

“*Hirudo medicinalis*” (sanguessuga): eficácia do seu uso no tratamento da insuficiência venosa em retalhos epigástricos de ratos*

“*Hirudo medicinalis*” (leech): their effective use in venous compromised rat epigastric flaps

ANTONIO LOURENÇO SEVERO¹, ANTONIR NOLLA², RICARDO DEBONA³, JOHN OVIEDO⁴, JANAÍNE BORTOLIN⁵, PAULO CÉSAR FAIAD PILUSKI⁶, OSVANDRÉ LECH⁷

RESUMO

Objetivo: Demonstrar a eficácia do uso de sanguessugas (*Hirudo medicinalis*) na insuficiência venosa nos retalhos epigástricos em ilha, utilizando ratos Wistar. **Métodos:** Em 23 ratos foram realizados retalhos epigástricos bilateralmente, criando uma oclusão venosa de seis horas em ambos. Em um dos retalhos foi aplicado o tratamento com a sanguessuga de maneira randomizada, enquanto o lado contralateral serviu como controle. Foram analisados o

número de retalhos sobreviventes e necrosados, o tempo de sucção e de sangramento após a mordida da sanguessuga. **Resultados:** O número de retalhos que sobreviveram com o uso de sanguessugas foi significativamente superior quando comparado com o grupo de controle, respectivamente, 86,97% e 52,18% ($n = 23$, $p < 0,0134$, teste z de proporção). O tempo médio de sucção foi de 92 minutos (mínimo de 14 minutos e máximo de 186 minutos, $n = 23$) e o tempo de sangramento, em média, de 63 minutos (mínimo de 17 minutos e máximo de 157 minutos), não sendo estatisticamente significante ($p < 0,32$ pelo teste t de Student). **Conclusão:** O uso de sanguessugas melhorou a sobrevivência de retalhos com isquemia venosa de seis horas em modelo experimental em ratos.

Descritores – *Hirudo medicinalis*; Insuficiência venosa; Ratos Wistar; Sanguessugas; Isquemia

ABSTRACT

Objective: To show the effectiveness of using leeches (*Hirudo medicinalis*) in venous compromised island epigastric flaps using Wistar rats. **Methods:** Island epigastric flaps were performed bilaterally in 23 rats to create a six hour venous occlusion in both flaps. In one of the flaps, leech treatment was randomly applied, and the other side served as control. An analysis was made of the number of surviving and necrosed flaps, the time of suction and of bleeding after the leech bite. **Results:** The number of surviving flaps after the leech treatment was significantly higher when compared to the control group, respectively 86.97% and 52.18% ($n = 23$, p

* Trabalho realizado no Instituto de Ortopedia e Traumatologia – IOT – Passo Fundo (RS), Brasil.

1. Mestre em Biomecânica; Médico Instrutor da Residência Médica Instituto de Ortopedia e Traumatologia – IOT – Passo Fundo (RS), Brasil.
2. Residente (R4) do Serviço de Membro Superior e Microcirurgia do Instituto de Ortopedia e Traumatologia – IOT – Passo Fundo (RS), Brasil.
3. Residente Instituto de Ortopedia e Traumatologia – IOT – Passo Fundo (RS), Brasil.
4. Residente (R4) do Serviço de Membro Superior e Microcirurgia Instituto de Ortopedia e Traumatologia – IOT – Passo Fundo (RS), Brasil.
5. Bióloga, Mestre em Agronomia pela Universidade de Passo Fundo – UPF – Passo Fundo (RS), Brasil.
6. Médico Instrutor da Residência Médica do Instituto de Ortopedia e Traumatologia – IOT – Passo Fundo (RS), Brasil.
7. Chefe do Programa de Residência Médica e do Treinamento Pós-residência do Instituto de Ortopedia e Traumatologia – IOT – Passo Fundo (RS), Brasil.

Endereço para correspondência: IOT – Instituto de Ortopedia e Traumatologia de Passo Fundo, Rua Independência, 889 – 99010-041 – Passo Fundo (RS), Brasil. Tel.: (54) 3045-2000. E-mail: iot@tpo.com.br, ombromao@iotrs.com.br
Recebido em 15/8/06. Aprovado para publicação em 17/5/07.
Copyright RBO2007

< 0.0134 , z proportion test). The mean suction time was 92 minutes (minimum 14 minutes and maximum 186 minutes, $n = 23$) and the mean bleeding time was 63 minutes (minimum 17 minutes and maximum 157 minutes), which was not statistically significant ($p < 0.32$, t Student test). **Conclusion:** The use of leeches improved the survival of flaps with 6 hour venous ischemia in an experimental model in rats.

Keywords – *Hirudo medicinalis*; Venous insufficiency; Rats, Wistar; Leeches; Ischemia

INTRODUÇÃO

Sanguessugas são anelídeos hematófagos parasitas que foram utilizados em vários procedimentos médicos no passado. Na Medicina anglo-saxônica, os médicos, inclusive, tinham o codinome de sanguessugas em virtude da importância desses seres na prática médica antiga. Nicander de Colofon (200-130 a.C.) foi, provavelmente, o primeiro médico a utilizar sanguessugas com fins terapêuticos. O uso delas em sangramento foi promulgado no conceito humoral de doença proposto por Galeno no segundo século⁽¹⁻²⁾. Em 1976, nos Estados Unidos da América, foi criada uma lei provisória para a comercialização das sanguessugas (*Hirudo medicinalis*), mas a aprovação pelo FDA (Food and Drug Administration) só ocorreu em 2004^(3,4), permitindo o seu uso como um instrumental médico para o tratamento de insuficiências venosas.

Outras espécies são usadas na Medicina, como a *H. troctina*, na África do Norte; *H. nipponia*, no Japão; *H. quinques-triata*, na Austrália; *Poecilobdella granulosa*, *Hirudinaria javanica* e *Hirudinaria manillensis*, no Sudeste Asiático; *Haementeria officinalis*, no México; *Macrobodella decora*, nos Estados Unidos da América; *Limnatis nilótica*, no Egito, Israel e Líbano; *Haementaria amazon*, na Amazônia (Eldor et al)⁽¹⁾. Há mais de 650 espécies, mas poucas aderem à pele de mamíferos. Além da propriedade de sucção⁽¹⁻²⁾, as sanguessugas também apresentam substâncias ativas secretadas em sua saliva (*hirudin*), as quais são: hialuronidase, collagenase, anti-agregante plaquetário e substâncias trombolíticas. Essas substâncias permitem sangramento, mesmo após o término da sucção.

A congestão venosa pode precipitar o insucesso de retalhos livres ou de reimplantes. A reconstituição microvascular das veias pode ser tecnicamente difícil, em especial em sítios onde foi realizada irradiação ou reimplantes digitais distais. A isquemia venosa parece ser pior do que a isquemia arterial na sobrevivência de tecidos⁽⁵⁾. Em artigos clínicos não controla-

dos tem sido relatado o uso de sanguessugas com sucesso no salvamento de reimplantes digitais⁽⁶⁾, de retalhos pediculados⁽⁷⁻⁸⁾, de retalhos livres⁽⁹⁾, em reimplante de lábios⁽¹⁰⁾, em congestão venosa aguda em membro inferior de recém-nascidos⁽¹¹⁾, em reimplantes de orelha⁽¹²⁾, em veias varicosas complicadas⁽¹³⁾. Contudo, nenhum dos relatos citados demonstrou, experimentalmente, a propriedade da sanguessuga no tratamento da insuficiência venosa. Este estudo experimental, portanto, tem por objetivo demonstrar a eficácia do uso de sanguessugas na sobrevivência de retalhos epigástricos de ratos submetidos à oclusão venosa prolongada temporária.

MÉTODOS

A pesquisa foi realizada no Laboratório Experimental do Instituto de Ortopedia e Traumatologia de Passo Fundo, RS, onde foram utilizados 23 ratos da raça *Wistar* com peso entre 200 e 400g. Os animais foram submetidos à anestesia com tionembutal 25mg/kg intraperitoneal e complementação com 1ml, caso necessário. Em todos realizou-se tricotomia da parede abdominal e região inguinal bilateral com tricótomos manuais, não sendo utilizados cremes depilatórios, que poderiam ser irritantes às sanguessugas (*H. medicinalis*).

Após posicionamento em decúbito dorsal, todos os ratos foram submetidos à elevação de dois retalhos epigástricos baseados na veia e artéria epigástrica, um do lado direito e outro do lado esquerdo, na dimensão de 4x6cm cada um. Todos os retalhos foram dissecados pelo mesmo cirurgião sênior. Em seguida, a drenagem venosa dos retalhos foi interrompida pela ligadura da veia epigástrica e pelo clampeamento da veia femoral proximal aos vasos epigástricos com o uso de *clamps* microcirúrgicos removíveis (figura 1).

Todos os retalhos foram submetidos a seis horas de oclusão venosa; em um lado foi utilizado *H. medicinalis*; o lado contralateral serviu de controle. Imitando-se o aparecimento da insuficiência venosa clínica, a *H. medicinalis* foi utilizada três horas após a oclusão venosa, colocada no retalho de maneira aleatória (figura 2).

A sanguessuga permaneceu aderida ao retalho até mostrar-se saciada, desprendendo-se dele espontaneamente. O tempo de permanência no retalho e a duração do sangramento após a sucção foram medidos (tabela 1).

Completadas seis horas de oclusão venosa, todos os retalhos tiveram seus *clamps* removidos da veia femoral proximal. Todos os animais foram ressuscitados com injeção subcutânea de 20ml de soro fisiológico na região dorsal e foram observados diariamente por cinco dias, para análise de reta-

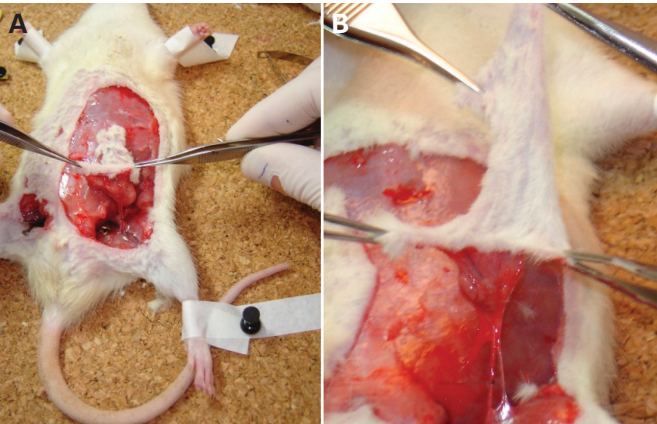


Figura 1 – A) Elevação do retalho epigástrico com a ligadura da veia epigástrica e clampeamento da veia femoral proximal (círculo). B) Visão aproximada da ligadura da veia epigástrica (seta).

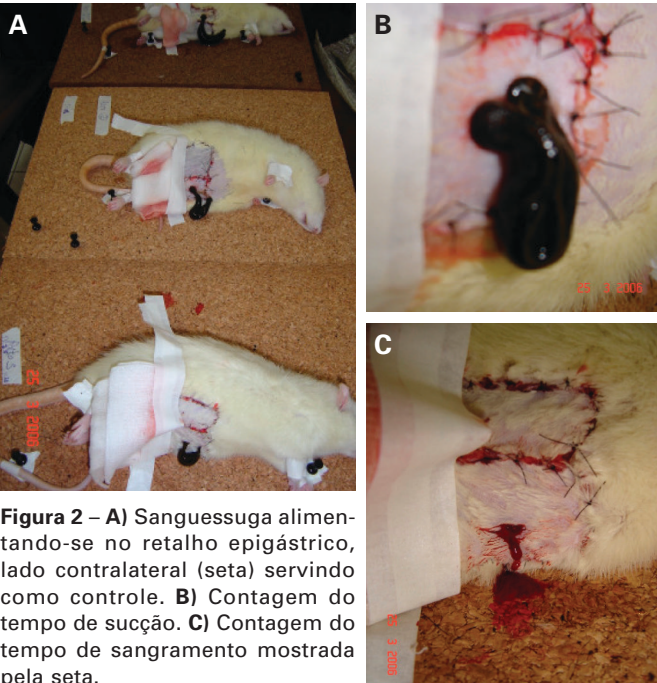


Figura 2 – A) Sangressuga alimentando-se no retalho epigástrico, lado contralateral (seta) servindo como controle. B) Contagem do tempo de sucção. C) Contagem do tempo de sangramento mostrada pela seta.

lhos, sendo, então, sacrificados com injeções intracardíacas de lidocaína a 2%, tendo morte instantânea (tabela 1, figura 3).

A sangressuga utilizada foi a da espécie *Hirudo medicinalis*, importada de *Leeches USA Ltd.* (300 Shames Drive, Westbury, NY 11590). Elas eram armazenadas num aquário com água destilada contendo um sal (*hirudotm salt 500 mg/l, Leeches USA*) em temperatura constante de 18 a 24°C.

A análise estatística utilizada foi o teste z de proporção com índice de significância com $p \leq 0,0134$.

TABELA 1

Tempo de sucção e sangramento com respectivas médias, sobrevida e necrose dos retalhos tratados e não tratados com sangressuga ($p < 0,0134$)

N	TS	DS	NEC.RC	NEC.RTS
1	180	42	Não	Não
2	180	44	Não	Não
3	147	122	Não	Não
4	146	41	Não	Não
5	180	70	Sim	Não
6	40	103	Não	Não
7	186	40	Não	Sim
8	180	22	Não	Não
9	30	17	Não	Não
10	90	70	Não	Não
11	136	157	Não	Não
12	71	129	Sim	Não
13	105	22	Sim	Não
14	18	40	Sim	Não
15	65	116	Sim	Não
16	14	71	Não	Sim
17	35	157	Sim	Não
18	46	133	Sim	Não
19	48	72	Sim	Não
20	63	53	Sim	Não
21	90	34	Sim	Não
22	54	70	Não	Sim
23	30	40	Sim	Não
M	92	72	–	–
Perc.NEC	–	–	47,82%	13,04%
Perc.SOB	–	–	52,18%	86,96%

Legenda: N = número de amostras; TS = tempo de sucção; DS = duração do sangramento; NEC.RC = necrose no retalho controle; NEC.RTS = necrose no retalho tratado com sangressuga; M = média; Perc.NEC = percentagem de necrose; Perc.SOB = percentagem de sobrevida.

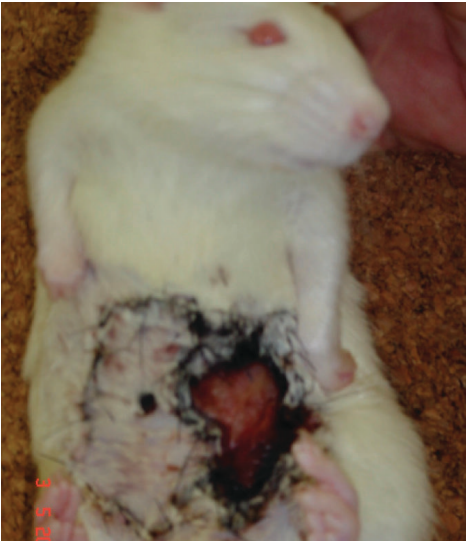


Figura 3 Retalho epigástrico tratado com sangressuga mostrando completa sobrevivência e retalho contralateral (seta) sem uso da sangressuga com necrose

RESULTADOS

Dos 23 ratos operados, em 11 (47,82%) foram observados sinais de necrose no lado de controle. Em três ratos (13,04%) foram observados sinais de necrose no lado em que se utilizou sanguessuga. Em nove ratos (39,13%) não se observou necrose em nenhum retalho, nem no lado controle nem no lado submetido ao tratamento com sanguessuga (tabela 1).

Os retalhos submetidos ao uso de sanguessugas tiveram sobrevida de 86,96%, ao passo que os retalhos de controle sobreviveram cerca de 52,18%. Portanto, o uso de sanguessuga gerou aumento na taxa de sobrevida dos retalhos na ordem de 34,78%. Esses resultados estão de acordo com o teste z de proporção, com $p < 0,0134$ (tabela 1).

A variação existente tanto no tempo de sucção (mínimo de 14 minutos e máximo de 186 minutos) quanto na duração do sangramento (mínimo de 17 minutos e máximo de 157 minutos) não gerou nenhuma correlação significativa estatisticamente ($p < 0,32$, teste *t* de Student; gráfico 1).

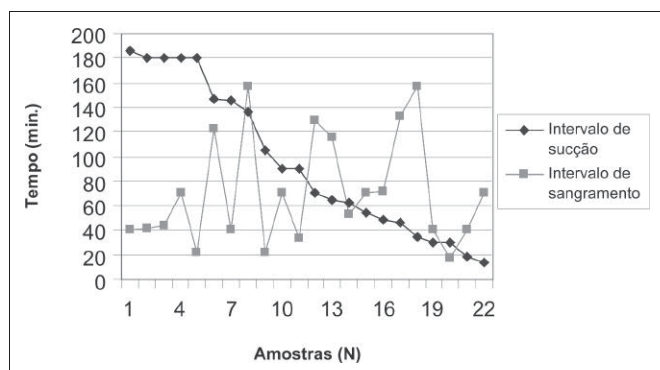


Gráfico 1 – Relação entre o intervalo de sucção e o intervalo de sangramento

$p < 0,32$, teste *t* de Student

DISCUSSÃO

Adams descreve a sanguessuga possuindo duas ventosas, localizadas cada uma nas extremidades de seu corpo cilíndrico⁽¹⁴⁾. Durante a sucção, a ventosa posterior mantém o anelídeo preso firmemente à pele, enquanto que a ventosa anterior posiciona contra a pele a boca, esta composta de três mandíbulas de formato trirradiado, tipo emblema do *Mercedes Benz*®, iniciando a sucção. Cada sanguessuga extrai em torno de 5 a 10ml de sangue e se desprende espontaneamente do local quando saciada. O *hirudin* secretado na saliva, no entanto, continua agindo, mantendo o sangramento constante por um período variável no local da mordida de algumas horas a 24

horas. Neste trabalho, observou-se que o sangramento, em ratos, persistiu, em média, por 72 minutos (mínimo de 17 minutos e máximo de 157 minutos) e o tempo de sucção durou em média 92 minutos (mínimo de 14 minutos e máximo de 186 minutos), dados similares aos observados por Lee *et al*, em cujo trabalho o tempo de sangramento foi de 79 ± 12 minutos e o de sucção, de 107 ± 13 minutos⁽¹⁵⁾. Contudo, tais dados discordam dos de Stepnick *et al* que, em uso clínico, relataram tempo de sangramento superior a 24 horas⁽¹⁶⁾.

De acordo com Whitlock *et al*, a sanguessuga medicinal tem relação simbiótica com uma bactéria gram-negativa aeróbica chamada *Aeromonas hydrophila*, que em humanos tem sido selecionada como causa de diarreia enterotóxica e de infecção oportunista em pacientes imunodeprimidos⁽¹⁷⁾. Por essa razão, cefalosporinas de terceira geração, ciprofloxacinas, aminoglicosídeos, tetraciclina, cloranfenicol ou sulfametoxazol-trimetoprim devem ser utilizados durante o tratamento com sanguessugas.

Os retalhos miocutâneos consistem na grande arma de cobertura para regiões destruídas por acidentes ou tumores, os quais necessitam de anastomoses vasculares, cujo insucesso é relativamente comum. Segundo os estudos de Hjortdal *et al* e Kerrigan *et al*, a insuficiência arterial é reconhecida clinicamente pela diminuição no tempo de enchimento capilar, palidez, diminuição da temperatura e ausência de sangramento após punção com agulha⁽¹⁸⁻¹⁹⁾. As causas mais comuns são a torção do pedículo, espasmo arterial, erro técnico e doença vascular (diabetes, tabagismo, dislipidemias, doenças reumáticas). O tratamento é cirúrgico (reintervenção) ou medicamentoso (simpatolíticos, vasodilatadores, bloqueadores de canais de cálcio, corticosteróides, entre outros). Já a insuficiência venosa inclui turgor, coloração violácea, edema, enchimento capilar rápido, temperatura normal ou elevada e produção de sangue escuro após a punção. As causas da insuficiência venosa são torção pedicular, edema, hematoma ou erro técnico, levando ao extravasamento eritrocitário, depósito de fibrina em regiões perivasculares, dano endotelial, formação de *shunt* arteriovenoso longe do leito capilar, trombose da microcirculação e perda do retalho.

Kerrigan *et al* compararam histologicamente os efeitos da oclusão venosa e arterial, observando que um período de três horas de oclusão venosa em retalhos do grande dorsal em porcos resultou em 40% de necrose das fibras musculares; contudo, um similar período de oclusão arterial resultou em nenhuma necrose muscular. No mesmo trabalho, após oito horas de obstrução venosa os retalhos necrosaram completamente⁽¹⁹⁾.

Em trabalho de Lee *et al*, elevaram-se retalhos epigástricos bilateralmente em ratos e ligaram-se os componentes venosos de cada retalho; depois de três horas de oclusão venosa, um dos retalhos foi tratado com sanguessuga. A obstrução venosa foi liberada após seis horas bilateralmente. A taxa de necrose foi de 72% no grupo de controle e no grupo tratado com sanguessuga, de 40,9%, ao passo que a taxa de sobrevivência foi de 16% no grupo de controle e de 51% no grupo tratado com sanguessuga⁽¹⁵⁾. Portanto, houve taxa de sobrevivência dos retalhos submetidos ao tratamento com sanguessuga de 35% (n = 22). No presente estudo, respectivamente, verificou-se taxa de necrose de 47,82% no grupo de controle e de 13,94% no grupo tratado com sanguessuga. Já a taxa de sobrevivência no grupo de controle foi de 52,18% e no grupo tratado com sanguessuga, de 86,96%, resultando em taxa de sobrevivência dos retalhos submetidos ao tratamento com sanguessuga de 34,78% (n = 23), o que demonstra semelhança com os estudos de Lee *et al*⁽¹⁵⁾.

Por esse motivo, sempre que se realiza um retalho microcirúrgico ou um reimplante, a observação pós-operatória é mandatória. Utley *et al* recomendam observação pela equipe de enfermagem a cada hora nas primeiras 24 horas e a cada duas horas nas 48 horas seguintes⁽²⁾. Além disso, o cirurgião ou o

residente sênior deve também realizar observação a cada oito horas. Esse procedimento é realizado para que se consiga detectar a lesão vascular venosa logo no início e, assim, exista tempo hábil para o seu tratamento, uma vez que lesões venosas tornam-se rapidamente irreversíveis, como demonstraram Angel *et al*⁽⁵⁾.

De acordo com Utley *et al*, o uso de sanguessugas para o tratamento da obstrução venosa tem-se mostrado muito eficiente, porque, além de elas removerem certa quantidade de sangue, também secretam pela saliva o polipeptídeo *hirudin*⁽²⁾. O *hirudin* que, segundo Utley *et al*, foi descoberto por Haycraft, em 1884, é o mais potente inibidor natural da trombina conhecido, agindo diretamente na cascata da coagulação⁽²⁾. Hoje, com a tecnologia do DNA recombinante bacteriano, já se consegue a sua produção similar (*desirudin*), com interesse principalmente no tratamento de doenças tromboembólicas sistêmicas.

CONCLUSÃO

Os achados deste trabalho evidenciam que o uso de sanguessugas melhora a sobrevida de retalhos com isquemia venosa de seis horas em modelo experimental em ratos.

REFERÊNCIAS

1. Eldor A, Orevi M, Rigbi M. The role of the leech in medical therapeutics. *Blood Rev.* 1996;10(4):201-9.
2. Utley DS, Koch RJ, Goode RL. The failing flap in facial plastic and reconstructive surgery: role of the medicinal leech. *Laryngoscope.* 1998; 108(8 Pt 1):1129-35.
3. Sawyer RT. Feeding and digestive system. In: Sawyer RT. *Leech biology and behaviour.* Oxford [Oxfordshire]; New York: Clarendon Press: Oxford University Press; 1986. p. 467-518.
4. Rados C. Beyond bloodletting: FDA gives leeches a medical makeover. *FDA Consumer Magazine* [serial on the Internet]. 2004 [cited 2007 Feb 12]; 38(5): [about 2 p.] Available from: http://www.fda.gov/fdac/features/2004/504_leech.html.
5. Angel MF, Mellow CG, Knight KR, O'Brien BM. Secondary ischemia time in rodents: contrasting complete pedicle interruption with venous obstruction. *Plast Reconstr Surg.* 1990; 85(5):789-93; discussion 794-5.
6. Golden MA, Quinn JJ, Partington MT. Leech therapy in digital replantation. *AORN J.* 1995;62(3):364-6, 369, 371-2, passim.
7. Batchelor AG, Davison P, Sully L. The salvage of congested skin flaps by the application of leeches. *Br J Plast Surg.* 1984;37(3):358-60.
8. Mortenson BW, Dawson KH, Murakami C. Medicinal leeches used to salvage a traumatic nasal flap. *Br J Oral and Maxillofac Surg.* 1998; 36(6):462-4.
9. Lim CL. Successful transfer of "free" microvascular superficial temporal artery flap with no obvious venous drainage and use of leeches for reducing venous congestion: case report. *Microsurgery.* 1986;7(2):87-8.
10. Walton RL, Beahm K, Brown RE, Upton J, Reinke K, Fudem G, et al.. Microsurgical replantation of the lip: a multi-institutional experience. *Plast Reconstr Surg.* 1998;102(2):358-68.
11. Weinfeld AB, Kattash M, Grifka R, Friedman JD. Leech therapy in the management of acute venous congestion of an infant's lower limb. *Plast Reconstr Surg.* 1998;102(5):1611-4.
12. Concannon MJ, Puckett CL. Microsurgical replantation of an ear in a child without venous repair. *Plast Reconstr Surg.* 1998;102(6):2088-93; discussion 2094-6.
13. Bapat RD, Acharya BS, Juvekar S, Dahanukar SA. Leech therapy for complicated varicose veins. *Indian J Med Res.* 1998;107:281-4.
14. Adams SL. The medicinal leech. A page from the annals of internal medicine. *Ann Intern Med.* 1988;109(5):399-405.
15. Lee C, Mehran RJ, Lessard ML, Kerrigan CL. Leeches: controlled trial in venous compromised rat epigastric flaps. *Br J Plast Surg.* 1992;45(3): 235-8.
16. Stepnick DW, Hayden RE. Postoperative monitoring and salvage of microvascular free flaps. *Otolaryngol Clin North Am.* 1994;27(6):1201-17.
17. Whitlock MR, O'Hare PM, Sanders R, Morrow NC. The medicinal leech and its use in plastic surgery: a possible cause for infection. *Br J Plast Surg.* 1983;36(2):240-4.
18. Hjortdal VE, Hansen ES, Hauge E. Myocutaneous flap ischemia: flow dynamics following venous and arterial obstruction. *Plast Reconstr Surg.* 1992;89(6):1083-91.
19. Kerrigan CL, Wizman P, Hjortdal VE, Sampalis J. Global flap ischemia: a comparison of arterial versus venous etiology. *Plast Reconstr Surg.* 1994; 93(7):1485-95; discussion 1496-7.