

Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina por iontoforese na viabilidade de retalho cutâneo randômico em ratos¹

Calcitonin gene-related peptide by iontophoresis on the viability of the random skin flaps in rats

Ivaldo Esteves Junior², Lydia Masako Ferreira³, Richard Eloin Liebano²

1. Trabalho da Disciplina de Cirurgia Plástica da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina (UNIFESP-EPM).
2. Mestre em Ciências Básicas pelo Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica Reparadora UNIFESP-EPM.
3. Professora Titular da Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP-EPM.

RESUMO

Objetivo: Investigar o efeito da administração tópica do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) por iontoforese na viabilidade de retalho cutâneo randômico em ratos. **Métodos:** Sessenta ratos Wistar EPM-1, adultos e machos foram submetidos a retalho cutâneo randômico. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos. Nos animais do grupo 1 (controle, n=15) realizou-se simulação de estímulo elétrico, no grupo 2 (iontoforese placebo, n=15) os animais foram submetidos à corrente contínua, no grupo 3 (controle de absorção, n=15) os animais receberam simulação de estímulo elétrico com CGRP e, por fim os animais do grupo 4 (tratado, n=15) foram tratados com iontoforese de CGRP. Em todos os grupos estes procedimentos foram realizados imediatamente após a técnica operatória e nos dois dias subsequentes. A porcentagem da área de necrose foi avaliada no sétimo dia de pós-operatório. **Resultados:** A média das porcentagens das áreas de necrose foram: grupo 1- 48%, grupo 2 – 51%, grupo 3 – 46% e, grupo 4 – 28%. A análise estatística, através do teste de Kruskal-Wallis, evidenciou diferença significativa ($p<0,001$). **Conclusão:** a administração tópica de CGRP por iontoforese é eficaz em aumentar a viabilidade de retalho cutâneo randômico em ratos.

Descritores: Receptores Cgrp. Retalhos cirúrgicos. Iontoforese. Ratos.

ABSTRACT

Purpose: Assess the effect of the local administration of calcitonin gene-related peptide (CGRP) by iontophoresis on the viability of random skin flap in rats. **Methods:** Sixty Wistar-EPM 1 rats were submitted to dorsal skin flap of cranial base 10 x 4 cm with interposition of a plastic barrier between the skin flap and the donor site. The animals were randomly distributed in four groups (n = 15 in each group) and were treated as follows: in group 1 (control), animals were submitted to a simulation of electrical current for 20 minutes; group 2, (iontophoresis placebo) animals were submitted to direct current of 4mA amplitude for 20 minutes; group 3 (absorption control) receive simulation of electrical current for 20 minutes with CGRP on one of the electrodes; group 4 (iontophoretically treated) treated by iontophoresis with CGRP. In all groups the procedures were performed immediately after the surgery and the two subsequent days. **Results:** The percentage of the necrosis area was calculated in all groups on the seventh postoperative day and results were as follows: group 1- 48%; group 2 – 51%; group 3 – 46% and group 4 – 28%. The statistical analysis presented significant difference when the comparison of group 4 to the other groups. **Conclusion:** The topical administration of the CGRP by iontophoresis is efficient to increase the viability of the random skin flap random in rats.

Key words: Receptors, Calcitonin Gene-Related Peptide. Surgical Flaps. Iontophoresis. Rats.

Introdução

A Cirurgia Plástica é uma especialidade que, com frequência, utiliza-se em seu arsenal terapêutico dos retalhos cutâneos, principalmente nas cirurgias reconstrutoras. Porém,

falhas na transferência do retalho podem ocorrer, culminando, não raro, com o insucesso do tratamento proposto. Os eventos que levam à diminuição na área de viabilidade do retalho podem

ser atribuídos a uma série de fatores extrínsecos e intrínsecos. Os fatores extrínsecos incluem condições sistêmicas (infecção, inflamação, arteriosclerose, hipotensão e má-nutrição) e causas locais (compressão, tensão, trombos ou torção no pedículo) que, contrastam diretamente com o único fator intrínseco associado, a insuficiência arterial do retalho. Esta complicação seria explicada pela secção de vasos cutâneos e de terminais nervosos simpáticos, à elevação do retalho, que provocariam a diminuição do fluxo sanguíneo ao longo do mesmo¹.

Trabalhos que investigaram técnicas relacionadas ao aumento do aporte sanguíneo com o intuito de melhorar a condição isquêmica do retalho e, logo, aumentar a área de viabilidade deste, foram publicados²⁻⁸. Alguns destes utilizaram-se de correntes elétricas e, seus resultados baseiam-se em duas teorias hipotéticas: a primeira seria a inibição de fibras simpáticas vasoconstritoras e, a segunda e mais aceita, seria a liberação de alguns neuropeptídeos como a substância P e o CGRP, que são encontrados nas terminações das fibras nervosas do tipo C e seriam liberadas através de estimulação elétrica antidrômica^{6,8}.

Outros autores têm investigado o papel do CGRP (8-37), antagonista do CGRP, que gera a diminuição dos efeitos do último e, com isto, diminuição da capacidade local na melhora da vascularização perante os tratamentos propostos^{5,6,9}.

O CGRP é uma substância endógena descrita como um potente vasodilatador^{10,11}, encontra-se na maior parte das lesões tissulares atuando, com efeito, regulador na isquemia¹¹ e, sua eficácia em aumentar a área de viabilidade de retalhos cutâneos pode ser observada quando administrada sistemicamente^{2,3,5,7}.

A iontoforese é um recurso que foi descrito pela primeira vez há quase um século e usada como intervenção clínica há mais de 40 anos. Como muitas intervenções terapêuticas, existem poucos estudos de pesquisas experimentais que mostrem seus efeitos, restringindo-se a relatos de casos e comentários clínicos. Iontoforeses é a transmissão de íons através da pele intacta, com introdução de substâncias sob a pele com fins terapêuticos, através da utilização de uma elétrica contínua. Caracteriza-se, assim, como técnica de aplicação tópica, podendo gerar seus efeitos locais sem possíveis e talvez indesejáveis alterações sistêmicas. Atualmente o uso desta técnica vem ressurgindo^{4,12} e, oferece promessa de eficácia terapêutica e de custos.

Logo, o objetivo deste estudo foi investigar o efeito da administração tópica do CGRP por iontoforese na viabilidade do retalho cutâneo randômico em ratos.

Métodos

Sessenta ratos Wistar-EPM1, adultos e machos pesando entre 320 e 356 g foram utilizados neste experimento. Estes foram mantidos em gaiolas individuais com temperatura ambiente entre 23° e 25° C e, com ciclos de 12 horas em claro/escuro recebendo ração comercial e água *ad libitum*.

Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de Cloridrato de Tiletamina (25mg/kg) e Cloridrato de Zolazepan (25mg/kg) previamente ao ato operatório e durante

as sessões de tratamento. Após a indução anestésica os animais foram posicionados em superfície plana com extensão dos membros e realizou-se subsequente tricotomia digital no dorso dos mesmos. Em seguida, o retalho cutâneo randômico de base cranial, com dimensões de 10 cm de comprimento e 4 cm de largura, foi demarcado, respeitando-se como limites os ângulos inferiores das escápulas e os ossos superiores da cintura pélvica. Os retalhos foram elevados do dorso dos animais, seguindo modelo experimental^{13,14} e, continham a fáscia superficial, panículo carnoso, tecido subcutâneo e pele, estes foram colocados na mesma posição com interposição de uma barreira plástica com as mesmas dimensões (10 X 4 cm). A sutura foi realizada através de pontos simples com fio de náilon monofilamentar 4-0 de 1 em 1 cm.

Estes animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos de 15 animais cada. Os animais do grupo 1 foram utilizados como controle recebendo colocação dos eletrodos (3,0x 5,0 cm), do eletroestimulador (EGF, Carci®, São Paulo, Brasil), na base do retalho e no abdome sendo, que o eletrodo da base foi conectado ao ânodo (positivo) e o do abdome ao cátodo (negativo), entre os eletrodos e a pele dos animais foram interpostas almofadas de gaze umedecidas com 4ml de solução fisiológica (SF) e, estas permaneceram nesta posição durante 20 minutos, porém sem a emissão de qualquer estímulo pelo eletroestimulador. Nos animais do grupo 2 os mesmos procedimentos do grupo 1 foram realizados e, nestes o eletroestimulador emitiu corrente contínua com amplitude de 4mA. Os animais do grupo 3 foram, também, submetidos aos mesmos procedimentos realizados no grupo 1, substituindo-se a SF, encontrada na almofada de gaze sob o eletrodo positivo, por 4 ml de CGRP (Tocris Kooockson Inc., Missouri, USA) diluído em SF à concentração de 10⁻⁶ M. Nos animais do grupo 4 o mesmo tratamento realizou-se em relação aos animais do grupo 3 sendo que o eletroestimulador emitiu a corrente contínua com amplitude de 4 mA por 20min. Estes procedimentos realizaram-se imediatamente após a técnica operatória e nos dois dias subsequentes.

A porcentagem da área de necrose dos retalhos foi verificada no sétimo dia de pós-operatório por meio do método de gabarito de papel¹⁵, salientando-se que todos os procedimentos de tratamento e de avaliação foram realizados em estudo duplo cego.

Para se avaliar as possíveis diferenças quanto à porcentagem da área de necrose entre esses mesmos grupos utilizou-se o teste não paramétrico para "k" amostras independentes de Kruskal-Wallis, complementado pelo teste de comparações múltiplas. O nível de rejeição para a hipótese de nulidade foi fixado sempre em um valor menor ou igual a 0,05 (5%).

Resultados

A média das porcentagens da área de necrose dos retalhos nos ratos foi de: grupo 1 - 48 %; grupo 2 - 51 %; grupo 3 - 46 % e grupo 4 - 28 %.

O teste de Kruskal-Wallis evidenciou diferença estatisticamente significativa entre os grupos (p<0,001) com G4<

G3,G2,G1(Figura 1).

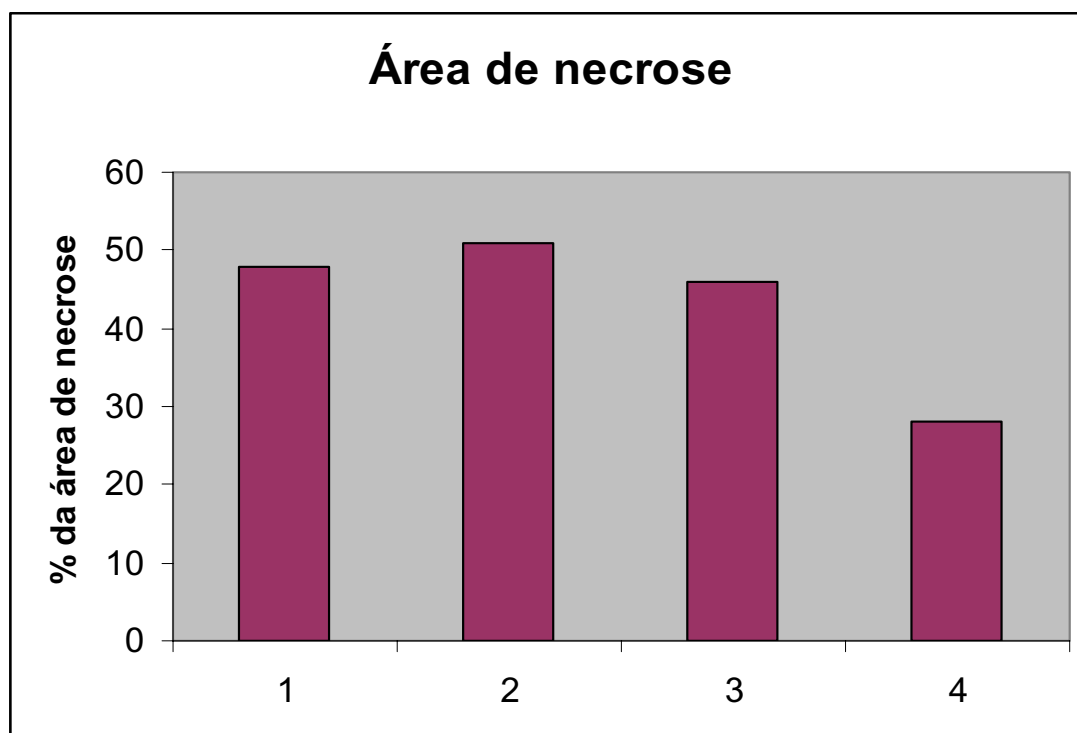


FIGURA 1 – Área de necrose do retalho cutâneo: grupo controle (1), grupo iontoforese placebo (2), grupo controle de absorção (3) e, grupo tratado (4), n=15 em cada grupo.

Discussão

Os eventos fisiopatológicos que ocorrem na porção distal do retalho cutâneo ainda não são precisamente entendidos, porém a diminuição do fluxo sanguíneo e, logo, a insuficiência arterial do retalho aparece como a principal causa de necrose e perda deste. Kerrigan² sugere que modalidades terapêuticas que aumentem o fluxo sanguíneo para o retalho cutâneo ou estabilizem a membrana celular do tecido isquêmico devem ser abordadas.

Embora é sabido que a pele do porco é a que mais se assemelha à humana o modelo de retalho cutâneo em ratos foi adotado devido a facilidade na obtenção e no manuseio além de baixo custo deste animal.

Neste estudo, foi utilizado o modelo de retalho cutâneo dorsal de base cranial, com dimensões de 10x4 cm, desenvolvido por McFarlane e col.¹³ como modelo experimental para se estudar a necrose e prevenção da mesma. Uma barreira plástica impermeável, de mesmas dimensões do retalho, foi interposta entre este e o leito doador a fim de se impedir a revascularização através de vasos do leito, garantindo assim condições homogêneas de isquemia e necrose^{16,17}.

O método de gabarito de papel descrito por Sasaki, Pang¹⁵ foi utilizado para se avaliar a área de necrose, principalmente, por expressar confiabilidade, com erro < 5%, além de possuir rápida e fácil aplicabilidade⁸.

Os resultados encontrados neste trabalho mostraram

similaridade com aqueles que utilizaram administração sistêmica de CGRP^{2,3,5,7}, bem como com aqueles que se utilizaram estimulação elétrica pura^{6,8}, sendo que os últimos relacionam seus resultados satisfatórios, em relação ao aumento na área de viabilidade do retalho cutâneo, à liberação local de CGRP, contudo a proposta terapêutica aqui abordada administra tal substância de forma tópica, independente de possíveis fatores que venham a impedir a administração sistêmica deste vasodilatador.

O procedimento iontoforético apresentou como parâmetros amplitude de 4mA durante 20 minutos de tratamento em observação ao trabalho de Asai e col.⁴ na administração da prostaglandina E1. Esta dose foi eficaz em ambos os procedimentos, porém não vem a confirmar que esta é a melhor dose para a administração destas substâncias ou de qualquer outra sendo, que novos estudos de parâmetros para o procedimento iontoforético podem vir a auxiliar em pesquisas na área.

O eletrodo posicionado na base do retalho foi utilizado como eletrodo de administração, ou ativo, e, este foi conectado ao ânodo do eletroestimulador, pois o CGRP é um cátion¹². Desta forma a força motriz da iontoforese pode ser gerada por repulsão de cargas iguais.

O CGRP foi utilizado à concentração de 10⁻⁶ M, pois, na literatura por nós pesquisada⁷, esta demonstrou melhores

resultados em se aumentar a área de viabilidade de retalhos cutâneos experimentais. Contudo, vale ressaltar que esta foi a concentração mais alta do estudo de Jansen e col.⁷ sugerindo que concentrações mais altas que estas podem ser mais eficientes.

Novos estudos podem surgir vindo a corroborar com estas questões e, logo, contribuindo a esta área da cirurgia que vem acolhendo os recursos físicos como coadjuvante.

Conclusão

A administração tópica de CGRP por iontoforese é eficaz em aumentar a viabilidade do retalho cutâneo randômico em ratos.

Referências

1. Kerrigan CL. Skin flap failure: pathophysiology. *Plast Reconstr Surg.* 1983; 72(6): 766-77.
2. Kjartansson J, Dalsgaard CJ. Calcitonin gene-related peptide increases survival of a musculocutaneous critical flap in the rat. *Eur J Pharmacol.* 1987; 142(3): 355-8.
3. Kjartansson J, Lundeberg T, Samuelson UE, Dalsgaard CJ, Heden P. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) and transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) increase cutaneous blood flow in a musculocutaneous flap in the rat. *Acta Physiol Scand.* 1988; 134(1): 89-94.
4. Asai S, Fukuta K, Torii S. Topical administration of prostaglandin E1 with iontophoresis for skin flap viability. *Ann Plast Surg.* 1997; 38(5): 514-7.
5. Gherardini G, Gurleck A, Milner SM, Matarasso A, Evans GR, Jernbeck J, Lundeberg T. Calcitonin gene-related peptide improves skin flap survival and tissue inflammation. *Neuropeptides* 1998; 32(3): 269-73.
6. Gherardini G, Lundeberg T, Cui JG, Eriksson SV, Trubek S, Linderöth B. Spinal cord stimulation improves survival in ischemic skin flaps: an experimental study of the possible mediation by calcitonin gene-related peptide. *Plast Reconstr Surg.* 1999; 103(4): 1221-8.
7. Jansen GB, Torkvist L, Lofgren O, Raud J, Lundeberg T. Effects of calcitonin gene-related on tissue survival, blood flow and neutrophil recruitment in experimental skin flaps. *Br J Plast Surg.* 1999; 52(4): 299-303.
8. Liebano RE, Ferreira LM, Neto MS. The effect of trans-cutaneous electrical nerve stimulation on the viability of random skin flaps in rats. *Can J Plast Surg.* 2002; 10(4): 151-4.
9. Chu DQ, Legon S, Smith DM, Costa SK, Cuttitta F, Brain SD. The calcitonin gene-related peptide (CGRP) antagonist CGRP (8-37) blocks vasodilatation in inflamed rat skin: involvement of adrenomedullin in addition to CGRP. *Neurosci Lett.* 2001; 310(2-3): 169-72.
10. Brain SD, Williams TJ, Tippins JR, Morris HR, MacIntyre I. Calcitonin gene-related peptide is potent vasodilator. *Nature* 1985; 313(5997): 54-6.
11. Gherardini G, Evans GR, Theodorsson E, Gurleck A, Milner SM, Palmer B, Lundeberg T. Calcitonin gene-related peptide in experimental ischemia. Implication of an endogenous anti-ischemic effect. *Ann Plast Surg.* 1996; 36(6): 616-20.
12. Gherardini G, Gurleck A, Evans GR, Milner SM, Matarasso A, Wassler M, Jernbeck J, Lundeberg T. Venous Ulcers: improved healing by iontophoretic administration of calcitonin gene-related and vasoactive intestinal polypeptide. *Plast Reconstr Surg.* 1998; 101(1): 90-3.
13. McFarlane RM, Deyoung G, Henry RA. The design of a pedicle flap in the rat to study necrosis and its prevention. *Plast Reconstr Surg.* 1965; 35: 177-82.
14. Liebano RE, Ferreira LM, Sabino Neto M. Modelo experimental para estimulação elétrica nervosa transcutânea em retalho cutâneo randômico isquêmico em ratos. *Acta Cir Bras.* 2003; 18: 54-9.
15. Sasaki GH, Pang CY. Hemodynamics and viability of acute neurovascular island skin flaps in rats. *Plast Reconstr Surg.* 1980; 65(2): 152-8.
16. Korlof B, Ugland O. Flaps and flap necrosis. Improving the circulation in skin flaps with Complamin and with Dicoumarol: animal experiments *Acta Chir Scand.* 1966; 131(5): 408-12.
17. Kaufman T, Angel MF, Eichenlaub EH, Levin M, Hurwitz DJ, Futrell JW. The salutary effects of the bed on the survival of experimental flaps. *Ann Plast Surg.* 1985; 14(1): 64-73.

Correspondência:

Ivaldo Esteves Junior
Rua Napoleão de Barros, 715/4º andar
04024-900 São Paulo – SP
Tel: (11)5576-4118
Fax: (11)5571-6579
sandra.dcir@epm.br
ivaldofisio@ig.com.br

Conflito de interesse: nenhum

Fonte de financiamento: Capes

Recebimento: 25/08/2004

Revisão: 20/09/2004

Aprovação: 18/10/2004

Como citar este artigo:

Esteves Junior I, Ferreira LM, Liebano RE. Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina por iontoforese na viabilidade de retalho cutâneo randômico em ratos. *Acta Cir Bras* [serial online] 2004 Nov-Dez;19(6). Disponível em URL: <http://www.scielo.br/acb> [também em CD-ROM].

*Figura colorida disponível em www.scielo.br/acb