

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas

**Detecção precoce de oclusão venosa em retalhos monopediculados
utilizando hemoglicoteste - estudo experimental em ratos**

Autor: Dr. Gustavo Levacov Berlim
Orientador: Prof. Dr. Marcus Vinicius Martins Collares

Dissertação de Mestrado
2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas

**Detecção precoce de oclusão venosa em retalhos monopediculados
utilizando hemoglicoteste - estudo experimental em ratos**

Autor: Dr. Gustavo Levacov Berlim
Orientador: Prof. Dr. Marcus Vinicius Martins Collares

Dissertação de Mestrado
2016

CIP - Catalogação na Publicação

Berlim, Gustavo Levacov

Detecção precoce de oclusão venosa em retalhos monopediculados utilizando hemoglicoteste - estudo experimental em ratos / Gustavo Levacov Berlin. -- 2016.

62 f.

Orientador: Marcus Vinicius Martins Collares.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. glucose. 2. modelos animais. 3. monitoramento. 4. perfusão. 5. retalhos cirúrgicos. I. Collares, Marcus Vinicius Martins, orient. II. Título.

Agradecimentos

Ao Serviço de Cirurgia Plástica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), salientando o apoio dos colegas Dr. Antônio C. P. Oliveira, Dr. Ciro P. Portinho, Dr. Gustavo Faller e Dr. Emerson Morello. Principalmente ao chefe do serviço, meu orientador, Dr. Marcus V. M. Collares, por todo apoio, liberdade e cobrança, cada um na medida certa.

Ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), particularmente ao Estatístico Luciano Santos Pinto Guimarães que me auxiliou nos cálculos antes e depois da obtenção dos dados, bem como na interpretação das análises estatísticas.

À Unidade de Experimentação Animal (UEA) do Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), em especial à Enfermeira Marta J. G. Cioato, à Veterinária Tuane Nerissa Alves Garcez e à Veterinária Fabíola Schons Meyer, que prestaram auxílio inestimável na programação e na execução desta pesquisa.

À Acadêmica Carolina Barbi da Faculdade de Medicina (FAMED) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), por ter sido essencial na execução dos procedimentos nos animais e por garantir que as aferições fossem realizadas nos tempos corretos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Cirúrgicas da Faculdade de Medicina (FAMED) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), salientando os professores Dr. Alessandro B. Oswaldt, Dr. Leandro T. Cavazolla e Dr. Ricardo Savaris, por terem me ajudado a concretizar este projeto com sugestões, apoio e ensinamentos.

Ao Fundo de Incentivo à Pesquisa (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo financiamento deste projeto.

À minha família por me apoiar, além de me ajudar com as revisões, correções e com sugestões.

Por fim, acima de tudo, ao meu filho e à minha esposa, por serem minha inspiração e minha grande motivação para meu aprimoramento pessoal e profissional.

Sumário

Lista de abreviaturas.....	7
Lista de figuras.....	8
Introdução.....	9
Revisão da Literatura.....	10
Defeitos cutâneos.....	10
Fechamento por segunda intenção.....	10
Sutura primária.....	11
Enxertos.....	12
Retalhos.....	13
Complicações.....	17
Monitoramento.....	18
Avaliação da glicose e metabólitos.....	19
Metabolismo normal.....	20
Metabolismo na isquemia e congestão.....	22
Hemoglicoteste.....	22
Oclusão arterial e venosa do pedículo do retalho.....	23
Custo dos métodos de dosagem de glicose.....	23
Referências bibliográficas.....	24
Objetivos.....	27
Artigo em Português.....	28
Artigo em Inglês.....	46

Lista de abreviaturas

ATP	Adenosina trifosfato
CO ₂	Dióxido de Carbono
CoA	Coenzima A
FADH ₂	Dinucleotídeo de flavina e adenina
H ₂ O	Água
HGT	Hemoglicoteste
IC95%	Intervalo de confiança 95%
mg/dL	Miligrama por decilitro
NADH	Dinucleotídeo de niconitamida e adenina
pH	Potencial de hidrogênio
ROC	Receiver operating characteristic
US\$	Dolar americano
VRAM	Retalho vertical do músculo reto abdominal

Lista de figuras

Revisão da Literatura

Figura 1	Sutura primária.	11
Figura 2	Tipos de enxertos de pele.	12
Figura 3	Retalho de Sushruta para reconstrução nasal.	14
Figura 4	Retalho de Tagliacozzi para reconstrução nasal.	15
Figura 5	Classificação dos retalhos musculares (quanto ao pedículo vascular).	16
Figura 6	Classificação dos retalhos axiais.	17
Figura 7	Glicólise.	21

Artigo em português

Figura 1	a) marcação dos retalhos. b) retalhos dissecados. c) veia epigástrica sup. dissecada. d) veia epigástrica sup. seccionada.	32
Figura 2	Média dos níveis de glicose (gráfico).	34
Figura 3	Curva ROC.	36

Artigo em inglês

Figure 1	a) Flaps outlined. b) Flaps dissected. c) Superior epigastric vein dissected. d) Superior epigastric vein ligated and divided.	50
Figura 2	Average glucose levels (chart).	52
Figura 3	ROC curve.	53

Introdução

Defeitos cutâneos em pacientes são muitos frequentes, principalmente como conseqüência de trauma ou do tratamento de alguma lesão. Há várias técnicas disponíveis para realizar o fechamento do defeito e a opção dependerá da complexidade do caso. Nos defeitos mais graves, frequentemente o método de fechamento inclui o uso de retalhos.

Existem diversos tipos de retalhos, porém todos têm uma característica em comum: a presença de pedículo vascular. A integridade do pedículo vascular permite a adequada perfusão do retalho. A principal complicação de cirurgias envolvendo retalhos é a má perfusão, seja por congestão ou por isquemia, o que pode levar a perdas parciais ou até à necrose total do retalho.

O diagnóstico precoce de má perfusão permite o tratamento desta complicação e possibilidade de evitar a perda do resultado cirúrgico. Este diagnóstico muitas vezes é difícil e, por este motivo, há diversas técnicas sendo estudadas para este fim.

Uma das linhas de pesquisa baseia-se no estudo do metabolismo tecidual na má perfusão. A hipóxia tecidual altera o metabolismo dos carboidratos, causando uma queda nos níveis de glicose (1,2). Esta queda tende a ser precoce, e está adequadamente estabelecida na literatura (3–5). Entretanto, não estão estabelecidos critérios diagnósticos com acurácia elevada que relacionem a concentração de glicose com a perfusão dos retalhos.

Revisão da Literatura

Defeitos cutâneos

Defeitos cutâneos e de partes moles são muito freqüentes na prática médica, em especial na cirurgia plástica. Podem ser resultantes diretos de trauma, queimaduras e infecções. Também podem ser secundários ao tratamento cirúrgico de neoplasias, malformações congênitas, anomalias vasculares, deformidades adquiridas, entre outros (6,7).

Usualmente, opta-se por realizar o fechamento pelo método mais simples, desde que este possa promover uma reconstrução adequada. Em ordem crescente de complexidade na sua execução: fechamento por segunda intenção, sutura primária, enxerto, retalho local, retalho a distância e retalho microcirúrgico (6,7).

Fechamento por segunda intenção

Esta pode ser considerada a forma mais simples de se tratar um defeito tecidual. Consiste em deixar a área cruenta seguir o processo natural de cicatrização e epitelização. Há a formação de tecido de granulação, retração e fibrose da área cruenta e epitelização a partir dos bordos da ferida. Normalmente produz cicatrizes de má qualidade, com retração cicatricial que frequentemente causa limitações funcionais, como se observa com freqüência em cicatrizes de queimaduras. A cobertura cutânea costuma ser de má qualidade por ser uma pele com pouca ou nenhuma derme, muito fina e sem anexos cutâneos, o que causa ressecamento e, eventualmente, fissuras e úlceras. Há risco de desenvolvimento de um tipo de carcinoma epidermóide, com prognóstico pior do que o usual, denominado Úlcera de Marjolin. Lesões

pequenas, em determinadas localizações, podem evoluir favoravelmente quando cicatrizadas por segunda intenção (6,7).

Frequentemente há necessidade de se realizar enxertos ou retalhos para tratar as complicações de áreas com cicatrização por segunda intenção ou para prevenir complicações nestas áreas (6,7).

Sutura primária

Esta é a forma mais simples de se tratar cirurgicamente um defeito tecidual. Quando possível, os tecidos são aproximados e mantidos unidos através de pontos de sutura (figura 1). É a forma mais usual de serem tratados os ferimentos traumáticos simples, bem como a ressecção de lesões menores e em áreas com mais abundância de pele e tecidos moles (6,7).

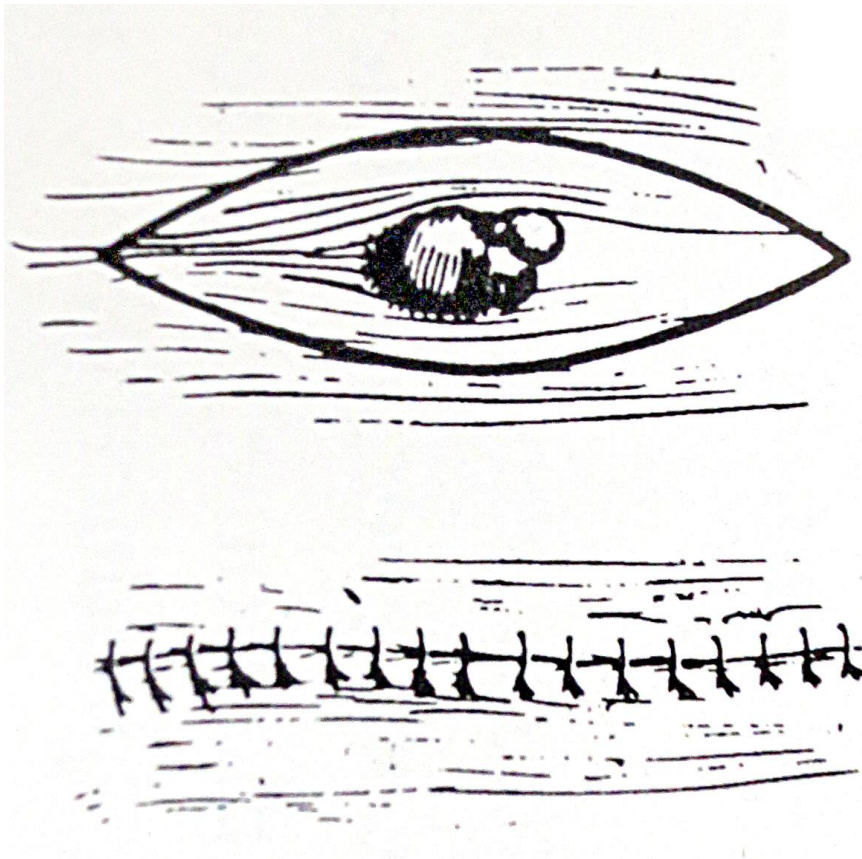


Figura 1 - Sutura primária.

Enxertos

Os enxertos podem ser classificados quanto à natureza do tecido mas, na maioria dos casos, tratamos de enxertos de pele. Estes podem ser subdivididos em parciais ou totais, dependendo da sua espessura (6,7) (figura 2).

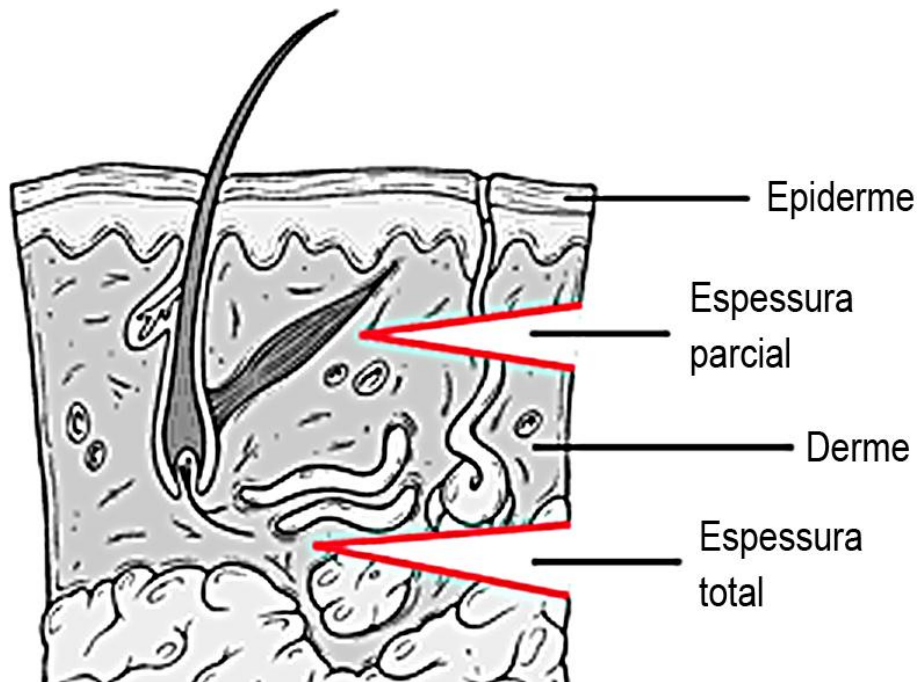


Figura 2 - Tipos de enxertos de pele.

Os enxertos de pele parcial são obtidos com o uso de uma Faca de Blair ou de um dermatômo. Obtem-se, de uma área doadora, uma lâmina de pele contendo epiderme e uma camada variável de derme. A área doadora reepiteliza através da epiderme presente nos anexos cutâneos que permanecerem, sendo melhor a qualidade da recuperação da área doadora, quanto mais fino o enxerto. A área enxertada terá uma qualidade melhor, quanto mais espesso for o enxerto, por conter mais derme (6,7).

Os enxertos de pele total são obtidos realizando-se a ressecção da epiderme e da derme (em toda sua espessura) da área doadora. Normalmente

há sobra cutânea na área doadora, sendo possível a sutura primária do defeito cutâneo resultante da obtenção do enxerto de pele total, mas também pode ser utilizada a pele de alguma peça cirúrgica que tenha sido ressecada na mesma cirurgia (6,7).

O enxerto é então fixado sobre a área com a falta tecidual, de modo a permanecer imóvel, para que possa ser revascularizado a partir dos capilares no leito receptor. Isto depende de haver um leito receptor adequado, ou seja sadio e bem vascularizado, o que é a principal limitação no uso de enxertos de pele. Além disto, os enxertos de pele resolvem a cobertura cutânea, mas não o defeito de partes moles (6,7).

Retalhos

Os retalhos são porções de tecido que trazem consigo seu aporte sangüíneo, ou seja, possuem um pedículo vascular. Assim sendo, os retalhos independem do leito receptor para sua vascularização, podendo ser utilizados em situações mais complexas, como na presença de infecção, contaminação e na cobertura de tecidos mal vascularizados, como ossos e cartilagem (6,7).

Quanto ao pedículo, os retalhos podem ser classificados em aleatórios, quando não há um pedículo vascular definido, e axiais, quando há um (ou mais) pedículos vasculares. Os retalhos axiais são mais confiáveis e mais versáteis sendo usualmente preferidos em relação aos retalhos aleatórios (6,7).

Histórico

O primeiro relato histórico da realização de cirurgias plásticas é de cerca de 600 A.C. e envolve o uso de retalhos. Sushruta, na Índia, descreve operações para a reconstrução de nariz (amputado) utilizando um retalho da

região frontal (figura 3). Celsus (25 A.C. a 50 D.C) utilizava retalhos de avanço, provavelmente com pedículos subcutâneos. Durante a Renascença, na Itália, realizava-se a reconstrução de perdas teciduais na face com um retalho pediculado do braço, cujo pedículo era seccionado em uma segunda cirurgia. Este tipo de retalho, bem como outras técnicas, foi descrito por Tagliacozzi, em 1597, para a reconstrução nasal (6) (figura 4).

Gent. Mag. Oct. 1797, Pl. I, p. 883.



Longmate sc.



Figura 3 - Retalho de Sushruta para reconstrução nasal.

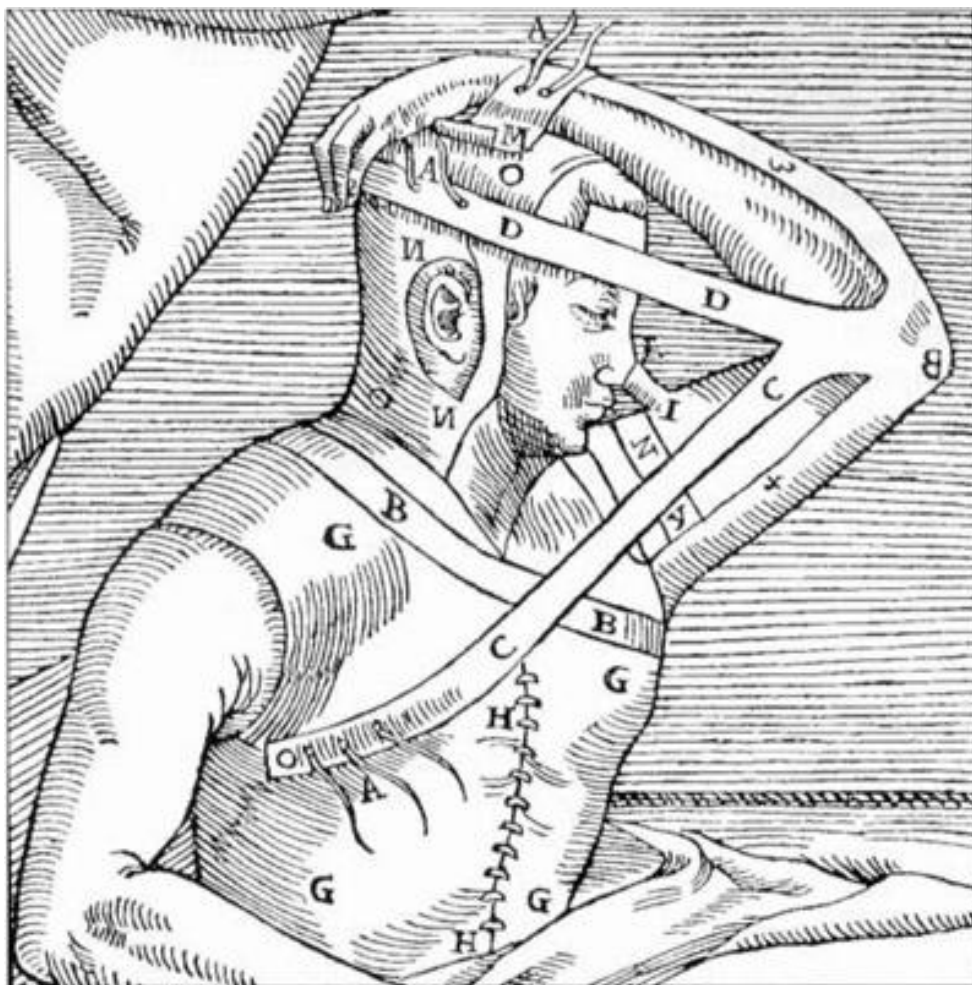


Figura 4 - Retalho de Tagliacozzi para reconstrução nasal.

Inicialmente, pensava-se que os retalhos deveriam seguir uma proporção de comprimento e largura que garantisse uma boa perfusão. Somente na década de 1960 surgiram as primeiras descrições de retalhos arteriais, e na década seguinte foram classificados em aleatórios e axiais (6,7).

Classificação

Os retalhos podem ser classificados, pela distância entre a área doadora e a área receptora, em locais e distantes; pelo aporte sanguíneo, em aleatórios e axiais, e pela sua composição (pele, músculo, fáscia, etc). É de se destacar os retalhos musculares (e miocutâneos) e os fasciocutâneos que, por serem

axiais, são muito confiáveis quanto a sua perfusão e versáteis quanto a sua utilidade (6,7).

Os retalhos musculares são classificados em cinco tipos, dependendo da quantidade, dominância e distribuição do(s) pedículo(s) arterial(ais) (figura 5). Os retalhos miocutâneos são retalhos musculares que trazem um ilha de pele sobrejacente. Esta pele é vascularizada por artérias perforantes que se originam no músculo. Os retalhos fasciocutâneos e septocutâneos se assemelham aos retalhos miocutâneos por incluírem uma ilha de pele vascularizada por vasos perforantes (6,7).

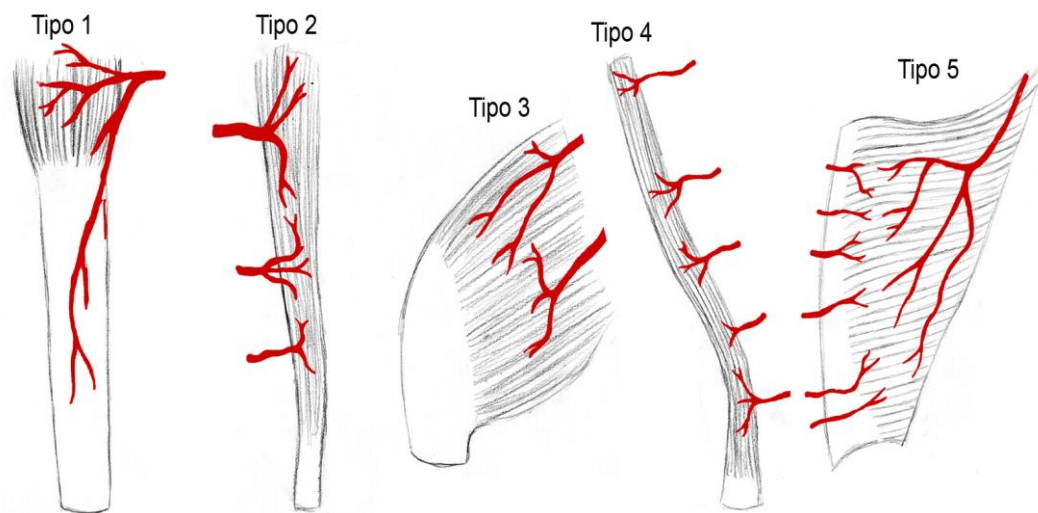


Figura 5 - Classificação dos retalhos.

Retalhos microcirúrgicos

Eventualmente não há possibilidade adequada de reconstrução com retalhos locais ou distantes pediculados. Nestes casos, a principal opção são os retalhos microcirúrgicos. Retalhos microcirúrgicos são retalhos axiais, cujo pedículo é seccionado e reanastomosado no sítio receptor com técnica microcirúrgica (6,7) (figura 6).

Retalhos Axiais

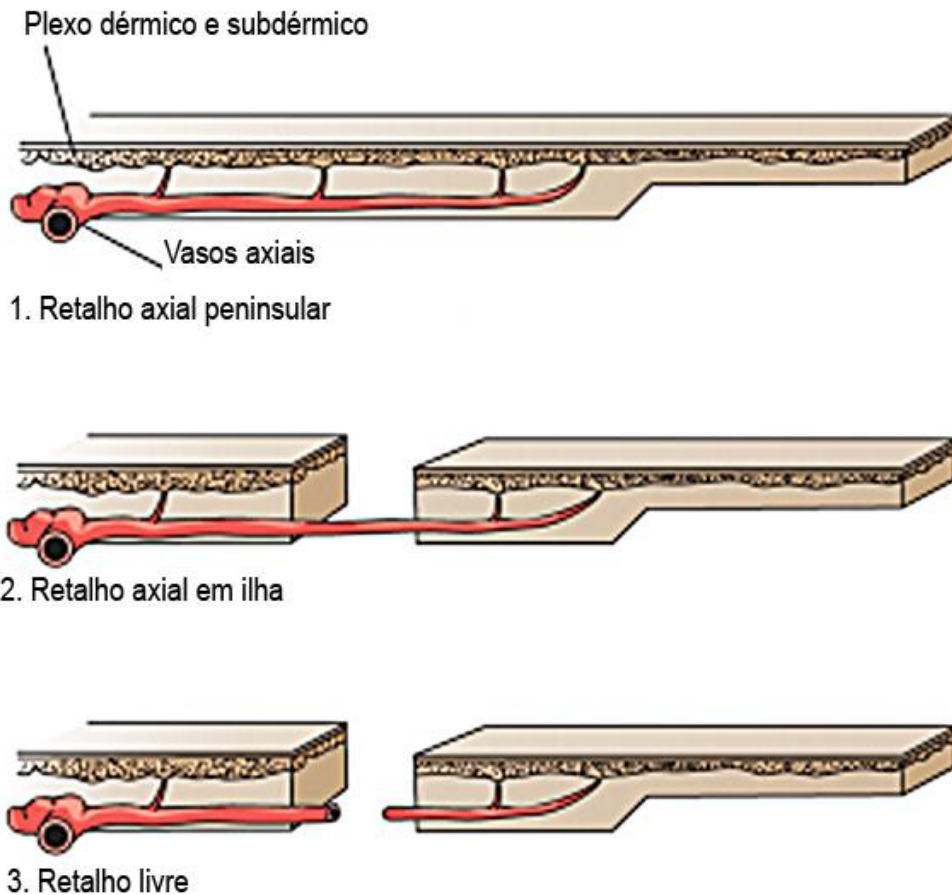


Figura 6 - Classificação dos retalhos axiais.

Este tipo de retalho foi descrito pela primeira vez em 1973 e, desde então, foram vários os avanços nesta área. Hoje é parte usual das opções de reconstrução oferecidas pela cirurgia plástica. Para sua realização é necessário microscópio cirúrgico, material e fios microcirúrgicos, bem como treinamento adequado da equipe médica (6,7).

Complicações

A complicação mais preocupante dos procedimentos envolvendo retalhos é a oclusão de algum vaso do seu pedículo. Os retalhos microcirúrgicos tem

um risco maior de trombose devido à presença de anastomose vascular no seu pedículo. A lesão na íntima vascular na zona da anastomose pode causar ativação da cascata de coagulação, levando à formação de um trombo, o qual pode determinar a oclusão vascular. Esta oclusão ocorre mais frequentemente na veia (8–12). Quando há oclusão de um vaso do pedículo do retalho, usualmente, há a perda da totalidade do retalho, tanto na oclusão arterial, levando à isquemia do retalho, quanto na oclusão venosa, levando à congestão (6,7).

Quando ocorre a oclusão de um vaso do pedículo de um retalho, a única possibilidade de salvar o retalho é a desobstrução do vaso ocluído. A chance de sucesso na reintervenção é diretamente proporcional ao tempo decorrido desde a oclusão do vaso até o reestabelecimento da perfusão adequada do retalho. Assim, é muito importante que o diagnóstico de má perfusão do retalho seja realizado precocemente (6–8,10,11).

Monitoramento

O diagnóstico de trombose, atualmente, é feito pela avaliação clínica do retalho. Avalia-se a temperatura, a cor, o enchimento capilar e o sangramento. Estes critérios são subjetivos e dependem de um avaliador experiente, usualmente membro da equipe cirúrgica. Além disto, esta avaliação é limitada pelo intervalo de tempo entre a oclusão vascular e o surgimento dos sintomas (10,13–15).

O método ideal para avaliar a viabilidade de retalhos deve ser fácil, rápido, objetivo, não invasivo, ter alto grau de sensibilidade e ser economicamente viável. Técnicas que podem ser empregadas incluem a

medida de temperatura externa (16), fluxometria por doppler (17), oximetria (18) e a tensão tecidual de dióxido de carbono (19).

A aferição da temperatura da superfície é um método simples e está relacionada à perfusão do retalho. Há evidências que diferentes variações térmicas em relação ao paciente podem indicar uma oclusão do fluxo arterial ou venoso. Entretanto, a localização do retalho e as variações na temperatura do paciente e do ambiente diminuem a precisão deste método, não sendo considerado confiável (13,14,16).

O doppler externo, embora seja um método não invasivo, está diretamente relacionado à habilidade de identificar o pedículo vascular e à experiência pessoal do examinador (14). A oclusão arterial tende a ser mais fácil de aferir, mas a trombose venosa pode ser de difícil detecção. Existem monitores doppler transcutâneos, que podem ser implantados, mas podem se deslocar e apresentam custo elevado (17,20).

A oximetria tecidual é um bom parâmetro para avaliar a perfusão de um retalho. O oxímetro de pulso convencional, que consiste em dois diodos, tem sua utilidade limitada a reimplantes de extremidades. O uso de espectroscopia infravermelha para a aferição direta da oxigenação tecidual tem um custo elevado, mas é um método recente e promissor. Além disto, ainda não estão estabelecidos os valores que podem diagnosticar a oclusão vascular de retalhos (12,18).

Avaliação da glicose e metabólitos

A experiência clínica com a monitorização direta de metabólitos teciduais demonstrou que os níveis de glicose intersticial respondem rapidamente a

mudanças na perfusão tecidual. A avaliação da glicose intersticial dos retalhos microcirúrgicos permite uma avaliação quantitativa do metabolismo no retalho, permitindo uma detecção precoce de uma oclusão vascular. Diversos estudos tem utilizado técnicas de microdiálise para estudar o metabolismo de retalhos microcirúrgicos em animais e humanos, demonstrando ser um método sensível e específico para a detecção precoce de trombose vascular em retalhos microcirúrgicos (3,4,21).

Sitzman e colaboradores, em 2010, publicaram um estudo, em ratos, em que comparam a glicose intersticial do retalho vertical do músculo reto abdominal (VRAM) com vaso ocluído com o retalho contralateral (5). A glicose intersticial foi medida utilizando um sensor implantável de glicose. Os resultados obtidos evidenciaram que a medida da glicose intersticial e a velocidade na queda desta medida são altamente sensíveis e específicas para o diagnóstico de oclusão vascular do pedículo do retalho. Este resultado teve significância estatística tanto para oclusão arterial quanto venosa.

Uma das diversas formas de dosar a glicose é com o uso de dispositivos de hemoglicoteste (HGT), que fazem a aferição através de uma pequena quantidade de sangue. Estes aparelhos estão amplamente disponíveis em nosso meio, tem um custo baixíssimo e apresentam grande acurácia na determinação da glicemia tecidual.

Metabolismo normal

O metabolismo normal de um retalho bem perfundido inclui a produção de energia através do catabolismo da glicose. Isto envolve o consumo de oxigênio, que é transportado pelo sangue, assim como a glicose. Estes chegam aos

tecidos pelo sangue arterial e capilares. Posteriormente se difundem pelo meio extracelular e entram nas células (1,2).

Dentro das células, a glicose segue uma rota metabólica denominada glicólise, na qual é transformada em duas moléculas de piruvato, gerando duas moléculas de adenosina trifosfato (ATP) e duas moléculas de dinucleótido de nicotinamida e adenina, em sua forma reduzida (NADH) (figura 7) (1,2).

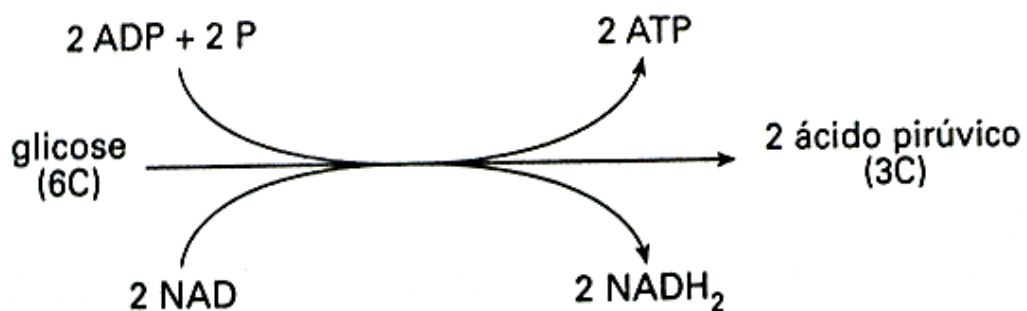


Figura 7 - Glicólise.

O piruvato, por sua vez, é oxidado e decarboxilado, formando acetil CoA (Coenzima A) e uma molécula de NADH, como na equação abaixo:



O Acetil CoA segue o Ciclo de Krebs (ciclo do ácido cítrico), formado por uma série de reações enzimáticas, que o transforma em duas moléculas de dióxido de carbono (CO_2), produzindo um ATP, três NADH e um FADH₂ (dinucleótido de flavina e adenina, em sua forma reduzida) (1,2).

Estes NADH e FADH₂, que são moléculas ricas em energia, serão oxidados na cadeia respiratória, consumindo oxigênio, gerando água (H_2O) e fazendo com que prótons sejam transferidos do interior da mitocôndria para o espaço entre as membranas mitocondriais. Isto resulta em uma diferença de

pH e de potencial elétrico transmembrana. Assim, quando estes prótons voltam para dentro da mitocôndria, há geração de energia, que é utilizada para a síntese de ATPs (fosforilação oxidativa) (1,2).

Seguindo estas rotas metabólicas fisiológicas, cada molécula de glicose gera 38 ATPs, que é a principal fonte energética das células (1,2).

Metabolismo na isquemia e congestão

Quando um tecido sofre de isquemia ou congestão, há prejuízo na perfusão do mesmo. Assim, há redução no aporte de glicose e, principalmente, de oxigênio. Isto faz com que o metabolismo seja alterado de sua normalidade (1,2).

Com a falta de oxigênio, há um bloqueio na cadeia respiratória. Isto, por sua vez, faz com que acumule NADH e FADH₂, o que impede o funcionamento do Ciclo de Krebs e a conversão de piruvato em acetil CoA. O piruvato acumulado é transformado em lactato, consumindo NADH, e permitindo que a glicólise siga acontecendo. Nestas condições são gerados dois ATPs para cada molécula de glicose (1,2).

Comparando-se o tecido isquêmico ou congesto com o tecido bem perfundido há aumento nos níveis de lactato, redução nos níveis de piruvato e redução nos níveis de glicose (3,4,21–23).

Hemoglicoteste

O aparelho de hemoglicoteste é um monitor eletrônico que realiza a dosagem de glicose em uma gota de sangue. Utiliza-se uma tira reagente, específica a cada monitor, a qual absorve, por capilaridade, uma quantidade padrão de sangue da gota. A maioria dos monitores utiliza um método

eletroquímico em que a tira reage com a glicose no sangue através de uma enzima (glicose oxidase ou desidrogenase) e conecta-se ao aparelho por um eletrodo. A reação química produzida gera uma corrente elétrica proporcional à quantidade de glicose no sangue. Assim, o aparelho mede a eletricidade produzida e infere a glicemia (24,25).

Oclusão arterial e venosa do pedículo do retalho

Estudos prévios com monitores de glicose subcutânea e com microdiálise demonstraram que a queda na glicose tecidual é semelhante no retalho isquêmico e no congesto. Como o retalho isquêmico tem pouca quantidade de sangue, não é possível obter uma gota de sangue para a realização do hemoglicoteste (4,5,26).

Custo dos métodos de dosagem de glicose

Tanto os monitores implantáveis de glicose quanto os hemoglicotestes tem um custo fixo do aparelho e um custo variável do material descartável utilizado para cada paciente ou aferição. Nos Estados Unidos, o custo de um monitor implantável é de US\$ 1500,00 e o custo de um hemoglicoteste é de US\$ 18,00 (5). O custo do material descartável vai depender da duração e frequência das aferições, mas tende a ser similar para os dois aparelhos. Cabe ressaltar que a maioria, senão a totalidade, das unidades hospitalares e de pesquisa animal já possuem aparelhos de hemoglicoteste, que são utilizados rotineiramente.

Referências bibliográficas

1. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. Harper's Biochemistry. 22nd ed. Norwalk, Connecticut: Appleton & Lange; 1990.
2. Stryer L. Biochemistry. 3rd ed. New York: W. H. Freeman and Company; 1988.
3. Contaldo C, Plock J, Djonov V, Leunig M, Banic A, Erni D. The influence of trauma and ischemia on carbohydrate metabolites monitored in hamster flap tissue. *Anesth Analg*. 2005 Mar;100(3):817–22.
4. Setälä LP, Korvenoja EM-L, Härmä M a, Alhava EM, Uusaro A V, Tenhunen JJ. Glucose, lactate, and pyruvate response in an experimental model of microvascular flap ischemia and reperfusion: a microdialysis study. *Microsurgery*. 2004 Jan;24(3):223–31.
5. Sitzman TJ, Hanson SE, King TW, Gutowski K a. Detection of flap venous and arterial occlusion using interstitial glucose monitoring in a rodent model. *Plast Reconstr Surg*. 2010 Jul;126(1):71–9.
6. McCarthy JG. Plastic Surgery. 3rd ed. W. B. Saunders Company; 1990.
7. Aston SJ, Beasley RW, Thorne CHM. Grabb and Smith's Plastic Surgery. 5th ed. Lippincott-Raven; 1997.
8. Bui DT, Cordeiro PG, Hu Q-Y, Disa JJ, Pusic A, Mehrara BJ. Free flap reexploration: indications, treatment, and outcomes in 1193 free flaps. *Plast Reconstr Surg*. 2007 Jun;119(7):2092–100.
9. Gill PS, Hunt JP, Guerra AB, Dellacroce FJ, Sullivan SK, Boraski J, et al. A 10-Year Retrospective Review of 758 DIEP Flaps for Breast Reconstruction. *Plast Reconstr Surg*. 2004 Apr;113(4):1153–60.

10. Kroll SS, Schusterman M a, Reece GP, Miller MJ, Evans GR, Robb GL, et al. Timing of pedicle thrombosis and flap loss after free-tissue transfer. *Plast Reconstr Surg.* 1996;98(7):1230–3.
11. Brown J., Devine J., Magennis P, Sillifant P, Rogers S., Vaughan E. Factors that influence the outcome of salvage in free tissue transfer. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2003 Feb;41(1):16–20.
12. Russell J a, Conforti ML, Connor NP, Hartig GK. Cutaneous tissue flap viability following partial venous obstruction. *Plast Reconstr Surg.* 2006 Jun;117(7):2259–66; discussion 2267–8.
13. Jallali N, Ridha H, Butler PE. Postoperative monitoring of free flaps in UK plastic surgery units. *Microsurgery.* 2005 Jan;25(6):469–72.
14. Disa JJ, Cordeiro PG, Hidalgo DA. Efficacy of conventional monitoring techniques in free tissue transfer: an 11-year experience in 750 consecutive cases. *Plast Reconstr Surg.* 1999;104(1):97–101.
15. Chubb D, Rozen WM, Whitaker IS, Acosta R, Grinsell D, Ashton MW. The efficacy of clinical assessment in the postoperative monitoring of free flaps: a review of 1140 consecutive cases. *Plast Reconstr Surg.* 2010 Apr;125(4):1157–66.
16. Kraemer R, Lorenzen J, Knobloch K, Papst S, Kabbani M, Koennecker S, et al. Free flap microcirculatory monitoring correlates to free flap temperature assessment. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* Elsevier Ltd; 2011 Oct;64(10):1353–8.
17. Kind GM, Buntic RF, Buncke GM, Cooper TM, Siko PP, Buncke HJ. The effect of an implantable Doppler probe on the salvage of microvascular tissue transplants. *Plast Reconstr Surg.* 1998;101(5):1268–73; discussion 1274–5.

18. Keller A. A new diagnostic algorithm for early prediction of vascular compromise in 208 microsurgical flaps using tissue oxygen saturation measurements. *Ann Plast Surg.* 2009 May;62(5):538–43.
19. Kvarstein G, Barstad M, Mirtaheri P, Tønnessen TI. Tissue carbon dioxide tension: a putative specific indicator of ischemia in porcine latissimus dorsi flaps. *Plast Reconstr Surg.* 2003 Dec;112(7):1825–31.
20. Gimbel ML, Rollins MD, Fukaya E, Hopf HW. Monitoring partial and full venous outflow compromise in a rabbit skin flap model. *Plast Reconstr Surg.* 2009 Sep;124(3):796–803.
21. Jyränki J, Suominen S, Vuola J, Bäck L. Microdialysis in clinical practice: monitoring intraoral free flaps. *Ann Plast Surg.* 2006 Apr;56(4):387–93.
22. Röjdmark J, Ungerstedt J, Blomqvist L, Ungerstedt U, Hedén P. Comparing metabolism during ischemia and reperfusion in free flaps of different tissue composition. *Eur J Plast Surg.* 2014 Apr 9;24(7):349–55.
23. Röjdmark J, Hedén P, Ungerstedt U. Microdialysis - a new technique for free flap surveillance: methodological description. *Eur J Plast Surg.* 1998 Sep 18;21(7):344–8.
24. MIT School of Engineering. How do glucometers work? [Internet]. 2011. Available from: <http://engineering.mit.edu/ask/how-do-glucometers-work>
25. Wikipedia. Glucose meter [Internet]. 2010. Available from: http://en.wikipedia.org/wiki/Glucose_meter
26. Röjdmark J, Hedén P, Ungerstedt U. Comparison of flap ischemia induced by arterial or venous occlusion in pigs with the aid of microdialysis. *Eur J Plast Surg.* 2000 Jul 17;23(5):278–82.

Objetivos

Objetivo Geral

- Avaliar a glicose tecidual de retalhos monopediculados submetidos à oclusão venosa de seu pedículo, em comparação com o controle contralateral.

Objetivos Específicos

- Desenvolver modelo experimental para estudo da oclusão vascular de retalhos utilizando o hemoglicoteste na dosagem de glicose tecidual.
- Confirmar a acurácia do HGT no diagnóstico de oclusão venosa em retalhos monopediculados em ratos.
- Identificar outros parâmetros de avaliação da perfusão tecidual dos retalhos.

Artigo em Português

Detecção precoce de oclusão venosa em retalhos monopediculados utilizando hemoglicoteste - estudo experimental em ratos

Berlim, GL; Oliveira, ACP; Portinho, CP; Morello, E; Barbi, C; Collares MVM

Resumo

Introdução: A monitorização da perfusão dos retalhos é importante para determinar sua viabilidade. A detecção e o tratamento precoce de obstruções vasculares aumentam as chances de sucesso do retalho.

Objetivos: Modificar modelo experimental existente com o uso de hemoglicoteste para medir níveis de glicose em retalhos cirúrgicos. Determinar critérios diagnósticos para hipoperfusão em retalhos.

Materiais e métodos: Foi realizado um estudo experimental em ratos, utilizando hemoglicoteste para a dosagem de glicose em retalhos verticais do reto abdominal com e sem oclusão venosa. Foi testada a acurácia de critérios diagnósticos alternativos para a detecção precoce de hipoperfusão.

Resultados: Houve queda significativa da glicose no retalho congestionado a partir de 15 minutos da oclusão vascular ($p < 0,001$). Utilizando-se diferença entre a glicose do retalho e a sistêmica de 20mg/dl ou mais, aos 30 minutos, a sensibilidade foi de 100% (IC95% 83,89-100,00%) e a especificidade foi de 90% (IC95% 69,90-97,21%).

Discussão: Os resultados obtidos no estudo com hemoglicoteste foram semelhantes aos obtidos com monitores subcutâneos, com um custo menor. No diagnóstico de hipoperfusão, o valor da glicose isoladamente tende a ser menos acurado que um valor que relacione a glicose do retalho com a sistêmica.

Conclusão: Resultados adequados foram obtidos no modelo experimental utilizando o hemoglicoteste. Critérios diagnósticos que comparam a glicose do retalho com a sistêmica foram acurados na avaliação da perfusão tecidual.

Descritores: Glucose; Modelos Animais; Monitoramento; Perfusão; Retalhos Cirúrgicos.

Introdução

A principal complicação de cirurgias que envolvem retalhos é a oclusão de um vaso do pedículo com a subsequente necrose do retalho, ocorrendo em 3 a 7% dos casos, mesmo com apurada técnica cirúrgica. Portanto, a monitorização da perfusão de retalhos é essencial, uma vez que a reintervenção precoce é a melhor opção para salvar um retalho mal perfundido. O diagnóstico de hipoperfusão é usualmente feito através da avaliação clínica do retalho por membro da equipe cirúrgica (1–8).

Vários métodos têm sido estudados com o objetivo de diagnosticar precocemente a oclusão vascular, além de tornar possível a avaliação por outros membros da equipe assistencial. Entre estes estão a medida da temperatura, fluxometria por doppler, oximetria, monitoramento transcutâneo da oxigenação sanguínea e avaliação da glicose e metabólitos teciduais (6,7,9–16).

O método ideal deve ser fácil, rápido, objetivo, não invasivo, ter alta sensibilidade no diagnóstico de má perfusão e ter baixo custo. A medida da glicose e metabólitos teciduais tem se mostrado muito eficiente na avaliação perfusional dos retalhos, porém muitos métodos de dosagem tem um custo

elevado, bem como a necessidade do uso de materiais especiais (14,15,17–20).

O hemoglicoteste, monitor glicêmico convencional, utilizando uma gota de sangue, é um método de baixo custo para a dosagem de glicose, facilmente disponível em qualquer unidade hospitalar.

Materiais e métodos

Foi realizado um estudo experimental, comparativo, controlado.

Animais

O cálculo de tamanho de amostra foi realizado com base nos resultados de um estudo prévio por Sitzman e colaboradores (19). Utilizando um nível de significância de 5% e um poder de 80% para detectar uma diferença entre os grupos de 150mg/dl com desvios padrão conforme os valores obtidos na aferição 15 minutos pós-intervenção no estudo supracitado, a estimativa do cálculo do tamanho amostral foi de dezesseis ratos (trinta e duas observações).

Inicialmente foi realizado um projeto piloto com quatro ratos que, conforme validação, foram incluídos na análise do estudo. Assim, vinte ratos Wistar, machos, com quatro meses de idade, hígidos e pesando em média 400-500 gramas foram utilizados no estudo.

Técnica Operatória

Previamente ao experimento, os animais receberam cloridrato de tramadol (5mg/kg) por via intraperitoneal. Foram submetidos à anestesia geral inalatória, com isofluorano, vaporizado em oxigênio 100%. A dose de isofluorano foi variável, sendo utilizada a menor concentração que mantivesse plano anestésico adequado.

Os animais foram fixados em posição supina sobre placas térmicas, e foi realizada tricotomia da região abdominal. Foram dissecados retalhos miocutâneos verticais baseados nos músculos retos-abdominais (VRAM), bilateralmente, conforme descrito previamente na literatura (21–24). Os retalhos ficaram pediculados exclusivamente nos vasos epigástricos superiores, os quais compõem o pedículo dominante do músculo reto abdominal em ratos (22,23). A cavidade peritoneal foi protegida com um campo plástico para reduzir a perda de calor e ressecamento das vísceras. A dissecação dos pedículos dos retalhos, contendo os vasos epigástricos superiores, foi feita com instrumental microcirúrgico e lupa. Foi gerada uma seqüência aleatória para definir em qual retalho de cada rato seria realizada a intervenção. A seqüência aleatória foi gerada no site www.sealedenvelope.com, como uma seqüência de vinte números, blocos de quatro e dois grupos (esquerdo e direito) (25). O retalho contralateral permaneceu com o pedículo íntegro (figura 1).

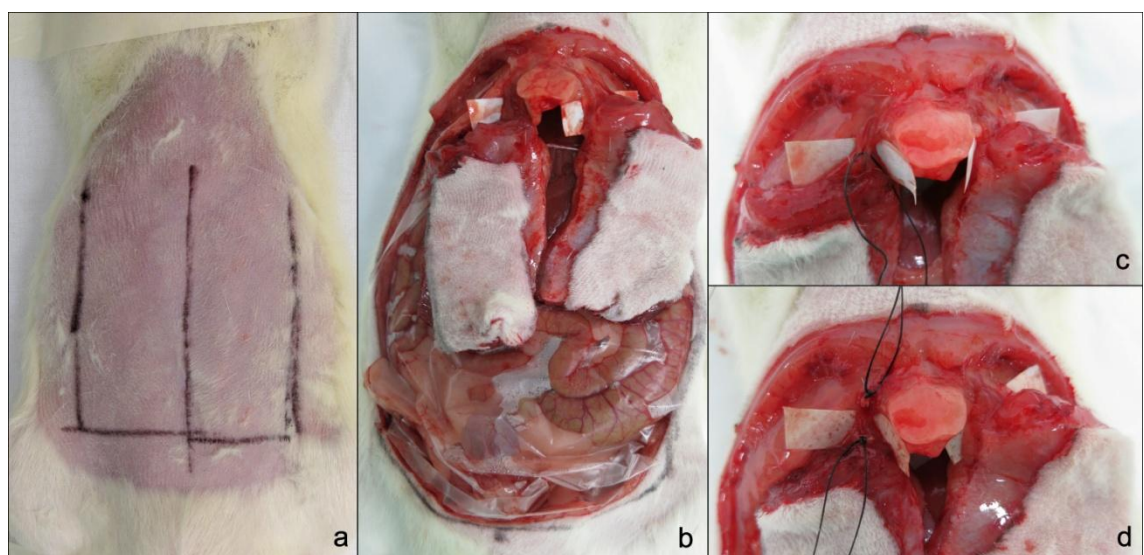


figura 1. a) marcação dos retalhos. b) retalhos dissecados. c) veia epigástrica superior dissecada. d) veia epigástrica superior ligada e seccionada.

Monitorização da Glicose

A glicose intersticial foi aferida em cada retalho de 15 em 15 minutos, a partir do tempo 0 (antes da secção venosa) até 60 minutos. Para a obtenção de uma gota de sangue para a dosagem da glicose, foi realizada uma ferida punctória em uma veia na face posterior do retalho, visível através da serosa. Também foi aferida a glicemia sistêmica do rato nos mesmos tempos, por meio de punção na veia da cauda. A glicose foi dosada com o aparelho MediSense Optimum (Abbott Diabetes Care INC., USA). Este equipamento é um dos modelos disponíveis regularmente em hospitais e laboratórios experimentais.

Eutanásia e Bioética

A eutanásia foi realizada ao término do procedimento com uma sobredose anestésica de isoflurano até a parada cardiorrespiratória e, após, a morte foi confirmada por exanguinação.

Foram observadas todas normas de biossegurança aplicáveis, bem como aspectos éticos pertinentes às pesquisas com animais (26,27).

Análise Estatística

Os valores de glicose são expressos como média \pm desvio padrão. A análise estatística foi realizada utilizando modelo de equações de estimativas generalizadas, em que foram comparados tempos e grupos (retalho congesto, retalho controle e sistêmico) e a interação entre grupos e tempos (28). Para as análises de diagnóstico foi realizada curva ROC (Receiver Operating Characteristic) e calculados valores de sensibilidade e especificidade, bem como seus intervalos de confiança 95%. Valores de p abaixo de 5% foram

considerados significativos. Foram utilizados os programas SPSS versão 22 e WinPEPI versão 11.39.

Resultados

Níveis de Glicose

Vinte animais foram operados com resultados satisfatórios, sendo todos incluídos na análise dos dados. A glicose sistêmica (medida na cauda) permaneceu estável durante o experimento em todos os animais. Previamente à oclusão venosa, a glicose estava similar entre os grupos, apesar de haver uma diferença significativa entre o retalho intervenção ($189,25 \pm 53,47$ mg/dl) e o retalho controle ($210,60 \pm 54,19$ mg/dl). A glicose caiu rapidamente no retalho intervenção após a oclusão venosa e se manteve estável no retalho controle e sistemicamente. A partir do 15º minuto pós-ligadura venosa, a glicose do retalho intervenção foi significativamente inferior ao retalho controle e à glicose sistêmica (figura 2).

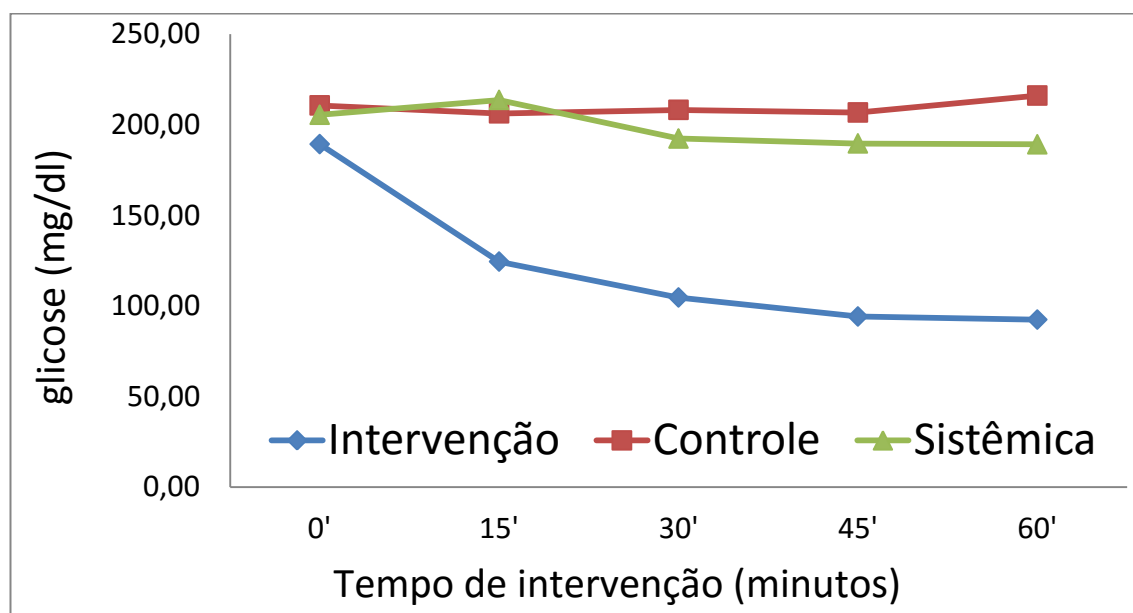


Figura 2. Média dos níveis de glicose.

Em uma análise isolada de cada grupo estudado, foi comparada a glicose previamente à ligadura (tempo 0') com a glicemia nos demais tempos cirúrgicos. No retalho controle e no sangue sistêmico não houve diferença estatisticamente significativa. No retalho intervenção, a glicemia no tempo 0' foi estatisticamente superior à glicemia nos demais tempos.

Diagnóstico de oclusão venosa

Na avaliação da glicose como parâmetro para o diagnóstico de hipoperfusão, foram utilizados os valores aos 30 minutos pós-oclusão venosa, por ser o momento em que os níveis de glicose começaram a se estabilizar no retalho intervenção. Foi calculada uma curva ROC para os valores da glicose, a diferença entre a glicose dos retalhos e a da cauda (retalho - cauda) e a relação da glicose dos retalhos com a da cauda (retalho / cauda). As áreas sob a curva foram, respectivamente, 0,925, 0,975 e 0,980 (figura 3).

Utilizando-se os níveis de glicose no retalho abaixo ou igual a 153 mg/dl como critério diagnóstico, obtém-se uma sensibilidade de 90% (Intervalo de Confiança (IC) 95% 69.90 - 97.21%) e especificidade de 85% (IC 95% 63.96% - 94.76%). Utilizando-se uma diferença de -20 mg/dl ou mais entre a glicose do retalho e da cauda, a sensibilidade é de 100% (IC 95% 83.89 - 100.00%) e a especificidade é de 90.00% (IC 95% 69.90% - 97.21%). Utilizando-se uma relação igual ou inferior a 0,8773 entre a glicose do retalho e da cauda, a sensibilidade é de 95% (IC 95% 76.39 - 99.11%) e a especificidade é de 90% (IC 95% 69.90 - 97.21).

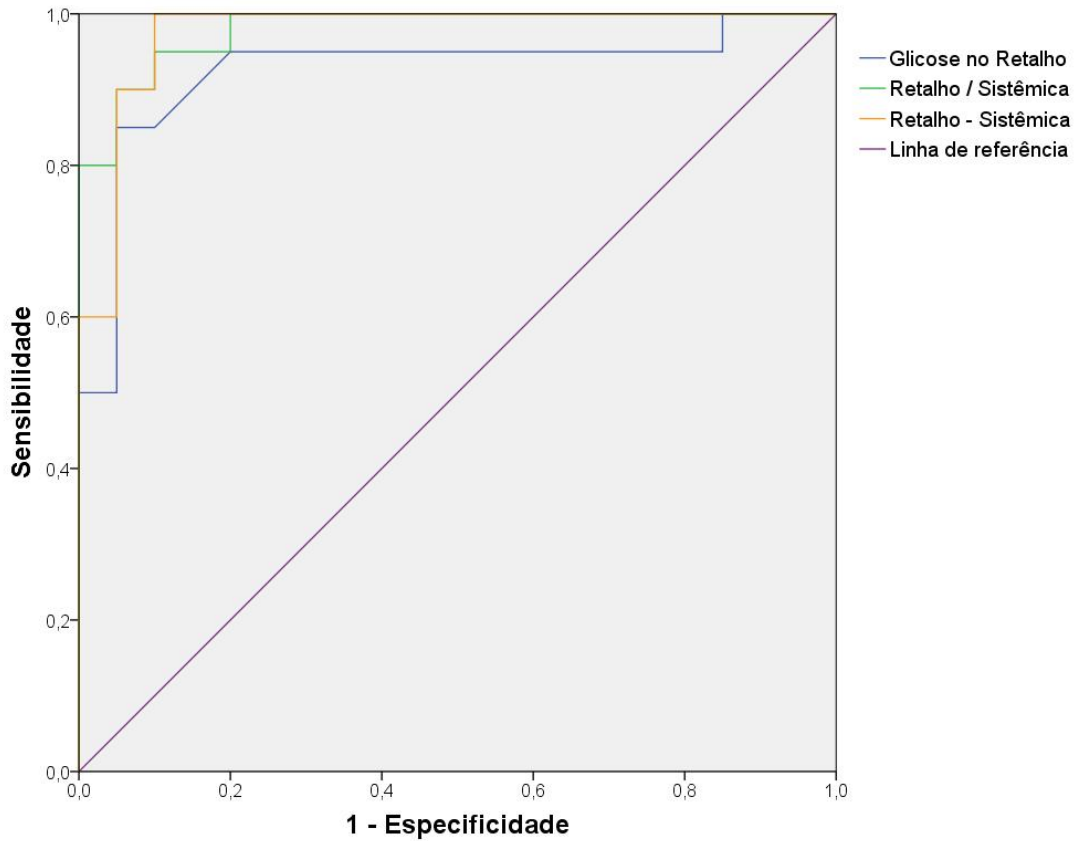


Figura 3. Curva ROC.

Discussão

Modelo experimental

A primeira medida de glicose, denominada tempo 0', foi realizada logo antes da ligadura da veia epigástrica superior. O pedículo do retalho intervenção foi submetido a uma dissecação mais extensa para separar a veia da artéria epigástrica, antes desta ser reparada e seccionada. Esta manipulação pode ter causado uma congestão parcial, por obstrução do fluxo venoso, o que pode ter levado a uma queda na glicose antes da ligadura ser realizada. Isto explicaria o resultado do tempo 0', em que o retalho intervenção foi significativamente mais hipoglicêmico que o retalho controle e a medida

sistêmica. Este pode ser considerado um viés conservador, uma vez que faz com que a magnitude da queda nos níveis de glicose seja menor no grupo intervenção.

Dosagem de glicose

A dosagem da glicose tecidual no retalho VRAM em ratos Wistar com hemoglicoteste foi possível, bem como detectar sua queda em retalhos congestos. Comparando-se a medida de glicose com hemoglicoteste e com monitor implantável de glicose, há limitações do uso do hemoglicotese, bem como detalhes técnicos que devem ser observados. Entretanto, o hemoglicoteste é significativamente mais barato que o monitor subcutâneo e é de mais fácil obtenção.

A principal limitação do uso do hemoglicoteste é que não funciona em retalhos isquêmicos. O retalho isquêmico tem redução no aporte sanguíneo e, conseqüentemente, não sangra. Assim, a ferida punctória com agulha não produz a gota de sangue necessária para a aferição dos níveis de glicose com hemoglicoteste, ou, se produz, é resultado de circulação venosa retrógrada, o que não é representativo da glicose tecidual no retalho (15,19,20).

Foi observado no desenvolvimento deste modelo animal que há pouco ou nenhum sangramento das feridas cutâneas nos ratos Wistar. Para se obter a gota de sangue necessária para a dosagem dos níveis teciduais de glicose, foi realizado ferimento punctório em uma veia superficial na face profunda do retalho.

Em alguns casos o ferimento punctório permaneceu sangrante, sem que isto fosse percebido, uma vez que o sangramento se originava na face que estava em contato com as vísceras. Este sangramento do retalho reduziu a

congestão do mesmo, causando uma melhora em sua perfusão, o que pode ter elevado os níveis de glicose. Este viés foi considerado conservador, uma vez que tende a reduzir o efeito da intervenção. Para evitar este sangramento venoso pode ser necessária a compressão do local da ferida punctória.

A ferida punctória também pode causar sangramento subseroso, uma vez que o retalho é de espessura total e a face profunda é revestida pelo peritônio parietal. Neste caso, houve a formação de hematomas subserosos ou intramusculares. Quando havia hematoma, foi necessário realizar as punções subseqüentes em outro local, frequentemente mais proximal ao pedículo. Na medida em que se aproxima do pedículo vascular, aumenta o calibre dos vasos e há mais chance do ferimento punctório lesar uma artéria, causando um sangramento arterial. A aferição da glicose no sangue arterial do retalho não reflete seu estado metabólico e sim a glicemia sistêmica. Este viés foi considerado conservador, uma vez que também tende a reduzir o efeito da intervenção nos níveis de glicose.

Os resultados obtidos neste estudo são comparáveis aos observados em estudos prévios que utilizaram monitores implantáveis de glicoses ou microdiálise na avaliação dos níveis de glicose em retalhos. Isto valida este modelo experimental como uma alternativa ao uso de tais monitores (14,15,17-20).

Diagnóstico de obstrução vascular no pedículo de retalhos

Alguns estudos clínicos já utilizaram hemoglicoteste para a monitorização da perfusão de retalhos. Ainda assim, há validade em se fazer estudos experimentais, pois há diferenças nos resultados deste estudo comparados com os demais. Na maioria dos trabalhos, é utilizada apenas a dosagem de

glicose no retalho para sua monitorização, enquanto neste foram utilizados parâmetros que comparam a glicose do retalho com a glicose sistêmica, o que foi mais acurado no diagnóstico da perfusão do retalho. É de se supor que o uso de medidas comparativas em outros trabalhos também aumentasse a acurácia no diagnóstico de hipoperfusão nos retalhos.

Neste estudo, tanto o valor absoluto da glicose, como a relação (absoluta e relativa) entre a glicose do retalho e a sistêmica foram muito efetivos no diagnóstico de hipoperfusão do retalho. Entretanto, os critérios que compararam a glicose do retalho com a sistêmica foram mais acurados que a medida isolada da glicose.

Em uma série de 33 retalhos (livres e pediculados), Hara e colaboradores utilizaram hemoglicoteste na monitoração pós-operatória dos pacientes. Utilizaram uma combinação de critérios clínicos e o nível absoluto de glicose no retalho para diagnosticar oclusão do pedículo vascular. Foi calculada a curva ROC e, utilizando-se um ponto de corte de 62mg/dl, a sensibilidade foi de 88% e a especificidade foi 82%. Estes resultados foram menos acurados que os obtidos no presente estudo, quando utilizados parâmetros comparativos com a glicose sistêmica (29).

Millan e colaboradores utilizaram o hemoglicoteste para aferir a glicose tecidual de retalhos livres realizados em 16 pacientes, a cada 3 horas nas primeiras 24 horas de pós-operatório. Cinco pacientes apresentaram trombose venosa do pedículo vascular, detectada por critérios clínicos. A comparação do nível de glicose nestes retalhos com os demais retalhos demonstrou diferenças significativas a partir da 6ª hora de pós-operatório. Apesar disto, os autores concluem que a medida da glicose não foi superior à avaliação clínica no diagnóstico de trombose venosa, com a ressalva de que consideraram

pequeno o número de casos. No presente trabalho, a detecção de hipoperfusão foi muito mais precoce. É possível que medidas mais precoces e freqüentes, comparando a glicose do retalho com a sistêmica, fossem superior à avaliação clínica (30).

Em um estudo multicêntrico realizado na França, Henault e colaboradores avaliaram retalhos livres realizados em 37 pacientes. Foram dosados a glicose e o lactato tecidual com hemoglicoteste e um dosador de lactato, ambos utilizando uma gota de sangue obtida por ferimento punctório. Utilizando-se um nível de glicose inferior a 69,37mg/dl (3.85 mmol/L) associado a um nível de lactato superior a 57.66 mg/dl (6.4 mmol/L), foi calculada uma sensibilidade de 98,5% e uma especificidade de 99,5%. O diagnóstico, com estes critérios, teria sido, em média, 5,4 horas anterior ao diagnóstico clínico de má perfusão. É possível que se obtivesse resultados semelhantes, sem a necessidade de dosar o lactato, se fosse utilizada a metodologia comparativa testada neste estudo (31).

Em um estudo prospectivo, Bashir e colaboradores avaliaram a perfusão de 127 retalhos (44 livres e 83 pediculados) com hemoglicoteste. As medidas iniciaram no pós-operatório imediato e foram repetidas às 6, 12, 24 e 48 horas de pós-operatório. A acurácia diagnóstica foi testada utilizando um ponto de corte de 62mg/dl, baseado na curva ROC calculada e em estudo prévio por Hara e colaboradores (29). Foi observada sensibilidade de 90% e especificidade de 78%. É razoável supor que se fossem utilizados critérios comparativos da dosagem de glicose, resultados mais acurados teriam sido obtidos (32).

Conclusão

A glicose tecidual do retalho VRAM em ratos Wistar pode ser adequadamente dosada com hemoglicoteste. Isto representa uma redução de custo quando comparado a monitores implantáveis de glicose ou técnicas envolvendo microdiálise. O modelo experimental é adequado para avaliar a perfusão de retalhos. O uso de critérios que comparem a glicose dos retalhos e a sistêmica aumenta a acurácia do diagnóstico de hipoperfusão, quando comparado ao valor da glicose no retalho isoladamente.

Fonte de financiamento

O estudo foi financiado pelo Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Bibliografia

1. Glicksman A, Ferder M, Casale P, Posner J, Kim R, Strauch B. 1457 years of microsurgical experience. *Plast Reconstr Surg.* 1997;100(2):355–63.
2. Bui DT, Cordeiro PG, Hu Q-Y, Disa JJ, Pusic A, Mehrara BJ. Free flap reexploration: indications, treatment, and outcomes in 1193 free flaps. *Plast Reconstr Surg.* 2007 Jun;119(7):2092–100.
3. Gill PS, Hunt JP, Guerra AB, Dellacroce FJ, Sullivan SK, Boraski J, et al. A 10-Year Retrospective Review of 758 DIEP Flaps for Breast Reconstruction. *Plast Reconstr Surg.* 2004 Apr;113(4):1153–60.
4. Kroll SS, Schusterman M a, Reece GP, Miller MJ, Evans GR, Robb GL, et al. Timing of pedicle thrombosis and flap loss after free-tissue transfer. *Plast Reconstr Surg.* 1996;98(7):1230–3.

5. Brown J., Devine J., Magennis P, Sillifant P, Rogers S., Vaughan E. Factors that influence the outcome of salvage in free tissue transfer. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2003 Feb;41(1):16–20.
6. Jallali N, Ridha H, Butler PE. Postoperative monitoring of free flaps in UK plastic surgery units. *Microsurgery.* 2005 Jan;25(6):469–72.
7. Disa JJ, Cordeiro PG, Hidalgo DA. Efficacy of conventional monitoring techniques in free tissue transfer: an 11-year experience in 750 consecutive cases. *Plast Reconstr Surg.* 1999;104(1):97–101.
8. Chubb D, Rozen WM, Whitaker IS, Acosta R, Grinsell D, Ashton MW. The efficacy of clinical assessment in the postoperative monitoring of free flaps: a review of 1140 consecutive cases. *Plast Reconstr Surg.* 2010 Apr;125(4):1157–66.
9. Kraemer R, Lorenzen J, Knobloch K, Papst S, Kabbani M, Koennecker S, et al. Free flap microcirculatory monitoring correlates to free flap temperature assessment. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* Elsevier Ltd; 2011 Oct;64(10):1353–8.
10. Kind GM, Buntic RF, Buncke GM, Cooper TM, Siko PP, Buncke HJ. The effect of an implantable Doppler probe on the salvage of microvascular tissue transplants. *Plastic and reconstructive surgery.* 1998. p. 1268–73; discussion 1274–5.
11. Gimbel ML, Rollins MD, Fukaya E, Hopf HW. Monitoring partial and full venous outflow compromise in a rabbit skin flap model. *Plast Reconstr Surg.* 2009 Sep;124(3):796–803.
12. Keller A. A new diagnostic algorithm for early prediction of vascular compromise in 208 microsurgical flaps using tissue oxygen saturation measurements. *Ann Plast Surg.* 2009 May;62(5):538–43.

13. Russell J a, Conforti ML, Connor NP, Hartig GK. Cutaneous tissue flap viability following partial venous obstruction. *Plast Reconstr Surg.* 2006 Jun;117(7):2259–66; discussion 2267–8.
14. Contaldo C, Plock J, Djonov V, Leunig M, Banic A, Erni D. The influence of trauma and ischemia on carbohydrate metabolites monitored in hamster flap tissue. *Anesth Analg.* 2005 Mar;100(3):817–22.
15. Setälä LP, Korvenoja EM-L, Härmä M a, Alhava EM, Uusaro A V, Tenhunen JJ. Glucose, lactate, and pyruvate response in an experimental model of microvascular flap ischemia and reperfusion: a microdialysis study. *Microsurgery.* 2004 Jan;24(3):223–31.
16. Jyränki J, Suominen S, Vuola J, Bäck L. Microdialysis in clinical practice: monitoring intraoral free flaps. *Ann Plast Surg.* 2006 Apr;56(4):387–93.
17. Röjdmark J, Ungerstedt J, Blomqvist L, Ungerstedt U, Hedén P. Comparing metabolism during ischemia and reperfusion in free flaps of different tissue composition. *Eur J Plast Surg.* 2014 Apr 9;24(7):349–55.
18. Röjdmark J, Hedén P, Ungerstedt U. Microdialysis - a new technique for free flap surveillance: methodological description. *Eur J Plast Surg.* 1998 Sep 18;21(7):344–8.
19. Sitzman TJ, Hanson SE, King TW, Gutowski K a. Detection of flap venous and arterial occlusion using interstitial glucose monitoring in a rodent model. *Plast Reconstr Surg.* 2010 Jul;126(1):71–9.
20. Röjdmark J, Hedén P, Ungerstedt U. Comparison of flap ischemia induced by arterial or venous occlusion in pigs with the aid of microdialysis. *Eur J Plast Surg.* 2000 Jul 17;23(5):278–82.
21. Dunn RM, Mancoll J. Flap models in the rat: a review and reappraisal. *Plast Reconstr Surg.* 1992;90(2):319–28.

22. Ozgentaş HE, Shenaq S, Spira M. Development of a TRAM flap model in the rat and study of vascular dominance. *Plast Reconstr Surg.* 1994;94(7):1012–7; 1025–6 discussion.
23. Hallock GG, Rice DC. Physiologic superiority of the anatomic dominant pedicle of the TRAM flap in a rat model. *Plast Reconstr Surg.* 1995;96(1):111–8.
24. Dunn RM, Huff W, Mancoll J. The rat rectus abdominis myocutaneous flap: a true myocutaneous flap model. *Ann Plast Surg.* 1993;31(4):352–7.
25. Sealed Envelope [Internet]. Available from: <https://www.sealedenvelope.com/simple-randomiser/v1/lists>
26. Resource I of LA. Guide for the care and use of laboratory animals. Washington: National Academy Press; 2011.
27. CIOMS. International guiding principles for biomedical research involving animals. *Lives in Balance.* New York: Oxford University Press; 1985. p. 259.
28. Guimarães LS, Hirakata VN. Uso do Modelo de Equações de Estimativas Generalizadas na análise de dados longitudinais. *Rev HCPA.* 2012;32(4):503–11.
29. Hara H, Mihara M, Iida T, Narushima M, Todokoro T, Yamamoto T, et al. Blood glucose measurement for flap monitoring to salvage flaps from venous thrombosis. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* Elsevier Ltd; 2012 May;65(5):616–9.
30. Millan LS, Ishida LC, Choi EMO, Giacchetto Junior EC, Wei TH, Mattar Júnior R, et al. Detection of venous thrombosis in free flaps by measurement of capillary blood glucose. *Reviista Bras Cir Plástica.* 2012;27(4):523–6.

31. Henault B, Pluvy I, Pauchot J, Sinna R, Labruère-Chazal C, Zwetyenga N. Capillary measurement of lactate and glucose for free flap monitoring. *Ann Chir Plast esthétique*. Elsevier Masson SAS; 2014 Mar;59(1):15–21.
32. Bashir MM, Tayyab Z, Afzal S, Khan FA. Diagnostic Accuracy of Blood Glucose Measurements in Detecting Venous Compromise in Flaps. 2015;26(5):1492–4.

Artigo em Inglês

Early detection of venous occlusion in mono-pedicled flaps using a glucometer - an experimental study in rats

Berlim, GL; Oliveira, ACP; Portinho, CP; Morello, E; Barbi, C; Collares MVM

Summary

Background: Flap perfusion monitoring is important to determine its viability. Early detection and treatment of vascular obstructions increase the chances of flap survival.

Objectives: To modify an existing experimental model using a standard glucometer to measure glucose levels on surgical flaps. To determine diagnostic criteria for flap hypoperfusion.

Materials and methods: An experimental study in rats was performed using a glucometer to measure glucose in vertical rectus abdominis flaps in the presence and absence of venous occlusion. The accuracy of alternative diagnostic criteria were tested for early detection of hypoperfusion.

Results: Starting at 15 minutes after venous occlusion, there was a significant drop in glucose measured at the congested flap ($p < 0,001$). Using a 20mg/dl or greater difference in glucose levels between the flap and systemic blood as a diagnostic criteria, at 30 min post occlusion, the sensitivity was 100% (95%CI 83,99-100%) and the specificity was 90% (95%CI 69,90-97,21%) for the diagnosis of flap congestion.

Discussion: The results obtained using a glucometer were similar to the results using a continuous subcutaneous monitor, at a lower cost. In the diagnosis of hypoperfusion, flap glucose levels have a tendency to be less accurate than its comparison to systemic glucose.

Conclusion: Adequate results were obtained with the experimental model using a glucometer. Diagnostic criteria that compare the flap's glucose levels with the systemic levels were accurate in the evaluation of tissue perfusion.

Keywords: Animal Models; Glucose; Monitoring; Perfusion; Surgical Flaps.

Introduction

The most common complication of flap surgery is occlusion of a pedicle vessel with subsequent necrosis of the flap, occurring in 3 to 7% of cases, even with advanced surgical techniques. Therefore, monitorization of flaps perfusion is essential, since early reoperation is the best chance of salvaging a poorly perfused flap. Diagnosis of hypoperfusion is usually done through the clinical evaluation of the flap by a member of the surgical team (1–8).

Many methods have been tested to obtain earlier diagnosis of a flap's pedicle vascular occlusion, as well as to provide an objective evaluation that could be done by other caregivers. Among these are temperature measurement, doppler fluxometry, transcutaneous blood oxigenation measurement and tissue glucose and metabolites levels (6,7,9–16).

The ideal method should be easy, quick, objective, non-invasive, highly sensible in the diagnosis of hypoperfusion and have a low cost. Tissue glucose and metabolites levels have been shown to be highly efficient in the evaluation of flap perfusion, although many measurement methods have a high cost, as well as the need to use special equipment (14,15,17–20).

The regular glucose meter (glucometer), using a drop of blood, is a low cost method for glucose measurement, readily available at any hospital unit.

Materials and methods

An experimental, comparative, controlled study was performed.

Animals

Sample size was calculated based on the results of a previous study by Sitzman et al (19). Using a 5% significance level and a power of 80% to detect a difference between groups of 150mg/dl of glucose, with standard deviations as obtained at 15 minutes post intervention in the previously mentioned study, the sample size estimation was that of 16 rats (32 observations).

A pilot study with four rats was conducted first and, according to validation, the results were included in the final analysis of the data. Therefore, 20 male Wistar rats, four months old, healthy and with an average weight of 400 to 500 grams were used in the study.

Surgical methods

Before the experiment, the animals received tramadol hydrochloride (5mg/kg) intraperitoneally. General inhalatory anesthesia was conducted using isoflurane, vaporized in 100% oxygen, the dosage was variable and the lowest concentration that maintained an adequate anesthetic level was used.

The rats were positioned in a supine position, on thermal plates and abdominal trichotomy was performed. Bilateral vertical rectus abdominis myocutaneous flaps (VRAM) were dissected, according to the techniques previously described in medical literature (21–24). The flaps were pedicled exclusively by the superior epigastric vessels, which is the dominant pedicle in the rat's rectus abdominis muscle (22,23). A plastic surgical drape was used to protect the abdominal cavity and to reduce temperature and humidity loss by

internal organs. Dissection of the pedicle containing the upper epigastric vessels was performed with microsurgical equipment and under magnification. The side in which the epigastric vein underwent ligation and division was defined based on a random sequence previously defined. The random sequence was generated at www.sealedenvelope.com, as a sequence of twenty numbers, in blocks of four numbers and two groups (left and right) (25). The pedicle on the other side remained with its vessels intact (figure 1).

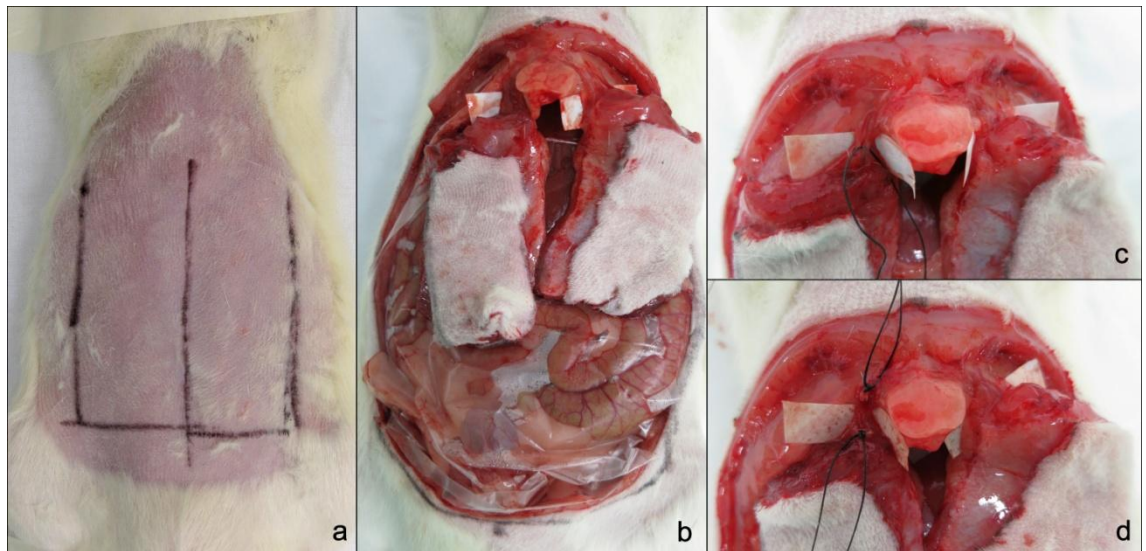


figure 1. a) Flaps outlined. b) Flaps dissected. c) Superior epigastric vein dissected. d) Superior epigastric vein ligated and divided.

Glucose measurement

Interstitial glucose was measured in each flap every 15 minutes, from time 0' (before the ligation and division of the superior epigastric vein) to 60 minutes. To obtain a drop of blood to be used on the glucometer, a puncture wound was performed on a vein on the posterior side of the flap, which were visible through the parietal peritoneum. Systemic glycemia was also measured at the same time intervals, on a caudal vein. Glucose levels were measured using

MediSense Optimum (Abbott Diabetes Care INC., USA) glucometer. This is one of the standard glucometers available at hospitals and experimental laboratories.

Euthanasia and bioethics

Euthanasia was performed at the end of the experiment with an anesthetic overdose of isoflurane, as needed to induce cardiorespiratory arrest and, after that, death was confirmed by exsanguination.

Every applicable biosafety regulations were followed, as well as ethical aspects relevant to animal research (26,27).

Statistical analysis

Glucose levels are expressed as mean \pm standard deviation. Statistical Analysis was performed using a model of general estimating equations, comparing measurement times and groups (congested flap, control flap and systemic control) and the interaction between measurement times and groups (28). For diagnostic analysis, a ROC (Receiver Operating Characteristic) curve was used and sensitivity and specificity values, as well as their 95% confidence intervals were calculated. P values less than 5% were considered significant. Calculations were performed on SPSS v.22 and WinPEPI v.11.39.

Results

Glucose Levels

Twenty rats were successfully operated, results from every one of these were included in data analysis. Systemic glucose (tail measurement) remained stable during the experiment in every animal. Previously to venous occlusion,

glucose was similar in every group, despite the presence of a significant difference between the intervention ($189,25 \pm 53,47$ mg/dl) and control groups ($210,60 \pm 54,19$ mg/dl). Glucose levels fell rapidly following venous occlusion in the intervention group and remained stable on the control group and systemically. Starting at 15 minutes post venous occlusion, flap glucose levels were significantly lower than on the control flap and on the systemic blood (figure 2).

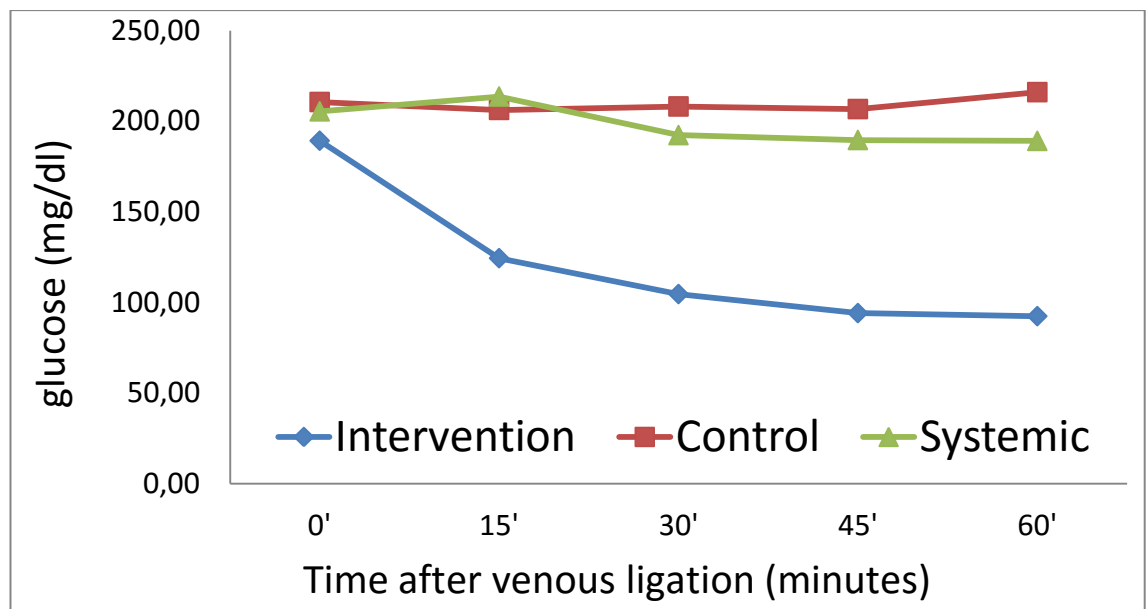


Figure 2. Average glucose levels.

A separate analysis of each group was performed, comparing glucose levels previously to venous obstruction (time 0') to the other measurement times. On the control flap and on systemic blood, there were no statistically significant differences. On the intervention flap, glucose levels before venous ligation and division were statistically superior to levels at every measurement after venous occlusion.

Venous occlusion diagnosis

For the evaluation of glucose levels as a diagnostic test for hypoperfusion, the values at 30 minutes post venous occlusion were used because at that moment the levels started to stabilize on the intervention flap. A ROC curve was calculated for the glucose levels, the difference between glucose levels at the flap and the systemic levels (flap - tail) and the relation between glucose levels at the flap and the systemic levels (flap / tail). The areas under the curve were, respectively, 0,925, 0,975 e 0,980 (figure 3).

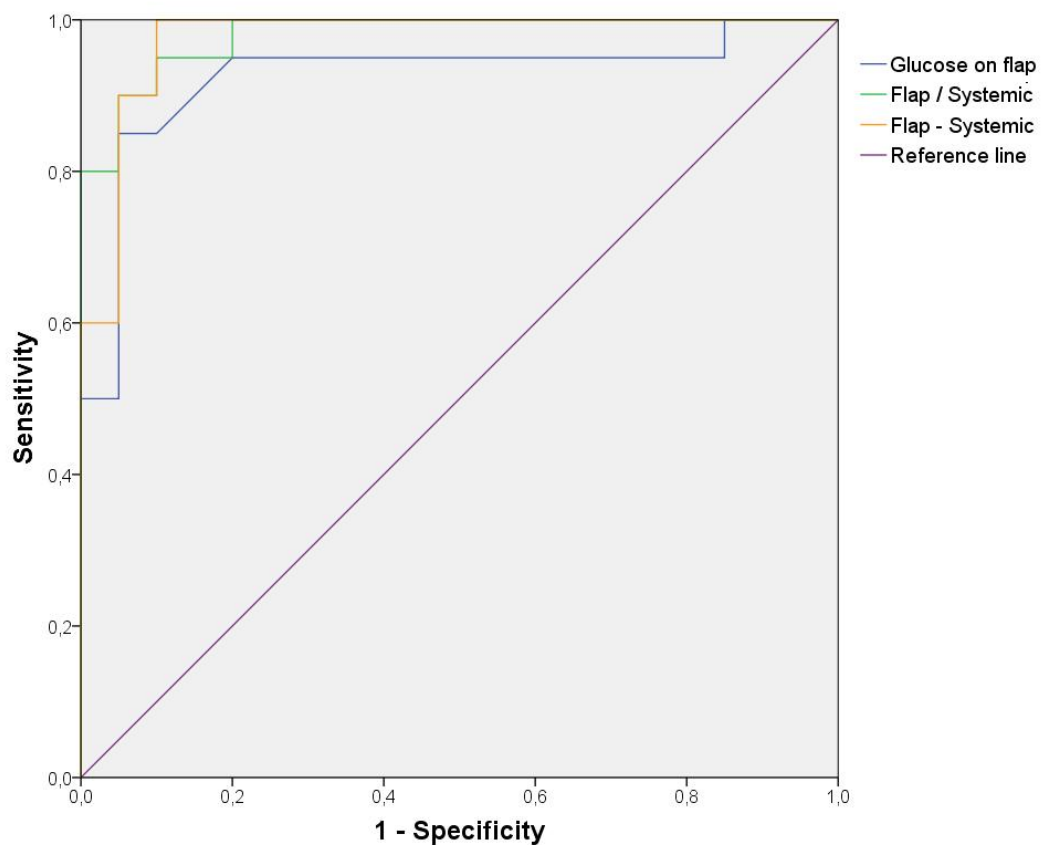


Figure 3. ROC curve.

Using the glucose levels on the flap as a diagnostic test, with a cut-off value set at 153mg/dl, sensitivity was 90% (95% confidence interval, 69.90 to

97.21%) and specificity was 85% (95% confidence interval, 63.96 to 94.76%). Using the difference between the flap's and the systemic glucose levels, with a cut-off value set at -20mg/dl, sensitivity was 100% (95% confidence interval, 83.89 to 100.00%) and specificity was 90% (95% confidence interval, 69.90% to 97.21%). Using the relation between the flap's and the systemic glucose levels, with a cut-off value set at 0,8773, sensitivity was 95% (95% confidence interval, 76.39 to 99.11%) and specificity was 90% (95% confidence interval, 69.90% to 97.21%).

Discussion

Experimental model

The first measurement of glucose levels, time 0', was performed right before ligation and division of the superior epigastric vein. The pedicle of the intervention flap was submitted to a greater extent of dissection, since the vein was isolated from the artery, before being ligated and divided. That may have cause a partial congestion on the flap, as a result of partial venous outflow obstruction, which may have led to a fall on glucose levels prior to ligation and division being performed. This would explain the levels obtained at time 0', in which the intervention flap was significantly more hypoglycemic than the control flap and the systemic measurement. This can be considered a conservative bias, since it reduces the amount of drop on glucose levels on the intervention flap.

Glucose measurement

The measurement of glucose levels on VRAM flaps in Wistar rats was possible using a standard glucometer, as was the detection of a fall on glucose

levels in congested flaps. Comparing glucose measurement with the glucometer to that using an implantable glucose monitor, there are some limitations with the use of a glucometer, as well as some technical aspects that must be observed. In spite of that, the glucometer is significantly less expensive than the implantable monitor and is more readily available.

The main limitation on the use of a glucometer is that it will not work on ischemic flaps. The ischemic flap has less blood inflow and, therefore, will not bleed. As a result, the pinprick will not produce the drop of blood necessary to measure glucose levels with a glucometer. If a drop of blood is produced on a ischemic flap, it is from retrograde venous blood flow, which will not reflect the flap's glucose levels (15,19,20).

As was observed during this study, there is little, if any at all, bleeding on cutaneous wounds on Wistar rats. To obtain a drop of blood for glucose level measurement, a pinprick was performed on a superficial vein on the posterior aspect of the flap.

In some flaps, the pinprick remained bleeding, without that being noticed, since it was on the posterior aspect of the flap, facing the internal organs. This bleeding reduced the congestion on the flap, leading to a better perfusion, which may have elevated glucose levels. This was also considered a conservative bias, since it lessens the consequences of the intervention. To avoid this type of venous bleeding, it may be necessary to apply gentle pressure on the pinprick site.

The pinprick can also cause subserosal bleeding, since it is full thickness flap and it's posterior aspect is lined by parietal peritoneum. In these cases there was subserosal or intramuscular hematoma formation. When a hematoma was present, it was necessary to perform further pinpricks on other sites, often

closer to the pedicle. The closer to the pedicle, the greater the caliber of the blood vessels and greater the chances of an accidental pinprick of an artery, which causes arterial bleeding. Glucose measurement on the flap's arterial blood do not reflect its metabolic state, rather it reflects systemic glucose levels. This bias was considered to be conservative as well, because it reduces the effects of the intervention on glucose levels.

The results obtained on this study are comparable to those observed on previous studies which used implantable glucose monitors or microdialysis for flap glucose level measurement. This validates this experimental model as an alternative to those using such monitors (14,15,17–20).

Venous obstruction diagnosis

Some clinical trials have already used glucometers for the monitorization of flap perfusion. Still, it is valid to perform experimental studies, since there are differences between the results obtained on this study and on clinical trials. On most studies, isolated glucose values on the flap are used for its monitorization, on our study we used diagnostic parameters that compared the glucose levels on the flaps with the systemic glucose levels, which were more accurate on the evaluation of the flap's perfusion. It is reasonable to suppose that the use of comparative glucose levels in other studies would also increase the accuracy in the diagnosis of hypoperfusion on the flaps.

On this study, both the isolated glucose level and the comparison of the flap's glucose levels with the systemic levels (absolute and relative differences) were effective in the diagnosis of flap congestion. Even though, criteria which used comparative glucose levels were more accurate than the use of the isolated glucose levels on the flaps.

In a series of 33 flaps (free and pedicled), Hara et al. used glucometers for the postoperative monitorization of patients. They used a combination of clinical criteria and glucose levels on the flap to diagnose vascular pedicle obstruction. A ROC curve was calculated and, with a cut-off value set at 62mg/dl, sensitivity was 88% and specificity was 82%. These results were less accurate than the ones obtained on our study, with comparative glucose levels diagnostic criteria (29).

Millan et al. used glucometers to measure glucose levels of free flaps performed on 16 patients, every 3 hours during the first 24 hours postoperatively. Five patients had venous thrombosis of the vascular pedicle, diagnosed by clinical criteria. The comparison of glucose levels on these flaps with those on the other flaps showed significant differences after the sixth postoperative hour. Despite this, the authors conclude that glucose levels measurement was not superior to clinical evaluation on the diagnosis of venous thrombosis, although they considered that the number of cases was small. On our study, hypoperfusion detection was made much sooner. It is possible that earlier and more frequent measurements, comparing the glucose levels on the flaps with the systemic levels, would have been superior than clinical evaluation (30).

In a French multicenter study, Henault et al. evaluated free flaps performed in 37 patients. Tissue glucose and lactate were measured with a glucometer and a lactate dosage device, both using a drop of blood obtained by a pinprick. Using cut-off value of 69,37mg/dl for glucose levels and 57.66mg/dl for lactate levels, a sensitivity of 98,5% and a specificity of 99,5% were calculated. Diagnosis, using these criteria, would have been, in average, 5.4 hours earlier to the clinical diagnosis of hypoperfusion. It is possible that similar

results could have been obtained, without the need to measure lactate, if our comparative methodology had been used (31).

In a prospective study, Bashir et al. used glucometers to monitor the perfusion in 127 flaps (44 free and 83 pedicled). Measurements were made immediately after the operation and at 6, 12, 24 and 48 hours postoperatively. Diagnostic accuracy was tested using a cut-off value of 62mg/dl, based on the calculated ROC curve and on previous results by Hara et al.(29). The results were a sensibility of 90% and a specificity of 78%. It is reasonable to suppose that if comparative criteria of glucose levels were used, more accurate results would have been obtained (32).

Conclusion

Tissue glucose levels of VRAM flaps in Wistar rats can be adequately measured with a glucometer. This represents a cost reduction, if compared to implantable glucose monitors or microdialysis. The experimental model was adequate in the evaluation of flap perfusion. The use of a criteria that compares glucose levels on the flaps with the systemic levels increases the accuracy in the diagnosis of hypoperfusion, when compared to the isolated glucose level on the flap.

Financial support

The study was funded by a grant from the Research and Events Incentive Fund (FIPE) of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Bibliography

1. Glicksman A, Ferder M, Casale P, Posner J, Kim R, Strauch B. 1457 years of microsurgical experience. *Plast Reconstr Surg.* 1997;100(2):355–63.
2. Bui DT, Cordeiro PG, Hu Q-Y, Disa JJ, Pusic A, Mehrara BJ. Free flap reexploration: indications, treatment, and outcomes in 1193 free flaps. *Plast Reconstr Surg.* 2007 Jun;119(7):2092–100.
3. Gill PS, Hunt JP, Guerra AB, Dellacroce FJ, Sullivan SK, Boraski J, et al. A 10-Year Retrospective Review of 758 DIEP Flaps for Breast Reconstruction. *Plast Reconstr Surg.* 2004 Apr;113(4):1153–60.
4. Kroll SS, Schusterman M a, Reece GP, Miller MJ, Evans GR, Robb GL, et al. Timing of pedicle thrombosis and flap loss after free-tissue transfer. *Plast Reconstr Surg.* 1996;98(7):1230–3.
5. Brown J., Devine J., Magennis P, Sillifant P, Rogers S., Vaughan E. Factors that influence the outcome of salvage in free tissue transfer. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2003 Feb;41(1):16–20.
6. Jallali N, Ridha H, Butler PE. Postoperative monitoring of free flaps in UK plastic surgery units. *Microsurgery.* 2005 Jan;25(6):469–72.
7. Disa JJ, Cordeiro PG, Hidalgo DA. Efficacy of conventional monitoring techniques in free tissue transfer: an 11-year experience in 750 consecutive cases. *Plast Reconstr Surg.* 1999;104(1):97–101.
8. Chubb D, Rozen WM, Whitaker IS, Acosta R, Grinsell D, Ashton MW. The efficacy of clinical assessment in the postoperative monitoring of free flaps: a review of 1140 consecutive cases. *Plast Reconstr Surg.* 2010 Apr;125(4):1157–66.

9. Kraemer R, Lorenzen J, Knobloch K, Papst S, Kabbani M, Koennecker S, et al. Free flap microcirculatory monitoring correlates to free flap temperature assessment. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. Elsevier Ltd; 2011 Oct;64(10):1353–8.
10. Kind GM, Buntic RF, Buncke GM, Cooper TM, Siko PP, Buncke HJ. The effect of an implantable Doppler probe on the salvage of microvascular tissue transplants. *Plast Reconstr Surg*. 1998;101(5):1268–73; discussion 1274–5.
11. Gimbel ML, Rollins MD, Fukaya E, Hopf HW. Monitoring partial and full venous outflow compromise in a rabbit skin flap model. *Plast Reconstr Surg*. 2009 Sep;124(3):796–803.
12. Keller A. A new diagnostic algorithm for early prediction of vascular compromise in 208 microsurgical flaps using tissue oxygen saturation measurements. *Ann Plast Surg*. 2009 May;62(5):538–43.
13. Russell J a, Conforti ML, Connor NP, Hartig GK. Cutaneous tissue flap viability following partial venous obstruction. *Plast Reconstr Surg*. 2006 Jun;117(7):2259–66; discussion 2267–8.
14. Contaldo C, Plock J, Djonov V, Leunig M, Banic A, Erni D. The influence of trauma and ischemia on carbohydrate metabolites monitored in hamster flap tissue. *Anesth Analg*. 2005 Mar;100(3):817–22.
15. Setälä LP, Korvenoja EM-L, Härmä M a, Alhava EM, Uusaro A V, Tenhunen JJ. Glucose, lactate, and pyruvate response in an experimental model of microvascular flap ischemia and reperfusion: a microdialysis study. *Microsurgery*. 2004 Jan;24(3):223–31.
16. Jyränki J, Suominen S, Vuola J, Bäck L. Microdialysis in clinical practice: monitoring intraoral free flaps. *Ann Plast Surg*. 2006 Apr;56(4):387–93.

17. Röjdmark J, Ungerstedt J, Blomqvist L, Ungerstedt U, Hedén P. Comparing metabolism during ischemia and reperfusion in free flaps of different tissue composition. *Eur J Plast Surg*. 2014 Apr 9;24(7):349–55.
18. Röjdmark J, Hedén P, Ungerstedt U. Microdialysis - a new technique for free flap surveillance: methodological description. *Eur J Plast Surg*. 1998 Sep 18;21(7):344–8.
19. Sitzman TJ, Hanson SE, King TW, Gutowski K a. Detection of flap venous and arterial occlusion using interstitial glucose monitoring in a rodent model. *Plast Reconstr Surg*. 2010 Jul;126(1):71–9.
20. Röjdmark J, Hedén P, Ungerstedt U. Comparison of flap ischemia induced by arterial or venous occlusion in pigs with the aid of microdialysis. *Eur J Plast Surg*. 2000 Jul 17;23(5):278–82.
21. Dunn RM, Mancoll J. Flap models in the rat: a review and reappraisal. *Plast Reconstr Surg*. 1992;90(2):319–28.
22. Ozgentaş HE, Shenaq S, Spira M. Development of a TRAM flap model in the rat and study of vascular dominance. *Plast Reconstr Surg*. 1994;94(7):1012–7; 1025–6 discussion.
23. Hallock GG, Rice DC. Physiologic superiority of the anatomic dominant pedicle of the TRAM flap in a rat model. *Plast Reconstr Surg*. 1995;96(1):111–8.
24. Dunn RM, Huff W, Mancoll J. The rat rectus abdominis myocutaneous flap: a true myocutaneous flap model. *Ann Plast Surg*. 1993;31(4):352–7.
25. Sealed Envelope [Internet]. Available from: <https://www.sealedenvelope.com/simple-randomiser/v1/lists>
26. Resource I of LA. Guide for the care and use of laboratory animals. Washington: National Academy Press; 2011.

27. CIOMS. International guiding principles for biomedical research involving animals. *Lives in Balance*. New York: Oxford University Press; 1985. p. 259.
28. Guimarães LS, Hirakata VN. Uso do Modelo de Equações de Estimativas Generalizadas na análise de dados longitudinais. *Rev HCPA*. 2012;32(4):503–11.
29. Hara H, Mihara M, Iida T, Narushima M, Todokoro T, Yamamoto T, et al. Blood glucose measurement for flap monitoring to salvage flaps from venous thrombosis. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. Elsevier Ltd; 2012 May;65(5):616–9.
30. Millan LS, Ishida LC, Choi EMO, Giacchetto Junior EC, Wei TH, Mattar Júnior R, et al. Detection of venous thrombosis in free flaps by measurement of capillary blood glucose. *Revista Bras Cir Plástica*. 2012;27(4):523–6.
31. Henault B, Pluvy I, Pauchot J, Sinna R, Labrière-Chazal C, Zwetyenga N. Capillary measurement of lactate and glucose for free flap monitoring. *Ann Chir Plast esthétique*. Elsevier Masson SAS; 2014 Mar;59(1):15–21.
32. Bashir MM, Tayyab Z, Afzal S, Khan FA. Diagnostic Accuracy of Blood Glucose Measurements in Detecting Venous Compromise in Flaps. 2015;26(5):1492–4.