tamanho da amostra baseado nos achados publicados na literatura indexada [19, 23, 24, 26-28] e com auxílio da equipe de estatística do grupo de pesquisa e pós-graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Com os resultados de anatomopatologia disponíveis, os dados foram analisados usando o programa estatístico *SPSS Windows* versão 12.02 (*Statistical Package for Social Sciences*). As variáveis contínuas foram expressas em médias com o respectivo desvio padrão, comparadas com o teste *t Student* e Análise de Variância (ANOVA), considerados significativos achados a partir de significância  $p < 0.05$  e clinicamente relevantes diferenças maiores que 10% entre os grupos.

## LOCAL DE REALIZAÇÃO DO ESTUDO

O estudo foi realizado no Centro de Pesquisas. Unidade de Experimentação Animal, do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e seus resultados avaliados no Serviço de Patologia deste hospital.

#### DELINEAMENTO

Estudo experimental, cego, randomizado e controlado.

#### VARIÁVEIS ESTUDADAS

Peso

Comprimento retalhos

Largura retalhos

Percentual de necrose sob visualização direta

Percentual de necrose sob visualização anátomo-patológica

Percentual de área necrótica sob medição digital

Mortalidade

#### MATERIAIS E MÉTODOS

Foram selecionados 45 ratos Wistar, machos, com cerca de 60 dias de vida, peso médio de 299,5g (248g-356g) (figura 1) mantidos em isolamento padrão de 15

dias. Passado este período foram randomicamente selecionados em 3 grupos (A, B, C), quando receberam a primeira dose do tratamento respectivo por gavage[29], ou seja, administração da solução diretamente ao nível do estômago do animal com uso de seringa e agulha rígida, própria para o procedimento, com controle da dose aplicada, sendo os animais encaminhados então para o procedimento cirúrgico. Foram anestesiados com ketamina e xilazina intraperitoneal, imobilizados em decúbito ventral e submetidos a tricotomia na zona dorsal do tronco. Posteriormente, o cirurgião, cegado, desenhava os limites do retalho cutâneo de base proximal. Em seguida foi aplicada anestesia local com bupivacaína 0,5 mg/ml circunferencialmente fora da zona de cirurgia, como forma de analgesia. Foi elevado então um retalho com dissecação cuidadosa, técnica estéril, promovendo elevação completa do retalho em 3 lados de 10 x 2 cm, mantendo base proximal (cefálica) junto ao ângulo inferior das escápulas, no plano formado por tecido areolar frouxo entre a fáscia profunda muscular e a camada superficial *panicullus carnosus*, conforme descrito no modelo proposto por McFarlane[30](FIG.2A-2C). Uma vez reposicionado em seu leito, o retalho foi então suturado com mononylon 3.0 por pontos individualizados e o rato encaminhado para uma caixa individual com alimentação *ad libitum* e controle de iluminação e temperatura. Os animais já divididos eram mantidos isolados para evitar lesões por canibalismo ou atividades de sociabilização normais entre eles.

As doses subseqüentes dos medicamentos também foram administradas por gavage.

Sildenafil foi obtido através de apresentação comercial de nome Viagra (Labs. Pfizer Ltda) ; Tadalafil através de apresentação comercial de nome Ciális (Eli Lilly do Brasil Ltda).

O preparo das doses foi feito no momento da aplicação. O medicamento era triturado com auxílio de um pilão e uma cuba de cerâmica, próprias para o procedimento, diluído em água destilada em proporção que permitisse o fracionamento e a aplicação de aproximadamente 1 ml de solução para cada animal, conforme o peso. Feita a diluição, a solução era misturada para evitar sedimentação do medicamento e aspirada em seringas para serem administradas pelo método de gavage, supracitado.

Para o grupo A, foi aplicado a diluição de sildenafil 10 mg/kg/dose diluído em água destilada era aplicada na forma de 1 ml de solução de 12/12h. Para o grupo B, a diluição de tadalafil 10mg/kg diluído em água destilada era aplicada na forma de 1 ml de solução pela manhã e água destilada 1 ml 12 horas após. Para o grupo C (grupo controle) foi aplicado água destilada, 1 ml, de 12/12h. Deste modo, todos os animais de experimento receberam a dose de 1 ml de suas respectiva solução a cada 12 horas, pelo método de gavage, por 7 dias.

Completados 7 dias de evolução pós-operatória, os ratos foram sacrificados em câmara de CO<sub>2</sub> e os retalhos imediatamente retirados e medidos quanto a largura, comprimento e distância da base do retalho até o início da necrose (figura 3A-C). Em seguida, foram fotografados. As imagens digitalizadas foram submetidas a avaliação computadorizada com auxílio do programa AutoCad 2008 (*versão B.51.0*) para medição de área, com o que se obteve a medição da proporção constituída pela área necrótica de cada peça em relação a sua área total (proporção). As peças foram então armazenadas em solução de formol tamponado para subsequente avaliação anatomopatológica por meio de coloração de hematoxilina-eosina. O exame microscópico foi realizado em amostras retiradas da secção longitudinal de cada retalho a partir da linha média, com o que se mediu o ponto em que iniciava-se a necrose a partir da base dos retalhos.



## RESULTADOS

Ao final do dia 7, quando houve o sacrifício dos animais, a zona de necrose já estava delimitada. Todos os animais sobreviveram ao uso dos fármacos ao longo de sete dias. A medida da largura, do comprimento e da necrose das peças sob visualização direta, no momento da retirada das mesmas, apresentou os seguintes resultados (tabela 1): comprimento médio 10,4 (9,3-16) cm, largura média 1,7 (1,1-2,0) cm, necrose média de 4,4 (0-10) cm. Quando estratificado por grupos, a necrose média distribuiu-se assim (tabela 2): grupo A 4,4 (0-9,3) cm, grupo B 4,9 (2,3-1) cm, grupo C 4,0 (0-7,3) cm (figura 4). As peças foram então fotografadas para posterior análise e armazenadas em formol, submetidas ao exame anatomopatológico com subsequente medição da necrose por este método, sendo achados os seguintes resultados (tabela 3): necrose média 4,0 (0-7,4), necrose média no grupo A 4,3 (0-6,0) cm, necrose média no grupo B 4,6 (2,7-7,4), necrose média no grupo C 3,3 (0-5,7) (Figura 5). Foi realizada análise controlando os resultados de necrose medida sob visualização direta pelo peso e tamanho das peças quanto ao comprimento e a largura e também foi realizada análise controlando os resultados de necrose sob medição microscópica pelo peso e tamanho das peças quanto ao comprimento e a largura. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos em nenhuma das medidas, ( $p>0,05$ ).

As imagens fotografadas foram encaminhadas para análise com auxílio do programa AutoCAD (versão b.51.0), com o que foi medida a relação entre a área necrótica e a área total para cada um dos retalhos. Os resultados encontrados foram (tabela 4): Necrose percentual média 40,4 % (0-69%), necrose percentual média grupo

A 46,5 % (0-65%), necrose percentual média grupo B 40,4% (22-69%), necrose percentual média grupo C 34,4 % (0-54%) (Figura 6).

Os resultados obtidos para as variáveis proporção de necrose na linha média sob visualização direta, linha média ao exame microscópico e áreas necrótica/área total nas imagens digitalizadas foram então submetidos ao controle estatístico para o peso de cada rato, com o que não houve alteração significativa, ou seja, permaneceu sem encontrar diferença com significância estatística entre os grupos.

## DISCUSSÃO

Embora a pesquisa de tratamentos visando o controle da necrose tecidual tenha percorrido um longo caminho, ainda há muitas perguntas sem resposta. A análise dos resultados encontrados nesta pesquisa remete a inúmeros questionamentos, que vão desde a escolha do melhor método até a interpretação dos achados na literatura para responder a pergunta mote deste trabalho – os inibidores da fosfodiesterase V são benéficos para diminuir a necrose tecidual cutânea?

A fundamentação teórica é consistente. Sildenafil e tadalafil são potentes inibidores da fosfodiesterase V (PDE V) e, por esse efeito, explicam-se os principais achados de sua ação. Óxido nítrico ativa a enzima guanilato ciclase e subsequentemente forma guanidina monofosfato cíclico (GMPc), que por sua vez promove relaxamento da musculatura lisa e vasodilatação secundária. A enzima fosfodiesterase V promove desativação do GMPc, diminuindo assim a ação do óxido nítrico. Neste ponto entra o efeito dos inibidores da fosfodiesterase V, bloqueando a desativação do GMPc e aumentando a ação do óxido nítrico para vasodilatação. A PVE V também atua sobre

agregação plaquetária, sugerindo que sildenafil e tadalafil possam diminuí-la. Estes efeitos, em teoria, podem colaborar na sobrevivência de retalhos cutâneos em sofrimento.

Nos trabalhos publicados na literatura indexada há tendência demonstrando efeito positivo dos inibidores da fosfodiesterase V em diminuir a necrose tecidual em ratos [23-26, 28]. Como regra, a análise dos resultados foi feita com as peças no sétimo dia de lesão, com o que se acharia uma delimitação adequada da área necrótica. Em um dos trabalhos[26], entretanto, foi feita análise seqüencial dos retalhos, nos dias 1, 3, 5 e 7. Este trabalho deixou claro um efeito de menor impacto no sétimo dia de avaliação, sugerindo melhora inicial que poderia não ser sustentada a longo prazo ou, por outro lados, que poderia ser melhorada agregando algum fator que favorecesse a angiogênese. O mesmo grupo de pesquisa testou em seguida a associação com fator de crescimento vascular endotelial, sem notar melhora satisfatória relacionada ao uso deste[27].

Outro detalhe que chama a atenção é a boa resposta com o modelo de McFarlane[30] em todos os trabalhos publicados sobre sildenafil e tadalafil. Na literatura há muitas discussões envolvendo este modelo[30-38]. As principais dificuldades com seu uso são a localização de pontos fixos para marcar os limites dos retalhos, controle da vascularização axial (e não randômica) pela entrada de vasos tanto caudal como cefalicamente (McFarlane ou McFarlane reverso) e nutrição do retalho por capilarização, como se fora um enxerto de pele. Por tais motivos há uma constante busca por novos modelos mais regulares, consistentes e, portanto, confiáveis. Os trabalhos que encontramos sobre sildenafil e tadalafil, entretanto, apresentaram retalhos com resultados confiáveis; tanto nos grupos experimento como nos grupos controle, houve pequena variação intragrupos (< 5%) e diferenças puderam ser encontradas, ou seja, mesmo que o benefício obtido pelo uso do fármaco seja eventualmente pequeno, a

consistência do método permitiu que fosse alcançada diferença estatística entre os grupos.

Em nossa pesquisa este achado, entretanto, não se repetiu. Embora tenha havido uma tendência em favor do tratamento (necrose percentual tadalafil < necrose percentual sildenafil < necrose percentual controle) naquele que foi nosso principal método de aferição dos resultados (medição da área necrótica), não foi encontrada diferença estatística entre os grupos. Nos resultados obtidos a partir de medição anatomopatológica (necrose tadalafil < necrose controle < necrose sildenafil) também não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, sendo os resultados obtidos com uso de sildenafil ainda inferiores os obtidos no próprio grupo controle.

Em nossa opinião, estes achados podem ser explicados principalmente por dois fatores. Em primeiro lugar, devemos considerar o tamanho do efeito provocado pela medicação. Na medida em que se procura alternativas para tratar um problema clínico (necrose tecidual) por vezes podem ser achados métodos que tragam algum benefício, mas não com o tamanho de ação desejado. Assim, devemos levar em consideração que não é importante apenas a existência do efeito benéfico, mas também o seu tamanho, para que seus eventuais riscos sejam justificados no uso. Em segundo lugar, deve-se ter em mente que muitas vezes trabalhos bem elaborados mas sem resultados positivos não alcançam publicação em revista indexada, o que nos remete ao viés de publicação.

No que se refere ao modelo de retalho cutâneo proposto por McFarlane para pesquisa experimental em ratos, entendemos que o mesmo não se mostrou confiável neste estudo, uma vez que encontramos grande variabilidade no percentual de necrose cutânea entre animais de um mesmo grupo, de modo que devemos também caminhar na

busca por um modelo reprodutível e confiável para aplicar nas pesquisas em nosso meio.

Como conseqüência, a busca por uma alternativa terapêutica visando melhora dos resultados de necrose cutânea deve seguir, ficando como caminhos a busca por um modelo mais confiável para pesquisa animal e a pesquisa de novas alternativas, seguras, confiáveis e eficazes, para o tratamento da necrose cutânea.

## CONCLUSÃO

Este estudo não demonstrou haver benefício com o uso de sildenafil ou tadalafil no que se refere a prevenção de necrose em retalhos cutâneos em ratos. Este resultado pode dever-se a real inexistência de benefício por parte das drogas testadas ou por um efeito pequeno, não capaz de ser demonstrado com o poder deste trabalho. Deste modo, entendemos que deve-se prosseguir com a pesquisa nesta linha, buscando alternativas seguras e eficazes para a prevenção e o tratamento da necrose cutânea.

## REFERENCIAS

1. Adamson, J.E., et al., *The effects of dimethyl sulfoxide on the experimental pedicle flap: a preliminary report*. *Plast Reconstr Surg*, 1966. **37**(2): p. 105-10.
2. Barisoni, D.M. and N. Veall, *Effect of thymoxamine on circulation in skin flaps and in denervated skin*. *Lancet*, 1969. **1**(7591): p. 400-1.
3. Finseth, F., *Clinical salvage of three failing skin flaps by treatment with a vasodilator drug*. *Plast Reconstr Surg*, 1979. **63**(3): p. 304-8.
4. Kerrigan, C.L. and R.K. Daniel, *Pharmacologic treatment of the failing skin flap*. *Plast Reconstr Surg*, 1982. **70**(5): p. 541-9.
5. Miyawaki, T., et al., *The effect of low-molecular-weight heparin in the survival of a rabbit congested skin flap*. *Plast Reconstr Surg*, 2002. **109**(6): p. 1994-9.
6. Shalom, A., T. Friedman, and M. Westreich, *Effect of aspirin and heparin on random skin flap survival in rats*. *Dermatol Surg*, 2008. **34**(6): p. 785-90; discussion 790.

7. Wray, R.C., Jr. and V.L. Young, *Drug treatment and flap survival*. *Plast Reconstr Surg*, 1984. **73**(6): p. 939-42.
8. Scholz, T. and G.R. Evans, *Impact of hypertonic and hyperoncotic saline solutions on ischemia-reperfusion injury in free flaps*. *Plast Reconstr Surg*, 2008. **122**(1): p. 85-94.
9. Ergun, H., et al., *The effect of dipyrrone on survival of skin flaps*. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*, 2001. **35**(1): p. 19-22.
10. Shalom, A., T. Friedman, and M. Westreich, *The effect of postoperative aspirin on random pattern flaps in rats*. *Am Surg*, 2007. **73**(11): p. 1126-8.
11. Kargi, E., et al., *Dual synergistic effect: the effect of dexamethasone plus carnitine on skin flap survival*. *Ann Plast Surg*, 2004. **53**(5): p. 488-91.
12. Esclamado, R.M., W.F. Larrabee, Jr., and G.E. Zel, *Efficacy of steroids and hyperbaric oxygen on survival of dorsal skin flaps in rats*. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 1990. **102**(1): p. 41-4.
13. Kindwall, E.P., L.J. Gottlieb, and D.L. Larson, *Hyperbaric oxygen therapy in plastic surgery: a review article*. *Plast Reconstr Surg*, 1991. **88**(5): p. 898-908.
14. Ulkur, E., et al., *The effect of hyperbaric oxygen therapy on the delay procedure*. *Plast Reconstr Surg*, 2007. **119**(1): p. 86-94.
15. Davis, R.E., et al., *Comparison of topical anti-ischemic agents in the salvage of failing random-pattern skin flaps in rats*. *Arch Facial Plast Surg*, 1999. **1**(1): p. 27-32.
16. Nichter, L.S., M.W. Sobieski, and M.T. Edgerton, *Efficacy of topical nitroglycerin for random-pattern skin-flap salvage*. *Plast Reconstr Surg*, 1985. **75**(6): p. 847-52.
17. Rohrich, R.J., G.W. Cherry, and M. Spira, *Enhancement of skin-flap survival using nitroglycerin ointment*. *Plast Reconstr Surg*, 1984. **73**(6): p. 943-8.
18. Um, S.C., et al., *Involvement of nitric oxide in survival of random pattern skin flap*. *Plast Reconstr Surg*, 1998. **101**(3): p. 785-92.
19. Conti, C.R., C.J. Pepine, and M. Sweeney, *Efficacy and safety of sildenafil citrate in the treatment of erectile dysfunction in patients with ischemic heart disease*. *Am J Cardiol*, 1999. **83**(5A): p. 29C-34C.
20. Ghofrani, H.A., et al., *Differences in hemodynamic and oxygenation responses to three different phosphodiesterase-5 inhibitors in patients with pulmonary arterial hypertension: a randomized prospective study*. *J Am Coll Cardiol*, 2004. **44**(7): p. 1488-96.
21. Wallis, R.M., et al., *Tissue distribution of phosphodiesterase families and the effects of sildenafil on tissue cyclic nucleotides, platelet function, and the contractile responses of trabeculae carneae and aortic rings in vitro*. *Am J Cardiol*, 1999. **83**(5A): p. 3C-12C.
22. Halcox, J.P., et al., *The effect of sildenafil on human vascular function, platelet activation, and myocardial ischemia*. *J Am Coll Cardiol*, 2002. **40**(7): p. 1232-40.
23. Sarifakioglu, N., et al., *The influence of sildenafil on random skin flap survival in rats: an experimental study*. *Br J Plast Surg*, 2004. **57**(8): p. 769-72.
24. Ulusoy, M.G., et al., *Improved flap viability with site-specific delivery of sildenafil citrate using fibrin glue*. *Ann Plast Surg*, 2005. **55**(3): p. 292-6.
25. Ayyildiz, A., et al., *Effect of sildenafil citrate on viability of flaps: an experimental study in rats*. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*, 2005. **39**(4): p. 204-8.

26. Hart, K., et al., *Short- and long-term effects of sildenafil on skin flap survival in rats*. Laryngoscope, 2006. **116**(4): p. 522-8.
27. Tsai, J.W., et al., *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): p. 624-31.
28. Oh, M., H. Chang, and K.W. Minn, *The effects of tadalafil on axial-pattern skin flap survival in rats*. Dermatol Surg, 2008. **34**(5): p. 626-30; discussion 630.
29. Ökva, K., *Refinements for Intragastric Gavage in Rats*. Scand. J. Lab. Anim. Sci., 2006. **33**(4): p. 243-252.
30. McFarlane, R.M., G. Deyoung, and R.A. Henry, *The Design of a Pedicle Flap in the Rat to Study Necrosis and Its Prevention*. Plast Reconstr Surg, 1965. **35**: p. 177-82.
31. Hurn, I.L., et al., *Standardization of the dorsal rat flap model*. Ann Plast Surg, 1983. **11**(3): p. 210-3.
32. Hammond, D.C., et al., *The dorsal skin-flap model in the rat: factors influencing survival*. Plast Reconstr Surg, 1993. **91**(2): p. 316-21.
33. Milton, S.H., *Pedicled skin-flaps: the fallacy of the length: width ratio*. Br J Surg, 1970. **57**(7): p. 502-8.
34. Hosnuter, M., et al., *An ameliorated skin flap model in rats for experimental research*. J Plast Reconstr Aesthet Surg, 2006. **59**(3): p. 299-303.
35. Syed, S.A., et al., *A new experimental model: the vascular pedicle cutaneous flap over the dorsal aspect (flank and hip) of the rat*. Br J Plast Surg, 1992. **45**(1): p. 23-5.
36. Ahmed, S.S., et al., *A new experimental model: the vascular pedicled cutaneous flap over the mid-dorsum of the rat*. Ann Plast Surg, 1997. **39**(5): p. 495-9.
37. Ozcan, G., S. Shenaq, and M. Spira, *A new flap model in the rat*. Ann Plast Surg, 1991. **27**(4): p. 332-8.
38. Akyurek, M., et al., *A new flap model in the rat: the pectoral skin flap*. Ann Plast Surg, 1999. **42**(2): p. 185-92.

Tabela 1 Características dos animais estudados e das peças (retalhos cutâneos) em cada um dos métodos de aferição dos resultados

Animal	Grupo	Peso (gramas)	Comprimento dos retalhos (milímetros)	Largura dos retalhos (milímetros)	Necrose dos retalhos sob visão direta (milímetros)	Percentual de Necrose nos retalhos (%)	Necrose sob exame anátomo-patológico (milímetros)	Percentual de Necrose sob exame anátomo-patológico (%)	Percentual de Necrose sob medição das imagens digitalizadas (%)
1	C	318	95	20	38	40	32	35	38
2	B	294	120	20	51	43	37	39	28
3	A	299	99	20	23	23	45	48	22
4	C	307	94	19	53	56	54	59	61
5	B	306	98	19	42	43	27	30	45
6	A	298	96	18	33	34	44	49	36
7	C	312	100	20	33	33	60	64	37
8	B	298	100	17	44	44	35	36	39
9	A	317	100	19	34	34	34	38	29
10	C	289	96	18	57	59	54	61	56
11	B	273	98	17	48	49	43	48	42
12	A	287	97	20	45	46	49	54	32
13	C	248	100	18	9	9	39	39	31
14	B	277	97	18	31	32	28	30	41
15	A	298	100	19	39	39	60	67	44
16	C	285	93	19	16	17	59	63	62
17	B	266	100	17	38	38	7	7	34
18	A	283	120	16	70	58	27	29	51
19	C	302	140	12	93	66	56	57	58
20	B	356	95	16	45	47	38	40	39
21	A	328	96	17	54	56	74	76	55
22	C	301	97	17	93	96	48	54	60
23	B	316	94	17	49	52	21	23	41
24	A	344	100	17	32	32	30	31	36
25	C	307	95	19	52	55	60	64	65
26	B	309	100	17	33	33	30	33	41
27	A	317	120	18	70	58	52	60	47
28	C	307	100	20	90	90	0	0	0
29	B	306	106	16	51	48	40	41	43
30	A	291	96	15	28	29	56	64	24
31	C	301	100	11	24	24	19	20	48
32	B	269	100	19	26	26	57	65	0
33	A	292	105	12	30	29	48	48	44
34	C	270	99	16	0	0	39	44	52
35	B	284	95	18	30	32	39	41	30
36	A	278	160	19	99	62	34	37	40
37	C	299	97	17	60	62	29	33	60
38	B	289	100	16	50	50	49	54	41
39	A	316	100	18	36	36	43	47	38
40	C	279	94	18	0	0	44	65	23
41	B	411	130	18	73	56	51	53	54
42	A	277	160	17	109	68	62	67	69
43	C	322	110	18	50	45	46	50	46
44	B	324	100	20	0	0	0	0	0
45	A	334	100	20	30	30	33	39	40
Média		301,9	104,3	17,6	44,7	41,8	41	44,6	40,4
Mínimo-máximo		248-411	93-160	11-20	0-109	0-95,9	0-74	0-76,3	0-69



Tabela 2: Distribuição dos resultados de necrose medida por visualização direta entre os grupos (p=0,69)

grupo	Número de animais	Média (milímetros)	Mínimo-máximo (milímetros)	Erro padrão	Desvio padrão	Intervalo de confiança
A	15	48,8	23-109	6,9	26,6	34,1-63,5
B	15	40,7	0-73	4,1	16,1	31,8-49,7
C	15	44,5	0-93	8,2	31,6	27,0-62,0

Tabela 3: Distribuição dos resultados de necrose medida por anátomo-patologia entre os grupos (p=0,079)

grupo	Número de animais	Média (milímetros)	Mínimo-máximo (milímetros)	Erro padrão	Desvio padrão	Intervalo de confiança
A	15	46,1	27-74	3,4	13,3	38,7-53,4
B	15	33,5	0-57	4,0	15,5	24,9-42,0
C	15	42,6	0-6	4,4	17,0	33,2-52,0

Tabela 4: Distribuição dos resultados do percentual de área necrótica/área total (p=0,10)

grupo	Número de animais	Média (milímetros)	Mínimo-máximo (milímetros)	Erro padrão	Desvio padrão	Intervalo de confiança
A	15	40,4	22-69	3,1	12,1	33,7-47,0
B	15	34,5	0-54	3,9	15,2	26,0-42,9
C	15	46,5	0-65	4,6	17,9	36,6-56,4



Figura 2A. Rato anestesiado, com marcação baseada em template a partir do ângulo inferior das escápulas, 10 x 2 cm.

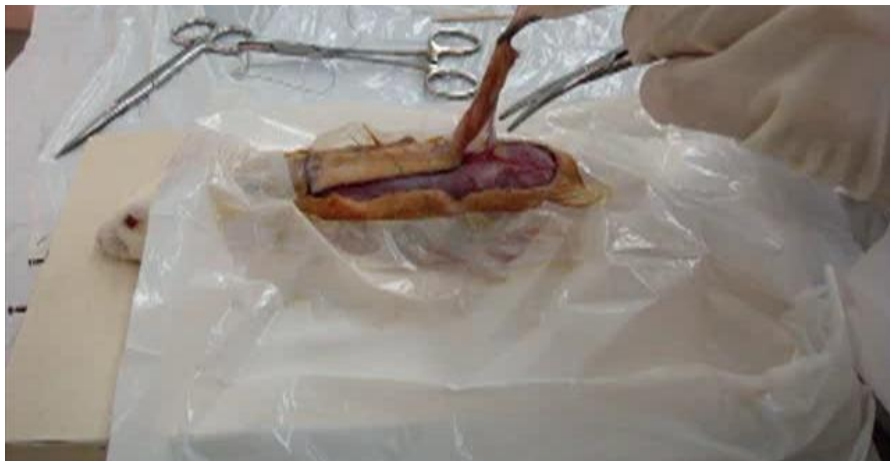


Figura 2B. Retalho em elevação. Base cefálica, dissecado em tecido areolar frouxo, superficialmente a fáscia muscular e profundamente ao *Panicullus carnosus*.

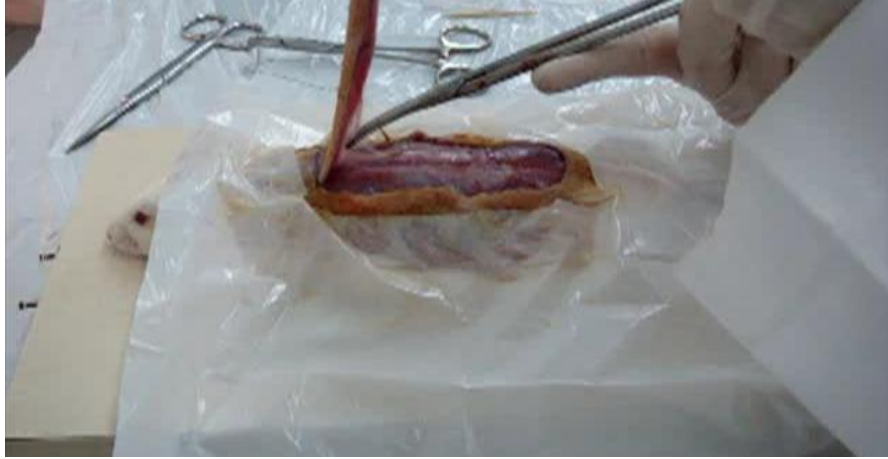


Figura 2C. Retalho elevado, será suturado novamente ao seu leito com mononylon 3.0

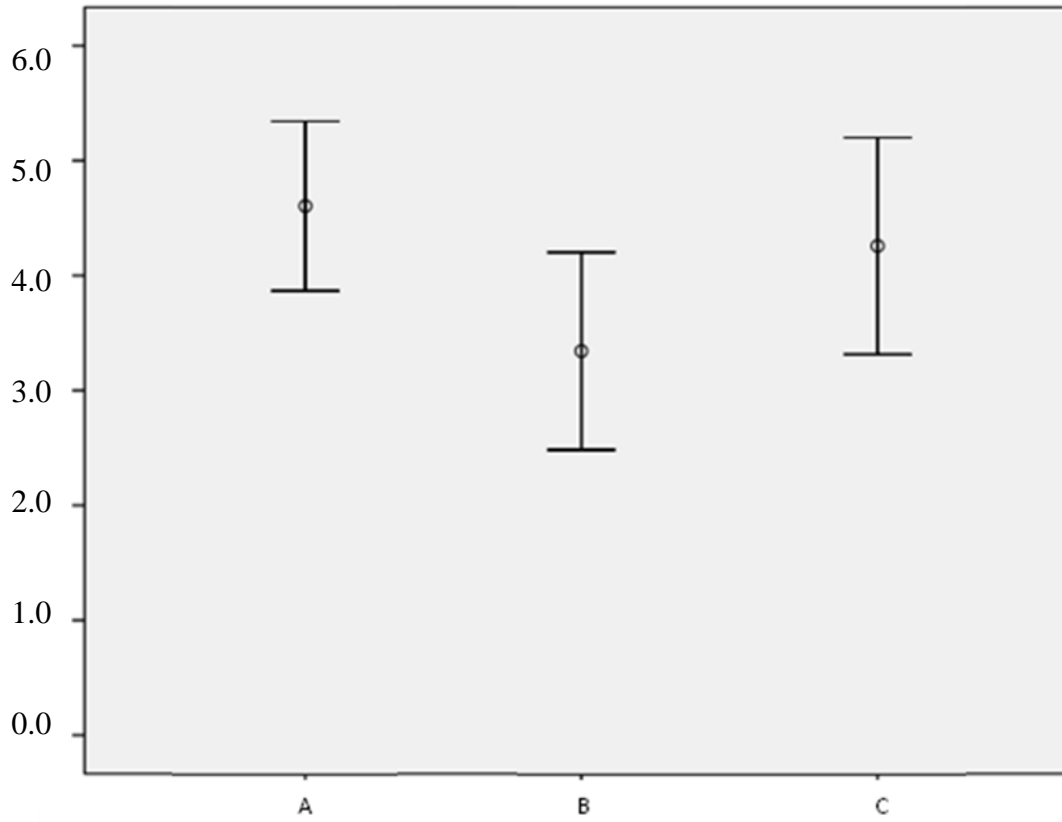


Figura 5: gráfico representando o intervalo de confiança de necrose (em centímetros) para os resultados obtidos pelo exame de microscopia (anátomo-patológico)

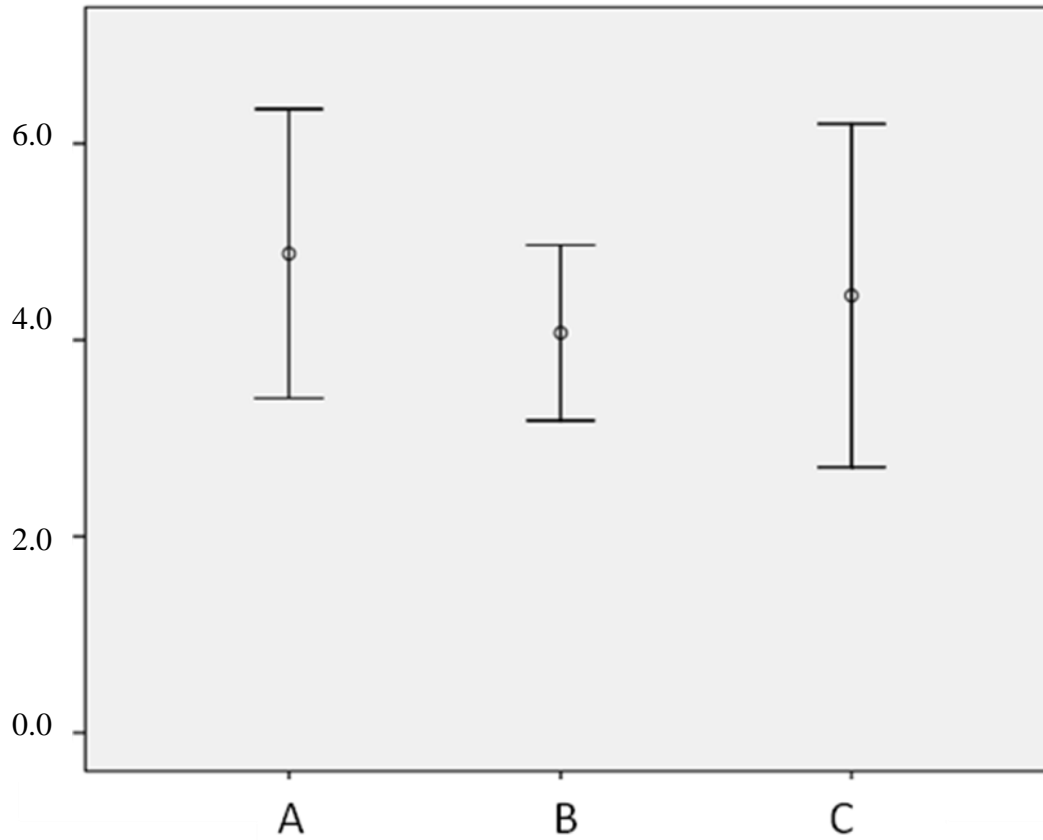


Figura 4: gráfico representando o intervalo de confiança de necrose (em centímetros) para os resultados obtidos pela medição por visualização direta

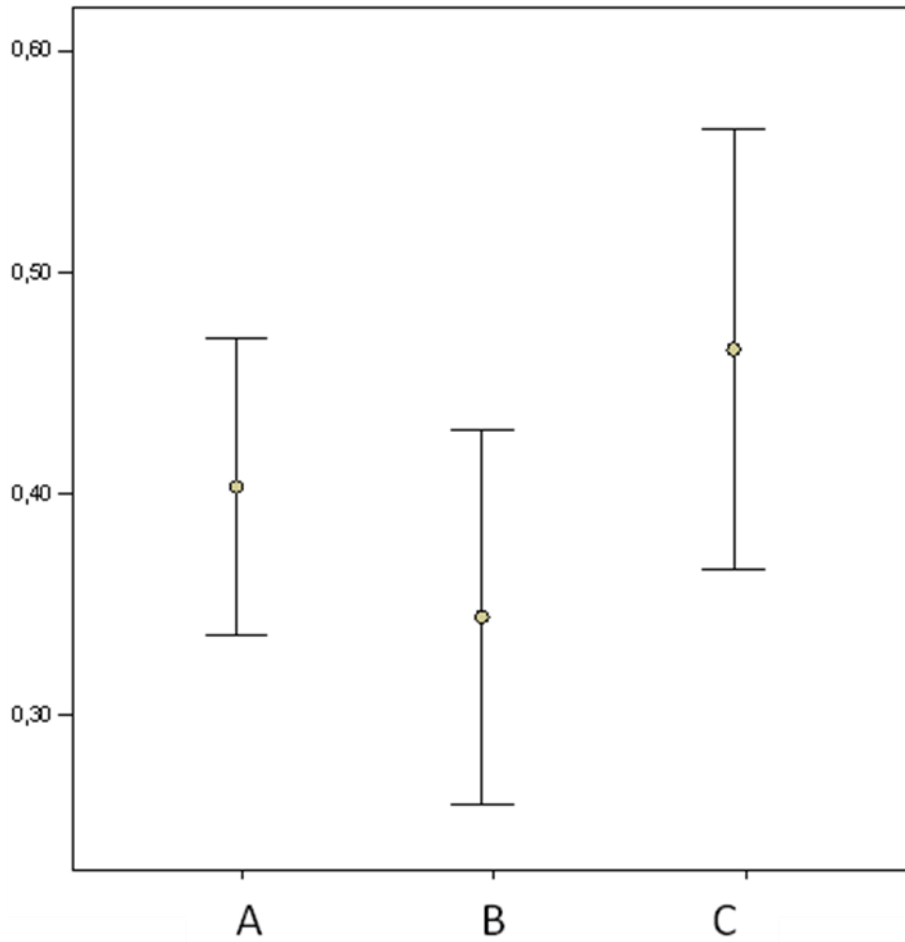


Figura 6: gráfico representando o intervalo de confiança para percentual de área necrótica (relação área necrótica/área total) para os resultados obtidos pela medição das imagens digitalizadas.

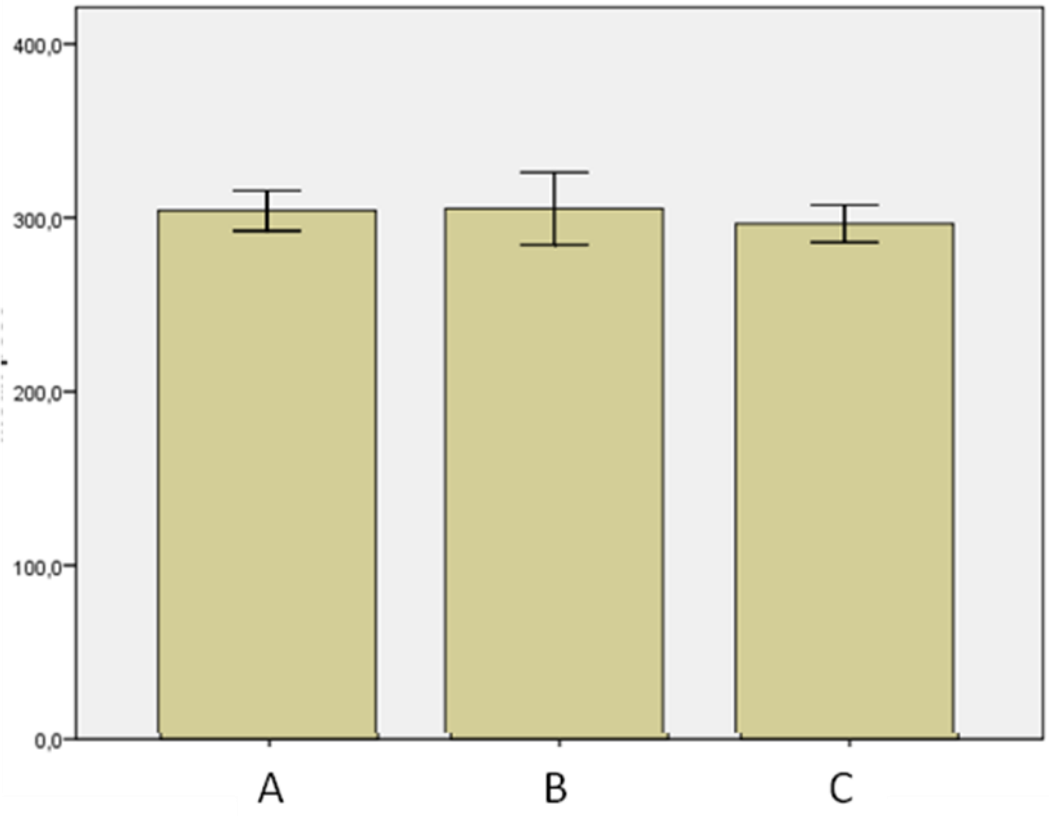


Figura 1: gráfico de barras usado para apresentar o peso médio (gramas) dos ratos em cada grupo com o respectivo intervalo de confiança



Figura 3A: Rato após o sacrifício, antes da retirada do retalho. A base do retalho é cranial, onde vê-se coloração rosada. No ápice, coloração escurecida, sugestivo de necrose.



Figura 3B: Retalho já retirada do animal, foi medido quanto a largura, comprimento e necrose na linha média, sendo posteriormente fotografado e armazenado em formol tamponado. Base a direita da imagem, ápice a esquerda.





Figura 3C: amostra de retalho onde não ocorreu necrose; base a direita da imagem, ápice a esquerda.

## ANEXO 3 - ARTIGO EM INGLÊS

Effect of sildenafil and tadalafil on rat cutaneous flap survival: a comparative study

Authors: Carlos Francisco Jungblut, João Luiz Ellera Gomes.

Co-Authors: Thiago Farias Bujes, Jane Maria Ulbrich Kulczynski.

### ABSTRACT

Aiming at the detection of beneficial effects of sildenafil or tadalafil on protecting ischemic flaps, 45 Wistar rats were subjected to a McFarlane cephalic based flap designed on the dorsum of each rat (10 x 2 cm). Rats were divided into 3 groups of 15 rats each. Group A received 10 mg/kg/dose of sildenafil, 12/12h; group B received 10 mg/kg/dose of tadalafil in the morning and 1 ml of water in the evening (12 hours afterwards); group C (control group) received 1 ml of water, 12/12 h. Drug administration was made by gavage (intra gastric), over a seven day period. After that, rats were sacrificed in a CO<sub>2</sub> chamber and flaps were taken for posterior analysis. Results: midline necrosis percent under direct view were: mean 41.8% (0-95.9%), group A 42.3% (23.2-68.1%), group B 39.5% (0-56.1%), group C 43.5% (0-95.9%) (p=0.861); In the microscopic results, the mean percent necrosis was 44.6% (0-76%), and for group A 50.4% (29.3-76.3%), group B 36.1% (0-64.8%), group C 47.3% (0-64.7%) (p=0.06). Digital images of the flaps were analyzed by the ratio necrotic area/total area. Mean necrotic percentile was 40.4% (0-69%), and for group A 40.4% (22-69%), group B 43.4% (0-54%), group C 46.5% (0-65%) (p=0.10). Results didn't show consistent difference among groups. Conclusion: The use of enteral sildenafil or tadalafil was not effective in the treatment of ischemic flap in the current investigation.

## INTRODUCTION

Cutaneous injuries are frequently the cause of surgical treatment in traumatized patients, sometimes associated to complex injuries, like exposed fracture and soft tissue injuries. When there are too much cutaneous losses on a primary closure, or when there is exposure of noble structures or when the characteristics of the region do not allow the use of skin graft, it is possible to opt for the surgical technique of cutaneous flap targeting at a better soft tissue covering. Flap nutrition comes from its own pedicle (axial or random, island or peninsular) and is essential for its survival. During surgical procedure tissue damage and hematoma formation are controlled by careful surgical techniques while pos-operative may have contribution of pharmacologic adjuvant. Flap ischemia may lead to partial or complete flap loosening, mostly at distal parts. Preventing this a large number of treatments were tested (anticoagulants, vasodilators, simpthycolitics, shock waves, hyperbaric chamber,...) without satisfactory clinical results, indicating the need for further investigation and better understanding. Research of new drugs to improve flap survival may occupy this gap with wide application in reconstructive surgery.

## LITERATURE REVIEW

### Ischemic flap therapeutics

Failing cutaneous flaps and its complications have been the object of innumerable studies. Dimethylsulfoxid was used by Adamnson [1] in the sixties, suggesting clinical improvement with its use. Barisoni[2] in 1969 presented thymoxamine results (alpha-

adrenergic block) evaluating flaps vascularization. In 1979, Finseth[3] showed its results with isoxsuprin, a vasodilator. Since new researches were being developed the use of animals (rats, rabbits and swine) in these experimental studies became the alternative way of testing and comparing various new drugs. Sympatholytics were also studied as they could have some vasodilatory effect, special references to phenoxybenzamine, propranolol, reserpina e guanethidine studies[4]. Aiming at some anticoagulant effect, heparin[5-7] and pentoxifylline[8-10] did show perfusion improvement in laboratory animals. Dextran[4, 11], an platelet antiagregant and blood expander, have been used in some clinical protocols. Changes in blood viscosity seem to improve flap perfusion although forceful anemia and protein depletion may not be applied as therapeutics.

Dipiron and acetil salicylic acid do have good results in some researches [6, 12, 13], although without confirmatory human clinical researches. Corticotherapy[14] was used as a way of improving flap resistance to ischemia, but without consistent results. Hiperbaric therapy [15-17] has shown satisfactory results, but restricted to selected health centers. Vasodilators were tested too. Nithritos [4, 18-21] (dimethylsulfoxide, histamine, hidralazin, isoxsuprine) are not routinely used in clinical practice. Present researches apply a lot of different protocols and methodologies, what makes it difficult to create clinical protocols based on them.

#### Phosphodiesterase 5 inhibitors

Recent researches shows phosphodiesterase (PDE) inhibitors as a new way to improve blood perfusion in vascular ischemic tissue, decreasing local vasoconstriction and its deleterious effects, which may have significant use in cutaneous flap surgery. Phosphodiesterase inhibitors have a primordial place in physiologic regulations just like

platelets aggregation, smooth muscle relaxation, homeostasis, immune response and heart contractile function, apparently without significant aggregated risk [22-24]. Phosphodiesterase 5 (PDE 5) has high specificity for cyclic monophosphat guadenosin (GMPc) and is present in the smooth muscle, including the one in vascular system. When nitric oxide is released from endothelial cells, it acts in the smooth muscle cells that cover microvasculature. It binds then to ciclase guanelate (CG), resulting in its activation and subsequent GMPc formation, what promotes phosphorylation of the contractile protein myosin from smooth muscle, getting to myosin relaxation and blood vessel dilation. Phosphodieterase 5 inhibitors prevent myosin dephosphorilation, making it last longer. Nitric oxide induces vasodilatation, inhibits platelets aggregation, promotes angiogenesis and has been effective on preventing necrosis in animal flaps researches[21]. Its clinical use, however, got compromised by its systemic hypotensive effects. PDE 5 are highly selective for its target cells, the way that could promote less systemic paraeffects while preserving the capacity of improving flap blood flow[24-31].

In this research we intend to show the effects of medications used in clinical practice to inhibit Phosphodieterase 5, as with sildenafil and tadalafil, comparing its results with a control group and with each other, in saving ischemic cutaneous flap in rats. Sildenafil, the older one, with a longer time of use, mainly for erectile disfuncion, was showed in other researches[26-31], with favorable results. Tadalafil was tried topically[31] with promising results. There is no study comparing these two drugs with a control group, validating results. As tadalafil has a longer midlife and some pharmacodynamic difference with respect to phosphodiesterase specificity it may be used with longer dose interval without compromising its effect[31].

## OBJECTIVE

The objective of the investigation is to show sildenafil and tadalafil efficacy in decreasing ischemic cutaneous flap necrosis in rats.

## ETHIC ASPECTS

This study was approved by *Hospital de Clínicas de Porto Alegre* research and postgraduate group, protocol number 08497. Adequate care in minimizing animal suffering was a priority in the study, since capture, surgical procedure, post surgical care, administration of medication and sacrifice. The number of animals (n) taken was calculated in order to avoid unnecessary sacrifices with estimated results and differences intra groups and between groups.

No conflict of interest was detected during this investigation.

## Statistical analysis

Animal sample size was calculated based on previously published studies [22, 26, 27, 29-31] in the statistics team from research and postgraduate group of Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Results were analyzed using SPSS for windows v.12.02 (Statistical Package for Social Sciences). Continuous variables were shown by the mean and standard deviation, compared by student t test and ANOVA. Results were considered statistically significant if  $p < 0.05$  and differences considered relevant if greater than 10 % between groups.

## LOCATION OF STUDIES

This research was performed at the research center – animal experiment unit, of *Hospital de Clínicas de Porto Alegre* (HCPA). Results were obtained with the collaboration of the hospital pathology service.

## DELINEAMENT

Experimental, blind, randomized and controlled study.

## STUDIED VARIABLES

Weight

Flaps Length

Flaps Width

Percent of necrosis by direct vision

Percent of necrosis by microscopic vision

Percent of necrosis by digital area measurement

Mortality

## MATERIAL AND METHOD

Forty five wistar male rats, about 60 days old, mean weight 299.5 g (248-356) (figure 1) were surmised in a quarantine period of 15 days and then included in the study. They were randomly divided into three groups of fifteen rats each (A, B and C)

and submitted to surgical treatment. Before surgery rats received respective treatment by gavage [32] (intra-gastric administration) using a metal needle developed for that purpose (subsequent doses were administered by this way again). Dose was determined based on rat's weight.

Anesthesia was performed using intraperitoneal ketamin and xilasin. Rats were then immobilized in ventral decubit and tricotomized. After that, surgeon (blinded) drew cranial based flaps bounds.

Local anesthesia was performed using bupivacain 0.5 mg/ml outside flaps borders. Flap was then carefully elevated to perform a 10 x 2 cm cranially based flap. Proximal border of flaps was the inferior scapular angle. Dissection was made through areolar tissue plane deep to the panniculus carnosus and superficial to the deep fascia. The flap was then replaced in its bed and sutured, as proposed by McFarlane[33](figure 2A-2C). Rats were held in individualized cages (in order to avoid aggression or damage from socialization between them) with controlled temperature and illumination, food and water *ad libidun* .

Sildenafil was taken by commercial name Viagra (Labs. Pfizer Ltda); Taldalafil by commercial name Ciális (Eli Lilly do Brasil Ltda).

Doses were prepared just before administration. Drug was tittered, diluted and mixed using distilled water so that 1 ml of solution could be used for each rat when administering proposed dose.

Group A: Sildenafil, 10 mg/kg/dose administered 12/12h, dilute in distilled water, by gavage.



Group B: Tadalafil, 10 mg/kg/dose administered once a day and 1 ml of distilled water administered by gavage twelve hours after that, both by gavage.

Group C: Distilled water, 1 ml administered 12/12h by gavage (control group).

Thus all animals in the experiment received a dose of 1 ml of each respective solutions, every 12h based on gavage method, over a seven day period. With the completion of the 7 days, all rats were sacrificed in CO<sub>2</sub> chamber and flaps were immediately retrieved. Flaps length, flaps width and longitudinal midline non-necrotic tissue (from the base of the flap to the point where necrosis began) were measured (figure 3A-C).

After that, flaps were photographed and digitalized images used for percent of necrotic area measurement. AutoCad 2008 (*version B.51.0*) was used for that, obtaining necrotic area/ total area ratio. Flaps were maintained in formol solution and sent for microscopic evaluation. The procedure was carried out in samples retrieved from longitudinal midline of each flap to define the true point where necrosis began from the base to the apex of the flap.

## RESULTS

At day seven necrotic zone was easy to demark and no death did occur from administered medication. Direct visualization results were (table 1): mean length 10.4 cm (9.3-16.0 cm), mean width 1.7 cm (1.1-2.0 cm), mean midline longitudinal necrosis 4.4 cm (0-10 cm). Mean necrosis on each group was (table 2) (figure 4): group A 4.4 cm (0-9.3 cm), group B 4.9 cm (2.3-1 cm), group C 4.0 cm (0-7.3 cm).

Microscopic results were (table 3): mean necrosis 4.0 (0-7.4). Mean necrosis (figure 5) on group A was 4.3 cm (0-6.0 cm) on group B was 4.6 cm (2.7-7.4 cm) on group C was 3.3 cm (0-5.7 cm).

Percent of necrosis from flap digitalized images (table 4) were: mean percent necrosis 40.4% (0-69%). On each group (figure 6) it was: group A 46.5% (0-65%) group B 40.4% (22-69%) group C 34.4% (0-54%).

Results were submitted to statistical analysis and controlled for flap dimensions and rats weight. No statistical difference between groups in any of the studied variables ( $p>0.05$ ) was found.

## DISCUSSION

Although tissue necrosis has been the object of innumerable previous researches, there still are unsolved questions. Results of this work direct us to think about how to interpret previous literature results and what's the best way to perform new ones, trying to answer if phosphodiesterase V (PDE V) inhibitors do have beneficial effects on cutaneous tissue necrosis treatment.

Sildenafil and tadalafil are strong PDE V inhibitors, so that's why they may have this proposed beneficial effect. Nitric oxide activates guanilate ciclase and subsequently cyclic guanidine monophosphate (cGMP), which promotes smooth muscle release and secondary vasodilation. PDE V then deactivates cGMP and diminishing nitric oxide effect. At this point the PDE V inhibitors come into effect, blocking the cGMP deactivation and increasing nitric oxide action for vasodilation. PDE V also acts decreasing platelets activation, suggesting that sildenafil and tadalafil may also achieve that purpose. These effects could theoretically improve ischemic tissue survival.

Literature review suggests that PDE V could decrease ischemic tissue necroses in rats [26-29, 31]. Most works evaluated results after seven days pos-operative, when necroses should be easily demarked. One of them [29], however, analyzed flaps treated with sildenafil at days 1, 3, 5 and 7. The beneficial effect was greater at initial days, still present at day seven, although smaller. It may suggest that improvement may decrease or disappear after longer periods or, put differently, that the use of any drug that could improve angiogenesis could make flaps survival improve. The same research group[30] tried endothelial growth factor alone or with sildenafil for saving failing flaps in rats, without any demonstrable beneficial effect related to the association or endothelial growth factor alone, maintaining positive effect for sildenafil alone.

Interestingly, published works about sildenafil and tadalafil had good results with use of McFarlane[33] flap model. Indexed literature discusses repetitively this model. Main difficulties are related to finding the fixed points to demarcate borders of flap, control and avoidance of axial vasculature (should be random), choice of caudal or cephalic base (McFarlane x reverse McFarlane) and bias for capillary nutrition, just like a skin graft. Hence new researches have been proposed, looking for more stable and consistent rat flap model [33-41]. Sildenafil and tadalafil works did show, however, satisfactory results about this model, with small intragroup variability (less than 5%) making it easier to prove differences between groups since almost any discrepancy in the results was the direct consequence of drug effect, not from model flap instability.

Unfortunately, in this research the flap model wasn't as consistent. Although percent necrotic area did show some tendency of necroses decrease in treatment groups (tadalafil percent necroses < sildenafil percent necroses < control percent necroses), there was no statistical difference between groups. Microscopic results didn't show

statistical difference between groups and sildenafil results were worst than those of the control group.

In our opinion, these results are the consequences of two main factors. First, we must consider the actual strength of the proposed drug. Whenever it may have some clinical effect, the amount of this wasn't sufficient for this study to prove it, suggesting that even if it will be proven, risk/benefit must be analyzed before it can be applied to human research. Second, we must pay attention to publishing bias too. Works published showed good results with use of these drugs, but some good investigations without positive results may have got no indexed international publication.

With respect to flap model, McFarlane's one didn't show a predictable behavior during this investigation. There was too much variability between flaps necrosis results even in the same treatment group on direct view, microscopic view or digitalized images analysis. We intend to develop new researches on this area too, obviating this kind of problem by using a more predictable model.

Finalizing, new researches looking for better clinical results in cutaneous ischemic flap should go on, working on animal flap model improvement and on new effective and safe pharmacological alternatives for treatment of ischemic cutaneous flaps.

## CONCLUSION

This study couldn't demonstrate the benefits of using sildenafil or tadalafil on preventing necroses for ischemic cutaneous flap in rats. This may be a consequence of the inexistence of this effect or the amount of this wasn't sufficiently significant to be proved through the applied methodology and the power of this work. We believe that

it's necessary to continue the investigation, following this research line, looking for safe and effective ways to prevent and to treat necrosis of ischemic cutaneous flaps.

## REFERENCES

1. Adamson, J.E., et al., *The effects of dimethyl sulfoxide on the experimental pedicle flap: a preliminary report*. *Plast Reconstr Surg*, 1966. **37**(2): p. 105-10.
2. Barisoni, D.M. and N. Veall, *Effect of thymoxamine on circulation in skin flaps and in denervated skin*. *Lancet*, 1969. **1**(7591): p. 400-1.
3. Finseth, F., *Clinical salvage of three failing skin flaps by treatment with a vasodilator drug*. *Plast Reconstr Surg*, 1979. **63**(3): p. 304-8.
4. Kerrigan, C.L. and R.K. Daniel, *Pharmacologic treatment of the failing skin flap*. *Plast Reconstr Surg*, 1982. **70**(5): p. 541-9.
5. Miyawaki, T., et al., *The effect of low-molecular-weight heparin in the survival of a rabbit congested skin flap*. *Plast Reconstr Surg*, 2002. **109**(6): p. 1994-9.
6. Shalom, A., T. Friedman, and M. Westreich, *Effect of aspirin and heparin on random skin flap survival in rats*. *Dermatol Surg*, 2008. **34**(6): p. 785-90; discussion 790.
7. Wray, R.C., Jr. and V.L. Young, *Drug treatment and flap survival*. *Plast Reconstr Surg*, 1984. **73**(6): p. 939-42.
8. Takayanagi, S. and Y. Ogawa, *Effects of Pentoxifylline on flap survival*. *Plast Reconstr Surg*, 1980. **65**(6): p. 763-7.
9. Monteiro, D.T., W.P. Santamore, and P. Nemir, Jr., *The influence of pentoxifylline on skin-flap survival*. *Plast Reconstr Surg*, 1986. **77**(2): p. 277-81.
10. Isken, T., I. Serdaroglu, and E. Ozgentas, *The effects of the pentoxifylline on survival of the skin flaps in streptozotocin-diabetic rats*. *Ann Plast Surg*, 2009. **62**(4): p. 446-50.
11. Scholz, T. and G.R. Evans, *Impact of hypertonic and hyperoncotic saline solutions on ischemia-reperfusion injury in free flaps*. *Plast Reconstr Surg*, 2008. **122**(1): p. 85-94.
12. Ergun, H., et al., *The effect of dipyron on survival of skin flaps*. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*, 2001. **35**(1): p. 19-22.
13. Shalom, A., T. Friedman, and M. Westreich, *The effect of postoperative aspirin on random pattern flaps in rats*. *Am Surg*, 2007. **73**(11): p. 1126-8.
14. Kargi, E., et al., *Dual synergistic effect: the effect of dexamethasone plus carnitine on skin flap survival*. *Ann Plast Surg*, 2004. **53**(5): p. 488-91.
15. Esclamado, R.M., W.F. Larrabee, Jr., and G.E. Zel, *Efficacy of steroids and hyperbaric oxygen on survival of dorsal skin flaps in rats*. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 1990. **102**(1): p. 41-4.
16. Kindwall, E.P., L.J. Gottlieb, and D.L. Larson, *Hyperbaric oxygen therapy in plastic surgery: a review article*. *Plast Reconstr Surg*, 1991. **88**(5): p. 898-908.
17. Ulkur, E., et al., *The effect of hyperbaric oxygen therapy on the delay procedure*. *Plast Reconstr Surg*, 2007. **119**(1): p. 86-94.
18. Davis, R.E., et al., *Comparison of topical anti-ischemic agents in the salvage of failing random-pattern skin flaps in rats*. *Arch Facial Plast Surg*, 1999. **1**(1): p. 27-32.

19. Nichter, L.S., M.W. Sobieski, and M.T. Edgerton, *Efficacy of topical nitroglycerin for random-pattern skin-flap salvage*. *Plast Reconstr Surg*, 1985. **75**(6): p. 847-52.
20. Rohrich, R.J., G.W. Cherry, and M. Spira, *Enhancement of skin-flap survival using nitroglycerin ointment*. *Plast Reconstr Surg*, 1984. **73**(6): p. 943-8.
21. Um, S.C., et al., *Involvement of nitric oxide in survival of random pattern skin flap*. *Plast Reconstr Surg*, 1998. **101**(3): p. 785-92.
22. Conti, C.R., C.J. Pepine, and M. Sweeney, *Efficacy and safety of sildenafil citrate in the treatment of erectile dysfunction in patients with ischemic heart disease*. *Am J Cardiol*, 1999. **83**(5A): p. 29C-34C.
23. Ghofrani, H.A., et al., *Differences in hemodynamic and oxygenation responses to three different phosphodiesterase-5 inhibitors in patients with pulmonary arterial hypertension: a randomized prospective study*. *J Am Coll Cardiol*, 2004. **44**(7): p. 1488-96.
24. Wallis, R.M., et al., *Tissue distribution of phosphodiesterase families and the effects of sildenafil on tissue cyclic nucleotides, platelet function, and the contractile responses of trabeculae carneae and aortic rings in vitro*. *Am J Cardiol*, 1999. **83**(5A): p. 3C-12C.
25. Halcox, J.P., et al., *The effect of sildenafil on human vascular function, platelet activation, and myocardial ischemia*. *J Am Coll Cardiol*, 2002. **40**(7): p. 1232-40.
26. Sarifakioglu, N., et al., *The influence of sildenafil on random skin flap survival in rats: an experimental study*. *Br J Plast Surg*, 2004. **57**(8): p. 769-72.
27. Ulusoy, M.G., et al., *Improved flap viability with site-specific delivery of sildenafil citrate using fibrin glue*. *Ann Plast Surg*, 2005. **55**(3): p. 292-6.
28. Ayyildiz, A., et al., *Effect of sildenafil citrate on viability of flaps: an experimental study in rats*. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*, 2005. **39**(4): p. 204-8.
29. Hart, K., et al., *Short- and long-term effects of sildenafil on skin flap survival in rats*. *Laryngoscope*, 2006. **116**(4): p. 522-8.
30. Tsai, J.W., et al., *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): p. 624-31.
31. Oh, M., H. Chang, and K.W. Minn, *The effects of tadalafil on axial-pattern skin flap survival in rats*. *Dermatol Surg*, 2008. **34**(5): p. 626-30; discussion 630.
32. Ökva, K., *Refinements for Intragastric Gavage in Rats*. *Scand. J. Lab. Anim. Sci.*, 2006. **33**(4): p. 243-252.
33. McFarlane, R.M., G. Deyoung, and R.A. Henry, *The Design of a Pedicle Flap in the Rat to Study Necrosis and Its Prevention*. *Plast Reconstr Surg*, 1965. **35**: p. 177-82.
34. Hurn, I.L., et al., *Standardization of the dorsal rat flap model*. *Ann Plast Surg*, 1983. **11**(3): p. 210-3.
35. Hammond, D.C., et al., *The dorsal skin-flap model in the rat: factors influencing survival*. *Plast Reconstr Surg*, 1993. **91**(2): p. 316-21.
36. Milton, S.H., *Pedicled skin-flaps: the fallacy of the length: width ratio*. *Br J Surg*, 1970. **57**(7): p. 502-8.
37. Hosnuter, M., et al., *An ameliorated skin flap model in rats for experimental research*. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 2006. **59**(3): p. 299-303.

38. Syed, S.A., et al., *A new experimental model: the vascular pedicle cutaneous flap over the dorsal aspect (flank and hip) of the rat.* Br J Plast Surg, 1992. **45**(1): p. 23-5.
39. Ahmed, S.S., et al., *A new experimental model: the vascular pedicled cutaneous flap over the mid-dorsum of the rat.* Ann Plast Surg, 1997. **39**(5): p. 495-9.
40. Ozcan, G., S. Shenaq, and M. Spira, *A new flap model in the rat.* Ann Plast Surg, 1991. **27**(4): p. 332-8.
41. Akyurek, M., et al., *A new flap model in the rat: the pectoral skin flap.* Ann Plast Surg, 1999. **42**(2): p. 185-92.

Table 1 Rats and cutaneous flaps characteristics

Animal	group	weight (grams)	Flaps length (millimeters)	Flaps width (millimeters)	Direct view necrosis (millimeters)	Necrosis percent on Direct view (%)	Microscopic necrosis (millimeters)	Necroses percent on microscopy (%)	Necroses percent on digitalized images (%)
1	C	318	95	20	38	40	32	35	38
2	B	294	120	20	51	43	37	39	28
3	A	299	99	20	23	23	45	48	22
4	C	307	94	19	53	56	54	59	61
5	B	306	98	19	42	43	27	30	45
6	A	298	96	18	33	34	44	49	36
7	C	312	100	20	33	33	60	64	37
8	B	298	100	17	44	44	35	36	39
9	A	317	100	19	34	34	34	38	29
10	C	289	96	18	57	59	54	61	56
11	B	273	98	17	48	49	43	48	42
12	A	287	97	20	45	46	49	54	32
13	C	248	100	18	9	9	39	39	31
14	B	277	97	18	31	32	28	30	41
15	A	298	100	19	39	39	60	67	44
16	C	285	93	19	16	17	59	63	62
17	B	266	100	17	38	38	7	7	34
18	A	283	120	16	70	58	27	29	51
19	C	302	140	12	93	66	56	57	58
20	B	356	95	16	45	47	38	40	39
21	A	328	96	17	54	56	74	76	55
22	C	301	97	17	93	96	48	54	60
23	B	316	94	17	49	52	21	23	41
24	A	344	100	17	32	32	30	31	36
25	C	307	95	19	52	55	60	64	65
26	B	309	100	17	33	33	30	33	41
27	A	317	120	18	70	58	52	60	47
28	C	307	100	20	90	90	0	0	0
29	B	306	106	16	51	48	40	41	43
30	A	291	96	15	28	29	56	64	24
31	C	301	100	11	24	24	19	20	48
32	B	269	100	19	26	26	57	65	0
33	A	292	105	12	30	29	48	48	44
34	C	270	99	16	0	0	39	44	52
35	B	284	95	18	30	32	39	41	30
36	A	278	160	19	99	62	34	37	40
37	C	299	97	17	60	62	29	33	60
38	B	289	100	16	50	50	49	54	41
39	A	316	100	18	36	36	43	47	38
40	C	279	94	18	0	0	44	65	23
41	B	411	130	18	73	56	51	53	54
42	A	277	160	17	109	68	62	67	69
43	C	322	110	18	50	45	46	50	46
44	B	324	100	20	0	0	0	0	0
45	A	334	100	20	30	30	33	39	40
mean		301,9 248-411	104,3 93-160	17,6 11-20	44,7 0-109	41,8 0-95,9	41 0-74	44,6 0-76,3	40,4 0-69



Table 2: direct view necrosis on each group  
(p=0,69)

Group	N	Mean (millimeters)	Variability (millimeters)	Standard error	Standard deviation	Confidence interval
A	15	48,8	23-109	6,9	26,6	34,1-63,5
B	15	40,7	0-73	4,1	16,1	31,8-49,7
C	15	44,5	0-93	8,2	31,6	27,0-62,0

Table 3: microscopic necrosis on each group (p=0,079)

Group	N	Mean (millimeters)	Variability (millimeters)	Standard error	Standard deviation	Confidence interval
A	15	46,1	27-74	3,4	13,3	38,7-53,4
B	15	33,5	0-57	4,0	15,5	24,9-42,0
C	15	42,6	0-6	4,4	17,0	33,2-52,0

Table 4: necrotic area percent  
(p=0,10)

Group	N	Mean (millimeters)	Variability (millimeters)	Standard error	Standard deviation	Confidence interval
A	15	40,4	22-69	3,1	12,1	33,7-47,0
B	15	34,5	0-54	3,9	15,2	26,0-42,9
C	15	46,5	0-65	4,6	17,9	36,6-56,4



Figure 2A. Rat under anesthesia. Flap borders demarcated distally from inferior scapular angles. 10 x 2 cm.

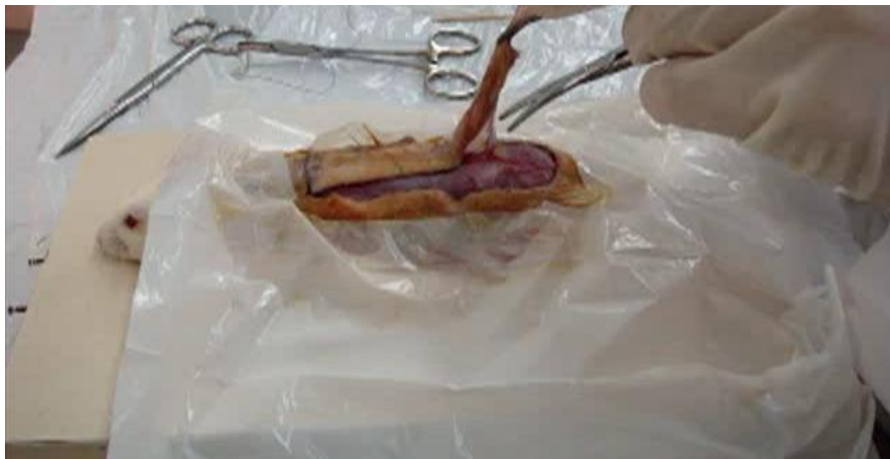


Figure 2B. Flap been elevated. Cephalic base, dissection through areolar tissue, superficially to muscle fascia and deeply to *Panicullus carnosus*.

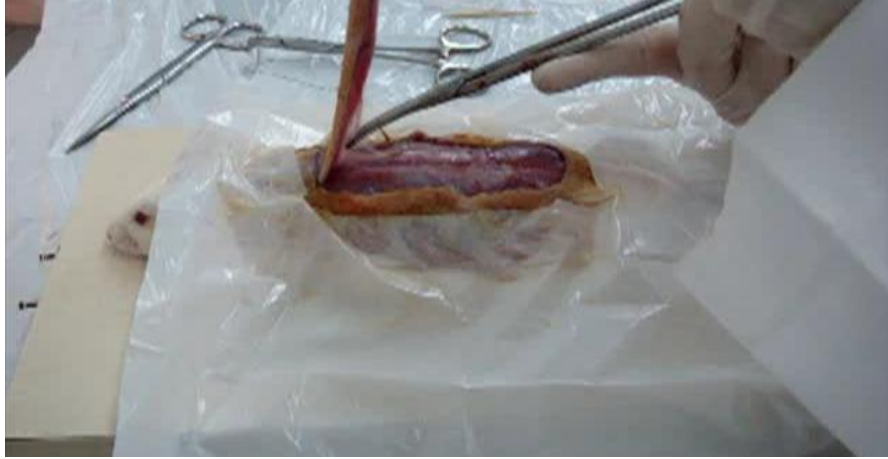


Figure 2C. Flap elevated, will be sutured again on his roof. mononylon 3.0

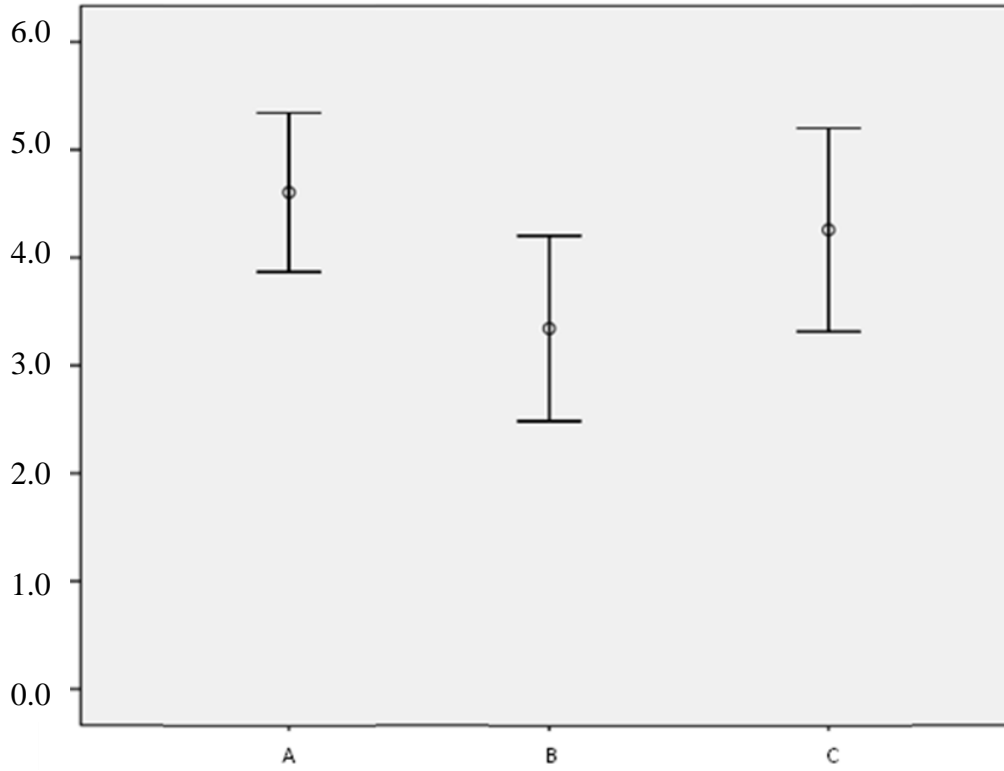


Figure 5: confidence interval for microscopic necrosis (centimeters)

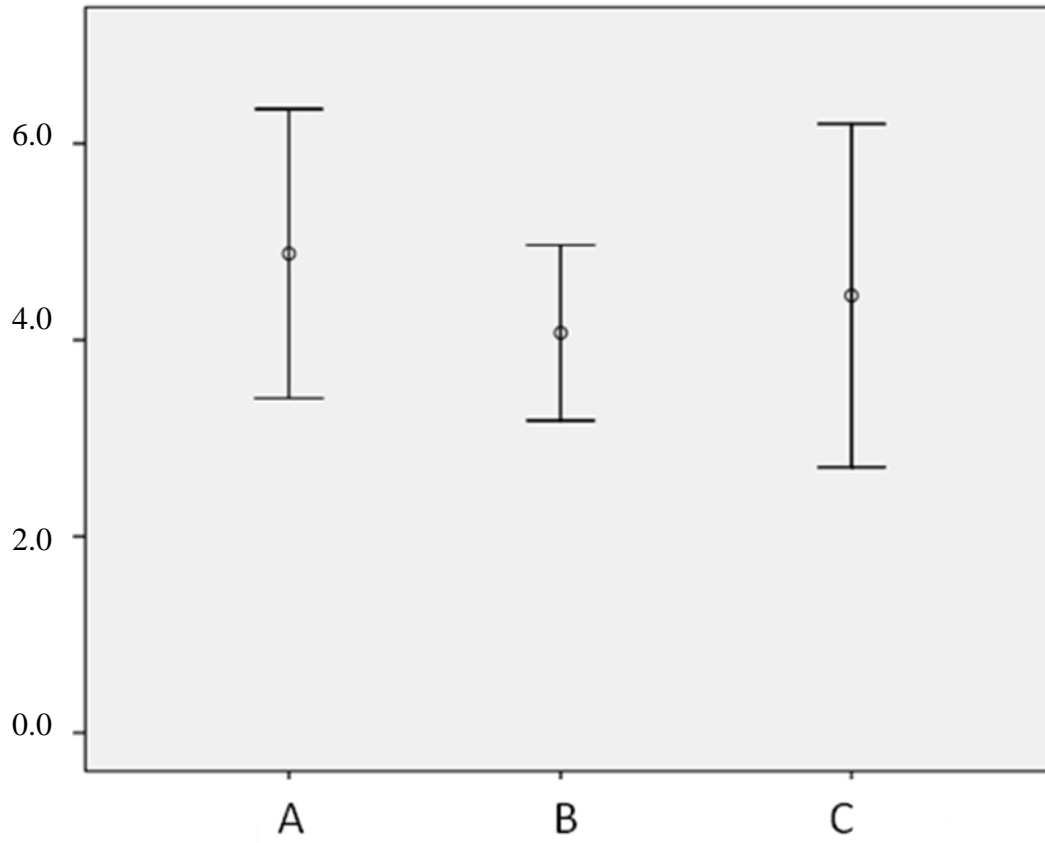


Figure 4: confidence interval for direct view necrosis (centimeters).

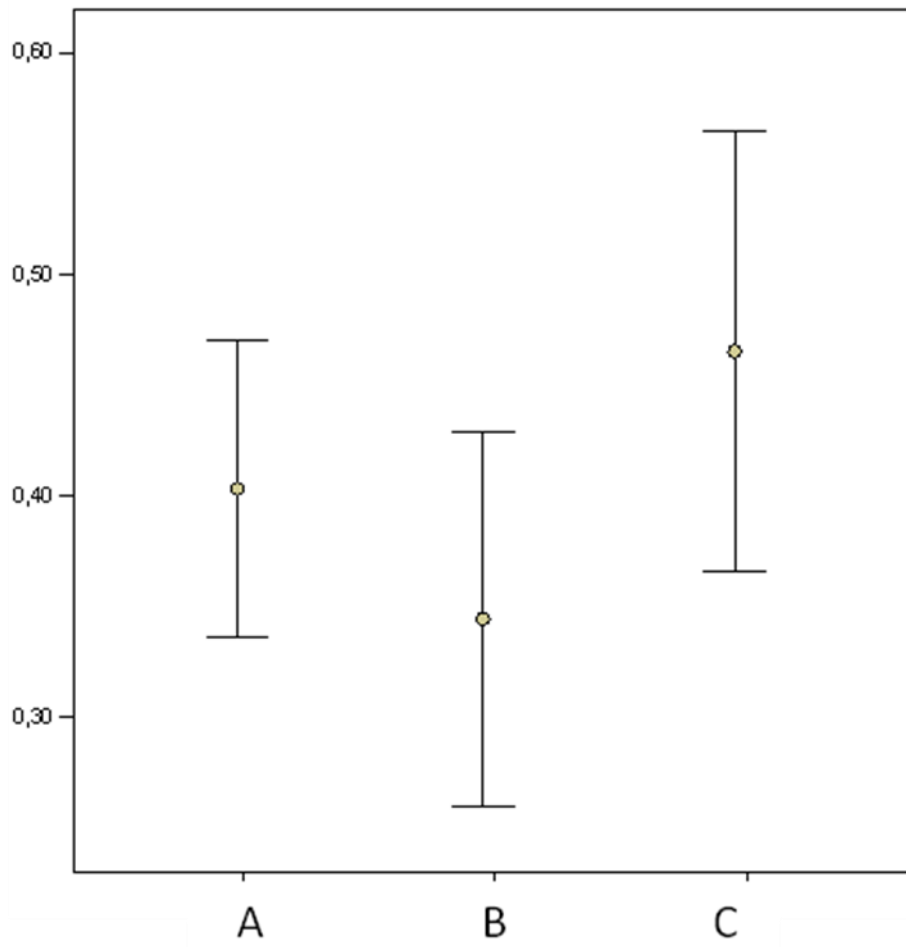


Figure 6: Confidence interval from necrotic area percent of digitalized images

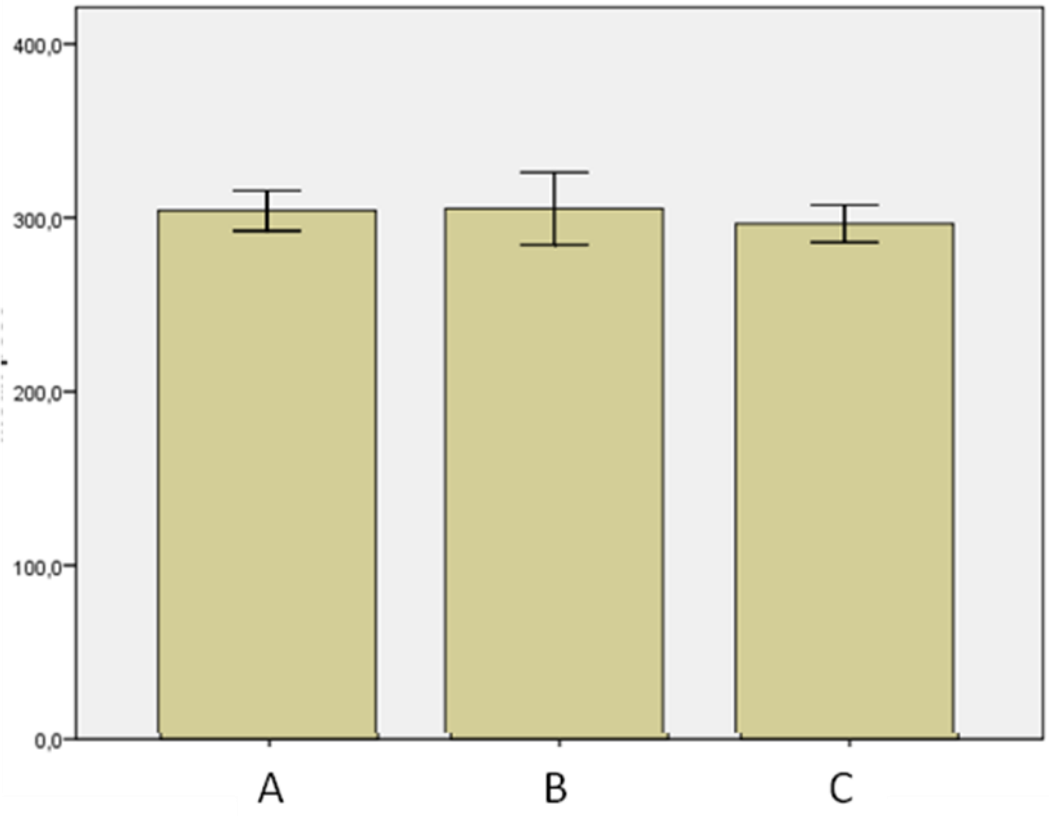


Figure 1: Rats weight on each group and confidence interval (grams)



Figure 3A: on flap base viable skin; on apice, signs of necrosis.



Figure 3B: flaps before formol conservation.





Figure 3C: sample of a flap without necrosis.