

AKIHITO INCA ATAHUALPA URDIALES

OCTREOTIDE NA CICATRIZAÇÃO DE ANASTOMOSES COLÔNICAS EM RATOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial para a obtenção do grau acadêmico de Mestre em Clínica Cirúrgica.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos L. Campos
Co-Orientador: Prof. Dr. João Carlos D. Repka
Coordenador: Prof. Dr. Jorge Eduardo F. Matias

CURITIBA

2006

AKIHITO INCA ATAHUALPA URDIALES

OCTREOTIDE NA CICATRIZAÇÃO DE ANASTOMOSES COLÔNICAS EM RATOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial para a obtenção do grau acadêmico de Mestre em Clínica Cirúrgica.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos L. Campos
Co-Orientador: Prof. Dr. João Carlos D. Repka
Coordenador: Prof. Dr. Jorge Eduardo F. Matias

CURITIBA

2006

FICHA CATALOGRÁFICA

Urdiales, Akihito Inca Atahualpa

Ocreotide na cicatrização de anastomoses colônicas em ratos / Akihito Inca Atahualpa Urdiales. – Curitiba, 2006.

x, 58p

Área de concentração: Clínica Cirúrgica.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos L. Campos.

Dissertação (MESTRADO) – Departamento de Clínica Cirúrgica, Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná.

1.Ocreotide 2.Cicatrização 3.Colon 4. Colágeno 5. Ratos.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus e as pessoas que sempre estiveram ao meu lado na construção das realizações de minha vida, aos meus pais Harue e José Luiz Urdiales, aos mestres que enriquecem o raciocínio e aos amigos que dividem problemas e soluções.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor *Antônio Carlos Ligocki Campos*, orientador dessa dissertação, pelos valiosos ensinamentos, pela dedicação e incansável motivação.

Ao Professor Doutor *Jorge Eduardo Fouto Matias* pela sua intenção em colocar nosso trabalho no âmbito de pesquisa e vida, pela sua dedicação na Pós-Graduação na Clínica Cirúrgica só posso agradecer sempre.

Ao Professor Doutor *João Carlos D. Repka*, pelos experientes ensinamentos, objetividade e esmero nas orientações.

Ao Professor Doutor *Sérgio Ioshi*, pela colaboração no estudo histológico deste trabalho.

Aos meus colegas de Mestrado, pela convivência fraternal durante todo o curso na busca por novas verdades e técnicas da clínica cirúrgica.

À Sra. *Rita Ortega*, pela ajuda e contribuição na realização desta dissertação.

Agradeço também aos acadêmicos de medicina *Daniilo Aedo*, *Hans Grohs* e *Alexandre Eduardo Augustin Czeckko* e à acadêmica de enfermagem *Taciane Mara Di Domenico* pelo seu apoio e participação na construção desse trabalho, além da professora estatística *Salette do Carmo Pelanda* pelo profissionalismo com que se dedica à estatística e às causas sociais.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	VI
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VIII
RESUMO.....	IX
ABSTRACT.....	X
1 INTRODUÇÃO.....	2
1.1 OBJETIVOS.....	3
2 REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1 A AÇÃO DO OCTREOTIDE.....	5
2.1.1 Receptores de Octreotide	7
2.1.2 Aplicações Terapêuticas do Octreotide.....	8
2.1.3 Octreotide em anastomoses experimentais	8
2.2 CICATRIZAÇÃO DAS ANASTOMOSES INTESTINAIS	9
2.2.1 Classificação dos Processos Biológicos da Cicatrização.....	10
2.3 MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DA CICATRIZAÇÃO DAS SUTURAS GASTRO- INTESTINAIS.....	14
2.3.1 Parâmetros Clínicos.....	14
2.3.2 Evolução Ponderal no Pós-operatório.....	14
2.3.3 Aderências Intra-abdominais	15
2.3.4 Métodos Mecânicos	15
2.3.4.1 Pressão de Ruptura.....	16
2.3.4.2 Força de Ruptura (“ <i>Breaking Strength</i> ”).....	16
2.4 PARÂMETROS HISTOLÓGICOS.....	17
3 MATERIAL E MÉTODO	20
3.1 MATERIAL	20
3.1.1 Tratamento pelo Octreotide (Sandostatin®)	20
3.2 MÉTODO	21
3.2.1 Procedimento Cirúrgico.....	21
3.2.2 Morte dos Animais	23
3.2.3 Dados Avaliados	24
3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	28
4 RESULTADOS	30

4.1 PESO	30
4.2 ÍNDICE DE ADERÊNCIAS.....	31
4.3 FORÇA MÁXIMA DE TRAÇÃO E DE RUPTURA.....	31
4.4 COMPARAÇÃO ENTRE OS COLÁGENOS MADURO E IMATURO.....	32
5 DISCUSSÃO.....	36
5.1 PARÂMETROS CLÍNICOS	39
5.1.1 Peso.....	39
5.1.2 Aderências Intra-abdominais	39
5.2 PARÂMETROS MECÂNICOS	40
5.2.1 Força Máxima de Tração (FMT).....	41
5.2.2 Força de Ruptura Total (FRT).....	41
5.3 PARÂMETROS HISTOLÓGICOS.....	42
5.4 EFEITO DO OCTREOTIDE NA CICATRIZAÇÃO DAS ANASTOMOSES COLÔNICAS.....	43
6 CONCLUSÕES.....	45
REFERÊNCIAS.....	46
APÊNDICE 1 – PROJETO OCTREOTIDE	53
APÊNDICE 2 – PLANILHA EM MICROSOFT EXCEL® – PESO	55
APÊNDICE 3 – PLANILHA EM MICROSOFT EXCEL® – COLÁGENO.....	57

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - ESQUEMA ESTRUTURAL DA SOMATOSTATINA HUMANA E ANÁLOGOS. SEMELHANÇA ESTRUTURAL NO TRECHO RESPONSÁVEL PELA FUNÇÃO BIOLÓGICA.....	6
TABELA 1 - PROPRIEDADES DOS CINCO SUBTIPOS DE RECEPTORES DA SOMATOSTATINA.....	7
FIGURA 2 - INJEÇÃO SUBCUTÂNEA DE OCTREOTIDE	21
FIGURA 3 - ANASTOMOSE COLÔNICA	22
FIGURA 4 - INSPEÇÃO DA CAVIDADE ABDOMINAL.....	23
FIGURA 5 - SEGMENTOS COLÔNICOS: O PRIMEIRO DESTINADO À ANÁLISE HISTOLÓGICA. ABAIXO A ANASTOMOSE ÍNTEGRA PARA ESTUDO TENSOMÉTRICO	24
QUADRO 1 - ÍNDICE DE ADERÊNCIAS DE KNIGHTLY	25
FIGURA 6 - A) MÁQUINA DE TENSÃO COMPUTADORIZADA; B) DETALHE DAS PRESILHAS TRACIONANDO CORPO DE PROVA.....	26
FIGURA 7 - A) COMPUTADOR COM O SOFTWARE TESC PARA MENSURAÇÃO E CONTROLE DAS TENSÕES; B) GRÁFICO DE FORÇA TÊNซิล DURANTE O ENSAIO MECÂNICO.....	26
FIGURA 8 - SISTEMA <i>RED, GREEN, BLUE</i> (RGB). EM VERMELHO OBSERVA-SE O COLÁGENO MADURO E EM VERDE O COLÁGENO IMATURO.....	27
TABELA 2 - COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DO PESO (g) INICIAL E FINAL ENTRE E DENTRO DOS GRUPOS.....	30
GRÁFICO 1 - COMPARAÇÃO DO PESO (g) INICIAL E FINAL ENTRE OS GRUPOS.....	30
TABELA 3 - COMPARAÇÃO DOS GRAUS DE ADERÊNCIA ENTRE OS GRUPOS.....	31
TABELA 4 - COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DA FORÇA MÁXIMA DE TRAÇÃO (FMT) E DA FORÇA DE RUPTURA TOTAL (FRT) ENTRE OS GRUPOS.....	32
GRÁFICO 2 - COMPARAÇÃO DA FORÇA MÁXIMA DE TRAÇÃO (FMT) E DA FORÇA DE RUPTURA TOTAL (FRT) ENTRE OS GRUPOS	32

TABELA 5 - COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DE COLÁGENO MADURO E IMATURO ENTRE OS GRUPOS	33
GRÁFICO 3 - COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DE COLÁGENO MADURO E IMATURO ENTRE OS GRUPOS	33
TABELA 6 - COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DO I _{MaC} ENTRE OS GRUPOS.....	33
GRÁFICO 4 - COMPARAÇÃO DO I _{MaC} ENTRE OS GRUPOS.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS

EP	- Erro Padrão
et al	- e colaboradores
FMT	- Força Máxima de Tração
FRT	- Força de Ruptura Total
IMaC	- Índice de maturação do colágeno
INMETRO	- Instituto Nacional de Metrologia
kgf	- Kilograma-força
M	- Média
n	- Tamanho da amostra
OCT	- Octreotide
PMN	- Leucócitos polimorfonucleares
p	- Nível de significância estatística
T	- Tensão
t ½	- Tempo de meia-vida
µm	- Micrômetro
µg	- Micrograma

RESUMO

Introdução: O octreotide, análogo da somatostatina, tem sido utilizado no tratamento de várias doenças por sua ampla distribuição no sistema nervoso e digestório. É frequentemente utilizado no tratamento de fístulas enterocutâneas. Entretanto, pelo fato do octreotide inibir hormônios tróficos e anabólicos e por reduzir o fluxo sanguíneo, surgiu a hipótese de que este poderia ser prejudicial na cicatrização de feridas cirúrgicas, anastomoses e inclusive no fechamento das fístulas. **Objetivo:** avaliar o efeito do octreotide, administrado por via subcutânea, na cicatrização de anastomoses colônicas em ratos. **Material e Método:** foram utilizados 42 ratos *Wistar* machos, adultos, divididos em grupo controle (GC) e grupo octreotide (GO). Os ratos foram randomizados para receber dose única diária de 20 µg/kg/dia de octreotide por via subcutânea. A dose inicial foi administrada durante 7 dias antes do procedimento cirúrgico e mantida até o 5º dia de pós-operatório. Os animais do grupo controle receberam dose única diária isovolumétrica de solução salina a 0,9% por via subcutânea. Todos os animais foram submetidos a duas secções colônicas, sendo uma a 6 cm da válvula ileocecal (colon ascendente) e outra 5 cm distais à primeira (colon descendente). No 5º dia de pós-operatório os animais foram mortos e as duas anastomoses de cada animal foram conservadas, alternadamente, em solução salina a 0,9% e formalina a 10% para estudos de resistência à tração e histológico pela técnica de *picrosirius-red* F3BA, respectivamente. Os resultados da determinação do percentual de colágeno foram expressos mediante o IMaC, que corresponde à razão entre as percentagens de colágeno maduro e imaturo. A análise estatística incluiu os testes t de Student e Kruskal Wallis com nível de significância adotado de $p < 0,05$ em todos os testes. **Resultados:** A análise da FMT ($0,222 \pm 0,013$ kgf/cm² vs $0,192 \pm 0,012$ kgf/cm², $p = 0,09$) e FRT ($0,141 \pm 0,014$ kgf/cm² vs $0,107 \pm 0,012$ kgf/cm², $p = 0,07$) não mostrou diferença entre os grupos. Ao se comparar as médias do IMaC, este foi maior no grupo octreotide ($10,09 \pm 1,53$ vs $5,87 \pm 0,77$, $p = 0,04$). **Conclusões:** o Octreotide não diminui a resistência tênsil da anastomose colônica em ratos e associa-se a maior deposição de colágeno maduro na anastomose.

Palavras-chave: Octreotide, Cicatrização, Colágeno, Anastomose cirúrgica, Colon, Ratos.

ABSTRACT

Introduction: Octreotide, an analogous of somatostatin has been used in the treatment of several diseases due to its wide distribution in the nervous and digestive system. It is frequently used in the treatment of enterocutaneous fistulas. However, because of its inhibitory effects of trophic and anabolic hormones and because it reduces blood flow, a hypothesis was created, which suggested that octreotide could be harmful for the healing of surgical wounds, anastomoses and even in the closure of fistulas. **Objective:** to evaluate the effect of octreotide administered subcutaneously on the healing of colonic anastomosis in rats. **Material and method:** forty-two adult, male Wistar rats were used and divided in to two groups: controls (CG) and octreotide group (OG). Rats were randomized to receive a single daily dose of 20 µg/kg/day of octreotide subcutaneously. An initial dose was administered seven days prior to the surgical procedure and giving daily until the 5th postoperative day. Rats from the control group received a single isovolumetric daily dose of 0.9% normal saline subcutaneously. All animals were submitted to two colonic sections, one 6 cm from the ileocecal valve (ascending colon) and the other 5 cm distal from the first one (descending colon). On the fifth PO day rats were sacrificed and the two anastomoses of each animal were preserved, alternatively, in 0.9% normal saline or 10% formaline for traction tests and histopatological studies by the picosirius-red F3BA stain, respectively. The results of the collagen deposition were expressed by the IMaC (Collagen Maturation Index), which corresponds to the ratio between type I and type III collagen percentages. Statistics included the Student's test and the Kruskal Wallis test and the adopted level of significance was 5%. **Results:** the FMT (Maximum Tension Strength) analysis was (0.222 ± 0.013 kgf/cm² vs. 0.192 ± 0.012 kgf/cm², $p=0.09$) and FRT (0.141 ± 0.014 kgf/cm² vs. 0.107 ± 0.012 kgf/cm², $p=0.07$) did not show significant difference between the two groups. When comparing the averages of the IMaC, it was higher in the octreotide group (10.09 ± 1.53 vs. 5.87 ± 0.77 , $p=0.04$). **Conclusion:** Octreotide does not decrease the tensile strength of colonic anastomosis in rats and is associated to a higher mature collagen deposition at the anastomosis.

Key words: Octreotide, wound healing, collagen, surgical anastomosis, colon, rats.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

KRULICH, em 1968, durante estudos de distribuição dos fatores de liberação do hormônio de crescimento no hipotálamo de ratos, detectou acidentalmente um peptídeo. Este peptídeo cíclico formado por 14 aminoácidos foi chamado de fator inibidor de liberação da somatotropina ou somatostatina (KRULICH et al., 1968). Inicialmente identificada como inibidor da liberação do GH pituitário, a somatostatina hoje é conhecida pelos seus efeitos exócrinos, endócrinos, parácrinos e autócrinos. Dez anos após, tornou-se disponível uma substância sintética de longa duração análoga à somatostatina, denominada octreotide. O octreotide é usado no tratamento de várias doenças, tais como: tumores carcinóides metastáticos, tumores secretores de peptídeos intestinais vasoativos, sangramento gastrointestinal, fístulas enterocutâneas, síndrome do intestino curto, síndrome de dumping, pancreatite, pseudocistos pancreáticos, fístulas pancreáticas, diarreia relacionada à AIDS, entre outros (TÜRKCAPAR et al., 1998).

O Octreotide é um potente inibidor das secreções gastrointestinal, biliar e pancreática, relaxa a musculatura intestinal e reduz a motilidade do trato digestivo. Estas propriedades permitiram aos pesquisadores empregá-lo na terapêutica das fístulas intestinais. Estudos demonstram que o medicamento encurta o tempo de fechamento espontâneo das fístulas (MEDEIROS et al, 2002).

As fístulas enterocutâneas representam importante problema para os especialistas que lidam com o aparelho digestivo, tendo em vista que podem acarretar grave depleção hidroeletrólítica, desequilíbrio ácido-base, infecção e desnutrição grave, com o respectivo impacto negativo da longa permanência hospitalar e do alto custo do tratamento. Elas ocorrem mais comumente como complicação de cirurgia gastrointestinal, trauma abdominal, doença de Crohn, abscessos intra-abdominais, irradiação ionizante, pancreatites, pseudocisto pancreático e neoplasias (FOSTER et al.,1996). O manuseio poderá ser clínico, cirúrgico, ou, como em muitos casos, haverá necessidade de terapêutica combinada.

Existem muitos estudos sobre a influência deletéria ou não do octreotide sobre anastomoses intestinais. Porém, não foram identificados trabalhos na literatura a respeito dos efeitos da administração do octreotide sobre a deposição de colágeno e resistência tênsil de anastomoses colônicas em ratos. Embora os benefícios

terapêuticos do octreotide tenham sido definidos, ainda é motivo de discussão na literatura a influência do octreotide na cicatrização de feridas. Enquanto autores como TÜRKÇAPAR et al, 1998 e HEUSER, et al 2000 apresentam trabalhos que demonstram efeito deletério do octreotide na cicatrização de anastomoses intestinais, outros (ALPER et al., 1997; MILLER et al., 1996; PAPALAMBROS et al., 2004; YAMANER et al., 1995) concluem que o octreotide pode ser usado com segurança sem comprometer o processo cicatricial.

1.1 OBJETIVOS

Avaliar a influência do Octreotide, administrado no período peri-operatório, na cicatrização de anastomoses colônicas de ratos *Wistar* adultos mediante parâmetros clínicos (peso e índice de aderências intra-abdominais), parâmetro mecânico e histológico.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A AÇÃO DO OCTREOTIDE

Estudos realizados por BRAZEAU et al. (1973) demonstraram que a somatostatina atua na regulação da liberação do hormônio de crescimento. A somatostatina é um tetradecapeptídeo que possui várias ações fisiológicas. Modula a neurotransmissão no sistema nervoso central e regula a liberação do hormônio de crescimento e tireotrofina. Tem também ação reguladora no trato gastrointestinal, bem como no pâncreas endócrino e exócrino. Inibe a divisão celular e a maioria das secreções gastrointestinais endócrinas e exócrinas; reduz o fluxo sanguíneo esplâncnico e retarda o trânsito gastrointestinal. A meia-vida curta da somatostatina (de um a dois minutos) limita o seu uso na prática clínica.

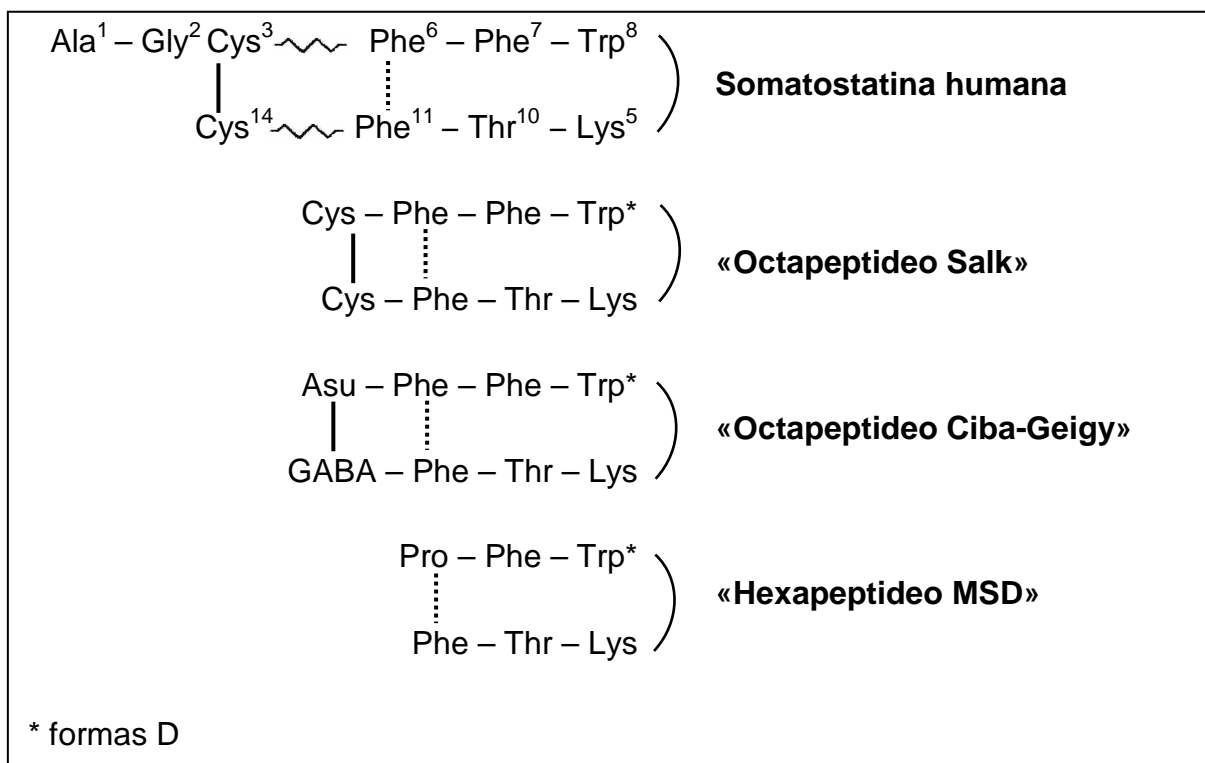
Atualmente a somatostatina é considerada precursora de um grupo de peptídeos com dois produtos bioativos importantes: somatostatina-14 e somatostatina-28. Como outros hormônios peptídeos, a somatostatina é sintetizada a partir de uma molécula maior que é rapidamente clivada na forma de pró-hormônio e processada enzimaticamente em outros produtos.

Entretanto, a baixa estabilidade metabólica do peptídeo natural, o tempo de meia-vida plasmática ($t_{1/2}$) menor de 3 minutos e a hipersecreção indesejável, limitam a sua administração terapêutica por via endovenosa em infusão contínua (GOMEZ-PAN et al.,1990). O extraordinário potencial terapêutico desta substância tem motivado, nos últimos anos, a síntese de vários análogos com modificações na estrutura molecular. Estas modificações têm o intuito de superar os problemas citados anteriormente. Estes estudos têm permitido melhor conhecimento da molécula da somatostatina, assim como da estrutura farmacológica necessária para conseguir uma administração terapêutica útil e eficaz.

Com este objetivo, pesquisadores do Instituto Salk comprovaram que para se obter atividade biológica completa (fixação e ativação do receptor), é necessário somente o fragmento de quatro aminoácidos Phe 7-Trp 8-Lys 9-Thr 10 e uma ponte dissulfeto. Os demais aminoácidos da molécula têm apenas função estrutural. Esse mesmo grupo comprovou que a redução dos aminoácidos estruturais confere maior resistência frente à degradação enzimática (GÓMEZ-PAN et al., 1990). Estas

observações permitiram o desenvolvimento de diversos análogos de baixo peso molecular como mostrado na figura 1.

FIGURA 1 - ESQUEMA ESTRUTURAL DA SOMATOSTATINA HUMANA E ANÁLOGOS. SEMELHANÇA ESTRUTURAL NO TRECHO RESPONSÁVEL PELA FUNÇÃO BIOLÓGICA



Em 1982, BAUER et al. desenvolveram o octapeptídeo SMS 201-995 chamado de octreotide (OCT), o qual conserva o fragmento biologicamente ativo e a ponte dissulfeto. Sua fórmula química é: DPhe-Cys-Phe-DTrp-Lys-Thr-Cys-Thr.

Apresenta um aminoácido fenilalanina na sua forma D na extremidade proximal, e um aminoácido treonina na outra extremidade da ponte dissulfeto. A D-fenilalanina parece exercer efeito protetor sobre a ponte dissulfeto, isto é, confere maior estabilidade frente à degradação enzimática. Desta maneira parece também agir o fragmento biologicamente ativo, D-triptofano, com atividade biológica mais potente. Em estudos pré-clínicos subseqüentes, BAUER et al. 1982, comprovaram a ação inibitória sobre o GH *in vitro* e *in vivo*. Esta ação inibitória foi significativamente superior à somatostatina (GÓMEZ-PAN et al., 1990). LAMBERTS et al. (1987) em estudo com voluntários sadios, comprovaram que o OCT quando administrado por via subcutânea tem um tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) plasmático de 113 minutos. Na

administração endovenosa, o $t_{1/2}$ plasmático é de 43 minutos. A concentração plasmática máxima ocorre 30 minutos após administração subcutânea.

O OCT foi o primeiro análogo da somatostatina a ser introduzido no uso clínico; apresenta várias vantagens em relação à sua precursora. É mais potente, alcança o mesmo efeito biológico da somatostatina com dose menor. Tem um $t_{1/2}$ plasmático suficientemente prolongado e boa tolerância o que permite sua administração de forma ambulatorial. Sua síntese é facilitada pelo baixo peso molecular. Não apresenta efeitos indesejáveis após o término do tratamento e interfere menos com os níveis glicêmicos (BAUER et al., 1996).

2.1.1 Receptores de Octreotide

As várias ações do octreotide são mediadas através de receptores de membrana específicos os quais têm sido demonstrados em várias regiões do cérebro, no pâncreas endócrino e exócrino, na mucosa do trato gastrointestinal bem como nas células do sistema imunológico.

Cinco subtipos de receptores humanos da somatostatina foram clonados e caracterizados. A tabela 1 mostra estes subtipos e suas afinidades com a somatostatina.

TABELA 1 - PROPRIEDADES DOS CINCO SUBTIPOS DE RECEPTORES DA SOMATOSTATINA

PROPRIEDADE	SUBTIPO 1	SUBTIPO 2	SUBTIPO 3	SUBTIPO 4	SUBTIPO 5
Cromossomo	14	17	22	20	16
Afinidade IC_{50}^* (nM) Somatostatina-14	1.1	1.3	1.6	0.5	0.9
Afinidade IC_{50}^* (nM) Octreotide	>1000	2.1	4.4 - 35	>1000	5.6
Distribuição nos Tecidos	Cérebro, Pulmões, Estômago, Jejuno, Rins, Fígado e Pâncreas.	Cérebro e Rins	Cérebro e Pâncreas	Cérebro e Pulmões	Cérebro, Coração, Glândulas Adrenais, Intestino Delgado, Hipófise e Músculo Esquelético.

*concentração necessária para inibir 50% da somatostatina radiomarcada ligada a um subtipo.

Os genes desses subtipos são localizados em diferentes cromossomos, o que sugere diferentes funções nos diversos órgãos (LAMBERTS et al., 1996).

2.1.2 Aplicações Terapêuticas do Octreotide

O Octreotide é utilizado no tratamento de várias doenças por ter ampla distribuição no sistema nervoso, gastrointestinal bem como muitas ações fisiológicas e hormonais.

Experimentalmente existem propostas de tratamento nos tumores neuroendócrinos que possuam receptores para somatostatina, síndrome de dumping, pancreatite pós-colangiopancreatografia endoscópica retrógrada, obstrução intestinal, síndrome do intestino curto e no manejo da dor na pancreatite crônica (LAMBERTS et al., 1996; TÜRKÇAPAR et al., 1998; MILLER et al., 1996).

2.1.3 Octreotide em anastomoses experimentais

YAMANER, et al., (1995) pesquisaram o efeito do octreotide na cicatrização de anastomoses intestinais em ratos *Wistar* com obstrução intestinal. Foi analisado perda hidroeletrolítica de sódio e potássio, lesões isquêmicas, pressão de ruptura e conteúdo de hidroxiprolina no 4º e 7º dia de pós-operatório. Concluíram que o octreotide atenua as lesões isquêmicas e a perda hidroeletrolítica na obstrução intestinal.

MILLER, MARTINDALE, GAO e GADACZ (1996) compararam o efeito de hidrocortisona e octreotide (2,5 µg/kg/dia e 25 µg/kg/dia respectivamente), em 60 ratos submetidos a anastomose de intestino delgado. O octreotide, mesmo em doses elevadas, não demonstrou efeito deletério na força de ruptura da anastomose, inflamação sistêmica e no conteúdo de colágeno.

ALPER, LEVY, KADOURI, et al., (1997) investigaram o efeito do octreotide na cicatrização de feridas. Foi utilizado, modelo experimental *in vitro* e *in vivo* (ratos *Wistar*). Octreotide foi adicionado a culturas de fibroblastos em doses de 2, 10, 30, 60 e 120 ng/mL e os fibroblastos foram contados em 2º, 4º e 6º dias. Anastomoses intestinais foram realizadas em 36 ratos. Os ratos do grupo octreotide GO (n= 18) receberam injeções SC de 25 µg/kg, duas vezes ao dia, e seis ratos foram mortos no

3º, 7º e 14º dia pós-operatório. O grupo controle GC recebeu injeções de solução salina isotônica. Foram avaliados a pressão de ruptura e o conteúdo de hidroxiprolina nos três dias. Concluíram que o octreotide não inibe a cicatrização tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

TÜRKÇAPAR, DEMIRER, SENGUL et al., (1998) estudaram os efeitos do octreotide na cicatrização de anastomoses colônicas em ratos; estes receberam 20 µg/kg/dia de octreotide, 100 mg/kg/dia de hidrocortisona ou 1 mL de solução salina, como controle. Estes autores concluíram que o octreotide foi tão prejudicial quanto a hidrocortisona na cicatrização de anastomoses colônicas de ratos.

PAPALAMBROS, FILIS, ANGELOPOULOU et al., (2004) estudaram 72 ratos submetidos à ressecção do intestino delgado, seguido por anastomose término-terminal, divididos em dois grupos: o primeiro grupo recebeu octreotide na dose de 7 µg/kg/dia, em duas doses diárias, e o grupo controle recebeu solução salina. Os ratos foram re-explorados no 4º, 8º e 15º pós-operatório. Foram analisados a pressão de explosão e o conteúdo de colágeno das anastomoses. Os autores concluíram que o octreotide não prejudica a cicatrização das anastomoses de intestino delgado, ao contrário, melhora a cicatrização no 8º e 15º dia de pós-operatório.

2.2 CICATRIZAÇÃO DAS ANASTOMOSES INTESTINAIS

Toda ferida é uma solução de continuidade produzida em um tecido, pelos mais diversos agentes. Dá lugar a um espaço anormal, interrompe o fluxo sanguíneo, altera a sensibilidade, acumula elementos celulares mortos com grau maior ou menor de contaminação, com ou sem infecção.

Para corrigir esta lesão, o organismo lança mão de complexo mecanismo com a finalidade de restaurar a semelhança usual normal, denominado cicatrização e que envolve: quimiotaxia, divisão celular, neovascularização, síntese de matriz protéica extracelular e remodelação da cicatriz. Este processo ocorre em todo o organismo.

A cicatrização de feridas consiste em perfeita e coordenada cascata de eventos celulares e moleculares que interagem para que ocorra repavimentação e reconstituição do tecido (ORTONNE; CLÉVI, 1994). Este evento é dinâmico

envolvendo processos bioquímicos e fisiológicos que se comportam de forma harmoniosa a fim de garantir a restauração tecidual. A perda tecidual pode ser completa ou incompleta determinando assim a definição do tipo de ferida.

Ferida de espessura parcial: ocorre após procedimentos dermatológicos como a dermoabrasão ou *peelings* químicos, pode também ser causada por traumatismos. A reparação faz-se pela reepitelização dos anexos epiteliais ou epitélio derivado da pele adjacente não acometida. Como resultado final tem-se uma cicatriz praticamente imperceptível.

Já as feridas de espessura total necessitam da formação de um novo tecido, o tecido de granulação; a epitelização, base da cicatrização nas feridas de espessura total, acontece apenas nas margens da ferida. Nesse caso, a cicatriz é totalmente perceptível e, muitas vezes, pronunciada (FAZIO; ZITELLI; GOSLEN, 2000).

2.2.1 Classificação dos Processos Biológicos da Cicatrização

CARREL, em 1910, fez a primeira descrição ordenada dos eventos da cicatrização que são aceitos até hoje. Diferentes classificações são utilizadas para facilitar o entendimento de um processo tão dinâmico e com fases interdependentes como a cicatrização. Existem autores que consideram três estágios no processo de cicatrização: inicialmente um estágio inflamatório (primeiros 4 dias), seguido por um de proliferação (3 a 14 dias) e finalizando com o reparo em um estágio de remodelação (10 a 180 dias) (HOWES; SOOY; HARVEY, 1929; ORTONNE; CLÉVY, 1994). Outros autores classificam de forma mais completa dividindo o processo em cinco fases principais: coagulação, inflamação, proliferação, contração da ferida e remodelação (ORGILL; DEMLING, 1988). Em um determinado período de tempo as fases coincidem e acontecem simultaneamente. Em seguida serão apresentadas as principais características de cada uma destas fases.

a) Coagulação

O início é imediato após o surgimento da ferida. Essa fase depende da atividade plaquetária e da cascata de coagulação (TERKELTAUB; GINSBERG, 1998). Ocorre complexa liberação de produtos. Substâncias vasoativas, proteínas

adesivas, fatores de crescimento e proteases são liberadas e ditam o desencadeamento de outras fases (CLARK,1985). A formação do coágulo serve para coaptar as bordas das feridas e também para cruzar a fibronectina, oferecendo matriz provisória na qual os fibroblastos, células endoteliais e queratinócitos podem ingressar na ferida (GRINNEL; BILLINGHAM; BURGESS, 1981).

b) Inflamação

Intimamente ligada à fase anterior, a inflamação depende de inúmeros mediadores químicos, das células inflamatórias como os leucócitos polimorfonucleares (PMN), macrófagos e linfócitos. A fase inflamatória é caracterizada inicialmente por vasoconstrição local decorrente de mediadores vasoativos, como tromboxane A₂, os quais são liberados pelas plaquetas aderidas ao local onde houve lesão endotelial. Em seguida ocorre vasodilatação local mediada pela ação das prostaglandinas. Com a vasodilatação há saída de fluidos e macromoléculas para o interstício. Fatores angiogênicos e de crescimento são liberados pelas células inflamatórias (BANDA et al., 1982).

A seguir, ocorre a adesão de neutrófilos atraídos quimiotaticamente pelos mediadores da inflamação. Inicia-se aí o processo de desbridamento da ferida com a lise dos tecidos desvitalizados e dos microorganismos presentes na ferida. As substâncias liberadas pelos neutrófilos começam a atrair os macrófagos e monócitos. A partir daí, estas serão as células dominantes nos primeiros dias do processo inflamatório, complementando a função de desbridamento e dando início ao processo de reparo.

Os PMN chegam no momento da injúria tissular e ficam por período que varia de três a cinco dias; são eles os responsáveis pela fagocitose das bactérias. O macrófago é a célula inflamatória mais importante dessa fase (DIEGELMANN; COHEN; KAPLAN, 1981). Permanece do terceiro ao décimo dia. Fagocita bactérias, desbrida corpos estranhos e direciona o desenvolvimento do tecido de granulação.

Os linfócitos aparecem na ferida em aproximadamente uma semana. Seu papel não é bem definido, porém suas linfocinas tem importante influência sobre os macrófagos.

Além das células inflamatórias e dos mediadores químicos, a fase inflamatória depende da fibronectina. Esta é sintetizada por uma variedade de

células como fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais. Adere simultaneamente à fibrina, ao colágeno e a outros tipos de células. Funciona como cola que consolida o coágulo de fibrina, as células e os componentes da matriz (MOSHER; FURCHT, 1981). Além de formar essa base para a matriz extracelular, tem propriedades quimiotáticas de opsonização e fagocitose de corpos estranhos e bactérias.

c) Proliferação

A fase de proliferação celular é continuação da fase anterior. Ocorre o aparecimento dos primeiros fibroblastos atraídos pelos fatores liberados pelos macrófagos. Esta fase é marcada pela proliferação fibroblástica, pela angiogênese e pela epitelização; todos estes processos são decorrentes da multiplicação celular. Dividida em três subfases, a proliferação é responsável pelo “fechamento” da lesão propriamente dita.

A primeira das fases da proliferação é a reepitelização. Ocorre a migração de queratinócitos não danificados das bordas da ferida e dos anexos epiteliais. Fatores de crescimento são os prováveis responsáveis pelos aumentos das mitoses e hiperplasia do epitélio (CHRISTOPHER, 1972).

A segunda fase da proliferação inclui a fibroplasia e formação da matriz, que é extremamente importante na formação do tecido de granulação. A formação do tecido de granulação depende do fibroblasto, célula crítica na formação da matriz. Longe de ser apenas produtor de colágeno, o fibroblasto produz elastina, fibronectina, glicosaminoglicana e proteases, estas responsáveis pelo desbridamento e remodelamento fisiológico (VAN WINKLE Jr. et al., 1969).

A última fase da proliferação é a angiogênese. Esta fase determina o suprimento de oxigênio e nutrientes para o processo de cicatrização. Inicialmente as células endoteliais migram para a área ferida e a seguir ocorre proliferação destas células.

d) Contração da ferida

É o movimento centrípeto das bordas da ferida (espessura total). As feridas de espessura parcial não contam com essa fase. Uma ferida de espessura total tem contração mesmo quando há enxertos, que diminuem em 20% o tamanho da ferida

(STEGMAN; TROMOVITCH; GLOGAU, 1982). Em cicatrizes por segunda intenção a contração pode reduzir 62% da área de superfície do defeito cutâneo (LAWRENCE; COMAISH; DAHL, 1986).

e) Remodelação

Essa é a última das fases, ocorre no colágeno e na matriz extracelular; permanece durante meses e é responsável pelo aumento da força de tensão e pela diminuição do tamanho da cicatriz e do eritema. Reformulações dos colágenos, melhoria nos componentes das fibras colágenas, reabsorção de água são eventos que permitem uma conexão que aumenta a força da cicatriz e diminui sua espessura (DOILLON, et al. 1985). A neovascularização diminui e, tardiamente a cicatriz é considerada avascular. Uma cicatriz normal tem aproximadamente 80% da força de tensão do tecido normal, não é volumosa e é plana.

Muitas variáveis tanto de ordem geral como de ordem local influenciam esse longo e complexo processo. Dos fatores gerais, interfere a idade, o estado nutricional do paciente, a existência de doenças de base, como diabetes, alterações cardiocirculatórias e de coagulação, aterosclerose, disfunção renal, quadros infecciosos sistêmicos e uso de drogas sistêmicas.

Dos fatores locais, interfere a técnica cirúrgica, formação de hematomas, infecção, reação de corpo estranho, uso de drogas tópicas e ressecamento durante a cicatrização.

HERRMANN, WOODWARD e PULASKI em 1964, observaram em ratos, que a seqüência de eventos que ocorre na cicatrização das anastomoses digestivas é semelhante a que ocorre em outros tecidos. A fase inflamatória estende-se até o 4º dia; a fase de fibroplasia até o 14º dia e a partir daí ocorre a fase de maturação.

ADAMSONS e KAHAN (1970) citam que o processo de cicatrização do trato gastrointestinal pode ser influenciado por diversos fatores que podem ser divididos em fatores locais (do próprio tecido em cicatrização) e fatores gerais (do organismo).

JIBORN, AHONEN e ZEDERFELDT em 1980, avaliaram o padrão de reparação das anastomoses colônicas em ratos por meio da utilização de hidroxiprolina radiomarcada. Observaram que há intenso ciclo de síntese e degradação das fibras colágenas no início do processo de cicatrização, com predomínio da degradação até o 4º dia de pós-operatório. Por volta do sétimo dia de

pós-operatório o processo de síntese sobrepuja o de degradação. Observaram também que este processo cíclico de síntese e degradação do colágeno ocorre não só na área da anastomose, mas também nos segmentos perianastomóticos, principalmente no segmento proximal.

2.3 MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DA CICATRIZAÇÃO DAS SUTURAS GASTRO-INTESTINAIS

As anastomoses intestinais podem ser avaliadas mediante parâmetros clínicos, mecânicos, histológicos e bioquímicos. Outros métodos, menos comumente utilizados, são os parâmetros microbiológicos, radiográficos, microangiográficos e de microscopia eletrônica.

2.3.1 Parâmetros Clínicos

Os parâmetros clínicos levam em consideração a evolução pós-operatória do animal e os achados intra-abdominais após sua morte, seja ela em meio à fase de experimentação, ou provocada no término desta para a coleta de dados.

Eles indicam o sucesso ou insucesso da anastomose e refletem a presença de deiscência anastomótica o que, em última análise, se procura avaliar nos experimentos em que se estuda cicatrização de anastomoses colônicas.

Os dados evolutivos mais comumente explorados são: ganho ou perda de peso e a evolução pós-operatória (óbitos).

À exploração da cavidade abdominal, os dados mais freqüentemente avaliados são: quantificação e qualificação de aderências pós-operatórias e possíveis complicações anastomóticas (deiscência, abscesso anastomótico e estenose).

2.3.2 Evolução Ponderal no Pós-operatório

O ganho ou perda de peso é considerado parâmetro clínico e nutricional que interfere na avaliação das anastomoses intestinais. A perda de peso pode indicar

indiretamente desnutrição e, conseqüentemente, determinar deficiência na cicatrização da anastomose.

LEITE et al. em 1993, avaliaram a influência da desnutrição na cicatrização de anastomose do colon distal em ratos e concluíram que a desnutrição protéica apresenta efeito deletério na cicatrização do colon no rato, com diminuição da força de ruptura e na concentração do colágeno.

2.3.3 Aderências Intra-abdominais

A formação de aderências intra-abdominais continua sendo um problema após cirurgias que envolvam acesso à cavidade peritoneal. Reflete indiretamente a capacidade de reparação da resposta inflamatória à agressão da cavidade abdominal. Um método de sistematização para a avaliação de aderências intra-abdominais foi proposto em 1962 por KNIGHTLY, AGOSTINO e CLIFFTON. Os autores investigaram o efeito da fibrinolisina e da heparina na formação de aderências peritoneais em ratos após trauma por tripsia do ceco. Os ratos eram mortos no 7º dia pós-operatório e as aderências classificadas de 0 a 4. A classificação variou de acordo com a extensão, número e densidade das aderências. Os índices serviram para caracterizar a intensidade do processo de aderência em cada nível e comparação entre os diversos grupos.

2.3.4 Métodos Mecânicos

HOWES, SOOY e HARVEY (1929) realizaram estudo pioneiro visando à sistematização da avaliação da tensão das feridas cirúrgicas na fase precoce da cicatrização. Naquele experimento foi avaliada a resistência da sutura em anastomoses intestinais e a capacidade da parede intestinal em conter a sutura realizada por meio de diferentes técnicas. Houve correlação entre as forças de tensão necessárias à ruptura dos tecidos e o processo fibroplásico.

A avaliação da resistência das anastomoses intestinais por métodos mecânicos tem sido realizada mais freqüentemente por duas técnicas: pressão de ruptura e força de ruptura.

2.3.4.1 Pressão de Ruptura

CHLUMSKY (1899) descreveu este método há pouco mais de um século e é bastante utilizado atualmente em estudos experimentais de cicatrização (RABAU et al., 1995; TÜRKÇAPAR et al., 1998).

A avaliação é feita no segmento do intestino onde foi realizada a anastomose, sendo que esta fica exatamente no centro da peça a ser testada. Uma das extremidades é fechada e na outra se conecta bomba de insuflação. Através desta última infunde-se líquido ou ar atmosférico até que haja ruptura da anastomose. A pressão de ruptura é registrada por manômetro ou fisiógrafo. Este método pode ser aplicado em segmento ressecado ou no animal anestesiado sem desfazer as aderências perianastomóticas. Os resultados serão diferentes nos dois casos, mas ambos com validade científica.

Segundo o trabalho de JIBORN, AHONEN e ZEDERFELDT (1978), duas variáveis podem ser obtidas a partir deste método: a pressão de explosão (*"Bursting pressure"*) e a tensão de explosão (*"Bursting wall tension"*). A primeira é a medida da pressão intraluminal no momento da explosão e a última é a medida da tensão circular da anastomose no momento da explosão. A diferença entre a tensão de explosão e a pressão de explosão é que a tensão leva em consideração o raio interno da alça intestinal no local da anastomose (Lei de Laplace: $T=P/R$, onde T é a tensão, P é a pressão e R é o raio).

2.3.4.2 Força de Ruptura (*"Breaking Strength"*)

Este método foi inicialmente utilizado para investigar a cicatrização de suturas em tendão e pele. Esta medida avalia a resistência da anastomose a forças de direção longitudinal representadas pela tração dos segmentos em direções opostas (JIBORN et al., 1978).

O método consiste na fixação das extremidades do segmento intestinal ao aparelho seguido de tração até que ocorra a ruptura no local onde se encontra a anastomose. Esta força pode ser exercida com aumento contínuo ou intermitente e pode ser utilizado segmento de tecido contendo a sutura ou a anastomose íntegra.

NARESSE et al. em 1987, com base no extensômetro de resistência elétrica (*Strain Gauge*), idealizaram um aparelho de tração para avaliar a força de ruptura das anastomoses intestinais. Para avaliar sua precisão foram utilizados 32 cães submetidos à anastomose de intestino delgado e aleatoriamente divididos em 4 grupos (3^o, 7^o, 14^o e 21^o pós-operatório). Os autores concluíram que o instrumento utilizado para medida de força de ruptura apresenta erro mínimo de leitura, tornando justificável sua utilização em investigações experimentais, não só da cicatrização intestinal, como de toda a ferida cirúrgica.

Em 1999 houve o desenvolvimento de método mecânico computadorizado de alta precisão para a determinação da força de ruptura, descrito por IKEUCHI et al. Os autores tentaram estabelecer correlação entre este método e o método de pressão de ruptura, já consagrado na literatura, bem como definir qual deles seria o mais indicado na avaliação mecânica da cicatrização de anastomoses intestinais. Concluíram que a força de ruptura seria o melhor método para avaliação biológica da cicatrização das anastomoses, enquanto que a pressão de ruptura seria mais adequada na pesquisa de integridade anastomótica em geral, não refletindo o processo cicatricial em si.

2.4 PARÂMETROS HISTOLÓGICOS

Os parâmetros histológicos permitem avaliar a presença e o arranjo de estruturas microscópicas envolvidas no processo de cicatrização, como por exemplo, células e matriz extracelular. É muito empregado em estudos experimentais, porém é subjetivo e sujeito a erros de interpretação. É importante, então, que se utilizem métodos que possibilitem extrair dados passíveis de quantificação, para que seja factível realizar comparações e avaliações do processo de cicatrização.

Dentre as técnicas histológicas de coloração para o colágeno, a técnica que utiliza o corante *sirius red* F3BA se destaca pela maior seletividade para tecido conjuntivo e por ser mais adequado para a leitura em microscopia de luz polarizada (SWEAT; PUCHTLER; ROSENTHAL, 1964). A adição de ácido pícrico previne a coloração de estruturas que não contenham colágeno (JUNQUEIRA; COSSERMELLI; BRENTANI, 1978).

Na coloração *picrosirius red* (PCS), a reação do corante com as fibras de colágeno determina disposição paralela das moléculas do corante em relação às fibras colágenas, o que aumenta a sua birrefringência. Esta birrefringência apresenta diferentes padrões de cores e tonalidades que se correlaciona com o tipo de colágeno. Isto permite a diferenciação das fibras colágenas em tipo I e tipo III (JUNQUEIRA et al., 1978).

Em estudo conduzido por DAYAN et al. (1989), onde foram comparados vários tipos de fibras colágenas purificadas de espessuras diferentes pelo método PCS, foi observado que o entrelaçamento e o alinhamento entre as moléculas, e não apenas sua espessura, constituiu o fator mais importante para determinar o padrão de birrefringência. Na observação com luz polarizada, as fibras com maior entrelaçamento e maior espessura apresentaram coloração laranja-avermelhado e foram denominadas colágeno do tipo I (maduro). As fibras mais afiladas e menos entrelaçadas apresentaram coloração esverdeada e foram denominadas colágeno tipo III (imaturo).

O cálculo da percentagem das fibras classificadas em maduras ou imaturas de acordo com a sua coloração permite a avaliação qualitativa de fibras colágenas e pode ser utilizado em estudos de cicatrização de anastomoses intestinais (RABAU et al., 1995; COSTA et al., 2003; VIZZOTTO Jr. et al. 2003; TRUBIAN, 2003).

Com base nas percentagens de colágeno tipo I e tipo III, foi criado o índice de maturação do colágeno (IMaC), definido como a razão entre essas percentagens.

$$\text{IMaC} = \frac{\% \text{ de Colágeno tipo I - Maduro}}{\% \text{ de Colágeno tipo III - Imaturo}}$$

Valores maiores do que um indicam que a percentagem de colágeno tipo I é maior do que a percentagem de colágeno tipo III (LEMOS, 2002).

3 MATERIAL E MÉTODO

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 MATERIAL

Foram utilizados 42 ratos *Wistar* (*Rattus norvegicus albinus*, *Roentia Mammalia*), machos, adultos, com idade média de 90 dias e peso médio de 310 gramas, provenientes do Biotério do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná.

Os animais foram alojados em grupos de dois em cada caixa de polipropileno, forrada com serragem e receberam água e ração *ad libitum*. As caixas estavam identificadas e separadas em dois grupos: o grupo octreotide (GO) e o grupo controle (GC).

Um rato de cada caixa teve a extremidade da cauda pintada para diferenciá-lo. As condições ambientais do laboratório foram mantidas constantes, com temperatura de $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ e ciclo claro-escuro de 12 horas.

Os animais foram mantidos no Laboratório de Cirurgia Experimental do Programa de Pós-graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná, onde também os procedimentos cirúrgicos foram realizados. Foram obedecidos os princípios éticos de experimentação animal preconizados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA (2000).

3.1.1 Tratamento pelo Octreotide (Sandostatin[®])

Utilizou-se o produto Sandostatin[®] (Novartis), adquirido na forma de caixa com 5 ampolas de 100 µg/mL, armazenado e transportado na temperatura indicada pelo laboratório fabricante, de 2°C a 10°C.

O produto foi diluído na concentração de 10 µg/mL duas vezes por semana, conforme a necessidade de aplicações, e a diluição foi realizada no laboratório de farmacotécnica do HC-UFPR (divisão de protocolos de pesquisa).

A dose utilizada de octreotide foi de 20 µg/kg/dia, dose única diária via subcutânea (PAPALAMBROS et al., 2004; TÜRKÇAPAR et al, 1998). O grupo controle recebeu dose isovolumétrica de solução salina isotônica, também por via subcutânea.

3.2 MÉTODO

Os ratos foram divididos em dois grupos:

1. Grupo controle (GC) – (n=21) recebeu injeção subcutânea de solução salina isotônica 0,9% por 7 dias antes da operação e após até o 5º dia PO.
2. Grupo octreotide (GO) – (n=21) recebeu injeção subcutânea de solução de octreotide por 7 dias antes da operação e após até o 5º dia PO (Figura 2).

FIGURA 2 - INJEÇÃO SUBCUTÂNEA DE OCTREOTIDE



3.2.1 Procedimento Cirúrgico

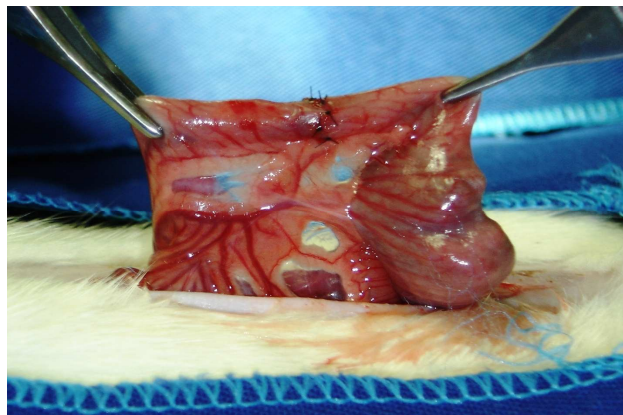
Pré-operatório: todos os animais foram submetidos a jejum de 12 horas prévias ao procedimento cirúrgico com o objetivo de diminuir o conteúdo fecal no intestino grosso do rato, local em que foram feitas as anastomoses.

Anestesia: para a anestesia foi utilizada mistura de isoflurano (Isothane[®]) e oxigênio através de sistema de vaporização calibrado. Os gases chegaram ao rato através do duto de saída do vaporizador, o qual foi adaptado à boca e narinas do animal com máscara emborrachada. As alterações no plano anestésico foram

manejadas através da calibração do vaporizador. Após a indução anestésica os animais foram pesados e identificados.

Procedeu-se então a tricotomia abdominal e fixação do animal à mesa cirúrgica com os membros em extensão. Na seqüência realizou-se antissepsia abdominal com polivinilpirrolidona-iodo a 10% (Povidine Tópico[®], Darrow, Rio de Janeiro, Brasil) e colocação de campo fenestrado estéril sobre o animal, expondo o campo operatório. Para acesso à cavidade abdominal realizou-se incisão de 4 cm, com bisturi lâmina nº15, interessando pele, aponeurose e peritônio. Foram realizadas duas secções completas no colon; a primeira no colon ascendente a aproximadamente 6 cm distais da válvula ileocecal e a segunda, 5 cm distais à primeira no colon descendente. Atentou-se para a preservação dos vasos cólicos (WALKER Jr., W.F. 1997). A reconstrução do trânsito foi realizada mediante anastomose término-terminal em plano único total com 8 pontos separados de fio monofilamentar nylon 6.0 (Mononylon[®]; Ethicon, Johnson & Johnson, São Paulo, Brasil) (Figura 3).

FIGURA 3 - ANASTOMOSE COLÔNICA



A síntese da parede foi feita com sutura contínua de fio monofilamentar de nylon 3.0 (Mononylon[®], Ethicon) com agulha cortante de 1,5cm, em dois planos: músculo-aponeurótico e cutâneo. A ferida foi limpa com gaze embebida em solução de cloreto de sódio a 0,9% e em seguida, polivinilpirrolidona-iodo (Povidine Tópico[®]).

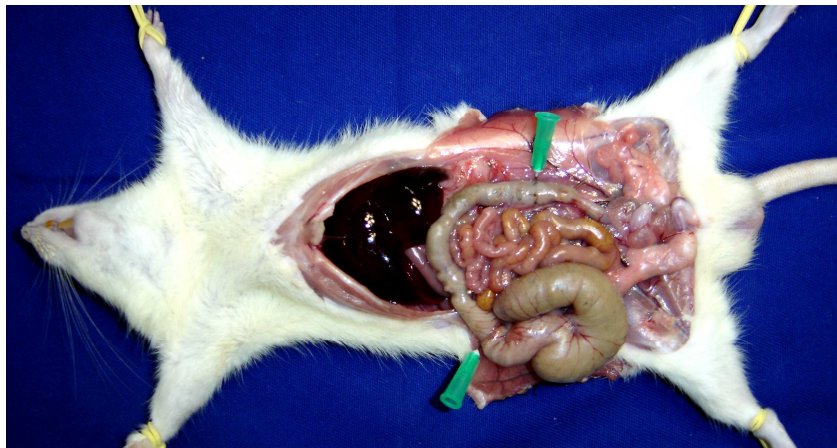
Pós-operatório: O fluxo de isoflurano foi suspenso logo após o término da síntese cirúrgica da parede abdominal e o rato passou a inalar oxigênio a 100% até o despertar. A recuperação anestésica ocorreu dentro de sua própria caixa com ar ambiente. No primeiro dia pós-operatório a administração subcutânea de solução

salina isotônica ou solução de octreotida foi reiniciada e mantida diariamente até a morte do animal.

3.2.2 Morte dos Animais

A morte de todos os ratos foi no 5º dia de pós-operatório. Os animais foram pesados e submetidos à inalação letal de isoflurano. Esta foi caracterizada pela ausência de reflexos e parada respiratória. Para acesso à cavidade abdominal realizou-se laparotomia mediana. Após inspeção da cavidade abdominal e classificação das aderências, procedeu-se à lise parcial destas e à retirada de dois segmentos do cólon com 5 cm de extensão cada (Figura 4).

FIGURA 4 - INSPEÇÃO DA CAVIDADE ABDOMINAL



Estes segmentos continham as anastomoses ascendente e descendente em suas porções médias, tendo cuidado para conseguir espécimes relativamente uniformes para todas as análises (Figura 5).

FIGURA 5 - SEGMENTOS COLÔNICOS: O PRIMEIRO DESTINADO À ANÁLISE HISTOLÓGICA. ABAIXO, A ANASTOMOSE ÍNTEGRA PARA ESTUDO TENSOMÉTRICO



Os dois espécimes cirúrgicos de cada animal (proximal e distal) foram, alternadamente, encaminhados para estudo histológico (conservados em formalina 10%) e de tração computadorizada (conservados em solução salina isotônica).

3.2.3 Dados Avaliados

a) Peso

Os ratos tiveram seus pesos aferidos todos os dias do experimento até a sua morte. Foi utilizado balança eletrônica (AUTOMATE AM 5500) no Laboratório de Cirurgia Experimental da Pós-graduação em Cirurgia da Universidade Federal do Paraná.

b) Aderências Intra-abdominais

Após a laparotomia, inspecionou-se a cavidade abdominal para classificação das aderências, que foram quantificadas segundo o índice de Knightly (KNIGHTLY; AGOSTINO; CLIFFTON, 1962) (Quadro 1)

QUADRO 1 - ÍNDICE DE ADERÊNCIAS DE KNIGHTLY

GRAU	DESCRIÇÃO
0	AUSÊNCIA DE ADERÊNCIAS
1	ADERÊNCIA ÚNICA, FINA E FACILMENTE SEPARÁVEL.
2	ADERÊNCIAS EM PEQUENA EXTENSÃO, FRACAS E QUE SE ROMPEM COM PEQUENA TRAÇÃO.
3	ADERÊNCIAS VISCERAIS EXTENSAS QUE SE ESTENDEM ATÉ A PAREDE
4	ADERÊNCIAS NUMEROSAS, EXTENSAS E DENSAS QUE ENVOLVEM O MESENTÉRIO, INTESTINO, OMENTO E PAREDE ABDOMINAL.

c) Força de Ruptura da Anastomose Colônica

A avaliação da força de ruptura da sutura colônica foi realizada no Laboratório de Cirurgia Experimental da Pós-Graduação em Cirurgia da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Para a avaliação desta variável foi utilizada a máquina universal de ensaio mecânico computadorizada, modelo DL-500MF (EMIC[®] – São José dos Pinhais – PR), com garras de pressão ajustável manualmente e sistema eletrônico de aquisição de dados.

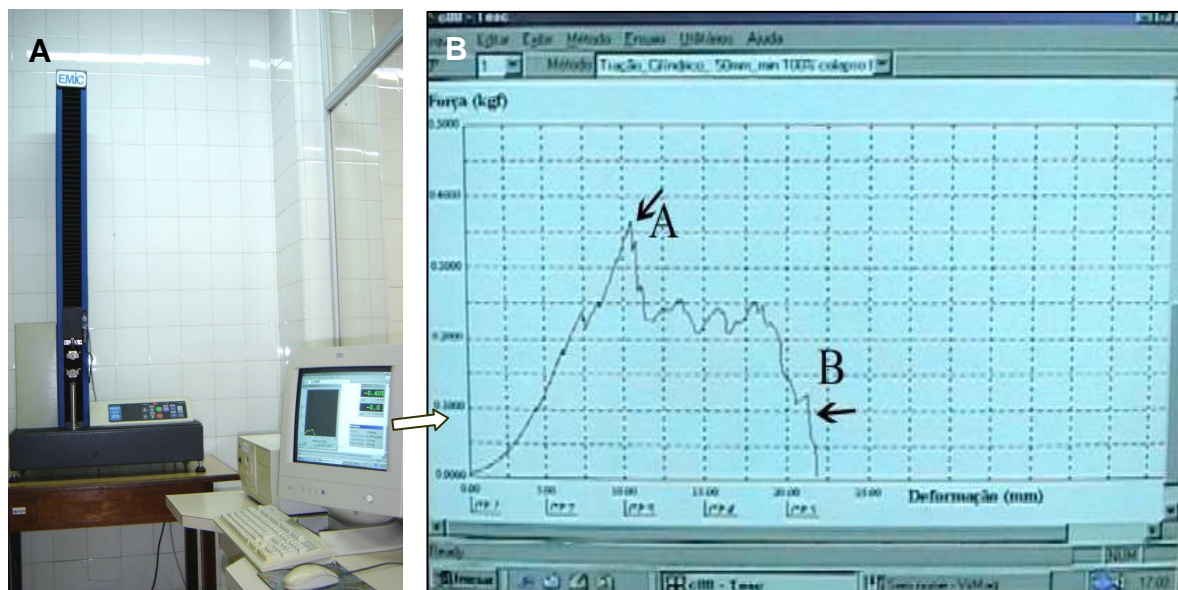
O segmento colônico separado para o ensaio de tensão foi acondicionado em frascos contendo solução salina a 0,9%. As suas extremidades foram fixadas às presilhas, contendo a anastomose em sua porção média. Todos os testes de tração foram feitos em intervalo máximo de 1 hora após a ressecção dos corpos de prova.

A tração ocorreu com velocidade de 50 mm/minuto, utilizando-se carga de 10 kg com sensibilidade de 50 g, com margem de erro de 0,5% até a ruptura total do corpo de prova. A força de tração é constantemente mensurada através do computador anexo ao sistema de presilhas (Figuras 6 e 7)

FIGURA 6 - A) MÁQUINA DE TENSÃO COMPUTADORIZADA; B) DETALHE DAS PRESILHAS TRACIONANDO CORPO DE PROVA



FIGURA 7 - A) COMPUTADOR COM O SOFTWARE TESC PARA MENSURAÇÃO E CONTROLE DAS TENSÕES; B) GRÁFICO DE FORÇA TÊNIL DURANTE O ENSAIO MECÂNICO



d) Densitometria do colágeno – Método *Sirius Red F3BA*

Após a obtenção do segmento colônico de cada animal destinado à análise histológica, as peças cirúrgicas foram abertas em sentido longitudinal, na borda anti-mesentérica e fixadas em formalina a 10%.

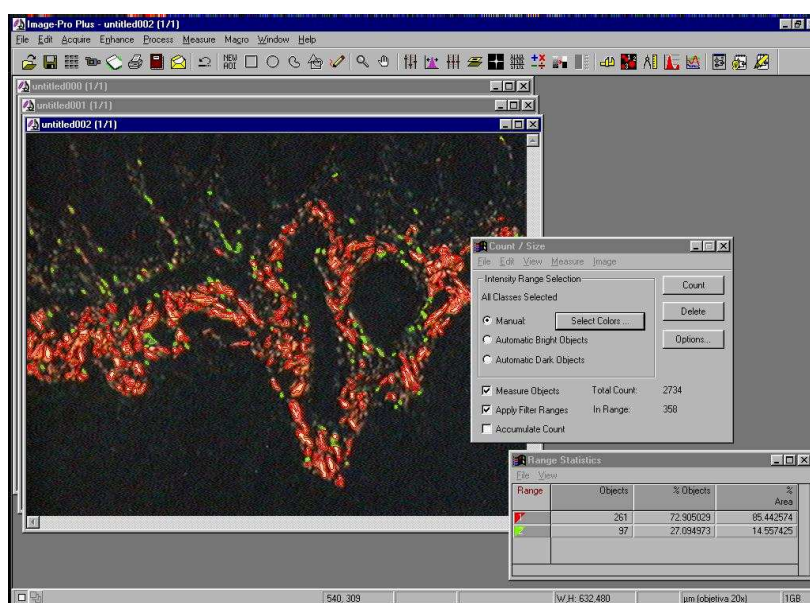
No Laboratório de Anatomia Patológica os fios de sutura foram retirados e foram efetuadas secções perpendiculares ao maior eixo da sutura. Foram encaminhados para processamento histológico, incluindo desidratação, diafanização

e embocamento em parafina. Após microtomia a 4 μm de espessura, os cortes histológicos foram submetidos à coloração de *picrosirius-red* F3BA.

Para identificação de colágeno maduro e imaturo, os cortes histológicos foram analisados por meio de microscópio óptico da marca Olympus[®], em aumento de 400 vezes, utilizando-se fonte de luz polarizada. As imagens foram captadas por câmera Sony[®] CCDÍRIS, transmitidas a monitor colorido Trinitron Sony[®], congeladas e digitalizadas por meio de placas Oculus TCX.

Realizou-se a análise das imagens mediante o aplicativo Image Pro-Plus versão 4.5 para Microsoft Windows[®] Sistema Red Green Blue(RGB), em computador da linha Pentium III[®] 733MHz (Figura 8).

FIGURA 8 - SISTEMA RED, GREEN, BLUE (RGB). EM VERMELHO OBSERVA-SE O COLÁGENO MADURO E EM VERDE O COLÁGENO IMATURO.



Este programa identifica o tipo de colágeno baseado em cores. Vermelho, amarelo e laranja correspondem a colágeno tipo I (maduro), enquanto que o verde representa colágeno tipo III (imaturo). Três campos foram avaliados (superior, médio e inferior) perpendicularmente à anastomose. Os resultados foram expressos em área percentual.

A partir da medida da percentagem de fibras colágenas foi calculado o índice de maturação do colágeno (IMaC), definido como a razão entre essas percentagens. Valor maior do que um indica predomínio de colágeno maduro.

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Procedeu-se ao tratamento estatístico julgado adequado conforme a natureza dos dados dos grupos ocreatide e controle.

Algumas variáveis qualitativas foram transformadas em frequência pela atribuição de índices, sendo elas: aderências intra-abdominais e dados histológicos. Estas variáveis foram submetidas à comparação das médias entre os grupos, utilizando as metodologias abaixo descritas.

Para comparação dos graus de aderência intra-abdominal (Índice de Knightly) entre os grupos foi utilizado o teste de Mann-Whitney.

Para as variáveis quantitativas observou-se o pré-requisito da distribuição normal (Gaussiana) das variáveis para a escolha do teste estatístico, com os resultados expressos como média \pm erro-padrão.

Na análise paramétrica foi utilizado o teste t de Student para comparação das médias das variáveis: força máxima de tração e força de ruptura total entre os grupos; pesos inicial e final entre e dentro dos grupos.

Na análise não-paramétrica foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis para as variáveis: colágenos tipo I e tipo III entre os grupos e comparação das médias do IMAc.

Em todos os testes estatísticos, o nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

Não houve óbito neste estudo. Três animais do grupo octreotide e dois animais do grupo controle não foram analisados estatisticamente com relação à força máxima de tração e força de ruptura total. Foram excluídos por ruptura do corpo de prova fora do local da anastomose.

4.1 PESO

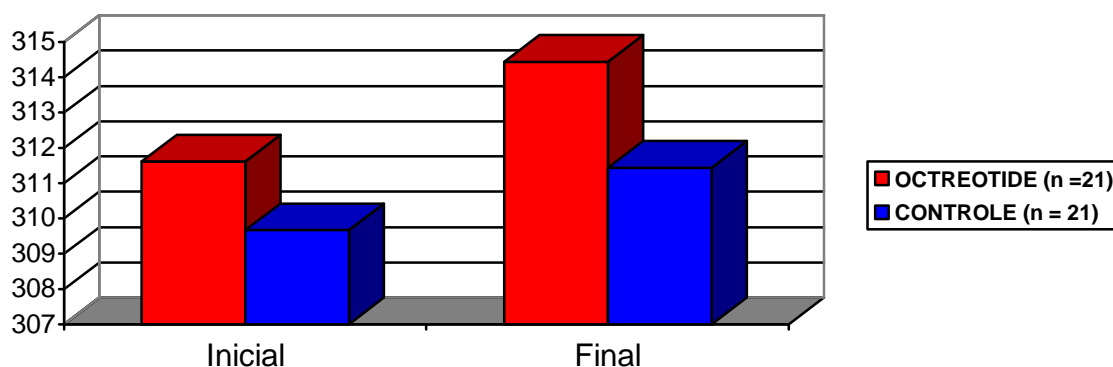
O peso dos animais avaliados no GO variou de 285g a 330g, sendo o peso médio de $313,58 \pm 1,95$. No grupo GC o peso variou de 284g a 320g sendo a média de $310,93 \pm 1,51$. A comparação das médias do peso inicial e peso final em cada grupo estão representados na tabela 2 e gráfico 1.

TABELA 2 - COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DO PESO (g) INICIAL E FINAL ENTRE E DENTRO DOS GRUPOS

PESOS (g)	OCTREOTIDE (n =21)	CONTROLE (n = 21)	p
	Média \pm EP	Média \pm EP	
Inicial	$311,62 \pm 2,32$	$309,67 \pm 1,64$	0,50
Final	$314,43 \pm 1,68$	$311,43 \pm 1,50$	0,19
p*	0,33	0,43	

Nota: n – tamanho da amostra; EP– Erro Padrão; p – nível de significância; p*– refere-se à comparação das médias inicial e final dentro dos grupos.

GRÁFICO 1 - COMPARAÇÃO DO PESO (g) INICIAL E FINAL ENTRE OS GRUPOS



O peso corporal inicial e final dos animais nos dois grupos não demonstrou diferença significativa ($p > 0,05$).

4.2 ÍNDICE DE ADERÊNCIAS

Quando foi avaliado o índice de aderências intra-abdominais nos grupos octreotide e controle foram observadas menos aderências no grupo octreotide, com $p=0,0003$ (Tabela 3).

TABELA 3 - COMPARAÇÃO DOS GRAUS DE ADERÊNCIA ENTRE OS GRUPOS

GRAU	FREQÜÊNCIA		p
	Octreotide (n = 21)	Controle (n = 21)	
0	10	3	0,0003
1	9	4	
2	2	9	
3	0	5	

n – tamanho da amostra; p – nível de significância.

4.3 FORÇA MÁXIMA DE TRAÇÃO E DE RUPTURA

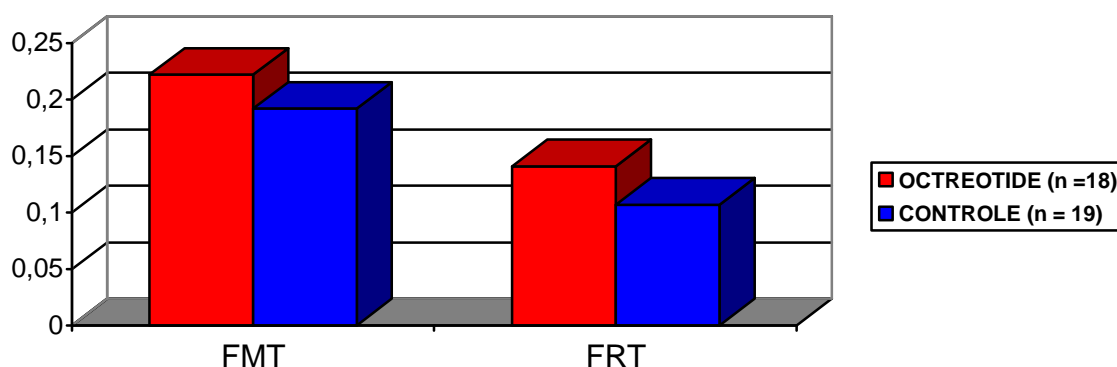
A força máxima de tração (FMT) e a força de ruptura total (FRT) foram analisadas por comparação das médias. Não houve diferença estatística entre os grupos, embora a FRT demonstre tendência a apresentar diferença com $p=0,07$ (Tabela 4 e Gráfico 2).

TABELA 4 - COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DA FORÇA MÁXIMA DE TRAÇÃO (FMT) E DA FORÇA DE RUPTURA TOTAL (FRT) ENTRE OS GRUPOS

VARIÁVEIS	MÉDIA ± EP		p
	Octreotide (n = 18)	Controle (n = 19)	
FMT	0,222 ± 0,013	0,192 ± 0,012	0,09
FRT	0,141 ± 0,014	0,107 ± 0,012	0,07

EP – Erro padrão; n – tamanho da amostra; p – nível de significância.

GRÁFICO 2 - COMPARAÇÃO DA FORÇA MÁXIMA DE TRAÇÃO (FMT) E DA FORÇA DE RUPTURA TOTAL (FRT) ENTRE OS GRUPOS



4.4 COMPARAÇÃO ENTRE COLÁGENOS MADURO E IMATURO

As Tabelas 5 e 6 demonstram a comparação das médias das áreas percentuais ocupadas pelos colágenos maduro, imaturo e as médias do IMAc em ambos os grupos. Foi estatisticamente significativo o predomínio de colágeno maduro em relação ao imaturo. Isso foi observado tanto no grupo octreotide quanto no controle.

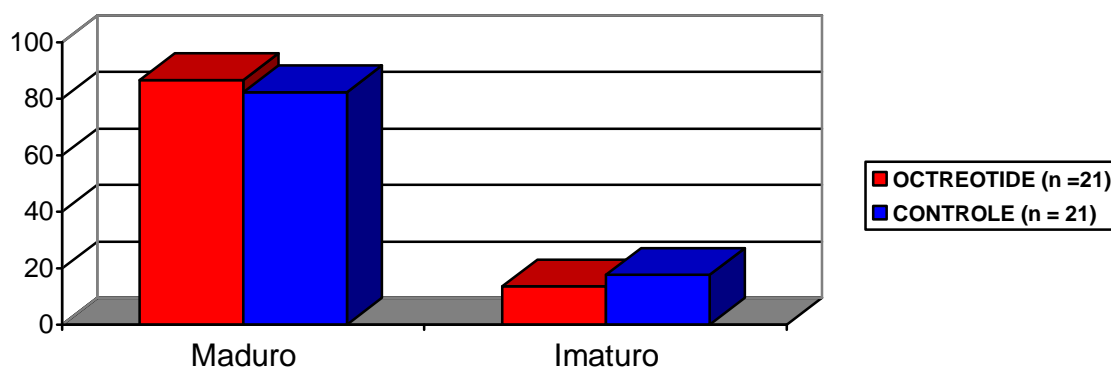
Ao se comparar o percentual de colágeno maduro entre os grupos, o grupo octreotide obteve percentagem maior com diferença estatística. Estes valores são demonstrados na tabela 5 e gráfico 3.

TABELA 5 - COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DE COLÁGENO MADURO E IMATURO ENTRE OS GRUPOS

COLÁGENO	MÉDIA ± EP		p
	Octreotide (n = 21)	Controle (n = 21)	
Maduro	86,58 ± 2,00	82,34 ± 1,52	0,04
Imaturo	13,60 ± 2,03	17,64 ± 1,52	0,04

n – tamanho da amostra; EP – Erro Padrão; p – nível de significância.

GRÁFICO 3 - COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DE COLÁGENO MADURO E IMATURO ENTRE OS GRUPOS



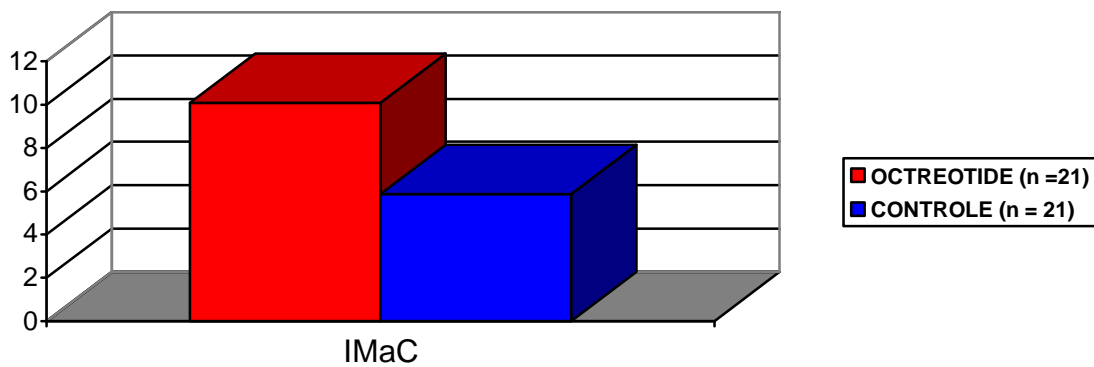
A análise das médias do IMaC mostrou valores acima de 1,0 tanto no grupo octreotide quanto no controle. Ao se comparar as médias do IMaC entre os grupos observou-se que a média do grupo octreotide foi estatisticamente maior com $p=0,04$. Estes percentuais são apresentados na tabela 6.

TABELA 6 - COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DO IMaC ENTRE OS GRUPOS

GRUPOS	n	IMaC	p
		M ± EP	
Octreotide	21	10,09 ± 1,53	0,04
Controle	21	5,87 ± 0,77	

n – tamanho da amostra; EP – Erro Padrão; p – nível de significância.

GRÁFICO 4 - COMPARAÇÃO DO IMAc ENTRE OS GRUPOS



5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

A cicatrização das anastomoses colônicas é mais lenta e tem índices de complicações maiores que as outras anastomoses do trato gastrointestinal (TÜRKÇAPAR et al., 1998). São influenciadas por fatores locais e sistêmicos, e por isso elas têm sido estudadas em ensaios clínicos e experimentais.

O efeito do octreotide na cicatrização ainda é desconhecido. Tem efeito antiproliferativo mediado por receptores específicos da somatostatina, inibe o hormônio de crescimento, o fator de crescimento epidérmico (FCE), o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I) e a secreção de insulina. Estes efeitos podem prejudicar a cicatrização das feridas (ALPER et al., 1997). A inibição da secreção intestinal, pancreática, biliar e da motilidade intestinal são algumas das ações do octreotide que podem beneficiar a cicatrização das anastomoses intestinais. Porém, a inibição dos hormônios anabólicos e tróficos podem ter um efeito negativo (PAPALAMBROS et al., 2004).

O octreotide é indicado no tratamento de várias doenças cirúrgicas. Em algumas delas, como a pancreatite ou as fístulas enterocutâneas, o octreotide é geralmente indicado durante o período pós-operatório, e por esta razão é de extrema importância a influência do octreotide na cicatrização de feridas. O efeito inibitório do octreotide no hormônio de crescimento e em outros fatores tróficos pode prejudicar a cicatrização das suturas criadas na pele ou nas estruturas intra-abdominais.

A dose diária de octreotide em estudos experimentais apresenta grande variação na literatura (1-20 µg/kg/dia). Doses maiores que 36 µg/kg/dia estão associadas a efeitos colaterais nos ratos (THOMPSON et al., 1993). Com base no estudo de TÜRKÇAPAR foi escolhida a dose de 20 µg/kg/dia.

O rato foi escolhido devido à sua disponibilidade para estudos que requerem grande número de animais genética e fisiologicamente semelhantes, fácil manipulação e condicionamento, e por sua similaridade ao homem em relação à composição da microflora fecal e processo de cicatrização (HERRMANN, et al., 1964). Optou-se por ratos machos para evitar variações hormonais e suas possíveis influências na cicatrização (NIAL; RYAN; O'BRIAN, 1982). Embora possa existir alguma dificuldade técnica na confecção das anastomoses devido às dimensões dos

órgãos intra-abdominais, após treinamento inicial, as anastomoses são perfeitamente exeqüíveis com relativa agilidade.

O período pré-operatório de sete dias serviu para a adaptação dos animais ao ambiente da experimentação e para adquirir níveis séricos de octreotíde. A ração utilizada foi a mesma utilizada em outros estudos experimentais em ratos.

Em relação ao uso de isoflurano como anestésico inalatório de escolha, o trabalho de TOSUN et al. (2005), demonstrou que o isoflurano quando comparado ao sevoflurano (grupo controle), não promove ação deletéria na cicatrização da pele de ratos *Wistar*. Como a cicatrização da pele apresenta fases de cicatrização parecidas com a do intestino, a droga foi utilizada com segurança. A utilização de isoflurano em anestesia inalatória de ratos em procedimentos cirúrgicos de média duração demonstrou-se segura, com boa tolerância e sem mortalidade associada (GOTOH; MATSUMOTO; IMAMURA, 2004). EGER e JOHNSON (1987) utilizaram isoflurano em ratos de três meses de vida e da mesma forma verificaram rápida indução e recuperação anestésicas. A técnica anestésica utilizada neste estudo foi eficaz pois proporcionou segurança durante o ato operatório, não causou morte de nenhum dos animais deste experimento, nem sinais de reações nociceptivas transoperatórias.

Na confecção da anastomose foram utilizados pontos simples, fio não absorvível, invertendo-se as bordas, pois a sutura interrompida foi descrita por alguns autores como favorecedora de melhor cicatrização com menor degradação de colágeno (HOWES et al., 1929; JIBORN et al., 1978).

Neste estudo, todos os ratos evoluíram sem fístulas ou infecção da ferida operatória. A execução da técnica mostrou-se factível, rápida e segura.

A definição do intervalo de tempo nos quais as anastomoses são avaliadas é uma decisão crítica porque a cicatrização é um processo contínuo. O protocolo ideal estudaria os parâmetros de cicatrização continuamente.

A escolha do 5º dia de pós-operatório para o sacrifício dos animais baseou-se nos estudos de JIBORN et al., 1978; GOTTRUP et al., 1981, FENG et al., 2003. Estes autores concluíram que a maioria das deiscências intestinais ocorrem até o 7º dia de pós-operatório e que, após este período a medida da força de ruptura se assemelha ao grupo controle (tecido intacto). Desta forma é possível correlacionar

os achados deste estudo experimental com complicações pós-operatórias encontradas na prática clínica.

FENG et al. (2003) obtiveram 100% de ruptura na linha anastomótica em peças analisadas no 5º dia do pós-operatório, período considerado crítico com relação à cicatrização de anastomoses colônicas. No estudo de COSTA et al. (2003) a partir do sétimo dia do pós-operatório houve maior número de rupturas fora da linha anastomótica o que impossibilitou a análise da força tênsil em alguns espécimes.

Durante a fase II (3 a 14 dias), período de aumento significativo na resistência da ferida, observa-se síntese aumentada de colágeno. Portanto, no 5º dia pós-operatório é possível a análise da anastomose do ponto de vista de resistência mecânica e morfometria do colágeno.

Os parâmetros clínicos, utilizados na avaliação da cicatrização das anastomoses intestinais possuem menor acurácia em relação aos métodos mecânicos computadorizados (FUMAGALLI et al., 1991; KANELLOS et al., 1996; KUZU et al., 1998; VIZZOTTO Jr. et al., 2003; TRUBIAN, 2003).

O parâmetro histológico, embora sujeito à subjetividade de quem o observe, também é importante fator de avaliação do processo de cicatrização das anastomoses. Este método propicia avaliação da cicatrização e permite identificar as alterações que diferentes substâncias produzem em nível tecidual. A quantidade de fibra colágena, principal elemento no tecido em cicatrização, pode ser avaliada com boa acurácia por este método. A análise microscópica isolada não serve como ferramenta para a quantificação do processo de cicatrização, mas o uso de corantes específicos para fibra colágena fornece informação útil quanto ao tipo de fibra. Poucos trabalhos estudaram a qualidade do colágeno. Levando-se isto em consideração foi utilizada neste estudo coloração específica para colágeno.

Os três parâmetros avaliados neste estudo (parâmetros clínicos, mecânico e histológico) serão abordados separadamente para melhor observação dos efeitos do octreotide na cicatrização das anastomoses colônicas em ratos.

5.1 PARÂMETROS CLÍNICOS

5.1.1 Peso

O estado nutricional e a ingesta protéico-calórica são fundamentais nos processos de cicatrização. O peso é importante parâmetro nutricional e a perda de peso no período peri-operatório indica indiretamente desnutrição e conseqüentemente deficiência na cicatrização das anastomoses. Por isso foi avaliada a diferença de peso entre os grupos.

Estudos como os de ROY VAN ZUIDEWIJN et al. (1986 e 1991); LAW et al. (1990) sugerem que o estado nutricional tem importância fundamental na cicatrização das anastomoses colônicas e que se houver desnutrição possivelmente a cicatrização destas anastomoses será afetada.

O octreotide tem como efeitos colaterais sintomas gastrointestinais como náusea, vômito, diarreia, distensão e dor abdominal, o que pode interferir na ingesta diária de nutrientes. Também diminui a absorção intestinal, o que poderia diminuir o peso e afetar adversamente a cicatrização por desnutrição (TÜRKÇAPAR et al., 1998). Com base no exposto, uma das preocupações deste estudo foi afastar o efeito da desnutrição na cicatrização das anastomoses colônicas. Por isto o peso foi utilizado como indicador indireto do estado nutricional dos animais. O peso corporal inicial e final dos animais nos dois grupos não demonstrou diferença significativa. Estes achados sugerem que a utilização do octreotide não interferiu no estado nutricional.

5.1.2 Aderências Intra-abdominais

A formação de aderências após cirurgia abdominal ainda é um problema. A presença de aderências intra-abdominais pode indicar indiretamente falha na anastomose, conseqüentemente é uma medida indireta da cicatrização (KUZU et al. 1998; KNIGHTLY et al. 1962). Nesta casuística, a quantificação de aderências pelo índice de Knightly mostrou-se menor no grupo octreotide.

É sabido que o octreotide reduz o número, resistência e extensão de aderências fibrosas em modelos experimentais submetidos à ressecção seguida de

reanastomose. Possivelmente isto ocorra por inibição do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I) o qual inibiria a síntese de glicosaminoglicanas nos fibroblastos (TSUZAKI et al., 1990; MALEC, et al., 1989). Em 2003, LAI et al. sugeriram que o OCT diminui o número de aderências porque inibe o fator de crescimento epidérmico e interfere no metabolismo do plasminogênio. Outros autores explicam a redução no número de aderências pela supressão da atividade da mieloperoxidase peritoneal (PAPALAMBROS et al., 2004).

5.2 PARÂMETROS MECÂNICOS

Muitos trabalhos na literatura mostram que os parâmetros mecânicos apresentam os resultados mais acurados como método de aferição da cicatrização de anastomoses (VAN WINKLE Jr. et al., 1969; FUMAGALLI et al., 1991; KANELLOS et al., 1996; ALPER et al., 1997; KUZU et al., 1998; TÜRKÇAPAR, et al. 1998; PAPALAMBROS, et al. 2004). No entanto, a interpretação destas informações é problemática devido aos diferentes métodos utilizados, além do emprego de diferentes animais e técnicas de sutura.

A força de ruptura mecânica é há muito tempo utilizada nos estudos de cicatrização das anastomoses. Embora a pressão de ruptura e a força de ruptura sejam comumente utilizadas para avaliar a resistência de anastomoses, estes dois métodos possivelmente avaliem características anastomóticas diferentes.

Em 1999, IKEUCHI et al. correlacionaram a pressão de ruptura com a força de ruptura. Concluíram que o último método é mais adequado para se avaliar os aspectos biológicos da cicatrização que possam influenciar a resistência anastomótica, pois a resistência mecânica da anastomose depende em grande parte do conteúdo de colágeno da submucosa. A força de ruptura é a força responsável pela perda de continuidade da parede intestinal. Portanto, a simples mensuração da pressão no momento da ruptura não mede de fato a resistência da anastomose.

Escolheu-se, para este trabalho, a tensiometria mecânica pela disponibilidade do aparelho além dos fatores mencionados acima. Foi utilizada para avaliação das anastomoses colônicas, a medida da força máxima de tração e a medida da força de ruptura total, de acordo com os estudos de GOTTRUP, 1981;

NARESSE et al., 1987; VIZZOTTO Jr, 2003; COSTA, 2003; LEMOS, 2002; TRUBIAN, 2003).

Da mesma forma que no estudo de IKEUCHI (1999), ocorreram, no presente trabalho, rupturas fora da linha anastomótica durante o teste de tração. Embora a ruptura tenha ocorrido na linha de sutura da anastomose na maioria dos animais, em alguns espécimes cirúrgicos tal ruptura ocorreu fora dessa linha. Isto ocorreu em três animais do GO e dois do GC, os quais foram excluídos da análise estatística.

5.2.1 Força Máxima de Tração (FMT)

A FMT, como definido anteriormente, é a força máxima atingida durante a tração em que começa a haver ruptura na linha da anastomose. Esta variável é equivalente à resistência tênsil mínima estudada no trabalho de IKEUCHI et al (1999). Observa-se que a primeira queda na força de tração durante o ensaio é o início da ruptura.

No presente trabalho, comparando-se os dois grupos, a FMT foi similar em ambos os grupos ($p=0,09$). Portanto, o octreotide não influenciou na FMT.

5.2.2 Força de Ruptura Total (FRT)

A FRT tem papel secundário como parâmetro de avaliação da resistência da anastomose, pois é pequena a sua sensibilidade em perceber pequenas diferenças de resistência à tração. Procedendo-se da mesma maneira pode-se observar que também não houve diferença entre os grupos ($p=0,07$).

A análise destes resultados indica que o octreotide não interferiu na resistência mecânica da anastomose no 5º dia de pós-operatório. O instrumento de medida da força de ruptura apresenta erro mínimo na sua leitura, tornando justificável sua utilização em investigações experimentais não só da cicatrização intestinal como de toda ferida cirúrgica.

5.3 PARÂMETROS HISTOLÓGICOS

Estudos comparando diversos métodos de coloração para análise do colágeno, concluíram que o corante *picrosirius-red* (PCS) é de simples execução, fácil interpretação e específico para o estudo do colágeno tecidual. Uma vez que torna suas fibras birrefringentes à luz polarizada, possibilita a sua quantificação e qualificação na amostra analisada.

As fibras de maior espessura (colágeno do tipo I) aparecem fortemente birrefringentes e fibras de menor espessura (colágeno do tipo III) aparecem fracamente birrefringentes. Esta diferenciação de cores permite análise qualitativa das fibras colágenas, ou seja, permite a diferenciação de fibras maduras e imaturas (SWEAT, et al., 1964; CONSTANTINE et al., 1968; ZAMBRANO et al., 1982; VIZZOTTO JÚNIOR, 2003; TRUBIAN et al., 2003).

Para a análise histológica do colágeno foi utilizado o método de coloração de PCS com base em estudos prévios que ressaltaram a importância de se obter análise qualitativa do colágeno (HENDRICKS et al., 1990; RABAU et al., 1995; LEMOS et al., 2002; COSTA et al., 2003; TRUBIAN et al., 2003).

TRUBIAN (2003), em estudo que avaliava o efeito do octreotide na cicatrização de sutura gástrica em ratos, concluiu que no 4º dia pós-operatório a administração de octreotide relacionou-se à maior proporção de colágeno tipo I em relação ao tipo III.

No presente estudo também foi observado que a percentagem de depósito de colágeno do tipo I (maduro) foi maior no GO. Isto significa maior organização e espessamento das fibras colágenas no grupo octreotide quando comparado com o grupo controle no 5º dia de pós-operatório. Provavelmente isto ocorreu porque o OCT não causou desnutrição e não interferiu na circulação. Porém, esta provável melhor cicatrização na avaliação histológica (colágeno), não se repetiu nas análises da FMT e da FRT como discutido previamente.

LEMOS (2002), em estudo para verificar o efeito da desnutrição intra-uterina na cicatrização da parede abdominal em ratos lactentes, sugeriu o índice de maturação do colágeno (IMaC). Foi observado no 7º dia pós-operatório o predomínio de fibras colágenas tipo III no grupo de ratos desnutridos. No 21º dia pós-operatório

observou-se um aumento significativo de colágeno tipo I em todos os animais, nutridos e desnutridos.

TRUBIAN et al. (2003), obtiveram valores de IMaC maiores no grupo octreotide em comparação com o grupo controle, enquanto que a FMT e FRT não apresentaram diferenças estatísticas.

Neste estudo, observaram-se valores de IMaC positivos (>1) nos grupos octreotide e controle. Estatisticamente, notaram-se valores de IMaC maiores no GO.

5.4 EFEITO DO OCTREOTIDE NA CICATRIZAÇÃO DAS ANASTOMOSES COLÔNICAS

A avaliação dos dados clínicos deste estudo, peso e índice de aderências, não mostraram interferência do octreotide na cicatrização das anastomoses colônicas.

O método mecânico é um método altamente eficaz para avaliação da resistência das anastomoses intestinais e do processo de cicatrização. Neste experimento, a força de ruptura, embora fosse maior no grupo octreotide, não apresentou diferença significativa.

Do ponto de vista histológico, o octreotide não teve efeito deletério na produção de colágeno, inclusive obteve médias de IMaC significativamente maiores.

Durante o tratamento com octreotide um procedimento cirúrgico por qualquer circunstância pode ser necessário. Portanto, em consideração aos resultados deste estudo, o octreotide pode ser utilizado com segurança no período peri-operatório; não ficou evidenciado efeito adverso do octreotide na cicatrização de anastomoses colônicas.

Para determinar todos os efeitos do octreotide na cicatrização de anastomoses colônicas, outros modelos clínicos e experimentais devem ser desenvolvidos.

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Com relação à utilização do octreotíde, administrado por via subcutânea, no período peri-operatório e sua influência na cicatrização de anastomoses colônicas de ratos adultos, pode-se concluir que:

1. O octreotíde não induz à perda de peso.
2. O uso de octreotíde está associado à redução no número de aderências intra-abdominais.
3. O octreotíde não interfere na resistência tênsil da anastomose.
4. O uso de octreotíde está associado a maior deposição de colágeno tipo I e maior IMaC em relação ao grupo controle.

REFERÊNCIAS

- ADAMSONS, R.J.; KAHAN, S.A. The rate of healing of incised wounds of different tissues in rabbits. **Surgery, Gynecology Obstetrics**, v.130, n.5, p.837-46, 1970.
- ALPER, D.; LEVY, A.; KADOURI, A.; ABARBANEL, J.; CHAIMOFF, C.; KYZER, S. The effect of octreotide on wound healing: an in vitro and in vivo experimental study. **European Journal of Surgery**, v.163, n.10, p.773-7, 1997.
- BANDA, M.J.; KNIGHTON, D.R.; HUNT, T.K.; WERB, Z. Isolation of a nonmitogenic angiogenesis factor from wound fluid. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, v.79, n.24, p.7773-7, 1982.
- BAUER, W.; BRINER, U.; DOEPFNER, W.; HALLER, R.; HUGUENIN, R.; MARBACH, P.; PETCHER, T.J. SMS 201-995: a very potent and selective octapeptide analogue of somatostatin with prolonged action. **Life Sciences**, v.31, n.11, p.1133-40, 1982.
- BRAZEAU, P.; VALE, W.; BURGUS, R.; LING, N.; BUTCHER, M.; RIVIER, J.; GUILLEMIN, R. Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. **Science**, v.179, n.68, p.77-9, 1973.
- CARREL, A. The treatment of wounds. **Journal of the American Medical Association**, v.55, p.2148-2150, 1910.
- CLARK, R.A. Cutaneous tissue repair: basic biologic considerations. I. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.13, n.5 pt 1, p.701-25, 1985.
- COHEN, I.K.; DIEGELMANN, R.F.; CROSSLAND, M.C. Wound care and wound healing. In: SCHWARTZ, S. **Principles of surgery**. New York: McGraw-Hill, 1999. p.279-303.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – COBEA. **Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação**. São Paulo: UNIFESP-EPM/AFIP/FAPESP, 2000. Disponível em: <http://www.cobea.org/principios.htm>. Acessado em: Jul/2005.
- CHRISTOPHER, E. Kinetic aspects of epidermal healing. In: MAIBACH, H.; ROVEE, D., (Eds.). **Epidermal wound healing**. St Louis: Mosby, 1972.
- COSTA, M.A.; CAMPOS, A.C.; COELHO, J.C.; DE BARROS, A.M.; MATSUMOTO, H.M. Oral glutamine and the healing of colonic anastomoses in rats. **JPEN Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v.27, n.3, p.182-6, 2003.
- DAYAN, D.; HISS, Y.; HIRSHBERG, A.; BUBIS, J.J.; WOLMAN, M. Are the polarization colors of picosirius red-stained collagen determined only by the diameter of the fibers? **Histochemistry**, v.93, p.27-9, 1989.

DIEGELMANN, R.F.; COHEN, I.K.; KAPLAN, A.M. The role of macrophages in wound repair: a review. **Plastic Reconstructive Surgery**, v.68, p.107-13, 1981.

FAZIO, M.J.; ZITELLI, J.A.; GOSLEN, J.B. Cicatrização de feridas. In: Coleman III, W.P.; Hanke, C.W.; Alt, T.H.; Asken, s. **Cirurgia cosmética: princípios e técnicas**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2000. p.18-23.

FENG, C.W.; AYRIZONO, M.L.S.; FAGUNDES, J.J.; COY, C.S.R.; GÓES, J.R.N.; LEONARDI, L.S. Estudos biomecânicos da ação de aderências sobre anastomose cólica: trabalho experimental em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.18, n.3, p.216-23, 2003.

FOSTER, C.E.; LEFOR, A.T. General control of gastrointestinal fistulas. **Surgical Clinics of North America**, v.76, p.1031-46, 1996.

GÓMEZ-PAN, A; DE LEIVA, A; SITGES-SERRA, A; TORTOSA, F. **Aplicaciones terapéuticas del SMS 201-995 (Sandostatin®)**. Barcelona: Sandoz, 1990.

GOTTRUP, F. Healing of incisional wounds in stomach and duodenum-Collagen distribution and relation to mechanical strength. **American Journal of Surgery**, v.141, p.222-7, 1981.

GRINNELL, F.; BILLINGHAM, R.E.; BURGESS, L. Distribution of fibronectin during wound healing in vivo. **Journal of Investigative Dermatology**, v.76, n.3, p.181-9, 1981.

HENDRIKS, T.; MASTBOOM, W.J. Healing of experimental intestinal anastomoses. Parameters for repair. **Diseases of the Colon Rectum**, v.33, n.10, p.891-901, 1990.

HERRMANN, J.B.; WOODWARD, S.C.; PULASKI, E.J. Healing of colonic anastomoses in the rat. **Surg Gynecol and Obstetrics**, v.119, p.269-75, 1964.

HEUSER, M; PÖPKEN, O.; KLEIMAN, I.; POST, S. Detrimental effects of octreotide on intestinal microcirculation. **Journal of Surgical Research**, v.92, p.186-92, 2000.

HOWES, E.L.; SOOY, J.W.; HARVEY, S.C. The healing of wounds as determined by their tensile strenght. **Journal of the American Medical Association**, v.92, p.42-5, 1929.

IKEUCHI, D.; ONODERA, H.; AUNG, T.; KAN, S.; KAWAMOTO, K.; IMAMURA, M.; MAETANI, S. Correlation of tensile strength with bursting pressure in the evaluation of intestinal anastomosis. **Digestive Surgery**, v.16, n.6, p.478-85, 1999.

JIBORN, H.; AHONEN, J.; ZEDERFELDT, B. Healing of experimental colonic anastomoses. III. Collagen metabolism in the colon after left colon resection. **American Journal of Surgery**, v.139, n.3, p.398-405, 1980.

JIBORN, H.; AHONEN, J.; ZEDERFELDT, B. Healing of experimental colonic anastomoses. II. Breaking strength of the colon after left colon resection and anastomosis. **American Journal of Surgery**, v.136, n.5, p.595-9, 1978.

JIBORN, H.; AHONEN, J.; ZEDERFELDT, B. Healing of experimental colonic anastomoses. The effect of suture technic on collagen concentration in the colonic wall. **American Journal of Surgery**, v.135, n.3, p.333-40, 1978.

JONSSON, K.; JIBORN, H.; ZEDERFELDT, B. Breaking strength of small intestinal anastomoses. **American Journal of Surgery**, v.145, n.6, p.800-3, 1983.

JUNQUEIRA, L.C.U.; COSSERMELLI, W.; BRENTANI, R. Differential staining of collagens type I, II and III by sirius red and polarization microscopy. **Archivum Histologicum Japonicum**, v.41, p.267-74, 1978.

KANELLOS, I.; KAVOUNI, A.; ZARABOUKAS, T.; ODISSEOS, C.; GALOVATSEA, K.; DADOUKIS, I. Influence of intraperitoneal 5-fluorouracil plus folinic acid on the healing of colonic anastomosis in rats. **European Surgical Research**, v.28, n.5, p.374-9, 1996.

KNIGHTLY, J.J.; AGOSTINO, D.; CLIFFTON, E.E. The effect of fibrinolysin and heparin on the formation of peritoneal adhesions. **Surgery**, v.52, p.250-8, 1962.

KRULICH, L.; DHARIWAL, A. P. S.; McCANN, S. M. Stimulatory and inhibitory effects of purified hypothalamic extracts on growth hormone release from rat pituitary in vitro. **Endocrinology**, 1968; 83:783-90.

KUZU, M.A.; KOSKOY, C.; KALE, T.; DEMIPRENCE, E.; RENDA, N. Experimental study of the effect of preoperative 5-fluorouracil on the integrity of colonic anastomoses. **British Journal of Surgery**, v.85, p.236-9, 1998.

LAI, H.S.; CHEN, Y.; CHANG, K.J.; CHEN, W.J. Effects of octreotide on epidermal growth factor receptor, tissue plasminogen activator, and plasminogen activator inhibitor during intraperitoneal adhesion formation. **Journal of Gastroenterology**, v.38, n.6, p.555-60, 2003.

LAMBERTS, S.W.J.; UITTERLINDEN, P.; DEL POZO, E. SMS 201-995 induces a continuous decline in circulating growth hormone and somatomedin-C levels during therapy of acromegalic patients for over two years. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.65, p.703-10, 1987.

LAMBERTS, S.W.; VAN DER LELY, A.J.; DE HERDER, W.W.; HOFLAND, L.J. Octreotide. **The New England Journal of Medicine**, v.334, n.4, p.246-54, 1996.

LAW, N.W.; ELLIS, H. The effect of parenteral nutrition on the healing of abdominal wall wounds and colonic anastomosis in protein-malnourished rats. **Surgery**, v.107, n.4, p.449-454, 1990.

LAWRENCE, C.M.; COMAISH, J.S.; DAHL, M.G. Excision of skin tumours without wound closure. **British Journal of Dermatology**, v.115, n.5, p.563-71, 1986.

LEITE, C.V.S.; NARESSE, L.E.; KOBAYASI, S.; MINOSSI, J.G.; BURINI, R.C.; CURI, P.R.; HOSSNE, W.S. Efeito da desnutrição protéica na anastomose do cólon

distal no rato: estudo da força de ruptura e do colágeno tecidual. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.8, n.4, p.145-50, 1993.

LEMOS, I.C.M.C. **Influência da desnutrição intra-uterina na cicatrização da parede abdominal de ratos lactentes avaliada mediante estudo tensiométrico e da morfometria do colágeno**. Curitiba, 2002. Tese (Doutorado em Clínica Cirúrgica) – Setor Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

MALEC, P.; ZEMAN, K.; MARKIEWICZ, K.; TCHORZEWSKI, H.; NOWAK, Z.; BAJ, Z. Short-term somatostatin infusion affects T lymphocyte responsiveness in humans. **Immunopharmacology**, v.17, p.45-9, 1989.

MARTINS JR, A; GUIMARÃES, AS; FERREIRA, AL. Efeito dos corticosteróides na cicatrização de anastomoses intestinais. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.7, p.28-30, 1992.

MEDEIROS, A.C.; MELO, N.M.C.; MACEDO, L.M.B.; MEDEIROS, I.C.; DANTAS FILHO, A.M.; AIRES NETO, T. Octreotida no tratamento de fístulas entéricas de ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.17, p.116-21, 2002.

MILLER, S.K.; MARTINDALE, R.G.; GAO, X.X.; GADACZ, T.R. The effects of octreotide on healing of small bowel anastomosis. **American Surgeon**, v.62, n.9, p.733-7, 1996.

MOSHER, D.F.; FURCHT, L.T. Fibronectin: review of its structure and possible functions. **Journal of Investigative Dermatology**, v.77, n.2, p.175-80, 1981.

NARESSE, L.E.; MENDES, E.F.; CURI, P.R.; LUCCHIARI, P.H.; KOBAYASI, S. Aparelho para medida da força de ruptura das anastomoses intestinais. **Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo**, v.42, n.5, p.204-8, 1987.

NIALL, M.; RYAN, G.B.; O'BRIEN, B.M. The effect of epidermal growth factor on wound healing in mice. **Journal of Surgical Research**, v.33, n.2, p.164-9, 1982

ORGILL, D.; DEMLING, R.H. Current concepts and approaches to wound healing. **Critical Care Medicine**, v.16, n.9, p.899-908, 1988.

ORTONNE, J.P.; CLEVY, J.P. Physiologie de la cicatrisation cutanée. **La Revue du Praticien**, v.44, n.13, p.1733-7, 1994.

PAPALAMBROS, E.; FILIS, K.; ANGELOPOULOU, R.; DIAMANTIS, T.; TSIGRIS, C.; BASTOUNIS, E. Does octreotide impair anastomotic healing after small bowel resection? **Acta Chirurgica Belgica**, v.104, n.2, p.198-203, 2004.

POSTLETHWAITE, A.E.; HOLNESS, M.A.; KATAI, H.; RAGHOW, R. Human fibroblasts synthesize elevated levels of extracellular matrix proteins in response to interleukin 4. **Journal of Clinical Investigation**, v.90, n.4, p.1479-85, 1992.

RABAU, M.; EYAL, A.; KLUGER, Y.; DAYAN, D. Bursting pressure in anastomotic healing in experimentally induced colitis in rats. **Diseases of the Colon Rectum**, v.41, n.4, p.468-72, 1998.

ROY VAN ZUIDEWIJN, D.B.; WOBES, T.; HENDRIKS, T.; KLOMPMAKERS, A.A.; de BOER, H.M. The effect of antineoplastic agents on the healing of small intestinal anastomosis in the rat. **Cancer**, v.58, p.62-6, 1986.

ROY VAN ZUIDEWIJN, D.B.; HENDRIKS, T.; WOBES, T.; DE BOER, H.M. Intraperitoneal cytostatics impair healing of experimental intestinal anastomosis. **British Journal of Cancer**, v.63, n.6, p.937-41, 1991.

STEGMAN, S.J.; TROMOVITCH, T.A.; GLOGAU, R.G. GRAFTS. In: _____. **Basics of dermatological surgery**. Chicago: Year Book Medical, 1982.

SWEAT, F.; PUCHTLER, H.; ROSENTHAL, S.I. Sirius red f3ba as a stain for connective tissue. **Archives of Pathology**, v.78, p.69-72, 1964.

TERKELTAUB, R.A.; GINSBERG, M.H. Platelets and response to injury. In: CLARK, R.A.F.; HENSON, P.M., (Eds.). **The molecular and cellular biology of wound repair**. New York: Plenum Press, 1998.

THOMPSON, J. S., NGUYEN, B. L. e HARTY, R. F. Somatostatin analogue inhibits intestinal regeneration. **Arch Surg**, v.128, n.4, p.385-9. Apr 1993.

TOSUN, Z.; TUNCER, S.; YOSUNKAYA, A.; ÖZKAN, A.; SENTÜRK, S.; SAVACI, N. Effects of isoflurane and sevoflurane on the survival of skin flaps in rats. **Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery and Hand Surgery**, v.39, n.5, p.268–71, 2005.

TRUBIAN, P.S. **Influência do octreotide na cicatrização de sutura gástrica em ratos: estudo tensiométrico e da morfometria do colágeno**. Curitiba, 2004. Dissertação (mestrado) – Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná.

TSUZAKI, S.; MOSES, A.C. Somatostatin inhibits deoxyribonucleic acid synthesis induced by both thyrotropin and insulin-like growth factor-I in FRTL5 cells. **Endocrinology**, v.126, p.3131-8, 1990.

TÜRKÇAPAR, A.G.; DEMIRER, S.; SENGUL, N.; ERSOZ, S.; KUTERDEM, E.; RENDÁ, N.; KUZU, I. The adverse effects of octreotide on the healing of colonic anastomoses in rats. **Surgical Today**, v.28, n.3, p.279-84, 1998.

VAN WINCKLE JUNIOR, W. The tensile strength of wounds and factors that influence it. **Surgery, Gynecology and Obstetrics**, v.129, n.4, p.819-42, 1969.

VIZZOTTO JUNIOR, A.O.; NORONHA, L.; SCHEFFEL, D.L.H.; CAMPOS, A.C.L. Influência da cisplatina administrada no pré e no pós-operatório sobre a cicatrização de anastomoses colônicas em ratos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.39, n.2, p.143-9, 2003.

WALKER Jr., W.F.; HOMBERGER, D.G. **Anatomy and dissection of the rat**. 3^a ed. New York: Basingstoke, 1997.

YAMANER, S.; BUGRA, D.; MÜSLÜMANOĞLU, M.; BULUT, T.; ÇUBUKÇU, O.; ADEMOĞLU, E. Effects of octreotide on healing of intestinal anastomosis following small bowel obstruction in rats. **Diseases of the Colon Rectum**, v.38, n.3, p.308-12, 1995.

ZAMBRANO, N.Z.; MONTES, G.S.; SHIGIHARA, K.M.; SANCHEZ, E.M.; JUNQUEIRA, L.C. Collagen arrangement in cartilages. **Acta Anatomica (Basel)**, v.113, p.26-38, 1982.

APÊNDICE 1:
PROJETO OCTREOTIDE

APÊNDICE 1 – PROJETO OCTREOTIDE

Projeto Octreotide

Cobaia nº _____ Início dia ___/___ (DIA 1)

Óbito pós Cx	
Controle	
Octreotide	

Intercorrências: _____

Evolução Pós Operatória: _____

Deiscência: Data ___/___

Aderência Intra Abdominal – Índice: _____

Peso	
Dia Inicial	Dia da Cirurgia
g	g
Peso Inic. – Dia Cx.: _____ Peso dia Cx. –dia Óbito: _____	
Dose Diária: Octreotide () Sol. Fisiol. ()	

Dia	1°	2°	3°	4°	5°	6°	Cx.	8°	9°	10°	11°	13°	14°	15°	16°
Dose							Peso								
							Dose de Anest.								

IMaC: _____

Força de Ruptura: _____

APÊNDICE 2
PLANILHA EM MICROSOFT EXCEL® – PESO

APÊNDICE 2 – PLANILHA EM MICROSOFT EXCEL® – PESO

Dia/Octreotide	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1	330	304	320	300	307	302	320	333	318	285	315	312	316	315	301	311	308	304	314	311	318
2	330	304	320	300	307	302	320	333	318	285	315	312	316	315	301	311	308	304	314	316	318
3	330	304	320	300	307	302	320	333	318	285	315	314	316	314	301	315	309	305	317	315	318
4	320	304	320	305	312	302	320	333	315	289	311	315	316	314	300	315	305	305	317	313	320
5	330	304	325	305	312	302	320	335	315	289	315	312	314	314	305	315	305	305	317	312	320
6	320	310	330	305	312	307	325	335	315	292	315	312	314	316	304	314	308	304	318	312	321
CX 7	320	310	330	310	318	310	325	335	318	292	315	315	315	316	304	313	309	304	319	315	322
8	320	306	320	310	318	307	325	331	319	295	314	314	318	316	301	312	308	306	316	315	321
9	330	306	320	310	318	315	325	330	317	295	312	314	319	318	302	313	305	306	316	316	322
10	330	310	320	310	310	315	325	333	317	294	314	312	314	317	302	315	306	306	314	318	320
11	325	310	320	310	310	315	328	335	314	298	313	311	317	317	304	316	304	305	312	312	320
Óbito	325	310	320	310	310	315	328	335	314	300	313	311	314	317	305	316	305	309	311	312	320
Dia/Controle	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1	308	312	284	317	306	313	303	299	308	310	312	308	318	312	308	314	312	315	313	317	314
2	308	312	284	317	306	313	303	299	308	310	312	308	318	311	308	315	315	318	315	317	312
3	308	312	284	317	306	313	303	299	310	310	312	304	319	313	308	315	316	319	315	315	311
4	309	314	284	319	305	311	305	302	310	310	314	307	316	312	307	316	316	319	316	311	312
5	312	314	284	320	307	312	306	302	310	309	314	308	317	312	307	316	317	314	316	313	312
6	314	314	286	320	305	315	305	302	312	309	312	306	317	312	304	317	319	316	310	311	312
CX 7	312	317	286	320	305	315	305	306	310	309	312	305	317	313	304	318	320	316	310	312	314
8	314	318	287	319	308	318	305	306	0	309	315	304	315	313	304	319	314	315	309	311	314
9	315	317	289	318	309	315	307	308	0	312	315	307	312	310	305	314	318	316	308	313	317
10	315	313	289	318	310	316	307	308	0	303	315	307	312	310	306	315	316	313	307	312	318
11	312	316	289	319	309	315	309	308	0	312	313	308	314	314	305	315	316	315	307	315	314
Óbito	312	316	291	319	310	317	309	309	0	314	314	308	314	313	306	315	315	316	307	315	314

APÊNDICE 3
PLANILHA EM MICROSOFT EXCEL® – COLÁGENO

APÊNDICE 3 – PLANILHA EM MICROSOFT EXCEL® – COLÁGENO

OCTREOTITE		1	2	3	4	5	MÉDIAS	IMaC
1	vermelho	58,14	62,88	75,77	70,16	72,33	67,86	2,11
	verde	41,95	37,11	24,22	29,83	27,66	32,15	
2	vermelho	77,53	86,2	74,36	88,42	88,21	82,94	4,87
	verde	22,46	13,79	25,63	11,57	11,78	17,05	
3	vermelho	92,29	84,36	87,97	91,39	79,65	87,13	6,78
	verde	7,7	15,63	12,02	8,6	20,34	12,86	
4	vermelho	57,96	61,67	56,38	67,45	77,67	64,23	1,8
	verde	42,03	38,32	43,61	32,54	22,32	35,76	
5	vermelho	81,11	83,21	82,92	80,98	89,4	83,52	5,07
	verde	18,88	16,78	17,07	19,01	10,59	16,47	
6	vermelho	72,04	91,64	91,07	94,79	90,56	88,02	7,35
	verde	27,95	8,34	8,92	5,2	9,43	11,97	
7	vermelho	66,54	69,26	70,69	79,89	68,7	71,02	2,45
	verde	33,45	30,73	29,3	20,1	31,29	28,97	
8	vermelho	87,85	91,87	88,59	84,36	86,49	87,83	7,22
	verde	12,14	8,12	11,4	15,63	13,5	12,16	
9	vermelho	94,83	95,21	81,66	88,49	86,6	89,36	8,4
	verde	5,16	4,78	18,33	11,51	13,39	10,63	
10	vermelho	89,25	65,05	81,2	87,87	89,22	82,52	3,84
	verde	30,74	34,94	18,79	12,12	10,77	21,47	
11	vermelho	83,17	91,74	74,71	67,57	85,6	80,56	4,15
	verde	16,82	8,25	25,28	32,42	14,39	19,43	
12	vermelho	98,57	92,79	96,59	90,74	95,11	94,76	18,1
	verde	1,42	7,2	3,4	9,25	4,88	5,23	
13	vermelho	91,23	95,52	96,91	91,93	97,14	94,55	17,4
	verde	8,76	4,47	3,08	8,06	2,85	5,44	
14	vermelho	90,02	92,47	97,55	93,51	97,8	94,27	16,5
	verde	9,97	7,52	2,44	6,48	2,19	5,72	
15	vermelho	94,51	83,33	96,83	92,02	83,95	90,13	9,14
	verde	5,48	16,66	3,16	7,97	16,04	9,86	
16	vermelho	98,9	93,95	97,84	98,19	92,06	96,19	25,3
	verde	1,09	6,04	2,15	1,8	7,93	3,80	
17	vermelho	87,19	90,07	89,29	97,2	96,19	91,99	11,5
	verde	12,8	9,92	10,7	2,79	3,8	8,00	
18	vermelho	97,22	86,93	93,57	96,55	96,51	94,16	16,1
	verde	2,77	13,06	6,42	3,44	3,48	5,83	
19	vermelho	89,74	90,02	96,67	92,9	87,76	91,42	10,7
	verde	10,25	9,97	3,32	7,09	12,23	8,57	
20	vermelho	97,94	93,63	92,42	98,72	97,57	96,06	24,4
	verde	2,05	6,36	7,57	1,27	2,42	3,93	
21	vermelho	95,7	82,97	89,06	92,74	87,57	89,61	8,63
	verde	4,29	17,02	10,93	7,25	12,42	10,38	

CONTROLE		1	2	3	4	5	MÉDIAS	
1	vermelho	85,46	91,9	99,09	75,04	86,33	87,56	7,05
	verde	14,53	8,09	0,9	24,95	13,66	12,43	
2	vermelho	88,19	93,67	85,44	79,99	79,06	85,27	5,79
	verde	11,8	6,32	14,55	20	20,93	14,72	
3	vermelho	77,73	72,91	65,13	77,49	87,21	76,09	3,18
	verde	22,26	27,08	34,86	22,5	12,78	23,90	
4	vermelho	73,67	62,19	72,48	82,99	81,85	74,64	2,94
	verde	26,32	37,8	27,51	17	18,14	25,35	
5	vermelho	82,79	94,62	81,06	89,08	88,08	87,13	6,77
	verde	17,2	5,37	18,93	10,91	11,91	12,86	
6	vermelho	84,31	75,1	76,8	80,89	82,78	79,98	4,00
	verde	15,68	24,89	23,19	19,1	17,21	20,01	
7	vermelho	81,21	64,73	61,91	74,69	80,45	72,60	2,65
	verde	18,78	35,26	38,08	25,3	19,54	27,39	
8	vermelho	85,26	91,26	69,17	83,75	93,19	84,53	5,47
	verde	14,73	8,73	30,82	16,24	6,8	15,46	
9	vermelho	86,28	87,21	89,26	82,45	93,29	87,70	7,13
	verde	13,71	12,78	10,73	17,54	6,7	12,29	
10	vermelho	77,73	87,11	73,72	71,22	77,9	77,54	3,45
	verde	22,26	12,88	26,27	28,77	22,09	22,45	
11	vermelho	84,44	66,05	70,49	66,7	73,15	72,17	2,59
	verde	15,55	33,94	29,5	33,29	26,84	27,82	
12	vermelho	92,87	73,66	78,77	67,64	62,97	75,18	3,03
	verde	7,12	26,33	21,22	32,35	37,02	24,81	
13	vermelho	92,54	93,14	92,56	91,09	89,31	91,73	11,1
	verde	7,45	6,85	7,43	8,9	10,68	8,26	
14	vermelho	88,82	95,41	96,42	92,61	96,88	94,03	15,8
	verde	11,17	4,58	3,57	7,38	3,11	5,96	
15	vermelho	86,04	95,85	94,93	86,99	86,35	90,03	9,04
	verde	13,95	4,14	5,06	13	13,64	9,96	
16	vermelho	83,16	93,06	72,19	80,85	96,44	85,14	5,73
	verde	16,83	6,93	27,8	19,14	3,55	14,85	
17	vermelho	85,8	88,15	79,05	60,74	93,74	81,50	4,42
	verde	14,19	11,64	20,94	39,25	6,25	18,45	
18	vermelho	86,05	91,29	96,46	96,13	91,42	92,27	12
	verde	13,94	8,7	3,53	3,86	8,57	7,72	
19	vermelho	69,13	72,95	76,02	72,01	83,55	74,73	2,96
	verde	30,86	27,04	23,97	27,98	16,44	25,26	
20	vermelho	62,64	80,09	77,04	69,32	87,37	75,29	3,05
	verde	37,35	19,9	22,95	30,67	12,62	24,70	
21	vermelho	83,34	73,98	72,72	95,8	94,88	84,14	5,31
	verde	16,65	26,01	27,27	4,19	5,11	15,85	