

PAULA SUZIN TRUBIAN

**NUTRIÇÃO PERIOPERATÓRIA E CICATRIZAÇÃO DE
ANASTOMOSES COLÔNICAS EM RATOS DESNUTRIDOS E
TOXÊMICOS: TENSIMETRIA, DENSITOMETRIA DO COLÁGENO E
QUANTIFICAÇÃO DE ANGIOGÊNESE E MIOFIBROBLASTOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos L. Campos

Co-orientador: Prof. Dr. João Carlos D. Repka

Coordenador: Prof. Dr. Jorge Eduardo F. Matias

CURITIBA

2008

Trubian, Paula Suzin

Nutrição perioperatória e cicatrização de anastomoses colônicas em ratos desnutridos e toxêmicos: tensiometria, densitometria do colágeno e quantificação de angiogênese e miofibroblastos / Paula Suzin Trubian. – Curitiba, 2008.

141 f.:il. (algumas color.); 29 cm.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos L. Campos

Co-Orientador: Prof. Dr. João Carlos D. Repka

Tese (Doutorado em Clínica Cirúrgica) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

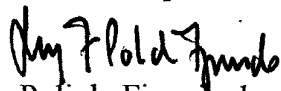
Desnutrição; Sepsis; Toxemia; Nutrição perioperatória; Anastomose; Cólon; Cicatrização de Feridas; LPS. I. Título.




MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA CIRÚRGICA
NÍVEL MESTRADO – DOUTORADO

Ata do julgamento da 117ª Tese de Doutorado 442ª do Curso para conclusão do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica, Nível **Doutorado** da Universidade Federal do Paraná, referente a aluna **PAULA SUZIN TRUBIAN**, com o título **NUTRIÇÃO PERI-OPERATÓRIA E CICATRIZAÇÃO DE ANASTOMOSES COLÔNICAS EM RATOS DESNUTRIDOS E TOXÊMICOS: TENSIOMETRIA, DENSITOMETRIA DO COLÁGENO E QUANTIFICAÇÃO DE ANGIOGÊNESE E MIOFIBROBLASTOS**, sendo na **Linha De Pesquisa**: Cicatrização e Medidas de Resistência dos Tecidos na **Área De Concentração**: Nutrição e Cicatrização em Cirurgia, tendo como orientador Prof.Dr.Antonio Carlos L.Campos.

Às sete horas e trinta minutos do dia vinte e três de junho de dois mil e oito, no Auditório do 7º andar do prédio central sala 701 do Hospital de Clínicas, teve início a prova em epígrafe, constituída pela Banca Examinadora os Professores Doutores Luiz Francisco Poli de Figueiredo, Izabel Cristina Meister Coelho Lemos, Paulo Afonso Nunes Nassif, Marco Aurélio Raeder da Costa e Alexandre Coutinho Teixeira de Freitas sendo este último Presidente da Banca. Aberta a sessão foi apresentada pelo Prof. Dr.Jorge Eduardo Fouto Matias Coordenador do Programa, a documentação probatória do cumprimento pelo candidato das exigências legais que lhe facultam submeter-se à avaliação da tese, como última etapa à sua titulação no Programa. A seguir o Presidente da Banca Examinadora convidou o candidato a apresentar oralmente resumo de sua tese no prazo máximo de trinta minutos para demonstração de sua capacidade didática e para melhor conhecimento do tema por parte da audiência composta de professores, médicos, alunos, familiares e demais interessados. Seguiu-se a arguição e imediata resposta pelo candidato, sucessivamente pelos componentes da Banca Examinadora. Obedecido o tempo máximo de vinte minutos para a arguição e igual tempo para cada resposta. Terminada a etapa de arguição, reuniu-se a Banca Examinadora em sala reservada para atribuição das notas, dos conceitos e lavratura do Parecer Conjunto. A Candidata foi considerado **APROVADA** considerando-se os parâmetros vigentes estabelecidos pelo programa e regidos pela legislação pertinente da instituição. Voltando à sala de sessão, o Senhor Presidente da Banca Examinadora leu os conceitos do Parecer Conjunto e deu por encerrada a sessão. E para que tudo conste, foi lavrada a presente Ata, que será assinada pelos seguintes componentes da Banca Examinadora.


Luiz Francisco Poli de Figueiredo


Izabel Cristina Meister Coelho Lemos


Paulo Afonso Nunes Nassif


Marco Aurélio Raeder da Costa


Alexandre Coutinho Teixeira de Freitas



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA CIRÚRGICA
NÍVEL MESTRADO - DOUTORADO

**PARECER CONJUNTO DA BANCA EXAMINADORA
DA AVALIAÇÃO DA DEFESA DE DOUTORADO**

Aluna **PAULA SUZIN TRUBIAN**

Título da Tese **NUTRIÇÃO PERI-OPERATÓRIA E CICATRIZAÇÃO DE ANASTOMOSES COLÔNICAS EM RATOS DESNUTRIDOS E TOXÊMICOS: TENSIOMETRIA, DENSITOMETRIA DO COLÁGENO E QUANTIFICAÇÃO DE ANGIOGÊNESE E MIOFIBROBLASTOS**

CONCEITOS EMITIDOS:

Prof.Dr.Luiz Francisco P. de Figueiredo	conceito emitido	A	equivalência	10
Profa.Dra. Izabel Cristina M. C. Lemos	conceito emitido	A	equivalência	10
Prof.Dr. Paulo Afonso Nunes Nassif	conceito emitido	A	equivalência	10
Prof.Dr. Marco Aurélio Raeder da Costa	conceito emitido	A	equivalência	10
Prof.Dr. Alexandre C. Teixeira de Freitas	conceito emitido	A	equivalência	10

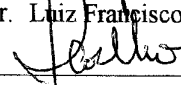
Conceito Final de Avaliação:

Conceito: A Equivalência: 10

Curitiba, 23 de junho de 2008



Prof..Dr. Luiz Francisco P. de Figueiredo



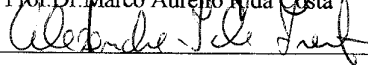
Profa.Dra. Izabel Cristina M. C. Lemos



Prof.Dr. Paulo Afonso Nunes Nassif



Prof.Dr. Marco Aurélio Raeder da Costa



Prof.Dr. Alexandre C. Teixeira de Freitas

Aos meus pais Odete e Danir,
pelo incentivo e exemplo de
caráter, amor e dedicação;
À minha irmã Patrícia,
companheira eterna;
Ao meu noivo Cristian, pelo apoio,
compreensão e amor constante.

AGRADECIMENTOS

À CAPES e à Universidade Federal do Paraná, pela oportunidade de crescimento científico.

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Ligocki Campos, orientador desta tese, pela confiança, constante incentivo, dedicação e auxílio; contribuindo de forma essencial desde o projeto até a concretização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. João Carlos Domingues Repka, co-orientador deste trabalho, pelo exemplo de dedicação à pesquisa e pelo valioso auxílio em várias etapas deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias, por seu empenho e grande dedicação na coordenação do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia da Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná.

À amiga Dra. Alessandra Borges Branco, pelo apoio incondicional na realização desta tese, exemplo de força e determinação.

Ao amigo Dr. Joel Antonio Bernhardt pelo companheirismo em todas as fases deste trabalho.

À Dra. Patrícia Suzin Trubian, pelo apoio e presença constante em minha vida.

Ao Dr. Cristian Aldabe Garcia pelo auxílio e cumplicidade nesta etapa tão importante.

Aos amigos e colegas Dr. Fausto Finger Filho e Dr. Nertan Tefilli, pelo auxílio e suporte durante esta trajetória.

Ao acadêmico de Medicina da Universidade Federal do Paraná, Nicolas Galat Ahumada, pelo auxílio nesta tese.

À Salete do Carmo Pelanda, pela contribuição para a análise estatística deste trabalho.

À funcionária do Programa de Pós-Graduação Regina Aparecida Sass Marques, pela ajuda em diferentes fases deste trabalho.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

*“O valor das coisas não está no tempo em que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso, existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.”
(Fernando Pessoa)*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	OBJETIVO.....	4
2	REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1	CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS	6
2.1.1	CICATRIZAÇÃO DAS ANASTOMOSES GASTROINTESTINAIS.....	7
2.1.2	IMPORTÂNCIA DO COLÁGENO NA CICATRIZAÇÃO DAS ANASTOMOSES COLÔNICAS	10
2.1.3	MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DAS ANASTOMOSES COLÔNICAS.....	12
2.1.3.1	PARÂMETROS CLÍNICOS	12
2.1.3.1.1	EVOLUÇÃO PÓS-OPERATÓRIA	13
2.1.3.2	PARÂMETROS MECÂNICOS	14
2.1.3.2.1	FORÇA DE EXPLOSÃO	14
2.1.3.2.2	FORÇA DE TRAÇÃO	15
2.1.3.3	PARÂMETROS HISTOLÓGICOS	18
2.1.3.4	PARÂMETROS IMUNOISTOQUÍMICOS	19
2.1.3.4.1	AVALIAÇÃO DA NEOVASCULARIZAÇÃO.....	20
2.1.3.4.2	AVALIAÇÃO DE MIOFIBROBLASTOS	22
2.2	SEPSE	24
2.2.1	RESPOSTA DO ORGANISMO À SEPSE	26
2.2.1.1	MONÓCITOS MACRÓFAGOS	27
2.2.1.2	CITOCINAS INFLAMATÓRIAS E SEUS MODULADORES	27
2.2.1.3	ENDOTÉLIO VASCULAR	28
2.2.1.4	LEUCÓCITOS POLIMORFONUCLEARES	29

2.2.1.5	PROTEÍNA C REATIVA	30
2.2.2	MODELO EXPERIMENTAL DE SESPE	31
2.2.2.1	MODELO DE LIGADURA E PERFURAÇÃO CECAL	31
2.2.2.2	MODELO DE LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS)	32
2.2.3	ENDOTOXEMIA	33
2.2.4	ESTRUTURA DO LIPOPOLISSACARÍDEO	34
2.2.5	CITOCINAS.....	38
2.2.6	SEPSE NA CICATRIZAÇÃO DE ANASTOMOSES COLÔNICAS ...	40
2.3	DESNUTRIÇÃO	43
2.3.1	DESNUTRIÇÃO NA CICATRIZAÇÃO DE ANASTOMOSES COLÔNICAS	45
2.3.2	NUTRIÇÃO PERIOPERATÓRIA NA CICATRIZAÇÃO DE ANASTOMOSES COLÔNICAS	47
2.3.3	CICATRIZAÇÃO DE ANASTOMOSES NA SEPSE E DESNUTRIÇÃO	51
3	MATERIAL E MÉTODO.....	56
3.1	MATERIAL.....	57
3.1.1	ANIMAIS.....	57
3.2	MÉTODO.....	58
3.2.1	GRUPOS DE ESTUDO.....	58
3.2.2	INDUÇÃO DA ENDOTOXEMIA	60
3.2.3	PROCEDIMENTO CIRÚRGICO	60
3.2.4	PÓS-OPERATÓRIO	62
3.2.5	SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS.....	63
3.2.6	DADOS AVALIADOS	64
3.2.6.1	PESO.....	64
3.2.6.2	INGESTÃO ALIMENTAR MÉDIA	64

3.2.6.3	ÓBITOS	65
3.2.6.4	EXAMES LABORATORIAIS.....	65
3.2.6.5	FORÇA DE TRAÇÃO.....	65
3.2.6.6	AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA	68
3.2.6.7	AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA	70
3.2.6.7.1	NÚMERO DE VASOS SANGUÍNEOS.....	70
3.2.6.7.2	NÚMERO DE MIOFIBROBLASTOS.....	71
3.2.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	73
4	RESULTADOS	76
4.1	PESO.....	76
4.2	ALBUMINA	78
4.3	PROTEÍNA C REATIVA.....	79
4.4	FATOR DE NECROSE TUMORAL.....	80
4.5	INTERLEUCINA – 6.....	80
4.6	LEUCÓCITOS, BASTONETES E PLAQUETAS.....	81
4.7	FORÇA DE TRAÇÃO.....	82
4.8	DENSITOMETRIA DO COLÁGENO.....	84
4.9	NÚMERO DE MIOFIBROBLASTOS.....	86
4.10	NÚMERO DE VASOS SANGUÍNEOS.....	87
5	DISCUSSÃO	89
6	CONCLUSÃO	104
	REFERÊNCIAS	106
	ANEXOS	128

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	VARIAÇÃO DO PESO NOS GRUPOS C, DT E DTN DURANTE O EXPERIMENTO.....	76
TABELA 2	NÍVEL SÉRICO DE ALBUMINA NO DIA DO PROCEDIMENTO CIRÚRGICO.....	78
TABELA 3	NÍVEL SÉRICO DE PROTEÍNA C REATIVA DOS GRUPOS NO DIA DO PROCEDIMENTO CIRÚRGICO.....	79
TABELA 4	NÍVEL SÉRICO DE FATOR DE NECROSE TUMORAL DOS GRUPOS NO DIA DO PROCEDIMENTO CIRÚRGICO....	80
TABELA 5	NÍVEL SÉRICO DE INTERLEUCINA-6 DOS GRUPOS NO DIA DO PROCEDIMENTO CIRÚRGICO.....	81
TABELA 6	NÍVEL SÉRICO DE LEUCÓCITOS, BASTONETES E PLAQUETAS DOS GRUPOS NO DIA DO PROCEDIMENTO CIRÚRGICO.....	81
TABELA 7	COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DA TENSÃO MÁXIMA (TM) E FORÇA MÁXIMA DE TRAÇÃO (FMT) NO 5 ^o DIA DE PÓS-OPERATÓRIO ENTRE OS GRUPOS C, DT E DTN.....	83
TABELA 8	COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DO PERCENTUAL DO COLÁGENO MADURO (TIPO I), IMATURO (TIPO III) E ÍNDICE DE MATURAÇÃO DO COLÁGENO (IMaC) ENTRE OS GRUPOS (DT, DTR E C).....	84
TABELA 9	NÚMERO DE MIOFIBROBLASTOS PRESENTE NAS ANASTOMOSES DOS GRUPOS C, DT E DTN.....	86
TABELA 10	NÚMERO DE VASOS SANGUÍNEOS PRESENTE NAS ANASTOMOSES DOS GRUPOS C, DT E DTN.....	87

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1	FATORES LOCAIS E SISTÊMICOS QUE FAVORECEM A CICATRIZAÇÃO	9
QUADRO 2	FATORES LOCAIS E SISTÊMICOS QUE DIFICULTAM A CICATRIZAÇÃO.....	9
QUADRO 3	DIANÓSTICO DE SEPSE	24
QUADRO 4	COMPOSIÇÃO DA RAÇÃO PARA RATOS.....	58
QUADRO 5	ÍNDICE DE MATURAÇÃO DO COLÁGENO (IMaC)	69
QUADRO 6	COMPARAÇÃO ENTRE VARIÁVEIS AVALIADAS NOS GRUPOS DT E DTN COM O GRUPO C	88

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1	CURVA DE VARIAÇÃO DAS MÉDIAS DE PESOS DOS GRUPOS C, DT E DTN.....	77
GRÁFICO 2	COMPARAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE ALBUMINA ENTRE OS GRUPOS (C, DT, DTN) NO DIA DA CIRURGIA.....	79
GRÁFICO 3	COMPARAÇÃO DA TENSÃO MÁXIMA NAS ANASTOMOSES ENTRE OS GRUPOS (C, DT, DTN) NO DIA DO SACRIFÍCIO.....	83
GRÁFICO 4	COMPARAÇÃO DA FORÇA MÁXIMA DE TRAÇÃO NAS ANASTOMOSES ENTRE OS GRUPOS (C, DT, DTN) NO DIA DO SACRIFÍCIO.....	84
GRÁFICO 5	COMPARAÇÃO DA DENSITOMETRIA DO COLÁGENO NAS ANASTOMOSES ENTRE OS GRUPOS (C, DT, DTN) NO DIA DO SACRIFÍCIO	85
GRÁFICO 6	COMPARAÇÃO DO NÚMERO DE MIOFIBROBLASTOS NAS ANASTOMOSES ENTRE OS GRUPOS (C, DT, DTN) NO DIA DO SACRIFÍCIO.....	86
GRÁFICO 7	COMPARAÇÃO DO NÚMERO DE VASOS SANGUÍNEOS NAS ANASTOMOSES ENTRE OS GRUPOS (C, DT, DTN) NO DIA DO SACRIFÍCIO.....	87

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS E MECÂNICAS DA FERIDA.....	8
FIGURA 2	SÍNTESE E DEGRADAÇÃO DO COLÁGENO NA CICATRIZAÇÃO.....	12
FIGURA 3	BACTÉRIA GRAM - NEGATIVA.....	35
FIGURA 4	ESQUEMA DE EVENTO CELULAR APÓS A SINALIZAÇÃO DO LPS	37
FIGURA 5	NUTRIÇÃO E INFECÇÃO.....	52
FIGURA 6	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	59
FIGURA 7	APLICAÇÃO DE LPS INTRAPERITONIAL.....	60
FIGURA 8	ANASTOMOSES COLÔNICAS.....	62
FIGURA 9	ASPECTO DA CAVIDADE ABDOMINAL NO SACRIFÍCIO.....	63
FIGURA 10	AMOSTRAS DAS ANASTOMOSES COLÔNICAS PARA ESTUDO TENSIMÉTRICO E ESTUDO ANÁTOMO-PATOLÓGICO....	64
FIGURA 11	MÁQUINA DE ENSAIO MECÂNICO COMPUTADORIZADA.....	66
FIGURA 12	GRÁFICO DO ESTUDO DE TRAÇÃO NOS CORPOS DE PROVA	67
FIGURA 13	SEQUÊNCIA DO ESTUDO TENSIMÉTRICO DAS ANASTOMOSES	67
FIGURA 14	FOTOMICROGRAFIA (20X) CORADA POR <i>PICROSIRIUS-RED</i> APÓS A POLARIZAÇÃO DA LUZ.....	68
FIGURA 15	ACHADOS HISTOLÓGICOS DIGITALIZADOS PARA ANÁLISE DE DEPOSIÇÃO DE COLÁGENO	69
FIGURA 16	VASOS SANGUÍNEOS COM ÍNTIMA CORADA.....	71
FIGURA 17	MIOFIBROBLASTOS CORADOS EM MARROM	72
FIGURA 18	CONTAGEM DE MIOFIBROBLASTOS.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

% - porcentagem

= - igual a

< - maior que

± - mais ou menos

® - marca registrada

> - menor que

µg- micrograma

≈ - semelhança

↑ - aumento

↓ - redução

ACTH - hormônio adrenocorticotrófico

APC – Proteína C Ativa

AVMA – American Veterinary medical Association

BASES – Brazilian sepsis Epidemiological Study

bat/min – batimentos por minuto

C - Grupo controle

CD14 – Antígeno de diferenciação de agrupamentos 14

CLP- ligadura e perfuração cecal

Cm - centímetro(s)

dl - Decilitro

DT- Grupo desnutrido toxêmico

DTN- Grupo desnutrido toxêmico com nutrição perioperatória

ELISA – Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

EP - Erro-padrão

et al - e colaboradores

FELANPE – Federação Latino Americana de Nutrição Parenteral e Enteral

FMT - Força máxima de tração

FRT - Força de ruptura total

g - Grama

GLU – glutamina
GLY- glicina
hPC- Proteína C humana
IBANUTRI – Inquérito Brasileiro de Avaliação Nutricional Hospitalar
IBP- Proteína Ligadora do lipossacáride
ICC – célula Intersticial Cajal
IKK1 – I kappa B quinase 1
IKK2 – I kappa B quinase 2
IKKb – I kappa beta
IL- 6 - Interleucina 6
IL-1 – Interleucina 1
IL-10 – Interleucina 10
IL-8 – Interleucina 8
IM- intramuscular
IMaC - Índice de maturação do colágeno
INMETRO- Instituto Nacional de Pesos e Medidas
Interferon-g - Interferon gama
ip- intraperitonal
IPARDES- Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social
IRAK – serina-treonina proteína quinase
ISEMF – miofibroblasto subepitelial intestinal
iv- intravenosa
IN κ B – Inibidor nuclear Kappa B
Kcal- quilocaloria(s)
Kg- quilograma(s)
Kgf - Quilograma-força
LPS- Lipopolissacarídeo
M - Média
MD2 – proteína adaptadora
mg – Miligrama
min - minuto
ml - Mililitro
mm³- milímetro cúbico
mov/min – movimentos por minuto

MTS - *Maximal Tensile Strength*
MyD88 – fator diferenciador mielóide 88
N- número
NFkB – Fator de Transcrição nuclear-Kappa B
NPT – nutrição parenteral total
° C - Graus Celsius
p - Nível de significância estatística
PCR- Proteína C Reativa
PCS- picosírus-red
PFA – Fator ativador plaquetário
PGE2- prostaglandina E2
PGI2 – prostaglandina/prostaciclina I2
pH- potencial de hidrogênio
PMN- polimorfonucleares
PTK – Proteína tirosina quinase
RNA - Ácido Ribonucléico
RTMI - Resistência Mínima à Tração
SBNPE – Sociedade Brasileira de Nutrição Parenteral e Enteral
sc- subcutânea
SIRS – Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica
TM- Tensão Máxima
TNF- Fator de Necrose Tumoral
TNF-a - Fator de Necrose Tumoral alfa
TRAF6- Fator de Necrose Tumoral associado ao Fator 6
TRL4 – receptor *toll like 4*
TRLs - receptores *toll like*
UFPR- Universidade Federal do Paraná
UTI – Unidade de Terapia Intensiva
vs. - versus

RESUMO

Introdução: Desnutrição e sepse afetam adversamente a cicatrização de anastomoses colônicas de formas independentes. O objetivo deste estudo é avaliar os efeitos da nutrição perioperatória na cicatrização de anastomoses colônicas em ratos desnutridos e toxêmicos. **Material e Método:** Foram utilizados 45 ratos Wistar adultos com peso médio de $266,18\text{g} \pm 4,23\text{g}$. Os ratos foram divididos aleatoriamente em 3 grupos: 1. Grupo controle (C): alimentados com ração padrão *ad libitum* durante 21 dias e submetidos a injeções de solução salina intraperitoneal (ip), isovolumétrica diária por 4 dias; 2. Grupo desnutrido e toxêmico (DT): alimentados com 50% da média da ingesta alimentar do grupo controle (*pair-feeding*) durante 21 dias e submetidos a injeções de LPS ip (1mg/Kg/d) por 4 dias; 3. Grupo desnutrido, toxêmico e com nutrição perioperatória (DTN): alimentados com método *pair-feeding* durante 21 dias, submetidos a injeções de LPS ip (1mg/Kg/g) por 4 dias e nutrição perioperatória durante 14 dias com ração padrão *ad libitum*. Os ratos foram submetidos a 2 secções colônicas reconstruídas com anastomoses término-terminais. Após a cirurgia, os grupos C e DNT tiveram livre acesso à água e à ração e o grupo DT foi alimentado com *água ad libitum* e método *pair-feeding*. Todos os ratos foram sacrificados no 5º dia de pós-operatório. O peso corporal e exames laboratoriais como leucócitos, bastonetes, Proteína C Reativa (PCR), Fator de Necrose Tumoral α (TNF α) e Interleucina-6 (IL-6) foram aferidos. As anastomoses colônicas foram ressecadas para avaliação da tensão máxima (TM), força máxima de tração (FMT), análise histológica e imunoistoquímica. Análise estatística foi realizada por meio dos testes t de Student e Mann-whitney. O nível de significado estatístico foi $p < 0,05$. **Resultados:** A média de peso do grupo DTN foi superior ao grupo DT e semelhante ao grupo C, assim como a dosagem de albumina sérica. A dosagem sérica de PCR e TNF foi superior no grupo DT em relação ao DTN e C. A aferição de IL-6, leucócitos e bastonetes foi superior nos grupos DT e DTN. O nível sérico de plaquetas foi inferior no grupo DT. No grupo DNT, a TM foi superior ao grupo DT ($0,86 \pm 0,14 \text{ Kgf/cm}^2$ vs $0,52 \pm 0,06 \text{ Kgf/cm}^2$; $p=0,04$) e semelhante ao grupo C ($0,86 \pm 0,14 \text{ Kgf/cm}^2$ vs $0,89 \pm 0,06 \text{ kgf/cm}^2$; $p=0,54$). A média da FMT também foi superior no grupo DTN em relação ao grupo DT ($0,32 \text{ Kgf} \pm 0,06$ vs $0,10 \text{ Kgf} \pm 0,01$; $p=0,04$) e semelhante ao grupo C ($0,32 \text{ Kgf} \pm 0,06$ vs $0,18 \text{ kgf} \pm 0,01$; $p=0,36$). A análise da densitometria do colágeno não demonstrou diferença entre os grupos. O número de miofibroblastos foi superior no grupo DTN em relação ao grupo DT ($6,17 \pm 0,46$ vs $4,06 \pm 0,77$; $p=0,03$), porém inferior ao grupo C ($6,17 \pm 0,46$ vs $7,62 \pm 0,28$, $p=0,02$). O número de vasos sanguíneos nas anastomoses foi semelhante nos grupos DT e DNT ($8,11 \pm 0,35$ vs $8,35 \pm 0,73$, $p=0,59$) e superior ao grupo C ($8,11 \pm 0,35$ vs $4,33 \pm 0,39$, $p=0,0000$ e $8,35 \pm 0,73$ vs $4,33 \pm 0,39$, $p=0,0004$). **Conclusão:** A nutrição perioperatória, durante 14 dias, aumentou a TM, a FMT, assim como o número de miofibroblastos nas anastomoses colônicas, no 5º dia de pós-operatório, em ratos desnutridos e toxêmicos. Também reestabeleceu o peso corpóreo e a albumina sérica. Assim, a nutrição perioperatória foi eficaz em reverter os efeitos deletérios da desnutrição e da toxemia.

DESCRITORES

Desnutrição; Sepse; Toxemia; Nutrição perioperatória; Anastomose; Cólon; Cicatrização de Feridas; LPS.

ABSTRACT

Background: Malnutrition and sepsis adversely affect the healing of colonic anastomosis in independent ways. The purpose of this study is to assess the effects of nutrition in perioperative healing of colonic anastomosis in undernourished and toxemics experimental rats. **Material and Methods:** Forty five adult male Wistar rats, weighing 266.18 ± 4.23 g, were randomly divided into 3 groups: 1. Group control (C), was fed chow diet *ad libitum* for 21 days and underwent intraperitoneal (ip) injections of isovolumetric saline solution daily for 4 days; 2. Group malnourished toxicemic (DT), fed 50% of the average dietary intake of the control group (pair-feeding) for 21 days and underwent ip LPS injections (1 mg/kg/d) for 4 days, 3. Group malnourished toxicemic, with perioperative nutrition (DTN), fed pair-feeding for 21 days, subject to ip LPS injections (1 mg/kg/d) for 4 days and perioperative nutrition with chow diet *ad libitum* for 14 days. All animals were submitted to 2 colonic sections, that were rebuilt by end-to-end anastomoses. After surgery, the groups C and DNT had free access to water and chow diet and DT group was fed with water *ad libitum* and pair-feeding. All rats were sacrificed at 5 days postoperatively. The body weight and laboratory tests like leukocytes, rods, C-Reactive protein (CRP), Tumor necrosis factor (TNF) and Interleukin-6(IL-6) were measured. The colonic anastomosis were cut off to assess the maximum tension (MT), maximum force of traction (MFT), histological analysis and immunohistochemistry. Statistical analysis was performed using the Student t test and Mann-whitney. The level of statistical significance was $p < 0.05$. **Results:** The average weight of the group DTN was superior to the group DT and similar to group C, as well as the level of serum albumin. The level of serum CRP and TNF was higher in group DT in relation to DTN and C. The level of IL-6, leukocytes and rods was higher in groups DT and DTN. The serum level of platelets was lower in the group DT. In group DNT, the MT was higher than the DT (0.86 vs. 0.52 ± 0.14 Kgf/cm² ± 0.06 Kgf/cm², $p = 0.04$) and similar to group C (0.86 ± 0.14 Kgf/cm² vs 0.89 ± 0.06 kgf/cm², $p = 0.54$). The average MFT in the group DTN was also higher than the DT group (0.32 Kgf ± 0.06 vs 0.10 Kgf ± 0.01 , $p = 0.04$) and similar to the control group (C) (0.32 Kgf ± 0.06 vs. 0.18 Kgf ± 0.01 , $p = 0.36$). The densitometry analysis of collagen has not shown difference between the groups. The number of myofibroblasts in the group DTN was higher than the DT group (6.17 ± 0.46 vs. 4.06 ± 0.77 , $p = 0.03$) but lower than the control group ($6.17 \pm 0.46 \pm 0.28$ vs. 7.62 , $p = 0.02$). The number of blood vessels in anastomosis was similar in groups DT and DNT (8.11 ± 0.35 vs. 8.35 ± 0.73 , $p = 0.59$) and higher than the control group (8.11 ± 0.35 vs. 4.33 ± 0.39 , $p = 0.0000$ and 8.35 ± 0.73 vs. 4.33 ± 0.39 , $p = 0.0004$). **Conclusion:** The perioperative nutrition, for 14 days, increased the MT, the MFT, as well as the number of myofibroblasts in colonic anastomosis on PO day 5 in undernourished and toxemics rats. It also recovered the normal body weight and serum albumin. Then, perioperative nutrition was effective in reversing the deleterious effects of malnutrition and toxemia.

KEY WORDS

Malnutrition; Sepsis; Toxicemic; Nutrition perioperative; Anastomosis; Colon; Wound Healing; LPS.

1 INTRODUÇÃO

O tratamento de diversas patologias cirúrgicas inclui ressecções e, conseqüentemente, anastomoses intestinais. Nos últimos dois séculos, a cicatrização de anastomoses intestinais vem sendo muito estudada, com ênfase às técnicas de sutura e materiais empregadas na confecção das anastomoses. As complicações das anastomoses podem ser inerentes à técnica cirúrgica, condições locais, tipo de doença, à idade dos pacientes e ao estado nutricional, entre outros. Dentre as complicações, a deiscência de anastomose tem lugar de destaque no que se refere ao aumento da mortalidade dos pacientes. Nas anastomoses colônicas, particularmente, a deiscência tem maior gravidade pela presença de fezes na cavidade peritonial e conseqüente peritonite, e torna-se uma preocupação constante (KORUDA e ROLANDELLI, 1990; CHIAN *et al.*, 2004; FERREIRA, 2004; FERREIRA *et al.*, 2006).

Vários estudos já provaram que o estado nutricional afeta diretamente a cicatrização de anastomoses. A desnutrição pode influenciar a cicatrização colônica por várias maneiras. A depleção protéica de macro e/ou micronutrientes tem efeito direto na disponibilidade de aminoácidos para o processo cicatricial, além da conseqüente diminuição da imunocompetência do organismo (WARD, 1982; SPANHEIMER, 1985; YUE *et al.*, 1986; YOUNG, 1988; ARNOLD e BARBUL, 2006; GONÇALVES *et al.*, 2005).

Outra condição clínica freqüente que, nos últimos anos, representa problema de saúde pública nas Unidades de Terapia Intensiva do Brasil é a sepse (SILVA *et al.*, 2004). A infecção intra-abdominal é geralmente considerada um grande fator de risco para a deiscência de anastomose colônica (KIYAMA *et al.*, 2000). A alteração da cicatrização pode ser resultado do aumento da lise do novo colágeno formado ou da diminuição da formação de colágeno intracelular (CAMPOS *et al.*, 2007).

Desnutrição e infecção são as duas maiores causas de morbidade e mortalidade no mundo em desenvolvimento. Estes dois problemas estão inter-relacionados: a desnutrição predispõe à infecção e a infecção pode alterar o estado nutricional (CALDER e JACKSON, 2000).

Já existe consenso de que a terapia nutricional melhora a cicatrização dos tecidos. A ingestão alimentar pré-operatória pode ser mais importante para a cicatrização do que o estado nutricional geral do paciente (WINDSOR; KNIGHT e HILL, 1998). O suporte perioperatório nutricional é geralmente recomendado para pacientes com desnutrição moderada ou grave e que toleram esperar pelo menos 7 dias para cirurgia eletiva (KALFARENTZOS *et al.*, 1997; DERVENIS *et al.*, 2003; HOWARD e ASCHELEY, 2003). A terapia nutricional na sepse atua de modo adjunto, prevenindo a desnutrição, contribuindo para a manutenção da síntese protéica e modulando a resposta inflamatória sistêmica (WAITZBERG, 2004).

Experimentalmente, Gonçalves *et al.*, em 2005, demonstraram que a desnutrição reduz a força de ruptura e a percentagem de deposição de colágeno maduro nas anastomoses colônicas no 5º dia de pós-operatório. Este mesmo estudo demonstrou, ainda, que a realimentação pré-operatória por sete dias aumentou a força de tração e a percentagem de colágeno maduro.

Há situações em que é necessária a realização de ressecções intestinais com anastomose colônica em pacientes desnutridos e sob condições sépticas. Entretanto, em alguns casos, pode-se postergar a intervenção cirúrgica e estabelecer alguma forma de terapia nutricional. Um exemplo clínico em que isto pode ocorrer é a diverticulite com abscesso intra-abdominal. Num primeiro momento, podemos manejar clinicamente o caso e postergar a cirurgia até melhorar o estado nutricional do paciente. Diante dos estudos realizados para avaliar a cicatrização de cólon, em vigência de sepse e desnutrição, observa-se que a nutrição perioperatória não foi devidamente explorada. Portanto, são necessários estudos complementares que poderão contribuir para o conhecimento da importante interação entre desnutrição, sepse e sua influência no processo cicatricial.

1.1. OBJETIVO

Avaliar os efeitos da nutrição perioperatória na cicatrização de anastomoses colônicas em ratos desnutridos e toxêmicos, no 5º dia de pós-operatório, mediante os seguintes parâmetros:

- 1) Tensiometria
- 2) Densitometria do colágeno
- 3) Angiogênese
- 4) Número de miofibroblastos

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS

A cicatrização das feridas resulta de uma série de eventos celulares, fisiológicos e bioquímicos que seguem, de uma maneira geral, os mesmos princípios básicos. A ruptura da integridade do tecido dá início a uma série de modificações. A primeira etapa da cicatrização começa com a fase inflamatória (0-3 dias). A hemostasia é realizada por vasoconstrição transitória local e formação de trombos na microcirculação lesada e nos vasos linfáticos. A seguir, substâncias vasoativas começam a afetar as vênulas na área injuriada causando vasodilatação e aumento da permeabilidade capilar, com extravazamento de plasma para a área do traumatismo, resultando em edema celular intersticial. A resposta celular inicia quando leucócitos polimorfonucleares (PMN) começam a invadir as margens da ferida, em aproximadamente três horas após o ferimento inicial. Muitos dos leucócitos sofrem lise e liberam seus grânulos citoplasmáticos na área traumatizada, levando à degradação enzimática (necrose celular) e preparação para fagocitose por macrófagos. Alguns monócitos estão presentes na ferida após 24 horas, e com 48 horas pós-ferimento, o número de macrófagos se equivale ao de leucócitos PMN. Fibroblastos aparecerão durante o estágio tardio da fase inflamatória (DIROSA, PAPADIMITRIOU e WILLOUGHBY, 1971; HURLEY, EDWARDS e HAM, 1970; IRVIN, 1981; LUNDBERG e GERDIN, 1984; BRASKÉN, 1991; ROSS, ODLAND, 1968; THORNTON e BARBUL, 1997).

O estágio proliferativo, que compreende o período do terceiro ao décimo quarto dia após o ferimento, é caracterizado por tecido de granulação e constitui a segunda etapa do processo de cicatrização. Nesta fase, fibroblastos começam a sintetizar colágeno e outras macrocélulas e a força tênsil da ferida aumenta rapidamente, relacionando-se com o acúmulo de colágeno. (CAMPOS *et al.*, 2007; LUNDBERG e GERDIN, 1984; BRASKÉN, 1991; ROSS, ODLAND, 1968; THORNTON e BARBUL, 1997).

A terceira fase da cicatrização é a maturação ou remodelamento e ocorre após 14 dias. A ferida se torna menos celular e muitos capilares são ocluídos e,

eventualmente, desaparecem. O tecido de granulação torna-se, gradualmente, uma cicatriz densa e relativamente avascular, consistindo de fibras de colágeno organizadas junto às linhas de tensão com fibroblastos relativamente inativos (CAMPOS *et al.*, 2007; IRVIN,1981; LUNDBERG e GERDIN, 1984; BRASKÉN, 1991; ROSS, ODLAND, 1968; THORNTON e BARBUL, 1997).

2.1.1 Cicatrização das anastomoses gastrointestinais

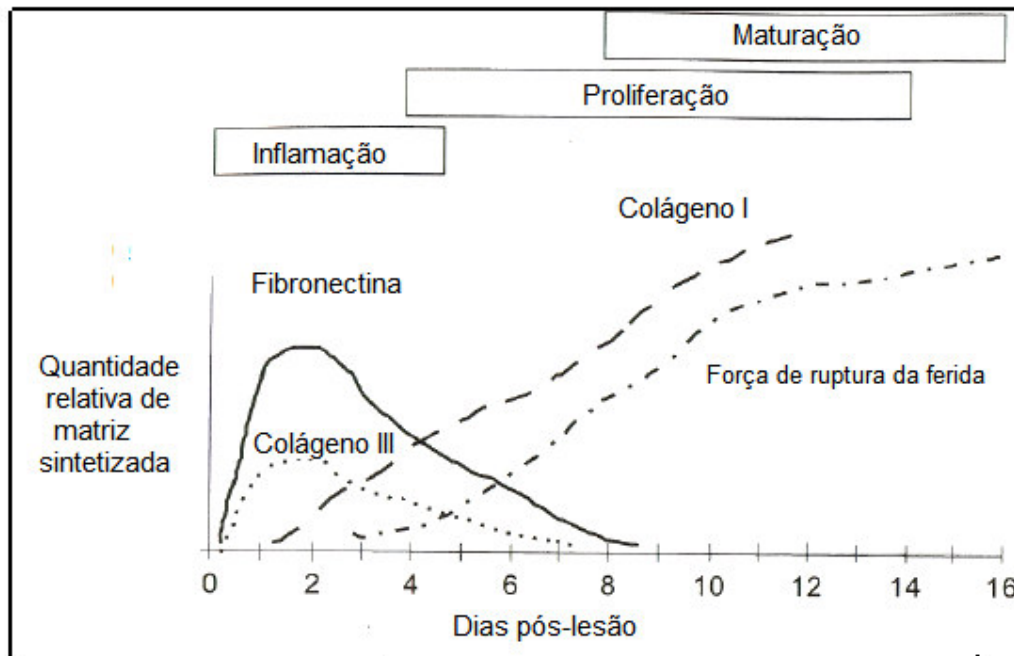
O processo de cicatrização gastrointestinal segue, essencialmente, os padrões similares a todas as feridas. Esta cicatrização é influenciada pelo peritônio, o qual reage a diferentes traumas com peritonite e/ou formação de aderências, e pelas múltiplas camadas da parede gástrica ou intestinal (ELLIS, 1962; BRASKÉN, 1991; RENVALL e JARVINEN, 1980 a, b; EKMEKTZOGLOU *et al.*, 2006).

Atualmente, as cirurgias que envolvem o trato gastrointestinal são muito freqüentes. As complicações nas anastomoses, como fístulas ou deiscências, são preocupações presentes na evolução dos pacientes submetidos a estes procedimentos (THORNTON e BARBUL, 1997; CHOBAN, JACKSON, POPLAWSKI, BISTOLARIDES, 2002; BOYLU *et al.*, 2005; BEZUTI *et al.*, 2002). Diferentes tipos de materiais e técnicas têm sido utilizados e aperfeiçoados visando sempre incrementar estes resultados pós-operatórios (SAVASSI-ROCHA e LOPES, 1994; GETZEN, ROE e HOLLOWAY, 1966).

Muitos componentes do processo de cicatrização são semelhantes em todos os tecidos: a resposta inflamatória inicial após a injúria, o depósito do colágeno inicialmente imaturo e sua substituição por colágeno maduro que resultará na maturação da ferida. Entretanto, existem diferenças entre os tecidos e isto traz variações, também, no processo de cicatrização: a) o ganho de força na cicatrização de suturas gástricas, duodenais e intestinais, em condições normais, é mais rápido do que ocorre em suturas de pele e tendão; b) a produção de colágeno a partir das fibras musculares lisas observada no trato gastrointestinal não ocorre na derme; c) a regulação da síntese de colágeno no trato gastrointestinal é diferente do observado na pele (THORNTON e BARBUL, 1997; SAVASSI-ROCHA e LOPES, 1994).

A cicatrização da anastomose começa sempre com uma forte reação inflamatória. Granulócitos são encontrados na anastomose 3 horas após a injúria e

seu número alcança o pico máximo após 12-24 horas. Monócitos e fibroblastos aparecem na linha de sutura após 24-48 horas da realização da anastomose. A reação inflamatória é mais prolongada na anastomose do cólon do que na anastomose do intestino delgado. Na anastomose do intestino delgado, a reação inflamatória quase desaparece após uma semana da cirurgia, mas durante o mesmo período, os leucócitos PMN ainda são numerosos na anastomose colônica (HENDRIKS *et al.*, 1985; HESP *et al.*, 1985; HENDRIKS e MASTBOOM, 1990). As alterações histológicas da anastomose acompanham as modificações das propriedades mecânicas do tecido cicatricial, como esquematizado na figura abaixo.



ADAPTADO DE WITTE; BARBUL, 1997

FIGURA 1. MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS E MECÂNICAS DA FERIDA

Segundo Savassi-Rocha e Lopes (1994), Thornton e Barbul (1997), vários fatores estão implicados no sucesso ou na falência do processo de cicatrização (Quadro 1 e 2).

FATORES LOCAIS	FATORES SISTÊMICOS
<ul style="list-style-type: none"> • Suprimento sanguíneo adequado • Ausência de tensão na linha de sutura • Intestino sadio • Hemostasia adequada • Sutura continente • Ausência de infecção 	<ul style="list-style-type: none"> • Fator de crescimento tecidual (TGF-β) • Hormônio de crescimento recombinante (GH)

QUADRO 1. FATORES LOCAIS E SISTÊMICOS QUE FAVORECEM A CICATRIZAÇÃO
 FONTE: SAVASSI-ROCHA E LOPES (1994); THORNTON E BARBUL (1997)

FATORES LOCAIS	FATORES SISTÊMICOS
<ul style="list-style-type: none"> • Contaminação bacteriana • Obstrução distal • Injúria causada pela radiação • Preparo inadequado do intestino • Hipertermia • Presença de drenos • Tumores fixos • Tensão na linha de sutura • Trauma • Corpo estranho • Ressecções extraperitoniais • Tecidos mal vascularizados 	<ul style="list-style-type: none"> • Desnutrição • Idade > 60anos • Sepses • Hipotensão trans-operatória • Obesidade • Hipovitaminoses • Deficiência de zinco • Coagulopatia • Duração prolongada da cirurgia • Hipóxia • Medicamentos • Imunossupressão • Transfusão sanguínea • Uremia • Icterícia • Neoplasia maligna

QUADRO 2. FATORES LOCAIS E SISTÊMICOS QUE DIFICULTAM A CICATRIZAÇÃO
 FONTE: SAVASSI-ROCHA E LOPES (1994); THORNTON E BARBUL (1997)

2.1.2 Importância do colágeno na cicatrização das anastomoses colônicas

Independentemente do tecido lesado, do ponto de vista funcional, o colágeno é o componente mais importante na reparação de tecidos (THORNTON e BARBUL, 1997; SAVASSI-ROCHA e LOPES, 1994; GOTTRUP, 1981).

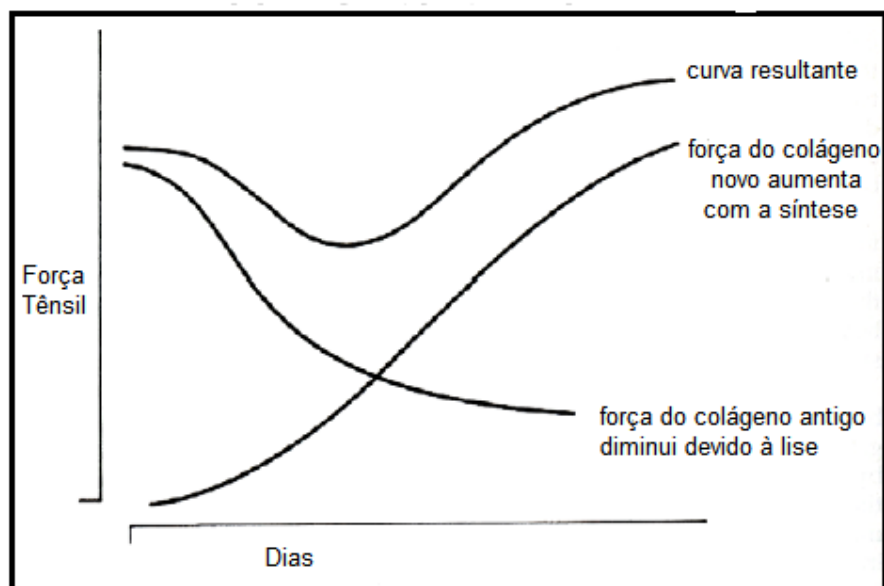
O colágeno é o maior componente estrutural da matriz extracelular e representa aproximadamente 25% da proteína corporal total. As moléculas de colágeno consistem de três cadeias de polipeptídeos (cadeias- α) idênticas ou similares, as quais formam uma hélice tripla (glicina, alanina, lisina, prolina, hidroxilisina e hidroxiprolina). A prolilhidroxilase transforma a prolina em hidroxiprolina, que passa a ser um aminoácido exclusivo do colágeno. A hidroxiprolina está presente em concentrações elevadas no colágeno, sendo indispensável para a estabilização da tríplice hélice da proteína. As hélices são secretadas no espaço extracelular como pró-colágeno. Após deixar a célula, os propeptídeos são removidos e se agrupam às moléculas de colágeno em fibrilas ou a outras estruturas que ocupam seu lugar (BRASKÉN, 1991, BORNSTEIN e SAGE, 1980; HAY, 1981; LAUAND *et al.*, 2004).

O colágeno pode ser classificado de acordo com a estrutura da hélice dominante e com o seu tamanho molecular. 1: colágeno fibrilar (tipos I, II, III, V e IX), 2: colágeno não-fibrilar grande (tipos IV, VI, VII e XII) e 3: colágeno de cadeia curta (tipos IX, X e XIII) (BRASKÉN, 1991). Três subtipos de colágeno (I, III e V) são identificados durante o processo cicatricial do cólon. Os colágenos I e III atingem proporções mais significativas e a relação entre eles têm importância maior no estudo da cicatrização anastomótica (BRASKÉN, 1991; JUNQUEIRA, MONTES, SANCHEZ, 1982).

A submucosa é a camada intestinal mais importante a ser incluída na anastomose, pois tem o maior teor de colágeno, o que confere sustentação à parede intestinal. Durante os primeiros dias de pós-operatório, a força da anastomose é baixa e o colágeno é degradado secundariamente à atividade de collagenase no sítio da injúria. A força anastomótica precoce é, então, dependente da capacidade da ancoragem da sutura até que o novo colágeno seja sintetizado por fibroblastos e pelas células da camada muscular (THOMPSON, *et al.*, 2006, LAUND *et al.*, 2004).

A concentração de colágeno e a resistência mecânica de anastomoses intestinais exibem diferentes padrões dependendo da fase de cicatrização. Cronin, Jackson e Dunphy, em 1968, realizaram estudo experimental com ressecção e anastomose colônica em ratos comparados com grupo controle, utilizando como parâmetros análise quantitativa de colágeno e a pressão de ruptura. Observaram que durante os três primeiros dias da cicatrização ocorreu decréscimo da concentração de colágeno de 40% até 2,5 centímetros próximo da anastomose. Durante os dois dias seguintes, embora tenha sido verificado que a pressão de ruptura encontrava-se próxima à do grupo controle, não havia alteração significativa na taxa de concentração de colágeno. A partir do quinto dia, a concentração de colágeno aumentou progressivamente até o décimo dia, atingindo concentrações próximas às do grupo controle, enquanto a pressão de ruptura apresentou valores bem acima do grupo controle. Existe controvérsia na correlação entre a análise quantitativa de colágeno com a resistência mecânica de anastomoses intestinais. Koruda e Rolandelli (1990), em artigo de revisão sobre estudos experimentais de cicatrização de anastomoses colônicas em animais, ressaltam a inexistência de trabalhos com significância estatística a respeito da correlação direta entre a medida da taxa de hidroxiprolina e a resistência mecânica das anastomoses, até aquela data. Estes autores citam que tanto a quantidade como a qualidade do colágeno, representada pela sua propriedade de entrelaçamento, determinam maior ou menor resistência mecânica da anastomose. Assim, a resistência de uma sutura intestinal poderia ser melhor definida pela determinação da proporcionalidade da presença de colágeno imaturo, pouco entrelaçado, e de colágeno maduro, bastante entrelaçado.

As anastomoses colônicas perdem 72% a 95% da sua força tecidual inicial, durante os três primeiros dias do processo cicatricial, quando há atividade mais intensa da colagenase (HÖGSTRÖN, HAGLUND e ZEDERFELDT, 1985 e JIBORN *et al.*, 1980). Após esse período inicial, a anastomose ganha força acompanhando o progressivo depósito de colágeno na área cicatricial (FIGURA 2). Entretanto, as características qualitativas do colágeno depositado são mais importantes para o suporte estrutural da anastomose do que sua concentração tecidual (HENDRIKS, MASTBOOM, 1990).



ADAPTADO DE THORNTON E BARBUL, 1997

FIGURA 2. SÍNTESE E DEGRADAÇÃO DO COLÁGENO NA CICATRIZAÇÃO

2.1.3 Métodos de avaliação das anastomoses colônicas

As anastomoses do trato gastrointestinal podem ter sua cicatrização avaliada por diferentes métodos. Em cirurgia experimental, os métodos mais comumente descritos são os parâmetros clínicos, mecânicos, imunoistopatológicos e bioquímicos. Outros parâmetros que podem ser utilizados são os microbiológicos, radiográficos, microangiográficos e de microscopia eletrônica (VIZZOTTO JUNIOR, 2001; COSTA, 2002; BONIN, 2003).

2.1.3.1 Parâmetros clínicos

Os parâmetros clínicos avaliam a evolução pós-operatória do animal de maneira observacional e subjetiva, a partir da coleta de dados evolutivos e análise macroscópica dos achados intra-abdominais durante o sacrifício (VIZZOTTO JUNIOR *et al.*, 2002; COSTA, 2002). Esses parâmetros indicam, direta ou indiretamente, a

ocorrência de deiscência anastomótica, que reflete alteração na cicatrização da anastomose.

2.1.3.1.1 Evolução pós-operatória

A alteração de peso é considerada importante parâmetro clínico e nutricional e interfere na avaliação das anastomoses. A perda de peso no perioperatório pode indicar indiretamente desnutrição e, conseqüentemente, determinar deficiência na cicatrização da anastomose.

Law e Ellis (1990), Leite *et al.* (1993), Karahasanoglu *et al.* (1998) e Gonçalves (2005) estudaram a influência da nutrição sobre a cicatrização de anastomoses colônicas em ratos. Os autores demonstraram grande importância da nutrição sobre a cicatrização destas anastomoses e que o peso também serve como parâmetro clínico na avaliação da cicatrização de anastomoses.

A infecção de ferida cirúrgica se manifesta pela drenagem de secreção purulenta abundante e exposição de tecido subcutâneo e aponeurótico, podendo comprometer a evolução pós-operatória (VIZZOTO JUNIOR, 2001; COSTA, 2002; BONIN, 2003). Naresse *et al.* (1993) estudaram os efeitos da peritonite fecal induzida em ratos Wistar sobre a cicatrização de anastomoses realizadas no cólon distal. Os achados destes autores demonstraram o efeito deletério da presença de infecção intra-abdominal concomitante à realização de suturas no intestino grosso.

Outro fator avaliado na evolução pós-operatória é a incidência de óbitos, que pode ser ou não devida às deiscências anastomóticas. Complicações anestésicas e metabólicas podem ser outras causas de óbitos (VIZZOTO JUNIOR, 2001; COSTA, 2002; BONIN, 2003).

Leite *et al.* (1993) estudaram o efeito da desnutrição protéica na anastomose de cólon distal em ratos mediante força de ruptura, deposição de colágeno tecidual e parâmetros clínicos. Observaram quatro casos de deiscências anastomóticas acompanhadas de óbito no grupo de animais desnutridos. Esta complicação não ocorreu no grupo controle, que recebeu dieta normoprotéica, demonstrando, assim, a relação direta entre desnutrição, deiscência, peritonite fecal e óbito. Naresse *et al.* (1993) estudaram os efeitos da peritonite fecal induzida em ratos sobre a

cicatrização de anastomoses realizadas no cólon distal. Os autores encontraram no grupo submetido à anastomose na vigência de peritonite uma incidência de deiscência em 10 animais, dos quais 7 evoluíram a óbito. Os achados corroboram com o efeito deletério da infecção intra-abdominal concomitante à realização de suturas no intestino grosso.

2.1.3.2 Parâmetros mecânicos

Segundo Naresse *et al.* (1987), um dos aspectos mais importantes da cicatrização diz respeito às propriedades mecânicas do tecido de reparação, o qual deve oferecer resistência necessária para não se romper ao ser submetido às tensões normais do organismo. A resistência de uma anastomose intestinal à força mecânica é fator fundamental para que não ocorra cicatrização inadequada e, conseqüentemente, disjunção da mesma. Fluxo sanguíneo baixo, mudança de fluidos dos tecidos e, concomitantemente, mudanças nas propriedades visco-elásticas do tecido após a necrose são exemplos de alterações que podem ocorrer (VAN WINCKLE, 1969; HOWES *et al.*, 1929 e HOWES, 1933).

Em 1929, HOWES *et al.*, em estudo pioneiro, avaliaram a tensão das feridas cirúrgicas na fase precoce da cicatrização. Naquele experimento foram avaliadas a resistência da sutura em anastomoses intestinais e a habilidade 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 estudados e o processo fibroplásico conhecido.

A resistência das anastomoses pode ser avaliada, no laboratório, mediante dois métodos: tração das extremidades (força máxima de tração/tensão) e resistência da ferida cirúrgica à insuflação gasosa ou de líquidos (força de explosão/ruptura) (KORUDA e ROLANDELLI, 1990; FERREIRA, 2005).

2.1.3.2.1 Força de explosão

Este método foi descrito por Chlumsky, em 1899, e é bastante utilizado atualmente em estudos experimentais de cicatrização (RABAU *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 uma bomba de insuflação. Através desta última, infunde-se líquido ou ar atmosférico até que haja explosão da anastomose. A pressão de explosão é registrada por manômetro ou fisiógrafo. A pressão de explosão é um bom parâmetro para monitorar a cicatrização de anastomoses intestinais, contanto que a ruptura ocorra na área da anastomose. Este período compreende a primeira semana de pós-operatório, quando a tensão é baixa e a possibilidade de deiscência é relativamente alta (HENDRIKCS e MASTBOOM, 1990).

O desenvolvimento da pressão de explosão nas anastomoses em cicatrização já foi amplamente investigado e possui um padrão bem definido. Nos primeiros 3 a 4 dias após a anastomose, a pressão de explosão permanece baixa. Após o 4º dia, a pressão aumenta rapidamente a valores acima daqueles observados em intestino sem lesão (IRVIN e HUNT, 1974; JIBORN *et al.*, 1978 a, b). Embora o quadro qualitativo pareça estabelecido, os dados quantitativos relatados na literatura apresentam bastante diferença. A existência deste grau de variação é até certo ponto esperada, uma vez que o reparo tecidual pode ser afetado por vários fatores, tais como: técnica de sutura, material utilizado, tratamento do intestino após o sacrifício (remoção ou não das aderências), entre outros (HENDRIKS e MASTBOOM, 1990). Desta forma, há indícios de que a pressão de explosão é apenas válida dentro de um estudo quando o protocolo é usado por vários grupos experimentais.

2.1.3.2.2. Força de tração

As forças mecânicas envolvidas nas anastomoses refletem de forma objetiva a integridade da mesma (KORUDA; ROLANDELLI, 1990). A avaliação da força tênsil da anastomose é freqüentemente utilizada em estudos experimentais com resultados que refletem com elevada precisão as propriedades biofísicas do tecido. Farhart *et al.* (1958) desenvolveram dispositivo mecânico para efetuar a tração de

um segmento de tecido e o utilizaram para avaliação de anastomoses em processo de cicatrização.

Jiborn, Ahonen e Zederfeldt publicaram dois estudos (1978a e 1978b): um utilizando a força de ruptura e outro utilizando a tensão de explosão, para avaliar a cicatrização de anastomoses de cólon esquerdo em ratos. No estudo em que se utilizou a força de ruptura como parâmetro, foram comparados três grupos: um grupo controle (sem anastomose) e outros dois grupos experimentais (anastomose com sutura contínua e anastomose com sutura interrompida). Neste mesmo estudo, os valores de força de ruptura para o grupo controle foram 65% maiores no cólon esquerdo comparado ao cólon transversal. Para os grupos experimentais, ambos tiveram medidas de força de ruptura baixas até o quarto dia pós-operatório, com aumento do ganho de força importante entre o quarto e décimo dia de pós-operatório. Após o décimo dia houve pouco acréscimo na medida da força de ruptura. Comparando os dois grupos, a força de ruptura atingiu 35% da força no grupo controle até o sétimo dia em ambos os grupos; no décimo dia, o grupo com sutura contínua atingiu 57% da força e o grupo com sutura interrompida atingiu 46% da força de ruptura do grupo controle. Estas diferenças não foram estatisticamente significativas. Já no vigésimo oitavo dia de pós-operatório, os valores correspondentes foram de 75% e 54%, respectivamente, para o grupo com sutura contínua e sutura interrompida, com diferença estatisticamente significativa.

Os autores compararam o estudo que utilizou a tensão de explosão com o que utilizou a força de ruptura e concluíram que a medida da tensão de explosão avaliou adequadamente a resistência da anastomose apenas nos primeiros dias de sua confecção, sendo observada com frequência a ruptura fora dela após o sétimo dia de pós-operatório. Em contrapartida, a medida da força de ruptura possibilitou a medida da resistência da anastomose até, pelo menos, quatro semanas de pós-operatório.

Posteriormente houve aprimoramento do método, com o desenvolvimento de um dispositivo eletromecânico, descrito por Jonsson, Jiborn e Zederfeldt (1983), com maior precisão para a aferição da força de ruptura. A utilização do método de força de tração para avaliação da resistência das anastomoses intestinais, como proposto por Jonsson, ocorre pela fixação das extremidades do segmento de intestino no aparelho, seguida de tração até que haja a ruptura deste segmento no local onde está a anastomose. A tração pode ser exercida com aumento contínuo da força,

como utilizado por Blomquist, Jiborn e Zederfeldt, em 1984, ou aumentando-se a força em intervalos.

Naresse *et al.* (1987) idealizaram um aparelho de tração para avaliar a força de ruptura das anastomoses intestinais. Os autores construíram este aparelho com base no extensômetro de resistência elétrica. Estes concluíram que o instrumento utilizado para medida de força de ruptura apresenta erros mínimos de leitura, tornando justificável sua utilização em investigações experimentais, não só da cicatrização intestinal, como de toda ferida cirúrgica.

Mais recentemente foi desenvolvido método mecânico computadorizado de alta precisão para a determinação da força de ruptura, descrito por Ikeuchi *et al.*, em 1999. Os autores tentaram estabelecer correlação entre este método e o método de pressão de explosão/ruptura, já consagrado na literatura, bem como definir qual deles seria considerado o padrão ouro na avaliação mecânica da cicatrização de anastomoses intestinais. Foram utilizados 48 ratos em modelo que tinha como objetivo medir a pressão e tensão de ruptura, simultaneamente, na mesma anastomose colônica, no período compreendido entre a realização da cirurgia e o 14^o dia de pós-operatório. A tensão de ruptura foi determinada mediante duas variáveis: força mínima de tração (força necessária para romper parte da anastomose) e força máxima de tração (força necessária para realizar a disjunção da anastomose). Durante a análise das variáveis os autores notaram que, durante a fase inflamatória da cicatrização (0-4 dias), havia pobre correlação entre força de tração e a pressão de ruptura, enquanto que na fase fibroplásica (após 5 dias) esta correlação se mostrou altamente significativa mediante análise de regressão. Valores positivos de forças mínimas e máximas de tensão foram encontrados quando as pressões de ruptura correspondentes eram iguais a zero. Os autores concluíram que a força mínima de tensão seria o melhor método para avaliação biológica da cicatrização das anastomoses enquanto a pressão de ruptura seria mais adequada na pesquisa de integridade anastomótica em geral, não refletindo o processo cicatricial.

Nos estudos de força de ruptura, a ruptura da anastomose quase sempre ocorre na linha de anastomose, durante as primeiras quatro semanas de pós-operatório. Esta medida de força se correlaciona com a síntese de novo colágeno, que inicia a partir do quarto dia de pós-operatório. Todas as anastomoses intestinais perdem muito de sua força original durante os três primeiros dias após a cirurgia. A

pressão de explosão é menor nos dias 2-3 após anastomose e, a seguir, esta força aumenta rapidamente. Uma semana após a cirurgia, a pressão de explosão da anastomose é similar à pressão de explosão dos controles não-operados e o intestino geralmente vai romper fora da linha de anastomose (VAN WINCKLE, 1969).

2.1.3.3 Parâmetros histológicos

Os parâmetros histológicos permitem avaliar a presença e a estrutura dos componentes microscópicos envolvidos no processo de cicatrização. Estes parâmetros são muito empregados em estudos experimentais, porém são subjetivos e sujeitos a erros de interpretação. Desta forma, é importante utilizar métodos que possibilitem avaliar dados passíveis de quantificação uniforme para que seja possível realizar comparações e avaliações do processo de cicatrização.

Sweat, Puchtler e Rosenthal (1964) recomendaram o *picrosirius red* F3BA (PCS) para coloração do colágeno utilizando a técnica de ácido pícrico. Esta técnica se destacou pela maior seletividade para tecido conjuntivo e por ser mais adequada na leitura microscópica por luz polarizada.

Constantine e Mowry (1968) compararam a utilidade do PCS, com picrofucsina e picroaniolina azul, assim como outras técnicas de coloração aplicadas no colágeno da derme em secções de parafina de pele humana. Estes autores concluíram que o PCS aumenta a birrefringência normal das fibras colágenas, facilitando o seu reconhecimento e classificação. O PCS era um corante usado no comércio, mas não previamente na histologia. Aplicado em várias células humanas coletadas nas necropsias, o PCS provou ser superior que a picrofucsina em muitas considerações. Ao contrário da picrofucsina, o PCS não enfraquece a sua coloração em poucos meses; este corante permanece nas fibras finas de colágeno mais intensamente e aumenta sua birrefringência espetacularmente em todas as fibras de colágeno, quando visto em luz polarizada. Esta propriedade permite que fibras muito pequenas sejam visualizadas facilmente.

Em 1979, Junqueira, Bignolas e Brentani confirmaram em seus experimentos que a coloração com PCS é um procedimento específico para o colágeno, uma vez que não cora fortemente as glicoproteínas. Estes mesmos

autores sugeriram que há aumento de, pelo menos, 700% na intensidade da luz devido à birrefringência do colágeno corado pelo PCS, quando comparado com controles. Esta característica é responsável pelas imagens claras que permitem a observação acurada do colágeno em diferentes tecidos.

O espectro das diferentes cores de polarização obtidas depois da coloração com PCS é útil na diferenciação entre os vários tipos de colágeno. A diferenciação de cores de polarização se deve mais à espessura das fibras do que à natureza delas (JUNQUEIRA; MONTES e SANCHEZ, 1982). Da mesma forma, Dayan, Hiss e Hirsberg *et al.*, em 1989, compararam vários tipos de fibras colágenas purificadas, de espessuras diferentes, pelo método PCS. Estes autores evidenciaram que o entrelaçamento e o alinhamento entre as moléculas, e não apenas sua espessura, constituíram 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-avermelhada 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 porcentagem das fibras, classificadas em maduras ou imaturas de acordo com a sua coloração, permite avaliação qualitativa de fibras colágenas, podendo ser utilizado em estudos de cicatrização de anastomoses (RABAU *et al.*, 1994; SKINOVSKI, 2000; COSTA, 2002; FERREIRA, 2004; ALVES, 2006; GONÇALVES, 2005; LEMOS, 2002 e SCHMITZ, 2006).

2.1.3.4. Parâmetros imunoistoquímicos

A imunoistoquímica é o método diagnóstico que tem como objetivo detectar um antígeno tecidual ou celular, mediante a utilização de anticorpo específico dirigido contra este componente celular (TORRES *et al.*, 1998).

Werner (2002) definiu o método como sendo a aplicação dos princípios imunológicos da ligação antígeno-anticorpo para estudo de células e tecidos. A imunoistoquímica consiste na utilização de anticorpos específicos conhecidos e manipulados quimicamente para que, ao se ligarem aos seus antígenos celulares ou teciduais correspondentes, devido a diversas reações e utilização de cromógenos,

produzam alteração de coloração visível à microscopia óptica, a qual indica o antígeno específico e o quantifica.

2.1.3.4.1 Avaliação da neovascularização

A formação de novos vasos sanguíneos envolve dois processos fundamentais: vasculogênese e angiogênese. A vasculogênese é a formação primária de vasos sanguíneos a partir dos precursores da célula endotelial, os angioblastos, durante o desenvolvimento embrionário. Caracteriza-se pela diferenciação e proliferação dos angioblastos, que se organizam numa rede vascular primitiva, denominado de plexo capilar primário, a partir do qual novos brotos capilares podem germinar, constituindo a base para o processo angiogênico. A angiogênese ou neovascularização é assim definida como o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos a partir de capilares pré-existentes (BATTEGAY 1995).

A angiogênese normal ocorre durante o período embrionário, porém é observada ao longo da vida adulta, em alguns eventos fisiológicos, assim como na reparação de feridas. O controle da angiogênese é feito por um delicado balanço entre fatores endógenos: promotores e inibidores. A célula endotelial do organismo adulto sadio apresenta *turn over* muito lento, exceto nas condições anteriores descritas. A manutenção da célula endotelial neste estado quiescente é determinada pela ação coordenada de fatores positivos e negativos. Sendo assim, quando os reguladores positivos predominam, a célula endotelial é ativada, prolifera e migra, ao passo que, quando o domínio é dos reguladores negativos, a célula endotelial retorna ao estado quiescente e assim se mantém (FOLKMAN e SHING 1992; FURCHT, 1986; FOLKMAN, 1995; FECHINE-JAMACARU; FECHINE-JAMACARU e MORAIS FILHO, 2005).

A angiogênese constitui, portanto, um complexo processo, que envolve mediadores solúveis, interações célula-célula e célula-matriz extracelular, bem como forças biomecânicas. Compreende diversas etapas, que, de forma simplificada podem ser assim descritas: aumento da permeabilidade vascular e deposição de fibrina extravascular; desarranjo da parede vascular, com remoção dos pericitos; degradação da membrana basal e da matriz extracelular; migração da célula

endotelial através da matriz extracelular remodelada; proliferação da célula endotelial; formação de estruturas tubulares; inibição da proliferação e migração da célula endotelial; reconstituição da membrana basal; maturação dos complexos juncionais; construção da parede vascular, através do recrutamento e diferenciação de células murais, pericitos e células de músculo liso; estabelecimento de fluxo sanguíneo no novo vaso (FOLKMAN e SHING 1992; FURCHT, 1986; FOLKMAN, 1995).

A cicatrização de feridas não pode ocorrer sem a neoformação vascular. A vascularização perfaz cerca de 60% do tecido de reparo inicial, sendo o chamado tecido de granulação, o nome original do tecido cicatricial temporário, derivado da proeminência desses vasos. Um abundante suprimento sanguíneo é necessário para suprir a grande demanda metabólica local exigida pelas atividades de desbridamento e fibroplasia no local da injúria tissular; a presença de vasos sanguíneos no sítio da lesão é esparsa, não fornecendo suficiente irrigação. A proliferação dos vasos exerce mais do que um papel nutritivo, pois a célula endotelial é também organizadora e reguladora da cicatrização, constituindo-se atualmente no alvo primário para a manipulação terapêutica no processo de reparação (ARNOLD e WEST, 1991; BATTEGAY, 1995; SKINOVSKY, 2005; ALVES, 2006).

Seifert *et al.*, (1997) demonstraram, em estudo experimental sobre angiogênese, um aumento significativo no crescimento de vasos na anastomose colônica do 3^o ao 7^o dia pós-operatório. Segundo Enestvedt *et al.* (2006) a maioria da neovascularização ocorre da periferia para o centro da anastomose, com perfusão mais pronunciada na mucosa injuriada que na sem injúria, sugerindo que a angiogênese é regulada durante o período mais crítico da cicatrização da anastomose.

A quantificação de vasos sanguíneos realizada por meio da técnica de imunistoquímica, utilizando-se anticorpo antifator VIII, também denominado fator de Von Willebrand, é altamente específico para tecido vascular. (WERNER, 2002; ALVES, 2006). A utilização do fator VIII como marcador de vascularização foi realizada por alguns estudos (JERDAN, MICHELS e GLASER, 1991; CHIBATA, 2003 e SKINOVSKY, 2005, ALVES, 2006).

2.1.3.4.2 Avaliação de miofibroblastos

A restauração da continuidade tecidual após lesão e a resistência do reparo tissular dependem primariamente da função do fibroblasto. Os miofibroblastos são células altamente diferenciadas que apresentam organelas especializadas, contendo apresentações comuns a fibras musculares e fibroblastos. Segundo Junqueira e Carneiro (1995), os fibroblastos são as células mais comuns do tecido conjuntivo e os principais produtores de fibras colágenas e material intercelular amorfo, sendo responsáveis pela síntese, deposição e remodelação da matriz extracelular.

Desde o início da segunda semana de cicatrização de feridas, os fibroblastos assumem o fenótipo de miofibroblastos, caracterizados pela presença de espessos feixes de actina-miosina, contendo microfilamentos dispostos ao longo de sua membrana citoplasmática e por sítios de ligação intercelular e célula-matriz (GRINNELL, 1994; SINGER e CLARK, 1999).

No ano de 1999, Powell *et al.* publicaram estudo de revisão discorrendo sobre os dois tipos de miofibroblastos identificados no intestino, os miofibroblastos subepiteliais intestinais (ISEMF), presentes especialmente na lâmina própria sob as células epiteliais, e as chamadas células intersticiais de Cajal (ICC), por sua vez localizadas na submucosa e muscular própria da parede do intestino delgado e cólon, sendo os dois tipos celulares derivados de um mesmo precursor. Os miofibroblastos intestinais são ativados e proliferam em resposta a diversos fatores de crescimento, particularmente o PDGF. Em especial o tipo ISEMF apresenta papel importante na organogênese intestinal e na contração da ferida após lesão; além disso, citocinas secretadas por este tipo celular promovem crescimento epitelial no processo de cicatrização do órgão, enquanto evidências demonstram que as células ICC atuam especialmente na neurotransmissão e motilidade intestinais.

Serini e Gabbiani (1999), em estudo sobre a atividade dos miofibroblastos, apresentaram fortes indícios de que a alfa-actina muscular lisa (actina α -SM), a isoforma típica destas células, exerce importante papel no desenvolvimento de sua força de contração.

Os pesquisadores Hinz *et al.* (2001), Lorena *et al.* (2002) e Tomasek *et al.* (2002) descreveram que os miofibroblastos são interconectados entre si por junções especiais e com a matriz extracelular pelo chamado fibronexus, uma complexa

membrana que envolve microfilamentos intracelulares em continuidade com fibronectina extracelular. Relataram também que estas células são importantes produtoras de colágeno dos tipos I e III, informando existir direta correlação entre o nível do principal marcador destas células, a actina α -SM e o grau de contração dos miofibroblastos.

Durante a cicatrização normal, o tecido de granulação começa a desaparecer quando a reepitelização encontra-se em fase final, ocorrendo então maciça apoptose dos miofibroblastos e componentes vasculares, levando à formação de uma cicatriz pobremente celular (SKINOVSKY, 2005).

A quantificação dos miofibroblastos realizada por meio de imunohistoquímica, utilizando-se o anticorpo anti- α -actina muscular lisa, foi realizado pela primeira vez por Skalli *et al.* (1986), cujos autores demonstraram positividade para a identificação dessas células. Hinz *et al.* (2001), em estudo experimental, e Lorena *et al.* (2002), em estudo de revisão sobre a importância dos miofibroblastos no processo de cicatrização, relataram que existe correlação direta entre o nível de actina α -SM e a capacidade contrátil dos miofibroblastos, sendo a expressão da mesma considerada por Schurch, Seemayer e Gabbiani (1998) como o principal marcador bioquímico deste tipo celular.

2.2 SEPSE

A patogênese e as manifestações clínicas da sepse resultam de complexa interação entre o agente infeccioso e o hospedeiro. A resposta orgânica ao estresse grave é complexa e integrada, e sua finalidade básica é a restauração da homeostase. Na maioria dos casos, a resposta é harmônica e ordenada, conduzindo o paciente à cura. No entanto, quando a resposta é excessiva, pode ocorrer um desequilíbrio profundo da homeostase, com bloqueio metabólico de vários órgãos e a resultado final é a morte (HILL *et al.*, 1998; BASILE-FILHO *et al.*, 2001).

Segundo o *American College of Chest Physicians* e a *Society of Critical Care Medicine*, sepse é a resposta inflamatória sistêmica do organismo frente ao estímulo infeccioso, e inclui a presença de dois ou mais de alguns critérios clínicos para o diagnóstico, conforme citação do quadro 3 (*AMERICAN COLLEGE OF CHEST PHYSICIANS*, 1992; PEREIRA JÚNIOR *et al.*, 1998; SALLES *et al.*, 1999; BASILE-FILHO *et al.*, 2001).

1. Temperatura corporal > 38°C ou < 36°C
2. Frequência respiratória > 20 mov/min ou PCO₂ < 32mmHg
3. Frequência cardíaca > 90 bat/min
4. Leucocitose > 12.000 células/mm³ ou < 4.000 células/mm³, ou mais que 10% de células imaturas na periferia.

QUADRO 3. DIAGNÓSTICO DE SEPSE: DOIS OU MAIS DOS 4 CRITÉRIOS SÃO NECESSÁRIOS
FONTE: *AMERICAN COLLEGE OF CHEST PHYSICIANS*, 1992

O choque séptico é uma das causas de morte cada vez mais freqüentes, em unidades de terapia intensiva do mundo todo, e tem os seguintes fatores contribuintes para o seu surgimento: a crescente população de idosos (maior que sessenta e cinco anos); a maior sobrevivência de diversas doenças debilitantes; o emprego mais freqüente de técnicas invasivas (cateteres vesicais, tubos endotraqueais, cateteres intravasculares, entre outros); o cuidado de maior número de pacientes imunossuprimidos e as infecções hospitalares (PEREIRA JÚNIOR *et al.*, 1998). A epidemiologia da sepse em 2003 revelou que, mesmo com o declínio

da mortalidade hospitalar, o número total de mortes continuou subindo e isso foi consequência do aumento da incidência de sepse (REMICK e WARD, 2004).

Martin *et al.* (2003) demonstraram que houve aumento da incidência de sepse no período de 1979 (82,7/100,000 população) a 2000 (240,4/100,000 população), em torno de 8,7% ao ano. A mortalidade reduziu-se de 27,8% nos primeiros anos para 17,9% nos últimos 5 anos de avaliação. Annane e colaboradores (2003) publicaram tendência semelhante na incidência e mortalidade quando avaliaram pacientes com choque séptico em um período de oito anos. As internações na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) aumentaram de 7 casos (em 1993) para 9,7 (em 2000) a cada 100 internações e a mortalidade reduziu de 62,1% (em 1993) para 55,9% (em 2000).

Nos Estados Unidos está estimado que a incidência de sepse ultrapasse 300.000-500.000 casos a cada ano, apesar da melhoria dos cuidados de suporte (GIACOMETTI *et al.*, 2005). No estudo de Angus em 2001, os autores estimaram em 750.000 novos casos a cada ano, com taxa de mortalidade entre 35 e 50%, o que representaria 200.000 a 300.000 mortes por sepse grave e choque séptico. Cerca de 55% dos pacientes com sepse grave apresentaram alguma comorbidade. Metade dos pacientes com sepse grave identificados recebeu, em algum momento de suas hospitalizações, cuidados intensivos. A taxa de mortalidade global foi de 28,6% e apresentou relação quase linear com a idade (10% em crianças e 38,4% nos adultos \geq 85 anos). Assumindo um crescimento anual de casos de 1,5%, chegar-se-ia a 934.000 novos casos em 2010 e de 1.110.000 novos casos no ano de 2020 somente nos Estados Unidos (FRIEDMAN *et al.*, 1998; ANGUS e LINDE-ZWIRDLE, 2001 a, b; UDOBI *et al.*, 2004; SALES *et al.*, 2006).

O estudo BASES (Brazilian Sepsis Epidemiological Study) envolveu 1383 pacientes adultos admitidos de maio de 2001 a janeiro de 2002 em cinco diferentes UTI de duas regiões (sul e sudeste) do Brasil. É um estudo prospectivo, de coorte, que avaliou todos os pacientes admitidos nestas unidades, independente de sua doença de base. A incidência de sepse, sepse grave e choque séptico foi de 61,4%, 35,6% e 30%, respectivamente. A mortalidade dos pacientes com Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS), sepse, sepse grave e choque séptico aumentou progressivamente (24,3%, 33,9%, 46,9% e 52,2%, respectivamente). Este estudo sugere que a sepse é o maior problema de saúde pública nas Unidades de

Terapia Intensiva do Brasil, com incidência em torno de 57 por 1000 pacientes/dia (SILVA *et al.*, 2004).

2.2.1 Resposta do organismo à sepse

A inflamação é uma resposta normal do hospedeiro contra agentes infecciosos. Mediadores como as citocinas são consideradas muito importantes na fisiopatologia da sepse. Entretanto, nos meados dos anos 90, ficou evidente que as alterações da fisiopatologia são dependentes de interação muito complexa entre o patógeno microbiano, células imunocompetentes e seus mediadores, células endoteliais e o sistema de coagulação (SANTOS, 2001; GLUCK, *et al.*, 2004; ESMON, 2004).

A primeira linha de defesa do hospedeiro à infecção é realizada por células fagocitárias (macrófagos, monócitos e granulócitos polimorfonucleares) e pela via alternativa do complemento, agindo de maneira não específica. Logo após, as imunoglobulinas e as células imunocompetentes iniciam resposta imune específica (PEREIRA JÚNIOR *et al.*, 1998).

Os componentes da parede bacteriana são os principais ativadores desta resposta do hospedeiro: as endotoxinas dos microorganismos Gram-negativos e o ácido teicóico dos microorganismos Gram-positivos. Estes componentes desencadeiam cascata inflamatória, sendo, inicialmente, liberados o Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- α) e a Interleucina-1 (IL-1), que estimulam intensa resposta celular, com liberação de mediadores secundários, quimiotaxia e ativação de granulócitos. Os mediadores secundários são responsáveis pela reativação das células fagocitárias e da cascata inflamatória, formando um ciclo vicioso inflamatório (JACOBI, 2002).

2.2.1.1 Monócitos macrófagos

Estas células constituem a primeira linha de defesa contra infecções após as barreiras naturais da pele e mucosas. As endotoxinas causam a liberação de citocinas diretamente destas células. Ao mesmo tempo, os microorganismos presentes no foco de infecção são fagocitados. Isto causa aumento do consumo de oxigênio pelos macrófagos e a produção de radicais livres de oxigênio (superóxidos, peroxidases, etc), juntamente com proteases e hidrolases (lisozimas, elastase, colagenase, etc), que são capazes de causar danos a estes patógenos. Os macrófagos ativados também secretam muitos mediadores inflamatórios, tais como leucotrienos e o fator ativador plaquetário (PAF), que são ativos em células distantes e amplificam a reação inflamatória (CAILLE *et al.*, 2004, PEREIRA JÚNIOR *et al.*, 1998).

2.2.1.2 Citoquinas inflamatórias e seus moduladores

Estudos experimentais e clínicos trouxeram à tona a importância das citocinas inflamatórias na patogênese da sepse e fundamentaram a intervenção na resposta do hospedeiro como potencial alvo terapêutico na sepse (CONSENSO BRASILEIRO DE SEPSE).

Os macrófagos monócitos ativados produzem, seqüencialmente, as citocinas inflamatórias: TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8. Após o contato com os mediadores bacterianos, níveis muito elevados de TNF e IL-1 são encontrados na circulação entre 30 a 90 minutos (GLUCK *et al.*, 2004). Estas citocinas agem em outras células ou elementos sanguíneos (polimorfonucleares, células endoteliais, fibroblastos, plaquetas e nos próprios monócitos) através da ligação a seus receptores de superfície, induzindo a produção e liberação de mediadores, que contribuem para a resposta inflamatória tardia. Após a liberação de TNF- α , IL-1 e PAF, o ácido araquidônico é metabolizado, formando os leucotrienos, tromboxano A₂ e prostaglandinas (especialmente a PGE₂ e PGI₂). A IL-1 e IL-6 ativam as

células T para produzir interferon- γ , IL-2 e IL-4. A maioria destes agentes atua diretamente no endotélio vascular (ZIMECKI *et al.*, 2004; PEREIRA JÚNIOR *et al.*, 1998; CONSENSO BRASILEIRO DE SEPSE).

Em 1893, Coley notou, em seres humanos, a regressão de tumores variados, após a injeção de endotoxinas bacterianas. A causa e o significado desse fenômeno permaneceram obscuras, até 1985, quando Beutler *et al.*, isolaram e purificaram uma citocina, dotada de efeito semelhante, denominada caquexina ou fator de necrose tumoral (TNF). Este estudo demonstrou que os níveis plasmáticos de TNF também estavam elevados no trauma e nas infecções graves. A partir desses estudos, outras citocinas pró-inflamatórias foram purificadas e, dentre elas, destaca-se a IL-1 β (GIRARDIN *et al.*, 1988). A elevação persistente ou temporal de algumas citocinas como TNF- α , IL-1 β e IL-6 foi relacionada à taxa de sobrevivência de pacientes críticos na evolução da sepse (DAMAS *et al.*, 1989; CASEY *et al.*, 1993). Os níveis de IL-6 podem persistir muito elevados durante a evolução clínica, talvez refletindo a persistência de lesão celular (GARDLUND *et al.*, 1995). Na sepse experimental, induzida por administração sistêmica de lipopolissacarídeo, observou-se que camundongos deficientes no gene para IL-6 apresentam maior índice de mortalidade e de produção de TNF- α , sugerindo papel antiinflamatório para a IL-6 (XING *et al.*, 1998). Nesse contexto, a IL-10, cujos níveis plasmáticos também estão elevados na sepse, atua como citocina antiinflamatória, por ser capaz de suprimir a produção de citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos (MARCHANT *et al.*, 1994; BASILE-FILHO *et al.*, 2001).

2.2.1.3 Endotélio vascular

Por muitos anos, o endotélio vascular foi considerado tecido essencialmente passivo. Sua função primária era apenas delimitar os vasos e servir como membrana semipermeável à água e às proteínas plasmáticas, mantendo adequada pressão coloidosmótica, regulando a entrada e saída de água e eletrólitos para o interstício. Porém, atualmente, o endotélio vascular é visto como uma barreira ativa, que aumenta ou limita a entrada e saída de substâncias no vaso pela secreção ou

metabolização de muitas moléculas ativas na regulação do tônus vascular, coagulação e permeabilidade (renina, endotelina, prostaciclina, óxido nítrico, PG-E2, aminas ativas, etc).

As células endoteliais possuem importante papel na homeostasia, regulação do tônus vascular e fibrinólise pela secreção de vasodilatadores e vasoconstritores. Quando ativadas diretamente pelo lipopolissacáride da membrana bacteriana (endotoxina) ou pelas citocinas, estas células adquirem função pró-coagulante e pro-trombótica, pela liberação de tromboplastina, inibidor do ativador do plasminogênio e do fator ativador plaquetário, além da diminuição da sua produção de trombosmodulina. Também produzem mediadores inflamatórios, tais como as interleucinas (IL-1, IL-6 e IL-8), fator agregante plaquetário, prostaciclina, endotelina (capaz de aumentar adversamente o tônus vascular) e o óxido nítrico (BASILE-FILHO *et al.*, 2001; PEREIRA JÚNIOR *et al.*, 1998). O óxido nítrico desempenha o papel principal na regulação do tônus vascular e apoptose, assim como nas plaquetas e nas funções enzimáticas (OTTESEN *et al.*, 2001).

2.2.1.4 Leucócitos polimorfonucleares

A presença do foco infeccioso, a liberação de endotoxinas, a produção de citocinas e a ativação da cascata da coagulação ativam os leucócitos polimorfonucleares. Estes são atraídos para o sítio de infecção e inflamação através de numerosos fatores quimiotáticos (fragmentos do complemento, IL-8, peptídios quimiotáticos, leucotrienos, etc) aumentando dramaticamente o seu número, próximo às vênulas pós-capilares. Os leucócitos polimorfonucleares passam através da barreira endotelial (por diapedese) atingindo a área de infecção, ampliando a resposta inflamatória.

A ativação dos leucócitos tem profundos efeitos no fluxo sanguíneo da microcirculação, uma vez que sua aderência ao endotélio causa estreitamento dos microvasos, causando aumento da resistência vascular, redistribuindo o fluxo sanguíneo, o que modula a oferta de oxigênio aos tecidos. A estimulação dos polimorfonucleares causa aumento no consumo de oxigênio, caracterizado pelo aumento na atividade da NADPH-oxidase. Isso produz as formas ativas de oxigênio, incluindo os radicais superóxidos e peróxidos, que são armas essenciais, durante a

sepsis, para a destruição de bactérias fagocitadas e para a limpeza de áreas necróticas, em conjunção com as proteases (PEREIRA JÚNIOR *et al.*, 1998).

2.2.1.5 Proteína C Reativa

A proteína C reativa (PCR) é uma proteína de fase-aguda sintetizada pelo fígado e liberada após o início de um processo inflamatório ou dano tecidual. Os níveis séricos aumentam após estímulo de várias citocinas como o TNF e interleucina-6 (THIJS e HACK, 1995). Vários estudos demonstraram que os níveis de PCR estão aumentados em pacientes sépticos (SCHENTAG *et al.*, 1984; MAURY 1989; YENTIS; SONI e SHELDON, 1995; SMITH *et al.*, 1995; PRESTERL *et al.*, 1997; POVOA *et al.*, 1998).

Uma importante diminuição dos níveis circulantes de proteína C e de antitrombina é observada em pacientes sépticos. A Proteína C humana (hPC), uma proteína plasmática dependente de vitamina K, desempenha papel fundamental na regulação da hemostasia. Esta complexa proteína circula na sua forma inativa, atuando na superfície endotelial e nas plaquetas, após conversão para sua forma ativa. Esta forma ativa (APC) funciona como anticoagulante, inativando os fatores Va e VIIIa, bloqueando, desta forma, a geração de trombina. A capacidade da APC de inibir a geração de trombina poderia reduzir os efeitos inflamatórios mediados por esta, diminuindo a clivagem do receptor de trombina e, subseqüentemente, reduzindo a ativação plaquetária e da célula endotelial. Demonstrou-se, recentemente, que a APC pode modular diretamente a função endotelial, induzindo a expressão de genes com atividade antiinflamatória e inibindo a morte celular por apoptose (CONSENSO BRASILEIRO DE SEPSIS; MEISNER *et al.*, 1999; GLUCK *et al.*, 2004).

2.2.2 Modelo experimental de sepse

O modelo de sepse intra-abdominal iniciou-se nos anos 30 com o isolamento da endotoxina e com o reconhecimento de que esta é a chave molecular na sepse humana. Nos trinta anos consecutivos, o modelo com utilização de endotoxina predominou. Alguns estudos constataram que os animais morriam muito mais rápido do que era visto na prática clínica, o que limitou este tipo de método experimental. Um segundo ímpeto surgiu pela necessidade de desenvolver modelos de abscesso intra-abdominal, pois o seu tratamento era um dilema na época (WEINSTEIN *et al.*, 1974; BARTLETT *et al.*, 1978). Então, nos anos 60, com a emergência de novos agentes antimicrobianos, o foco mudou da endotoxina para modelos de sepse intra-abdominal bacteriana. Estudos foram realizados na duas décadas seguintes usando vários modelos de inóculos bacterianos. Neste modelo, os animais ou apresentavam peritonite/bacteremia com evolução para morte entre 2 a 5 dias ou os animais sobreviventes desenvolviam abscesso intra-abdominal após uma semana de inoculação (WICHTERMAN *et al.*, 1980; DEITCH 2005).

2.2.2.1 Modelo de ligadura e perfuração cecal

O maior desenvolvimento no modelo de sepse ocorreu com o modelo de ligadura e perfuração cecal (CLP) nos anos 80. Este modelo tem a vantagem de combinar a injúria celular com a habilidade de modular o grau de contaminação bacteriana (WICHTERMAN *et al.*, 1980; DEITCH 2005).

Como originalmente descrito, o modelo de CLP resulta em choque séptico e morte ocorrendo entre 24 a 48h após a ligadura e perfuração cecal. Uma vantagem deste modelo é que a taxa de mortalidade e grau de contaminação pode ser modulada pelo tamanho da agulha usada para criar a perfuração no ceco ligado, assim como pelo número de perfurações realizadas. O CLP se tornou um dos modelos mais comuns para investigar a fisiopatologia e o tratamento da sepse abdominal e suas conseqüências sistêmicas. A principal característica do modelo de CLP é sua simplicidade e o fato de satisfazer muitos critérios atribuídos a um modelo

experimental apropriado: sepse polimicrobiana com origem determinada do foco de infecção (FINK e HARD, 1990; HUBBARD *et al.*, 2005; DEITCH, 2005).

2.2.2.2 Modelo de lipopolissacarídeo (LPS)

Apesar do modelo CPL estar próximo à realidade clínica, a grande maioria dos estudos em sepse experimental baseia-se em modelos nos quais a bactéria ou o LPS (lipopolissacarídeo) são administrados i.v. (intravenoso) ou i.p. (intraperitoneal). (SMITH *et al.*, 1993; ZELLEWGER *et al.*, 1997; ZANTL *et al.*, 1998; TURNBULL *et al.*, 2003; COBB *et al.*, 1999; STEWART *et al.*, 2002; DEITCH, 2005).

A administração endovenosa de LPS é amplamente utilizada para o estudo da sepse, pois mimetiza vários efeitos observados nestes pacientes, como: alterações hemodinâmicas e cardiovasculares, diminuição do débito urinário, redução da perfusão tecidual, hiporresponsividade a agentes vasoconstritores, coagulação intravascular disseminada e produção de grandes quantidades de citocinas na circulação.

Há quatro razões que sustentam o nível de hiperinflamação induzida pela endotoxina como causa da injúria orgânica na sepse. Primeiro, a infusão de endotoxina em animais experimentais ou em humanos voluntários causa a liberação de citocinas pró-inflamatórias. Segundo, a infusão de citocinas recombinantes em animais experimentais é usada na terapia do câncer e resulta em estado similar à sepse. Terceiro, níveis elevados de citocinas são encontradas no plasma de pacientes com sepse. O quarto motivo é que a inibição das citocinas inflamatórias liberadas pela indução de endotoxina previne a mortalidade em estudos clínicos (REMICK e WARD, 2004). Além disso, trata-se de modelo prático e reproduzível em muitas espécies animais, como em ratos, camundongos, coelhos, cães e primatas (BENJAMIN, 2001; DEITCH 2005).

O LPS, composto estável e relativamente puro, preenche alguns aspectos vantajosos para estudos experimentais. É conveniente para o uso, uma vez que é armazenado na forma liofilizada até o seu uso, em contraste com a utilização da bactéria, que é tipicamente estocada congelada e deve crescer em cultura por 18-24h para ser utilizada. A dose de LPS pode ser realmente mensurada e controlada,

enquanto que o uso da bactéria viável pode ter quantificação acurada somente retrospectivamente. Nos modelos de CLP a dose de microorganismos infectantes é desconhecida. (FINK e HARD, 1990).

O embasamento para idéia de que o LPS é patofisiologicamente importante na sepse humana recai sobre estudos recentes utilizando voluntários humanos. Em indivíduos normais, pequenas doses de LPS (4ng/Kg) induzem a mudanças hemodinâmicas, hematológicas e metabólicas que são qualitativamente similares àquelas observadas em pacientes sépticos (FINK e HARD, 1990). Em ratos, altas doses de LPS levam a um estado hipodinâmico, enquanto doses menores de LPS propiciam resposta hiperdinâmica (JONHSTON *et al.*,1989; FINK *et al.*,1990). Por muitos anos, os pesquisadores se interessaram por descrever os efeitos da infusão contínua de LPS em animais experimentais. Fish e Spitzer (1984), em seu modelo experimental, utilizaram infusão contínua intravenosa de LPS em ratos, na dose de 3mg/Kg/dia. Comparados com o grupo controle, os animais com infusão de LPS manifestaram muitos achados de sepse humana compensada, incluindo hipermetabolismo, anorexia, hipotensão, leucocitose e hiperlactatemia.

A administração de LPS pode ser endovenosa ou intraperitoneal. A aplicação intraperitoneal se aproxima mais de um quadro de sepse observado na clínica, pois o processo se inicia a partir do foco infeccioso ou da disseminação de LPS administrados na cavidade peritoneal, e não diretamente na circulação. Mas, ainda assim, o início do processo ocorre de forma muito rápida, e não gradativa, como acontece na maioria dos casos clínicos (BENJAMIN, 2001).

2.2.3 Endotoxemia

A endotoxemia é definida pela presença de endotoxina bacteriana na circulação sistêmica, diferenciando-se de bacteremia ou septicemia, que se define como presença da própria bactéria no sangue. A endotoxina bacteriana nada mais é do que um componente da parede externa das bactérias Gram-negativas, também conhecida como glicopolissacarídeo ou fosfolipopolissacarídeo (LPS). Esta endotoxina, em condições normais de homeostase do paciente, não apresenta

efeitos deletérios, devido ao limite de seu movimento transmural, principalmente pela barreira intestinal (SALLES *et al.*, 1999; WANG *et al.*, 2004; PACHECO, 2007).

2.2.4 Estrutura do lipopolissacarídeo

Os primeiros estudos para elucidar a estrutura molecular começaram nos anos 50 com Luderitz e Westphal (BEUTLER e RIETSCHHEL, 2003). Em 1960, ficou claro que a porção lipídica da molécula continha a atividade endotóxica. Outros experimentos foram realizados com o passar dos anos e, somente em 1980, quando o lipídio A livre foi finalmente preparado sinteticamente por Shiba *et al.*, no Japão, foi provado ser o centro da molécula endotóxica (ERRIDGE *et al.*, 2002).

O LPS é um componente integral da parede externa das bactérias Gram-negativas que contém antígenos e propriedades tóxicas da bactéria. Todas as bactérias Gram-negativas apresentam uma parede celular externa semelhante, constituída de dois componentes principais: uma camada interna de mucopolissacarídeo-peptideoglicano e uma camada externa de LPS responsável por todos os efeitos deletérios da endotoxemia. Figura 3 (BEUTLER e RIETSCHHEL, 2003; PACHECO, 2007).

O lipopolissacarídeo é formado por duas partes: parte hidrofóbica e hidrofílica, que exercem efeitos distintos. A parte hidrofóbica ou também denominada antígeno A é responsável pelos efeitos endotóxicos, ação antigênica e especificidade sorológica da molécula. A parte hidrofílica ou cadeia O específica é responsável pela maior ação antigênica do LPS e determina a identidade sorológica específica (BURNETT e SCHUSTER, 1982; NISENGARD e NEWMAN, 1994; SALLES *et al.*, 1999 PACHECO, 2007).

A molécula LPS é um potente estimulante inflamatório capaz de induzir direta e indiretamente uma resposta inflamatória e imunológica do hospedeiro, que será responsável por todo o efeito deletério da afecção. Diretamente, o LPS ativa o complemento, a coagulação e as cascatas fibrinolíticas através da ativação do fator de Hagerman (fator XII). As populações de células do hospedeiro, incluindo linfócitos, neutrófilos, células epiteliais, plaquetas e, mais importante, células

mononucleares, são ativadas por meio de interações específicas e inespecíficas de LPS (BENBAREK, 1998; PACHECO, 2007).

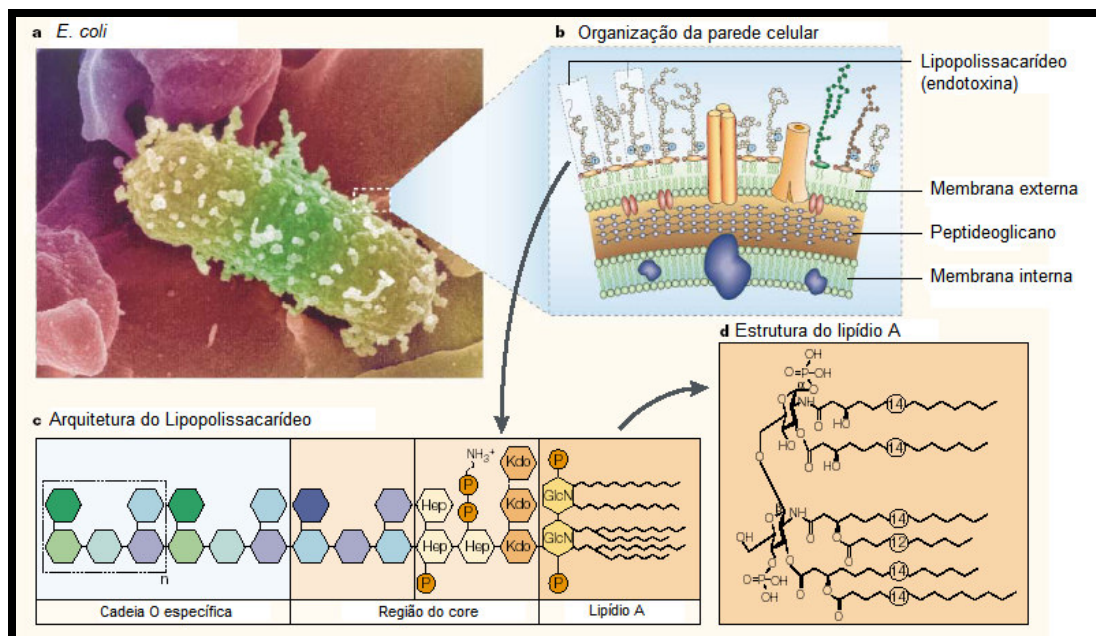


FIGURA 3. **Bactéria Gram-negativa.** Microscopia eletrônica da *Escherichia coli* (a) juntamente com representação esquemática da localização do lipopolissacarídeo (LPS; endotoxina) na parede celular da bactéria (b) e a arquitetura do LPS (c). Estrutura primária do centro tóxico do LPS, o lipídio A (d). ADAPTADO DE BEUTLER e RIETSCHER, 2003.

O início da resposta inflamatória ocorre quando o LPS liga-se à proteína ligadora de lipopolissacáride (LBP). O complexo LPS-LBP é então capaz de interagir com o receptor superficial celular denominado antígeno de diferenciação de agrupamentos 14 (CD14), que existe principalmente em fagócitos mononucleares e parece ser a maior superfície celular receptora para endotoxina (STELTER, 2000; PETROIANU *et al.*, 2004; PACHECO, 2007). Embora tenha papel fundamental na resposta à endotoxina, o receptor CD 14 não tem habilidade para transmitir efetivamente a presença da toxina para o interior da célula. Sendo assim, há outro receptor que é capaz de desempenhar esta função, chamado *Toll-like 4* (TLR-4) (DIKS *et al.*, 2004; GIACOMETTI *et al.*, 2005; TRIANTAFILOU *et al.*, 2005; LEU *et al.*, 2005; PACHECO, 2007).

Receptores *Toll-like* (TLRs) compreendem uma família de receptores superficiais celulares de proteínas presentes em diferentes células, cuja função em mamíferos é reconhecer componentes moleculares de microorganismos. O TLR é o

maior mecanismo molecular pelo qual o hospedeiro reconhece a invasão de um microorganismo. Esta informação é transmitida através da membrana celular e o sinal resultante é transmitido para o núcleo, a fim de que se inicie a resposta apropriada (WARREN, 2005). Recentemente levantou-se a hipótese de que o TLR4 é um crítico receptor para o LPS, sinalizando a defesa do hospedeiro e o sistema imunológico inativo que pode estar envolvido na regulação da imunidade adaptativa, sendo mediada pelos linfócitos B e T (OGIKUBO *et al.*, 2004).

A ativação celular desencadeada pelo LPS depende de três proteínas: CD14, TRL4 e MD2, formando o complexo receptor do LPS (MIYAKE, 2003; BEUTLER e RIETSCHHEL, 2003). Uma vez ativado o complexo TRL-4, ocorre o recrutamento de uma proteína adaptativa denominada MyD88, a qual se associa à IRAK (serina-treonina proteína quinase do receptor de IL-1), que é fosforilada e se liga à uma proteína adaptativa denominada TRAF6 (fator de necrose tumoral associado ao fator 6). Esta associação induz a mobilização de cálcio, ativação da proteína tirosina quinase K (PTK) que leva à ativação de MAPquinases, onde direta ou indiretamente irá ativar IKK1 e IKK2 (I kappa B Kinase 1 e 2), levando à ativação de NF κ B (fator nuclear kappa B) e da proteína citoplasmática ligada a um inibidor (I κ B) (MUROI e TANAMOTO, 2002; COHEN, 2002; WARREN, 2005).

A ativação da via das proteínas quinases C (PCK) leva à fosforilação do inibidor (I κ B) e à dissociação do complexo, permitindo que o NF κ B migre para o núcleo e realize sua função. Figura 4 (BEUTLER, 2002 e 2003).

O NF κ B regula a expressão de genes envolvidos nas respostas inflamatória e imunológica, aumentando a taxa de transcrição destes genes com conseqüente síntese de RNAm e proteínas, e tem papel importante na síntese dos mediadores pró-inflamatórios, além de regular a síntese de proteína C reativa (PCR) e iniciar a transcrição de citocinas com TNF α , IL1 β , IL2 e IL6 (GOSH e BALTIMORE, 1990).

Os macrófagos são importantes células na remoção de partículas transportadas pelo sangue, incluindo LPS, da circulação porta e da circulação sistêmica. Essas células mononucleares são fundamentais na patogenia da endotoxemia, porque quando ativadas por endotoxina, liberam mediadores de peptídeo (citocinas), fator de necrose tumoral (TNF), interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6), eicosanóides e fator ativador de plaquetas. Através da liberação inicial desses mediadores peptídicos e lipídicos, os monócitos ativam os leucócitos,

células endoteliais e plaquetas no hospedeiro, iniciando assim a resposta inflamatória. Os neutrófilos ativados contribuem através da liberação de enzimas proteolíticas e radicais livres de oxigênio reativos. Ainda, a endotoxina e o TNF estimulam a migração de neutrófilos e a aderência endotelial, que resulta na liberação de tromboplastina e na exposição de colágeno subendotelial, que ativam as cascatas intrínsecas e extrínsecas da coagulação (BENBAREK *et al.*, 1997; TIZARD, 1998; COHEN, 2002; BEUTLER e RIETSCHER, 2003; PETROIANU *et al.*, 2004; PACHECO, 2007).

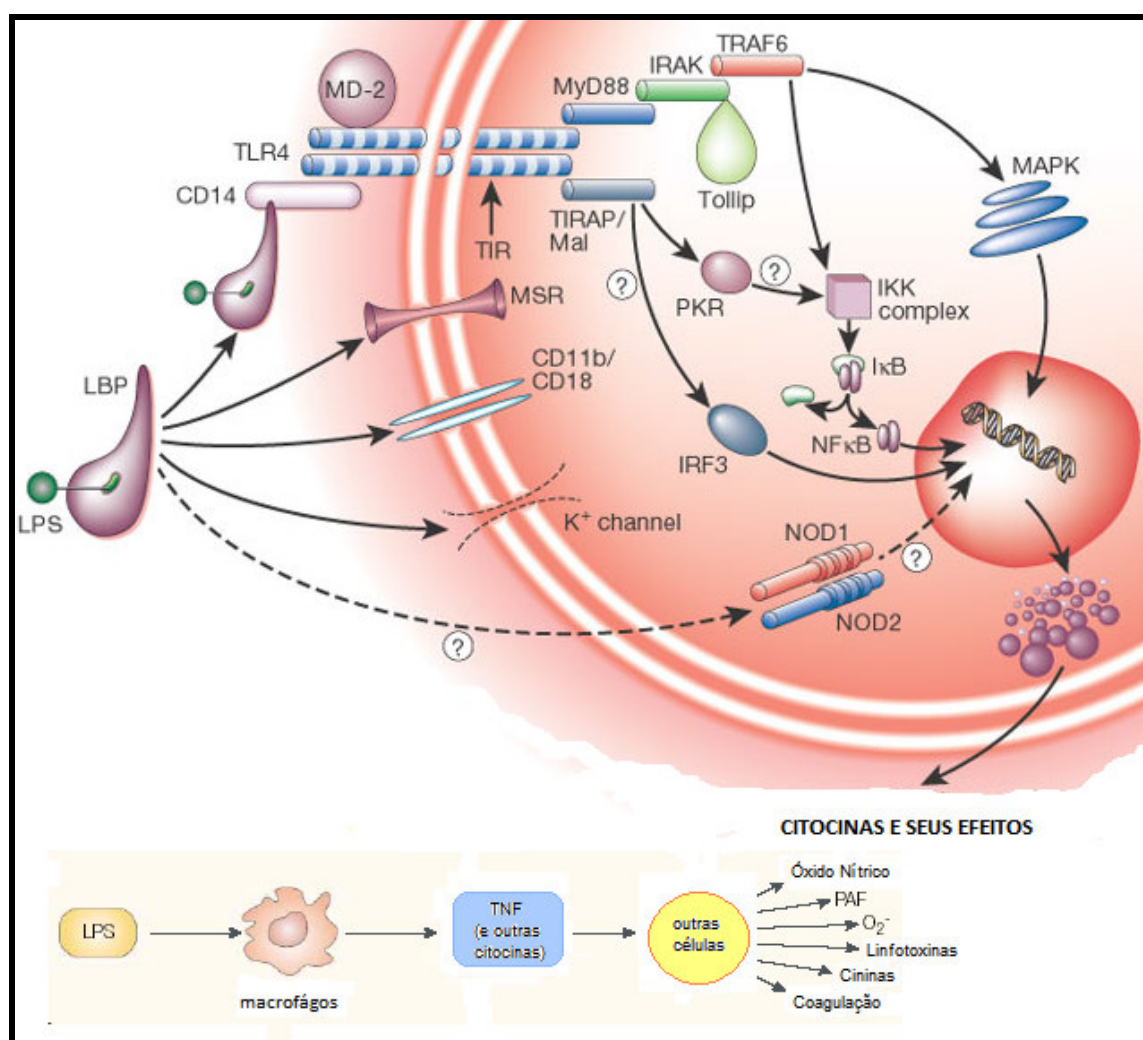


FIGURA 4. ESQUEMA DO EVENTO CELULAR APÓS A SINALIZAÇÃO DO LPS
ADAPTADO DE COHEN, 2002; BEUTLER E RIETSCHER, 2003.

2.2.5 Citocinas

As citocinas são proteínas reguladoras secretadas por macrófagos e exercem papel-chave na regulação da imunidade; são subdivididas em interleucina-1, interleucina-2, interleucina-6, interleucina-12 e fator de necrose tumoral (TIZARD, 1998). Os subtipos mais envolvidos na reação à endotoxina são o FNT, IL-1, IL-6 (SIMONS, 1996; PACHECO, 2007).

A interleucina-1 pode ser secretada por diferentes células, porém sua principal origem é do macrófago ativado. Essa ativação é feita pelo antígeno durante o processamento antigênico estimulando linfócitos T e a síntese de linfócitos B. A IL-1 participa na indução da febre, na resposta da fase aguda, na ativação da fosfolipase no catabolismo muscular, em alterações hematológicas, na ativação linfocitária e nos desarranjos celulares. Existe em duas diferentes moléculas, IL-1 alfa e IL-1 beta. A forma predominante no plasma é IL-1 beta.

A IL-1 divide muitas atividades biológicas com o TNF incluindo a indução da toxicidade sistêmica quando administrada em animais experimentais. Além disso, TNF e IL-1 freqüentemente irão exibir forte sinergismo com a injúria orgânica. Após a injeção de endotoxina, a produção de IL-1 ocorre lentamente, sendo seguida pelo TNF. Em camundongos injetados com endotoxina, o pico de bioatividade da IL-1 é evidenciado até 6h. Os camundongos que receberam 1mg de endotoxina tinham níveis de IL-1 dosados pelo método ELISA (enzime-liked immunoabsorbant assay) de 246 pg/ml em 2h. Geralmente, níveis altos de IL-1 no plasma indicam pior prognóstico da doença (HESSE *et al.*, 1988, DAMAS *et al.*, 1989; DEITCH 2005).

A IL-6 é também produzida por macrófagos ativados, pelos fibroblastos, pelas células endoteliais, pelos queratinócitos e linfócitos, e desempenha funções semelhantes a da IL-1. IL-6 é responsável pela febre e mudanças metabólicas na fase aguda da sepse (TANG, 1996). Recentemente, foi relatada a participação da IL-6 na cicatrização das anastomoses intestinais, sob condições sépticas em camundongos (ISHIMURA *et al.*, 2002). A IL-6 é também considerada um mediador fundamental em diversas etapas da inflamação (GALLUCCI *et al.*, 2000). Dentre os vários efeitos pró-inflamatórios que lhe são atribuídos, os intimamente relacionados ao processo de reparo são, na etapa mais tardia, a indução mitótica de

queratinócitos e, na fase mais precoce, os seus efeitos quimioatrativos sobre neutrófilos (SATO *et al.*, 1999).

A citocina que exerce maior efeito na sepse por bactérias Gram-negativas é o fator de necrose tumoral (TNF). Dentre as respostas à injeção de LPS em baixas concentrações, a liberação de TNF- α tem papel importante na resposta endotoxêmica, sendo detectado em quantidade significativa no soro de humanos e animais endotoxêmicos (WARD *et al.*, 1987).

O TNF- α foi descrito nos estudos pioneiros por Carswell (1975) como o fator presente no soro dos animais que receberam infusão de LPS, induzindo necrose de tumores. Várias evidências apontam para o TNF- α como um mediador importante na sepse, entre elas: a) é a primeira citocina que aparece na circulação, na sepse experimental e em humanos; b) a administração de TNF i.v., em animais, induz uma síndrome com as características da sepse, c) o tratamento com anticorpo anti-TNF protege contra os efeitos letais da endotoxina, em vários modelos animais (BENJAMIN, 2001). A maior parte das informações de que o TNF é responsável pela injúria de órgãos e morte na sepse vem dos estudos de Waage *et al.* (1987), detalhando que pacientes com sepse têm altos níveis de TNF. Injeções de TNF recombinante purificado induz a mudanças patológicas, incluindo alterações no sangue periférico e injúria de órgãos (REMICK e WARD, 2004). Estudo realizado por Murphey e colaboradores em 2001 mostrou que a administração de baixas doses de TNF pode induzir tolerância cruzada à endotoxina pela liberação de mecanismos antiinflamatórios.

O TNF- α é produzido por diferentes células da linhagem monocítica/macrofágica, em resposta a determinados estímulos tóxico-infecciosos, induzindo a ativação e a estimulação celular, modulando mediadores inflamatórios, enzimas, proteínas da fase aguda, e ainda outras citocinas como interleucinas (IL-1, IL-6 e IL-8). Uma vez liberado nos tecidos ou na circulação, o TNF- α age sobre os neutrófilos aumentando a atividade fagocítica, a citotoxicidade e a produção do ânion superóxido e de H₂O₂, além de estimular a degranulação e a aderência dessas células ao endotélio (BEYAERT e FIERS, 1998). O TNF, ainda, ativa a fosfolipase A₂ e desencadeia a produção de fator ativador de plaquetas (PAF), aumenta a síntese de catecolaminas, induz a febre e a expressão de antígenos de superfície das células endoteliais (BARTON *et al.*, 1996). Também ativa o complemento plasmático

resultando no estímulo ao sistema de coagulação sanguínea e geração de bradicinina plasmática, liberação de prostaglandina e aumento de substâncias vasoativas pelo endotélio, como as catecolaminas, leucotrienos e histamina (PACHECO, 2007).

Injeções de endotoxina em animais experimentais e em humanos induzem níveis plasmáticos de TNF. Injeções de endotoxina em ratos causam um pico no nível de TNF em 2h, com redução à normalidade em 4h. Camundongos também demonstram cinética semelhante (HESSE *et al.*, 1988; REMICK *et al.*, 1989; SPINAS *et al.*, 1991; BAGBY *et al.*, 1991; REMICK e WARD., 2004).

2.2.6 Sepse na cicatrização de anastomoses colônicas

A infecção no peritônio traz efeitos adversos na cicatrização de anastomoses colônicas. Tem sido sugerido que a infecção resulta em distúrbio do metabolismo do colágeno, principalmente na fase precoce da cicatrização.

Em 1976a, Irvin estudou o metabolismo do colágeno nas anastomoses colônicas infectadas. Os ratos foram submetidos à anastomose colônica (grupo controle) e à administração de fezes de rato autoclavada na cavidade peritoneal após a anastomose (grupo infectado). No dia da cirurgia, a anastomose realizada era imediatamente removida para mensuração do metabolismo do colágeno. O cólon foi anastomosado novamente e a segunda anastomose foi removida no 3º ou 7º dia de pós-operatório. Dessa forma, cada rato serviu como seu próprio controle. Cada anastomose foi avaliada pela fração de colágeno solúvel e insolúvel e conteúdo de hidroxiprolina. A infecção resultou em mudanças significativas no metabolismo do colágeno durante a fase precoce da cicatrização do cólon. Há redução significativa da quantidade de colágeno solúvel nas anastomoses infectadas no 3º dia de pós-operatório comparada com anastomoses do grupo controle, e redução na quantidade de ácido solúvel de colágeno e colágeno insolúvel no 7º dia pós-operatório nas anastomoses infectadas.

Högström *et al.* (1985) realizaram estudo sobre a influência da septicemia intraperitoneal na cicatrização de anastomoses colônicas e na pele. Neste estudo, os ratos foram submetidos à anastomose colônica e *E.coli* era injetada na cavidade

abdominal antes (90min) ou no momento de fechamento da parede abdominal. O grupo controle recebeu solução salina ao invés de bactéria. Os animais foram sacrificados no terceiro e sétimo dia pós-operatório. Não houve diferença na força de ruptura nas anastomoses e na cicatrização da pele entre ratos sépticos e controle.

Naresse e colaboradores, em 1993, avaliaram o efeito da peritonite fecal na cicatrização do cólon distal em ratos mediante força de ruptura, dosagem da concentração de hidroxiprolina e proteína tecidual. Os animais foram submetidos à injeção intraperitoneal de soro fisiológico (controle) ou à injeção intraperitoneal de uma suspensão de fezes humanas (peritonite). Após 6 horas da injeção intraperitoneal, os animais foram divididos em 6 momentos experimentais, sendo um lote sacrificado imediatamente após o sorteio (M0). Os ratos restantes, após limpeza da cavidade peritoneal, foram submetidos à anastomose colônica, sendo estes animais sacrificados após 4 (M1), 7 (M2), 10 (M3), 14 (M4) e 21 (M5) dias de pós-operatório. Os autores constataram em M0 diminuição da força de ruptura nos animais do grupo peritonite. No pós-operatório verificaram a ocorrência de deiscência da anastomose cólica em 8% dos animais, todos pertencentes ao grupo peritonite. O encontro de intenso processo inflamatório nos animais do grupo peritonite em M1 e M5 levou os autores a concluir que a etiologia das deiscências intestinais decorreu do prolongamento da fase latente do processo de cicatrização induzido pela infecção peritoneal.

Ahrendt *et al.* (1994) investigaram a cicatrização da anastomose de cólon em modelo experimental de sepse. No dia 0 os ratos foram submetidos à laparotomia ou ligadura com perfuração cecal. No dia seguinte, os ratos foram submetidos à ressecção de cólon esquerdo e anastomose com pontos separados. Após cinco dias, a anastomose foi avaliada. A sepse resultou em diminuição da pressão de explosão e diminuição da concentração de hidroxiprolina em todos segmentos analisados.

Ishimura *et al.* (1998) avaliaram a integridade da cicatrização da parede intestinal após anastomose sob condições sépticas e observaram a expressão local da IL-6 em volta do segmento anastomótico. Animais experimentais foram separados em LPS e grupo controle. Os animais recebiam injeção de LPS ou solução salina na cavidade peritoneal 24 horas antes da transecção e anastomose do cólon. A pressão de explosão da anastomose e a concentração de hidroxiprolina celular foram medidas como indicadores de cicatrização. Imunoistoquímica de IL-6

foi obtida das amostras do segmento anastomótico, pulmão, fígado e rim. As medidas de pressão de explosão e de hidroxiprolina foram significativamente menores no grupo LPS que no grupo controle 7 dias após a cirurgia. Os autores sugerem que a cicatrização em anastomoses está diminuída depois de cirurgias do trato digestivo sob condições sépticas e que a expressão local de IL-6 participa da cicatrização da parede.

Orlando *et al.* (1999) estudaram o efeito da contaminação fecal (peritonite) em anastomoses intestinais em ratos. Vinte ratos foram divididos em dois grupos: grupo controle e grupo com ligadura e perfuração cecal. Foram submetidos à relaparotomia doze horas após para ressecção parcial do ceco, seguida de anastomose colônica e ileal. No grupo controle foi realizado o mesmo procedimento, com exceção da ressecção de ceco. Os animais foram sacrificados após 4 dias. Não houve diferença significativa na força de tensão máxima da anastomose ou na concentração de hidroxiprolina nos dois grupos, tanto no intestino delgado quanto grosso. Isto sugere que pouco tempo de contaminação peritonial (12 horas) não influencia negativamente a anastomose intestinal primária.

2.3 DESNUTRIÇÃO

A desnutrição protéica-calórica é definida pela Organização Mundial da Saúde como condição(ões) patológica(s) que provém da menor ingestão, em várias proporções, de proteínas e calorias (WHO, 1973). Baseado em três estudos transversais realizados nas décadas de 70, 80 e 90, Batista Filho e Rissin (2003) fizeram uma análise da transição nutricional do Brasil. Nos últimos 25 anos, a desnutrição em crianças (relação altura/idade) apresentou um declínio cumulativo de 72%, enquanto em adultos sua prevalência baixou em 49% no meio rural e 52,7% no meio urbano, praticamente desaparecendo como problema epidemiológico em maiores de 18 anos.

A desnutrição hospitalar também é uma realidade mundial. A prevalência relatada está na taxa de 30 a 50%. Em 1998, Correia e colaboradores iniciaram pesquisa apoiada pela Sociedade Brasileira de Nutrição Parenteral e Enteral (SBNPE) sobre o estado nutricional dos doentes internados em hospitais de todo o Brasil, que ficou conhecido como IBRANUTRI (Inquérito Brasileiro de Avaliação Nutricional Hospitalar). Neste estudo, a desnutrição atingiu metade dos pacientes. Destes, mais de 70% desenvolveram complicações e, por causa delas, os custos de seu tratamento aumentaram, em média, 60,5%. A associação entre a presença de desnutrição e o maior índice de complicações, morbidade, mortalidade, custo e tempo de internação hospitalar foi confirmada. Apesar desta alta prevalência de desnutrição hospitalar, a terapia nutricional, parenteral, enteral ou oral foi utilizada em menos de 5% dos pacientes (CORREA e WAITZBERG, 2003; WAITZBERG, 1999). Waitzberg *et al.*, em 2001, atualizou os dados deste mesmo estudo envolvendo 4000 pacientes internados e mostrou que 48,1% deles estavam desnutridos, sendo que 12,6% apresentavam desnutrição grave e 35,5% desnutrição moderada.

A Federação Latino Americana de Nutrição Parenteral e Enteral (FELANPE) organizou um estudo multicêntrico para caracterizar o estado nutricional de pacientes hospitalizados em toda a América Latina. A desnutrição estava presente em 50,2% dos pacientes estudados e a desnutrição grave em 11,2% do grupo. A

desnutrição estava correlacionada com idade (>60 anos), presença de câncer ou infecção e longa permanência hospitalar (CORREA e CAMPOS, 2003).

Nos Estados Unidos, o *2002 Nutritional Screening Initiative*, realizou estudo multicêntrico organizado pela *American Dietetic Association* e pela *American Academy of Family Physicians*. Esta pesquisa revelou que 40 a 60% dos pacientes idosos hospitalizados estavam desnutridos ou com risco de desnutrição. Vinte e sessenta por cento dos pacientes em assistência domiciliar eram desnutridos. (*American Dietetic Association; American Academy of Family Physicians*, 2002; LANGEMO *et al.*, 2006).

A desnutrição pode ter origem na deficiência ou na ausência de qualquer nutriente, e sua instalação e gravidade dependem da causa, intensidade e duração da carência. Pode ser causada, principalmente, por dieta inadequada ou, secundariamente, por deficiência na absorção, por aumento da utilização ou ainda, excreção excessiva de nutrientes. Assim, várias formas de desnutrição podem ocorrer simultaneamente e, desta maneira, podem ter quadros carenciais devido a dietas quantitativa ou qualitativamente alteradas (STINNETT, 1983; FOCK, 2005). As formas clínicas características com manifestações mais graves são o kwashiorkor, decorrente de carência protéica com ingestão normal de carboidratos, e o marasmo, que decorre da deficiência prolongada de proteínas e carboidratos. Os quadros intermediários surgem pela combinação de vários graus de privação protéica com diversos graus de deficiência calórica total (DE ANGELIS, 1986).

Há muito tempo se reconhece que a desnutrição grave afeta adversamente a cicatrização de feridas, tanto em estudos clínicos como experimentais. A desnutrição traz impacto negativo para os pacientes, aumenta a morbidade e mortalidade com maior permanência e custo hospitalar (IRVIN, 1978; EMERY e SANDERSON, 1995).

A perda de proteína devido à desnutrição protéico-calórica, a forma mais comum de desnutrição no mundo, leva à diminuição da força tênsil dos tecidos, diminuição da função das células T, diminuição da atividade fagocítica e diminuição do complemento e dos níveis de anticorpos, diminuindo a habilidade do organismo de se defender contra infecções. Este comprometimento imunológico cursa clinicamente com aumento das taxas de complicações (CASEY *et al.*, 1983; DICKHAUT *et al.*, 1984; KAY *et al.*, 1987; FELGINES *et al.*, 1999; ARNOLD e BARBUL, 2006).

2.3.1 Desnutrição na cicatrização de anastomoses colônicas

Os efeitos deletérios da desnutrição na cicatrização de ferida têm sido observados nos estudos clínicos e experimentais. Em ratos, a redução da ingesta calórica em 50% resulta na diminuição da síntese de colágeno, do depósito da matriz protéica e da formação do tecido de granulação (SPANHEIMER, 1985; YUE *et al.*, 1986; YOUNG, 1988; ARNOLD e BARBUL, 2006; GONÇALVES, 2006). Na desnutrição, ao que tudo indica, a falha na cicatrização pode ser decorrente do depósito inadequado de colágeno, com prováveis alterações das ligações intra e intermoleculares. Estas alterações podem predispor a maior ação das proteinases neutras e radicais livres, com prejuízo no ganho da resistência mecânica da anastomose (HÖGSTRÖM, 1987).

O reestabelecimento da integridade intestinal é essencial nos primeiros dias após a cirurgia gastrointestinal. O retorno da força do intestino depende da formação de colágeno na zona de cicatrização anastomótica. Fibroblastos e, em menor escala, células musculares lisas são responsáveis pela formação de novas fibrilas colágenas na cicatriz anastomótica e elas são, então, reorganizadas em fibras colágenas sólidas, necessárias para reestabelecer a força do intestino (CHRISTENSEN *et al.*, 1995).

A relação entre hipoproteinemia e cicatrização de anastomoses colônicas em ratos foi investigada por Daly *et al.*, em 1972. Durante aquele experimento, os autores constataram que a força de explosão e a albumina sérica circulante diminuíram linearmente enquanto a perda de peso nos ratos aumentava. Irvin e Hunt (1974) também estudaram a cicatrização de anastomose colônica em ratos desnutridos. Os autores observaram que a desnutrição afetou o processo de cicatrização colônica em animais que receberam dieta isenta de proteína por 7 semanas. Estes animais perderam 34% do peso corporal e apresentaram diminuição significativa da força tênsil e da quantidade de colágeno nas anastomoses colônicas quando comparados ao grupo controle.

Law e Ellis (1989) estudaram os efeitos de dieta hipoprotéica (0,8 g proteína/dia) sobre a cicatrização de anastomoses colônicas. Os ratos do grupo de

estudo receberam dieta hipoprotéica durante 2 semanas e o grupo controle recebeu dieta padrão durante o mesmo período. O grupo desnutrido apresentou perda de peso de 11,9%. A análise da cicatrização foi realizada por meio da avaliação da pressão de ruptura. Os ratos submetidos à dieta hipoprotéica apresentaram índices de pressão de ruptura estatisticamente inferiores em relação ao grupo controle, principalmente entre o 4º e o 7º dias de pós-operatório. Por outro lado, não houve diferença significativa na concentração de hidroxiprolina entre os dois grupos.

A avaliação da cicatrização de anastomoses colônicas em ratos com desnutrição protéico-calórica também foi investigada por Ferreira e colaboradores em 2006. Os ratos foram divididos em dois grupos: controle e desnutridos (ingestão diária de metade da ração do grupo controle por vinte dias). O grupo de ratos desnutridos apresentou dados macroscópicos de pior prognóstico e mortalidade superior ao grupo controle. Este estudo concluiu que a desnutrição afeta negativamente a cicatrização das anastomoses e aumenta significativamente a mortalidade. Estes resultados também foram evidenciados em pesquisa realizada por Leite *et al.*(1993). Neste experimento, foram utilizados 185 ratos distribuídos por sorteio em 2 grupos experimentais: Grupo I = dieta-controle e cirurgia; Grupo II = dieta hipoprotéica e cirurgia. Os animais do grupo I receberam dieta contendo 20% de proteína e os do grupo II, 2% de proteína. Após um período de 21 dias, um lote de animais de cada grupo foi sacrificado para avaliação dos parâmetros mencionados anteriormente, sendo este momento caracterizado como MO. Os demais animais foram submetidos à cirurgia caracterizada por secção do cólon distal e anastomose. Tanto os animais do grupo I como os do grupo II receberam as respectivas dietas por período de 21 dias, dividido em 4 momentos: M1 (4º dia); M2 (7º dia); M3 (14º dia) e M4 (21º dia), nos quais os animais foram sucessivamente sacrificados. Verificou-se diminuição da força de ruptura das anastomoses intestinais em ambos os grupos (GI e GII), sendo que, nos animais com carência protéica, a força de ruptura foi 33% menor em M1, 39% em M2, 34% em M3 e 32% em M4 em relação aos respectivos controles. Nos animais com carência protéica, os valores da concentração do colágeno, na cicatriz, foram menores que no controle em M1 e M2, e maiores em M3 e M4. Com base neste estudo experimental, evidenciou-se que a desnutrição protéica apresentou efeito deletério na cicatrização do cólon distal no rato, com diminuição da força de ruptura e da concentração do colágeno.

2.3.2 Nutrição perioperatória na cicatrização de anastomoses colônicas

Ao mesmo tempo em que a desnutrição ganhou importância nos resultados adversos de cirurgias com anastomoses de cólon, surgiam alternativas para tentar compensar os efeitos deletérios dos déficits nutricionais. Muitos estudos começaram a pesquisar os efeitos de intervenções nutricionais como forma de otimizar a cicatrização intestinal e diminuir a morbimortalidade associada (SCHMITZ, 2006).

Doenças pré-operatórias breves ou diminuição da ingestão nutricional no período pré-operatório têm demonstrado impacto significativo na síntese de colágeno. Estes fatos sustentam o conceito de que a ingestão alimentar pré-operatória pode ser mais importante para a cicatrização do que o estado nutricional geral do paciente (WINDSOR; KNIGHT e HILL, 1988). O suporte pré-operatório nutricional é geralmente recomendado para pacientes com moderada (perda de 10 a 20% do peso e albumina sérica $<3.2\text{g/dl}$ a $>2.5\text{g/dl}$) a grave desnutrição ($>20\%$ de perda corporal e albumina sérica $<2.5\text{g/dl}$) e que toleram esperar pelo menos 7 dias para cirurgia eletiva. Se a função intestinal está mantida, o suporte nutricional enteral é geralmente preferido, devido à manutenção da barreira da mucosa intestinal (KALFARENTZOS *et al.*, 1997; DERVENIS *et al.*, 2003; HOWARD e ASCHELEY, 2003).

Há diversos estudos experimentais na literatura que avaliam os efeitos da nutrição pré-operatória na cicatrização, com resultados conflitantes. Irvin, em 1976b, estudou os efeitos da administração subcutânea do aminoácido essencial metionina na cicatrização de anastomoses colônicas de ratos desnutridos. Em seu estudo, os ratos desnutridos receberam dieta isenta de proteínas por 7 semanas antes do procedimento cirúrgico; os ratos do grupo controle receberam dieta normal. A restrição protéica por 7 semanas resultou em redução de 34% no peso corporal e redução significativa da força tênsil e da quantidade de colágeno nas anastomoses. A suplementação de metionina, entretanto, não demonstrou efeitos sobre os parâmetros de cicatrização avaliados.

Em 1978, este mesmo autor estudou os efeitos da desnutrição e da hiperalimentação na cicatrização de anastomoses colônicas e na incisão cutânea em ratos. Grupos de 10 ratos foram submetidos à dieta isenta de proteínas por períodos

de 1, 3, 5, 7 ou 8 semanas. No estudo sobre a hiperalimentação, os ratos foram divididos em 3 grupos: 1) Grupo teste – recebeu hiperalimentação oral Aminutrin® (fórmula sintética em pó de aminoácidos levogirógenos) durante a sétima semana de restrição de proteína e por 7 dias no pós-operatório; 2) Grupo controle desnutrido – recebeu dieta isenta de proteínas apenas; 3) Grupo controle normal – recebeu dieta regular durante 7 dias antes da cirurgia e por 7 dias no pós-operatório. Ratos que receberam dieta isenta em proteínas durante 7 semanas apresentaram média de redução do peso corporal de 37% e os ratos submetidos à restrição de proteína por 8 semanas, redução média de 44%. A presença de mudanças significativas na cicatrização apenas ocorreu nos ratos gravemente desnutridos, quando a perda de peso excedeu 1/3 do peso corporal normal. A desnutrição grave resultou em redução profunda da força mecânica das feridas abdominais, entretanto, as alterações na força tênsil das anastomoses colônicas foram muito menos evidentes. A terapia com aminoácido resultou em aumento significativo da força tênsil e da quantidade de colágeno das feridas abdominais, entretanto, não demonstrou efeitos na cicatrização colônica.

A realimentação rapidamente restaura a morfologia e a função do intestino (repara a atrofia do intestino e normaliza a permeabilidade intestinal) em ratos. A extensão das mudanças depende da quantidade de dieta consumida e, em particular, da quantidade e qualidade do nitrogênio na dieta (POULLMAIN *et al.*, 1989 e 1991). A redução da proteína da dieta pode limitar a disponibilidade de peptídeos para síntese de proteínas musculares. Estudos conduzidos em cobaias evidenciam que rações baseadas em aminoácidos resultaram em atrofia intestinal e diminuem a permeabilidade do intestino, além de reduzir a retenção de nitrogênio e o crescimento dos animais (POULLAIN *et al.*, 1989; BIRKE *et al.*, 1990).

Ward *et al.* (1982) investigaram o efeito da reintrodução precoce de dieta via oral na anastomose colônica em ratos com desnutrição protéica moderada. Três grupos foram comparados: 1) ratos alimentados com dieta normal antes (7 dias) e após (7 dias) da cirurgia, 2) ratos alimentados com dieta hipoprotéica (apenas 10-15 mg de proteínas/dia) antes da cirurgia e dieta normal após a cirurgia, e 3) ratos alimentados com dieta hipoprotéica antes e depois da cirurgia. O grupo de ratos com dieta hipoprotéica apresentou perda de peso de 12,4%. O estado nutricional foi avaliado pela perda de peso, balanço nitrogenado e dosagem de albumina sérica. Ratos que recebiam dieta depletada de proteína foram comparados com ratos que

receberam dieta restaurada após a cirurgia. Em comparação com ratos controle, os ratos com depleção de proteínas tiveram um valor de pressão de explosão menor, assim como a concentração sérica de albumina. Ratos que receberam ração restaurada tiveram menores dosagens de nitrogênio e pressão de explosão colônica normal. Este estudo demonstrou que a realimentação precoce após a cirurgia pode reverter os efeitos da desnutrição nas anastomoses colônicas.

A determinação dos efeitos da inanição e da realimentação no crescimento, a recuperação nutricional e o reparo intestinal foram avaliados em ratos desnutridos por Boza *et al.* (1999). Os ratos foram divididos em três grupos: 1. desnutridos por 3 dias (desnutridos), que receberam somente água; 2. desnutridos por 3 dias e após receberam dieta baseada em soja por mais 3 dias (realimentados); 3. ratos controle, que recebiam dieta de soja. As variáveis avaliadas foram o ganho de peso, a retenção de nitrogênio entre a desnutrição e a realimentação, a concentração de glutamina muscular, conteúdo de proteína celular, os níveis de glutathione no fígado e na mucosa intestinal e a apoptose intestinal. A inanição esteve associada com baixo nível de glutamina muscular e enfraquecimento da mucosa intestinal, incluindo um baixo conteúdo de proteína na mucosa e um alto nível de glutathione. A realimentação por três dias resultou em rápido reparo da atrofia do intestino e na normalização não só da permeabilidade intestinal, mas também da maioria dos marcadores metabólicos em outros tecidos.

Gonçalves *et al.*, em 2005, pesquisaram os efeitos da nutrição pré-operatória na cicatrização de anastomoses colônicas experimentais em ratos desnutridos. Os ratos foram divididos em 4 grupos: 1. Grupo controle (C1), alimentados com ração padrão *ad libitum* durante 21 dias; 2. Grupo desnutrido (D), alimentados com 50% da média de ingestão alimentar do grupo controle durante 21 dias; 3. Grupo nutrição pré-operatória (PRÉ), alimentados com 50% da dieta do grupo controle durante 21 dias e nutrição pré-operatória com ração padrão *ad libitum* durante 7 dias; 4. Grupo Controle 2 (C2), alimentados com ração padrão *ad libitum* durante 28 dias. Nos dias 22 e 29 do experimento os ratos foram submetidos à anastomose colônica. Os ratos foram sacrificados no 5º dia de pós-operatório e as anastomoses foram avaliadas. A Força máxima de tração (FMT) e a força ruptura total (FRT) foram inferiores no grupo desnutrido (D) em relação ao grupo controle (C). A porcentagem de colágeno tipo I (maduro) no grupo desnutrido foi menor em relação ao grupo controle. O grupo nutrição pré-operatória (PRÉ) mostrou aumento da FMT em relação ao grupo D. O

grupo PRÉ apresentou valores de FMT semelhantes aos do grupo C. Com relação à FRT, os índices do grupo PRÉ e C também foram semelhantes. Entretanto, o grupo PRÉ apresentou média de colágeno I (maduro) inferior à do grupo C. Os autores concluíram que a desnutrição causa diminuição da FMT e da percentagem de deposição de colágeno maduro no 5º dia de pós-operatório em anastomoses colônicas. A nutrição pré-operatória durante 7 dias aumentou a FMT e FRT, assim como a porcentagem de deposição de colágeno, alcançando valores semelhantes aos do grupo controle.

Da Costa *et al.* (2003) avaliaram o efeito da suplementação oral de glutamina na cicatrização de anastomoses colônicas em ratos. Os ratos receberam glicina ou glutamina durante sete dias. Após, foram submetidos à laparotomia com transecção e anastomose colônica. No pós-operatório receberam novamente glutamina ou glicina até o dia do sacrifício (dia 3 e 8). A suplementação oral de glutamina aumentou a força de ruptura total e a porcentagem de depósito de colágeno maduro em anastomoses colônicas no 3º e 8º dia de pós-operatório.

Schmitz, em 2006, estudou os efeitos da nutrição perioperatória suplementada com glutamina na cicatrização de anastomoses colônicas de ratos desnutridos. Os animais foram divididos em três grupos: grupo controle (CTL), que tinha livre acesso à água e ração por 21 dias; grupos Glutamina (GLN, n=16) e Glicina (GLY, n=16), alimentados com 50% da média de ingesta do grupo CTL por 21 dias (*pair feeding*) e, então, foram renutridos, respectivamente, com ração e água *ad libitum* mais L-Glutamina (1,5g/Kg/dia) ou solução isonitrogenada e isovolumétrica de Glicina através de gavagem durante seis dias antes e quatro dias após a operação. No sexto dia de suplementação, os ratos foram submetidos à anastomose colônica. Os ratos foram sacrificados no quinto dia pós-operatório e as anastomoses colônicas foram analisadas. Os resultados mostraram que não houve diferença estatística significativa entre os dois grupos na força tênsil. Na densitometria do colágeno, o índice de maturação do colágeno (IMaC) não demonstrou diferença estatisticamente significativa. Os autores concluíram que a suplementação perioperatória oral de Glutamina não tem efeito na cicatrização de anastomoses colônicas de ratos desnutridos.

Cihan e colaboradores, em 2004, estudam os efeitos de diferentes nutrientes enterais (ração normal, nutrição balanceada completa, nutrição elementar enriquecida com glutamina, dieta imunomoduladora e dieta rica em fibras) na

cicatrização de anastomoses colônicas em ratos. Os ratos foram divididos em grupos e, após serem submetidos à anastomose em cólon transverso, receberam, precocemente, a dieta correspondente ao seu grupo por um período de 7 dias. Os autores não encontraram diferença estatística nos valores de pressão de explosão. Os níveis de hidroxiprolina nos grupos que receberam dieta com fibras e dieta imunomoduladora foram estatisticamente maiores que o grupo controle. Nas condições normais, sem estresse, os autores não demonstraram efeitos superiores na alimentação precoce com preparações de dieta enteral comparado à dieta normal nas anastomoses colônicas quando se analisou pressão de explosão.

Em estudos subseqüentes, Law e Ellis (1990) avaliaram os efeitos da nutrição parenteral pós-operatória na cicatrização de feridas abdominais e anastomoses colônicas em ratos desnutridos. A desnutrição foi promovida pelo uso de dieta hipoprotéica (0,8 g/ dia) por duas semanas antes do procedimento cirúrgico e 5 dias após a cirurgia. A pressão de ruptura foi avaliada no 5º dia de pós-operatório. Foi demonstrado que ratos alimentados com dietas hipoprotéicas apresentaram aumento significativo da pressão de ruptura nas feridas abdominais e nas anastomoses colônicas após administração de alimentação parenteral pós-operatória. Kiyama *et al.* (1999) relatou a superioridade da nutrição enteral em relação à nutrição parenteral na cicatrização de anastomoses colônicas em ratos. A pressão de explosão e a medida de proteína total e de colágeno insolúvel foram significativamente maiores no grupo que recebeu nutrição enteral.

2.3.3 Cicatrização de anastomoses colônicas na sepse e desnutrição

Fistulas anastomóticas gastrointestinais estão geralmente associadas ao aumento da morbidade, da mortalidade e da estadia hospitalar. Fístulas após cirurgia colorretal ocorrem em torno de 5-15%. A mortalidade perioperatória está aumentada devido à presença de fezes na cavidade peritoneal, levando à peritonite e septicemia (KORUDA e ROLANDELLI, 1990; BRUCE *et al.*, 2001; BUCHMILLER-CRAIR, 2001; SOETERS *et al.*, 2002).

Desnutrição e infecção são as duas maiores causas de morbidade e mortalidade atualmente. Estes dois problemas estão inter-relacionados. A

desnutrição compromete a função de barreira, facilitando o acesso a patógenos. O comprometimento da função imune diminui a habilidade do hospedeiro para eliminar os patógenos, ao entrarem no organismo. Então, desnutrição predispõe à infecção. A infecção pode alterar o estado nutricional, mediado pelas mudanças na ingestão da dieta, absorção e necessidade de nutrientes e perdas de nutrientes endógenos. Então, a presença de infecção pode contribuir com o estado de desnutrição, formando um círculo vicioso. FIGURA 5 (CALDER e JACKSON, 2000).

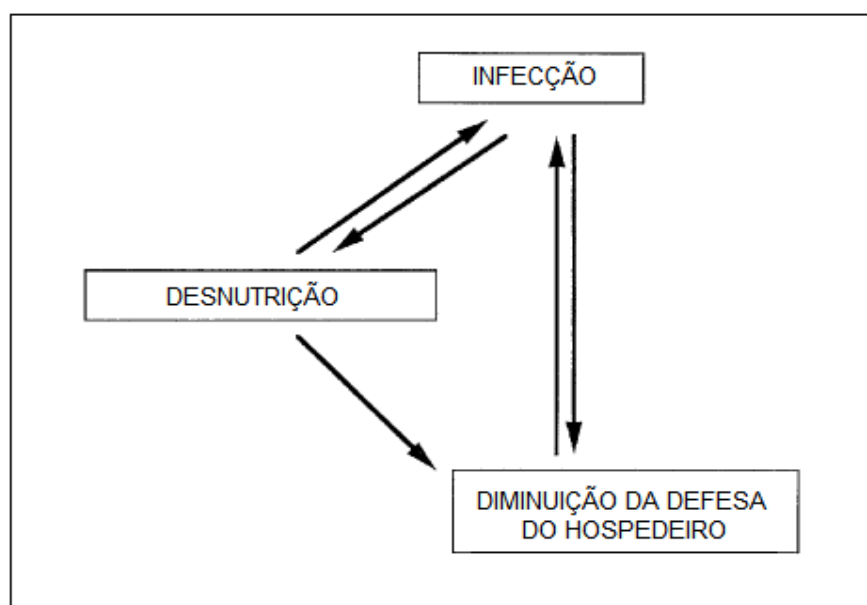


FIGURA 5. NUTRIÇÃO E INFECÇÃO
ADAPTADO DE CALDER E JACKSON, 2002

Um grande número de estudos em animais tem demonstrado os efeitos adversos da deficiência de proteína na imunidade. A deficiência de proteína diminui a resposta imune e aumenta a suscetibilidade a infecções. As defesas imunológicas são dependentes da replicação celular e da produção de proteínas com atividades biológicas (imunoglobulinas, citocinas). Praticamente todas as formas de imunidade podem ser afetadas pela desnutrição protéica-calórica, mas as defesas não-específicas e a imunidade celular são mais severamente afetadas que a resposta humoral (KUVIBIDILA *et al.*,1993).

Os pacientes sépticos exibem sinais profundos e acelerados de deficiência nutricional. Hiperglicemia, hiperlipidemia e intolerância a nutrientes têm sido observadas (RAINA *et al.*, 1999). Durante a desnutrição protéico-calórica, uma resposta atenuada na fase aguda e uma redução na produção de proteínas e citocinas têm sido propostas como mecanismo para diminuição da função imune, contribuindo para o aumento da mortalidade e morbidade devido à infecção (AMATI *et al.*, 2003; BROWN, 2003; LING, 2004; COOPER *et al.*, 2004).

A desnutrição crônica e a deficiência de micronutrientes comprometem a resposta das citocinas e afetam o mecanismo de células imunológicas. A combinação de desnutrição crônica e infecção enfraquece a resposta imune, levando a uma população de células imunes alteradas e a um aumento generalizado de mediadores inflamatórios (DULGER *et al.*, 2002). O sistema imunológico celular é mais diretamente afetado na desnutrição protéico-calórica do que o sistema imunológico humoral (CUNNINGHAM-RUNDLES, 2005).

A terapia nutricional na sepse atua de modo adjunto, prevenindo a desnutrição, contribuindo para a manutenção da síntese protéica aumentada e na modulação da resposta inflamatória sistêmica (WAITZBERG, 2004). A orientação atual da terapia nutricional na sepse está norteada por em duas diretrizes fundamentais: 1) fornecer um aporte protéico-calórico que não incremente o estado hipermetabólico vigente e que seja sinérgico com as vias metabólicas benéficas; e 2) nutrir o tubo digestivo, que é intensamente agredido nessa fase, e que passa a ser um foco de liberação de toxinas, subprodutos de bactérias e microorganismos para a circulação sistêmica, seguindo-se a perda funcional e estrutural de sua barreira mucosa. (WAITZBERG, 2004).

Leite e colaboradores (1995) estudaram a evolução da cicatrização de anastomoses intestinais em ratos submetidos à infecção peritoneal ou à desnutrição protéica. O grupo controle recebeu dieta com 20% de proteínas por 21 dias, sendo então submetido à anastomose do cólon distal. O outro grupo, além de receber a mesma dieta, foi submetido à peritonite com fezes humanas. Após 6 horas de evolução da peritonite, os animais foram submetidos à laparotomia, limpeza da cavidade abdominal e anastomose do cólon distal. A dieta a 20% de proteínas foi mantida no pós-operatório dos dois grupos anteriores. O 3º grupo (desnutrido) recebeu no mesmo período (pré e pós-operatório) dieta constituída de caseína e submetido ao mesmo procedimento cirúrgico. Amostras do cólon foram colhidas

antes do procedimento e no 4º, 7º, 14º e 21º dias de pós-operatório, para estudo da força de ruptura e da hidroxiprolina tecidual. Dos resultados obtidos, verificou-se incidência de 11,7% e 7% de deiscência, respectivamente, nos grupos peritonite e desnutrido, além de concomitância na diminuição da força de ruptura e da hidroxiprolina tecidual.

Kiyama *et al.* (2000) estudou a influência da nutrição pós-operatória precoce na cicatrização de anastomoses colônicas na presença de sepse intraabdominal em ratos. Os ratos foram submetidos à ligadura e perfuração cecal. Após 24 horas, o ceco foi ressecado e realizou-se anastomose no cólon esquerdo. Os animais foram randomizados em dois grupos: grupo com nutrição precoce, que recebeu água e ração, e grupo com nutrição tardia, que recebeu somente água nas primeiras 72 horas e ração após este período. Os animais foram sacrificados no 5º dia pós-operatório. O peso dos animais do grupo de nutrição precoce foi maior que o grupo que recebeu nutrição tardia. A nutrição precoce resultou em aumento na pressão de explosão e na concentração de colágeno total no sítio das anastomoses, comparado com o grupo de nutrição tardia. Os autores concluíram que a nutrição precoce tem efeito positivo na cicatrização de anastomoses na presença de sepse intra-abdominal.

Giovambattista e colaboradores (2000) estudaram a influência da restrição crônica de dieta na função basal neuroendócrina, imune e adiposa e a resposta durante a fase aguda ao choque endotóxico em ratas. O efeito da realimentação nos ratas desnutridas também foi avaliado. Níveis séricos de proteína total plasmática, glicose, triglicerídeos, ACTH (hormônio adrenocorticotrófico), corticosteróide, fator de necrose tumoral- α e leptina foram dosados em condição basal e duas horas depois da aplicação da endotoxina (LPS 180 μ g/Kg, ip), administrado em três grupos diferentes: (1) controles bem-nutridas; (2) desnutridas, como consequência da restrição crônica de dieta e (3) desnutridas realimentadas para recuperar o peso corporal nos valores do grupo controle bem-nutrido. As ratas desnutridas em comparação com grupo controle desenvolveram perda de peso, assim como hipoglicemia basal, hipotrigliceridemia, hipoleptinemia, hipercorticosteronemia e aumento do glicocorticóide adrenal; entretanto, não houve mudanças na proteína total basal, nos níveis plasmáticos de ACTH e TNF e na concentração de ACTH pituitário. Com a indução do choque endotóxico, o desenvolvimento da hipoglicemia foi abolido nas ratas desnutridas, e as concentrações plasmáticas de ACTH e TNF

após a endotoxemia foram significativamente maiores ($p < 0.05$) que os valores basais, e significativamente menores ($p < 0.05$) nas ratas desnutridas que nas bem-nutridas. Apesar da elevada concentração plasmática basal de corticosteroide nas ratas desnutridas versus ratas bem-nutridas, a liberação de glicocorticoide induzida pelo LPS foi similar nos dois grupos. O tratamento com LPS não modificou os níveis basais de leptina. O grupo desnutrido alimentado com dieta ad libitum, por 15 dias, restaurou seu peso corporal com níveis do grupo controle e a disfunção metabólica observada nas ratas desnutridas nas condições basais e pós LPS foi totalmente normalizada. Os resultados deste estudo claramente indicam que a desnutrição crônica não afeta somente a função reprodutiva, mas também as funções metabólicas, neuroendócrinas, imune e adiposa e, que os efeitos induzidos pela desnutrição podem ser totalmente revertidos após o retorno ao peso corpóreo normal.

3 MATERIAL E MÉTODO

As normas técnicas utilizadas neste trabalho seguiram as orientações contidas nas *Normas para Apresentação de Documentos Científicos* da Universidade Federal do Paraná de 2007 e a *Nomina Anatomica Veterinaria* de 1975.

O experimento foi realizado no Laboratório de Cirurgia Experimental da Pós-Graduação em Cirurgia da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Foram obedecidos os princípios éticos de experimentação animal preconizados pelo COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal).

3.1 MATERIAL

3.1.1 Animais

Foram utilizados 45 ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinos*, *Rodentia mammalia*), machos, adultos, com peso variando de 218,01g a 347,52g, oriundos do Biotério do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná. Os animais foram mantidos em gaiolas com capacidade para 5 animais, por um período de 7 dias de aclimatação. Os ratos receberam ração balanceada padrão denominada Nuvilab CR1® (Nuvital®, Colombo, PR) (Quadro 4) e água *ad libitum*. Após o período de aclimatação, os ratos foram acondicionados em gaiolas metabólicas individuais. O laboratório foi mantido com temperatura de $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ e ciclo claro-escuro de 12 horas, controlados eletronicamente (Cronomat®, Mallory do Brasil, São Paulo, SP).

COMPOSIÇÃO BÁSICA DO PRODUTO	
Carbonato de cálcio, farelo de milho, farelo de soja, farelo de trigo, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, premix mineral vitamínico, aminoácido.	
Umidade (max)	12,5%
Proteína bruta (min)	22%
Cálcio (max)	1,40%
Fósforo (min)	0,80%
Estrato etereo (minimo): 4%	
Material mineral (maximo): 10%	
Matéria fibrosa (maximo): 8%	
Vitaminas: A, D3, E, K3, B1, B2, B6, B12, niacina, ácido pantotênico, ácido fólico, biotina, colina.	
Microelementos: Ferro, zinco, cobre, iodo, manganês, selênio, cobalto.	

QUADRO 4. COMPOSIÇÃO DA RAÇÃO PARA RATOS

Nuvital CR1® (Nuvital Nutrientes, Colombo/PR.

3.2 MÉTODO

Após sete dias de aclimação, os ratos foram pesados e divididos aleatoriamente em três grupos de estudo.

3.2.1 Grupos de Estudo

O Grupo Controle (C) (N=15) recebeu dieta alimentar padrão (Nuvilab CR1, Nuvital®) e água *ad libitum*, durante vinte e um dias. Após, os ratos foram submetidos a uma aplicação diária de solução salina intraperitoneal (1ml) por um período de quatro dias. No vigésimo sexto dia, os ratos foram submetidos à procedimento cirúrgico. Este grupo recebeu durante todo o experimento dieta alimentar padrão (Nuvilab CR1, Nuvital®) *ad libitum* e foi considerado controle do modo *pair-feeding*.

O Grupo Desnutrido e Toxêmico (DT) (N=15) recebeu 50% da ingesta alimentar média diária do grupo controle (*pair-feeding*) e água *ad libitum*, durante 21 dias. Após este período, os ratos foram submetidos à endotoxemia com aplicações

diárias de Lipopolissacarídeo (LPS) intraperitoneal, na dose de 1mg/Kg, isovolumétrica, por um período de quatro dias. Este grupo permaneceu recebendo ração no modo pair-feeding durante o período de indução à toxemia, até o dia do sacrifício. No vigésimo sexto dia, os ratos foram submetidos a procedimento cirúrgico.

O Grupo Desnutrido Toxêmico e com Nutrição Perioperatória (DTN) (N=15) recebeu 50% da ingesta alimentar média diária do grupo controle (*pair-feeding*) e água *ad libitum*, durante 21 dias. Após este período os ratos foram submetidos a endotoxemia com aplicações diárias de Lipopolissacarídeo (LPS) intraperitoneal, na dose de 1mg/Kg, isovolumétrica, por um período de quatro dias. No primeiro dia de indução à endotoxemia, o grupo começou a receber dieta padrão *ad libitum*, por um período de 10 dias. No 11^o dia, os ratos foram submetidos a procedimento cirúrgico. No pós-operatório, continuaram recebendo ração e água *ad libitum* até o dia do sacrifício (5^o dia pós-operatório). Os ratos deste grupo receberam, então, nutrição perioperatória por um período de 14 dias (10 dias de pré-operatório e 4 dias de pós-operatório). O esquema do delineamento experimental está representado na Figura 6.

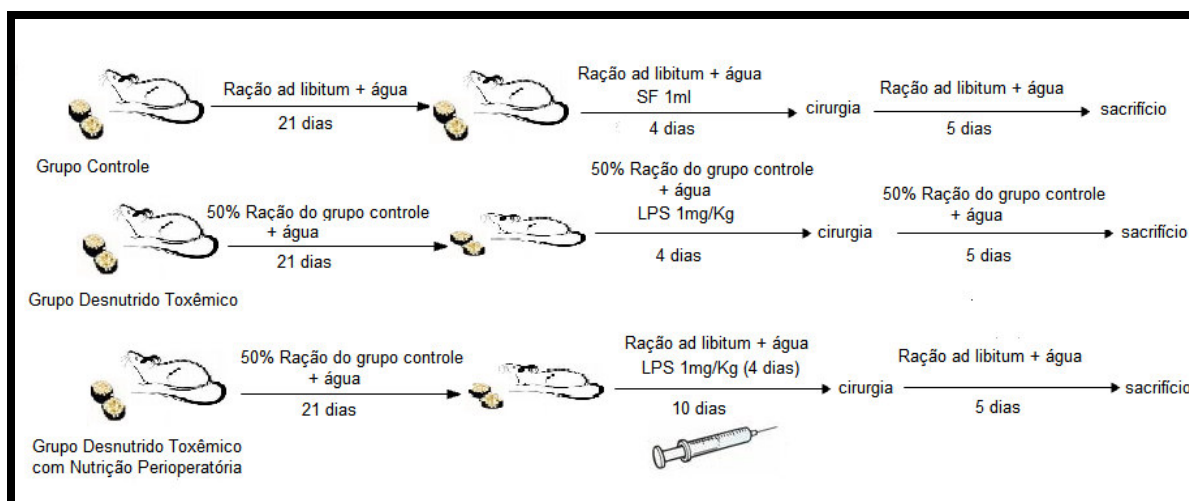


FIGURA 6. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

3.2.2 Indução da Endotoxemia

Os animais foram submetidos à endotoxemia após aplicações diárias de Lipopolisacarídeo de *Escherichia coli* 0111:B4, (Sigma Chemical®, St Louis, EUA) por período de quatro dias consecutivos. A dose utilizada foi de 1mg/Kg/dia por via intraperitoneal (Figura 7), em volume de 1ml. O LPS foi conservado em freezer a -4°C e diluído com água destilada conforme orientação do fabricante.



FIGURA 7. APLICAÇÃO DE LPS INTRAPERITONIAL

3.2.3 Procedimento cirúrgico

Pré-operatório: todos os ratos foram submetidos a jejum de 12 horas antes do procedimento cirúrgico.

Per-operatório:

Anestesia: para a indução anestésica foi utilizada a via inalatória com éter etílico comercial (Farmanil Quima®, Curitiba, PR) em sistema fechado de campânula, e para a manutenção da anestesia foi administrado cloridrato de xilazina 2% (Agener®, União, SP) na dose de 10mg/Kg associado à Ketamina 10% (Anasedan®, Vetbrads, SP) na dose de 50mg/Kg, intramuscular (OLIVEIRA, 2008). Após a anestesia, os animais foram pesados.

Ato Cirúrgico: realizou-se tricotomia da *regio abdominis media* (região abdominal média) e posterior fixação do rato à mesa cirúrgica com *membra* (membros) em extensão. Por meio de incisão abdominal mediana de cerca de 3 cm de extensão era obtido acesso ao *cavum abdominis* (cavidade abdominal) para a exposição do cólon. Procedeu-se, então, a duas secções completas do cólon, a primeira na *flexura coli dextra* (flexura menor do cólon) a aproximadamente 5 cm distais do *ostium ileale* (válvula íleo-cecal) e, a segunda, 6 cm distais à primeira no *colon descendens* (colon distal), atentando para a preservação dos *rami colici* (vasos cólicos). A reconstrução das duas secções foi realizada mediante anastomose término-terminal em plano único total com 8 pontos separados de fio monofilamentar de *nylon 6.0* (Mononylon®6,0, Ethicon, São José dos Campos, SP) (FIGURA 8). O fechamento da parede foi feito com sutura contínua ancorada de fio monofilamentar de *nylon 3.0* (Mononylon®3,0, Ethicon, São José dos Campos, SP) em 2 planos: músculo-aponeurótico e intradérmico.

Amostras de sangue, por punção cardíaca, foram coletadas imediatamente após o término do procedimento cirúrgico. A seguir, os animais foram hidratados com 100 ml/Kg de solução salina via subcutânea (KIYAMA *et al.*, 2000).

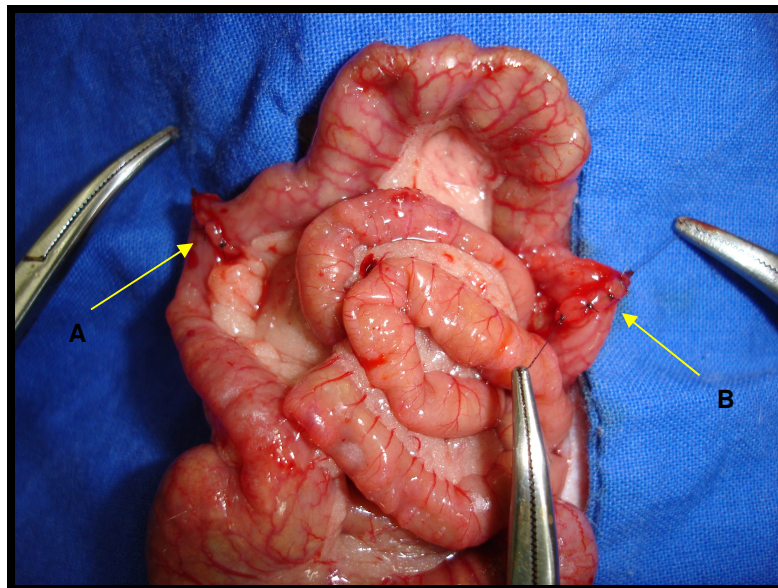


FIGURA 8. ANASTOMOSES COLÔNICAS: A. PROXIMAL. B. DISTAL (SETAS)

3.2.4. Pós-Operatório

Após o período de recuperação anestésica, cada animal foi recolocado em sua gaiola metabólica de origem e recebeu dipirona® (Eurofarma®, São Paulo, SP), por via oral, na dose de 20mg/kg/24h (AVMA). Durante as 24 horas seguintes, os ratos receberam água suplementada com sacarose a 100mg/ml, sendo mantido o jejum de ração por seis horas. Após esse período os ratos receberam ração na quantidade estabelecida para cada grupo:

- grupo C: ração *ad libitum*;
- grupo DT: 50% da ingesta alimentar média diária do grupo controle;
- grupo DTN: ração *ad libitum*.

A avaliação diária dos animais constou de observação do aspecto da ferida operatória quanto a sangramento, infecção, deiscência de pele e/ou evisceração e determinação de ingesta.

3.2.5. Sacrifício dos Animais

Todos os ratos foram sacrificados no quinto dia de pós-operatório por meio de dose letal de éter dietílico inalatório. Foi realizada laparotomia mediana para acesso ao *cavum abdominis* (cavidade abdominal) (Figura 9). Na seqüência, após inspeção cuidadosa da cavidade, foi realizada a lise parcial das aderências e retirada de dois segmentos do cólon, de 5 cm de extensão cada, contendo a anastomose proximal e a distal em suas porções médias. Os dois espécimes cirúrgicos de cada animal (proximal e distal) foram conservados alternadamente em solução salina isotônica e formalina a 10% para estudos de tração e para estudo histológico e imunohistológico, respectivamente (Figura 10 A e B).

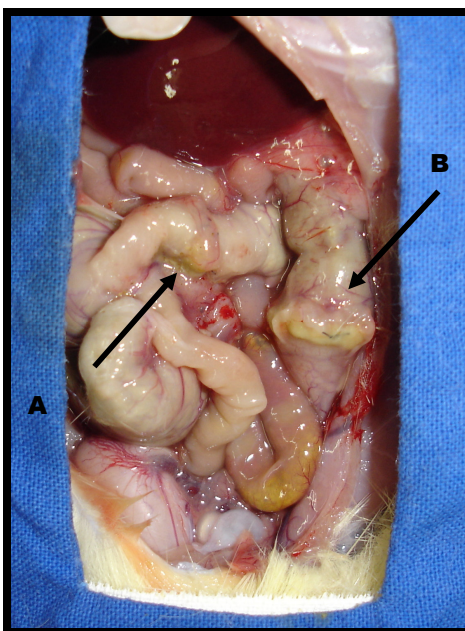


FIGURA 9. ASPECTO DA CAVIDADE ABDOMINAL NO DIA DO SACRIFÍCIO
A - ANASTOMOSE PROXIMAL; B - ANASTOMOSE DISTAL (SETAS)

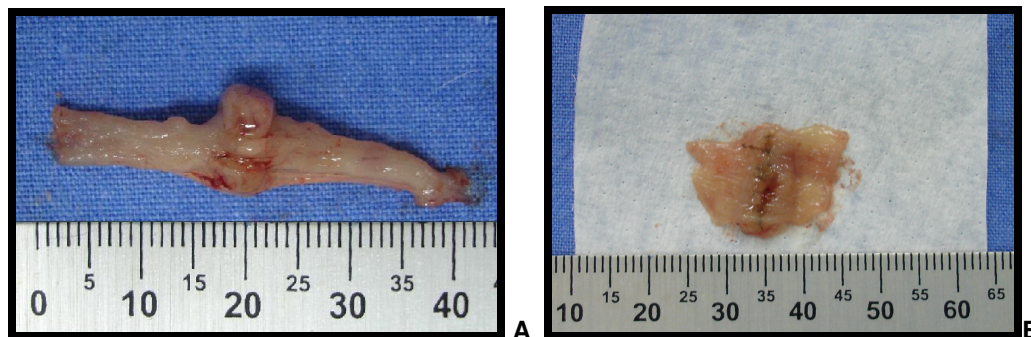


FIGURA 10. AMOSTRA DAS ANASTOMOSES COLÔNICAS PARA ESTUDO TENSIOMÉTRICO (A) E PARA ESTUDO PATOLÓGICO (B).

3.2.6 Dados Avaliados

3.2.6.1 Peso

Os ratos tiveram seus pesos aferidos no início do experimento, isto é, após os sete dias de aclimação, e a cada 7 dias até o sacrifício. A balança eletrônica utilizada para tal aferição (AM 5500 *Marte*®, São Paulo, SP) foi regulada de acordo com os padrões do INMETRO. Os valores do peso foram mensurados e registrados em gramas. Foi realizada a avaliação da curva de variação de peso durante o experimento.

3.2.6.2. Ingestão alimentar média

Diariamente, em 2 horários pré-determinados, foi oferecida a cada animal do Grupo Controle a quantidade fixa de ± 50 gramas de ração. A diferença diária entre peso da ração ofertada no dia anterior e o peso de ração restante (perdas ao redor do recipiente e fundo da gaiola) foi anotada e rotulada como ingesta alimentar. Os grupos de estudo DT e DTN receberam diariamente 50% da ingesta alimentar média ingerida pelos animais do grupo controle (*pair-feeding*) (Anexo I).

3.2.6.3. Óbitos

Todos os animais que durante o estudo evoluíram a óbito, apesar de não serem incluídos na análise estatística dos parâmetros de cicatrização, foram submetidos à laparotomia para identificação da *causa mortis*.

3.2.6.4. Exames laboratoriais

Para a coleta de sangue foi realizada punção intra-cardíaca e coletado sangue em seringa de 20 ml com agulha 25x8mm (Beckton-Dickinson) esterilizadas e apirogênicas, em volume de ± 8 ml. As amostras foram coletadas em frascos com anticoagulante (EDTA 10%) e sem anticoagulante para as dosagens de leucograma, bastonetes, plaquetas, albumina, Proteína C Reativa, TNF e IL-6 (Anexo II).

3.2.6.5 Força de Tração

A avaliação da força de tração da anastomose colônica foi realizada no Laboratório de Cirurgia Experimental da Pós-Graduação em Cirurgia da Universidade Federal do Paraná. Para avaliação desta variável foi utilizada máquina universal de ensaio mecânico computadorizada, da marca *EMIC*®, modelo DL-500-MF (EMIC, São José dos Pinhais, PR), com garras de pressão ajustáveis manualmente e sistema eletrônico de aquisição de dados com utilização do *software TESC*, versão 1.01. (Figura 11 A, B e C).

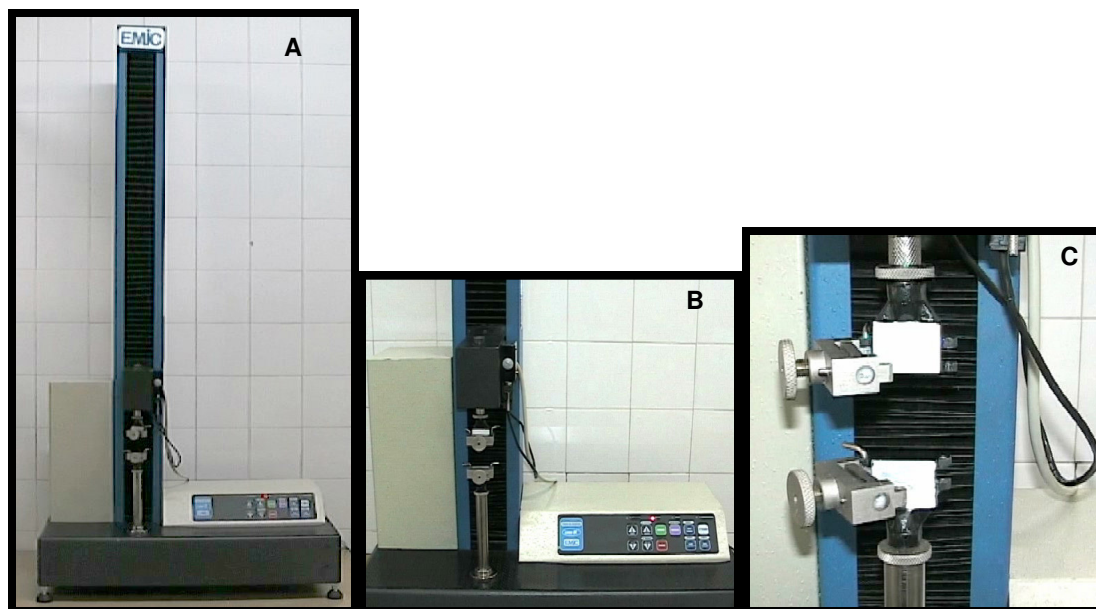


FIGURA 11. MÁQUINA DE ENSAIO MECÂNICO COMPUTADORIZADA
A e B. Painel de controle e dispositivo de tração; C. Detalhes do dispositivo de tração.

O segmento utilizado para a análise da tração foi cuidadosamente dissecado para remoção das aderências e acondicionado em frascos contendo solução salina a 0,9%. O estudo foi realizado por meio de fixação das extremidades do segmento colônico utilizando presilhas de metal.

A anastomose foi posicionada de modo que sua porção média ficasse eqüidistante das duas presilhas. Todos os testes de tração foram feitos logo após a ressecção dos corpos de prova, com intervalo máximo de 2 horas. 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%. A força de tração foi constantemente mensurada por meio de computador anexo ao sistema de presilhas. O programa demonstrava um sistema de coordenadas cartesianas cujo eixo x representava a unidade Distância e o eixo y, a unidade Força. Inicialmente o gráfico apresentou direção ascendente. No momento da ruptura inicial, o gráfico demonstrou a mudança imediata de direção correspondendo à Força Máxima de Tração (FMT) suportada pelo corpo de prova. Durante a fase descendente do gráfico, a ruptura da peça estava em progressão, até o momento de queda de tensão ao nível zero; este ponto correspondeu à separação total dos cotos colônicos. A última força medida pelo computador, no gráfico, foi denominada Força de Ruptura Total (FRT) (Figura 12 e 13).

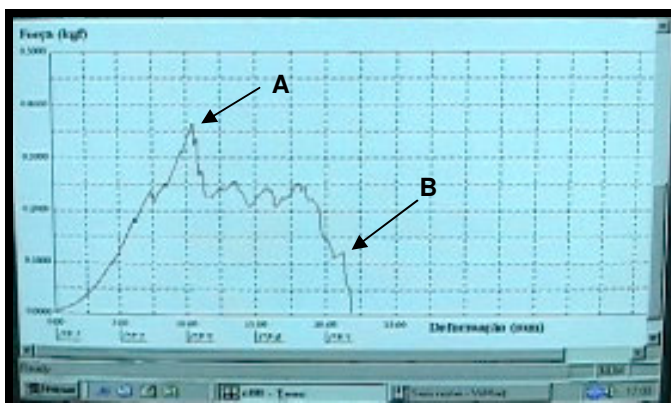


FIGURA 12. GRÁFICO DO ESTUDO DE TRAÇÃO NOS CORPOS DE PROVA
 A. Ponto correspondente à FMT. B. Ponto correspondente à FRT (Setas)



FIGURA 13. SEQUÊNCIA DO ESTUDO TENSIO MÉTRICO MOSTRANDO A RUPTURA DA ANASTOMOSE

A Tensão Máxima (TM) é medida em termos de quantidade de força suportada por unidade de área de secção. É dependente das dimensões do tecido e permite comparação mais adequada entre corpos de prova retirados de espécimes diferentes. As duas variáveis de força (TM e FMT) foram submetidas à análise, comparando-se os 3 grupos de animais (C, DT e DTN).

3.2.6.6 Avaliação Histológica

Após a obtenção do segmento colônico de cada animal, as peças cirúrgicas foram abertas em sentido longitudinal, na borda antimesentérica, dissecadas para a remoção das aderências, fixadas em formalina a 10% e encaminhadas para o estudo. Secções perpendiculares ao maior eixo da sutura foram efetuadas e encaminhadas para o processamento histológico, incluindo desidratação, diafanização e emblocamento em parafina histológica. Após microtomia a 4 μm de espessura, os cortes histológicos foram submetidos à coloração de *picrosirius-red* F3BA para identificação de colágenos maduro e imaturo por técnica de microscopia com luz polarizada e análise morfométrica computadorizada (Figura 14).

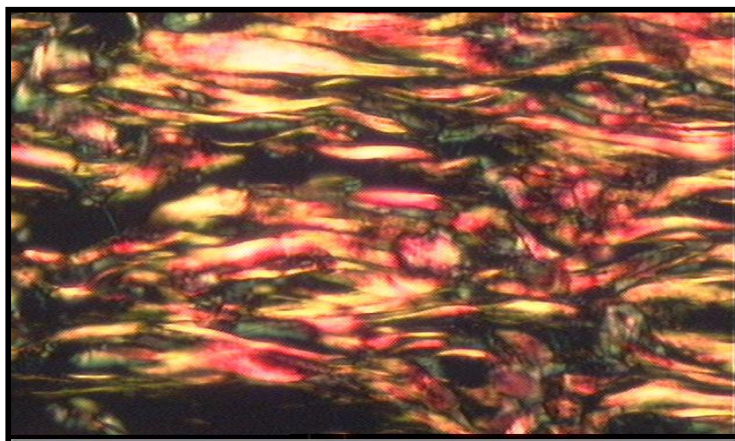


FIGURA 14. FOTOMICROGRAFIA (20X) CORADA POR *PICROSIRIUS-RED* APÓS A POLARIZAÇÃO DA LUZ

Foram avaliados os cortes histológicos por meio de microscópio óptico da marca *Olympus*® (*Olympus*, Tóquio, Japão), em aumento de 400 vezes, utilizando-se fonte de luz polarizada. As imagens foram captadas por câmera *Sony*® CCD 101 (*Sony*, Tóquio, Japão), transmitidas ao monitor colorido *Trinitron Sony*®, congeladas e digitalizadas por meio de placas *Oculus TCX*. Foi realizada a análise das imagens por meio de aplicativo *Image Pro-plus* versão 4.5 para *Windows* em computador da linha *Pentium*®III 733Mhz. A calibração do sistema foi baseada na densidade óptica dos pontos de resolução (“*pixels*”) que formam as imagens,

selecionando-se o valor limite de melhor resolução. No sistema RGB (“Red, Green, Blue”) foram considerados valores para tons de vermelho, amarelo e laranja (colágeno tipo I) e para tons de verde (colágeno tipo III). Todas as lâminas foram avaliadas sob as mesmas condições de regulagem, dentro dos parâmetros exigidos pelo referido aplicativo (Figura 15 A e B).

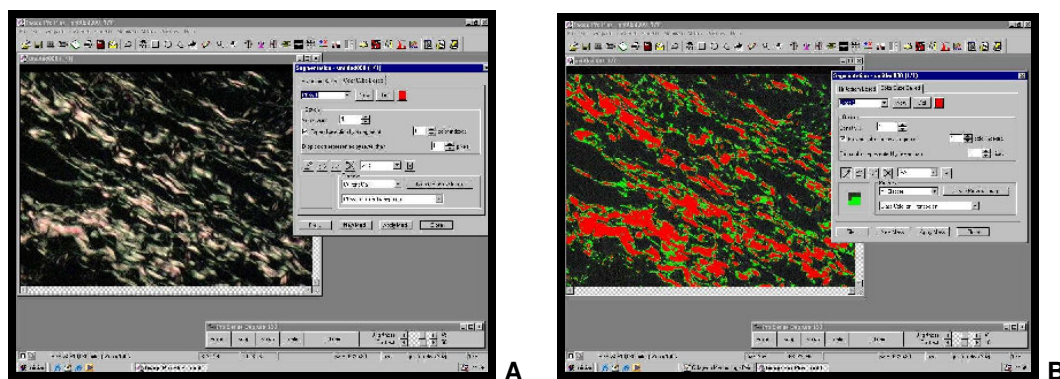


FIGURA 15. ACHADOS HISTOLÓGICOS DIGITALIZADOS PARA ANÁLISE DE DEPOSIÇÃO DE COLÁGENO. A. Imagem captada diretamente da microscopia pela câmera Sony®. B. Imagem digitalizada após aplicativo Image Pro-Plus, versão 4.5 ®.

Nos cortes histológicos analisados determinou-se o campo microscópico sobre a linha de sutura e foram obtidas medidas de três áreas distintas (superior, média e inferior). Em cada uma delas calculou-se o percentual da área ocupada pelas fibras que continham colágeno dos tipos I e III, em relação à área total examinada. A partir da medida da porcentagem de fibras colágenas foi calculado o índice de maturação de colágeno (IMaC), definido como a razão entre essas porcentagens. Quadro 5. Valores de IMaC maiores do que 1 (um) indicam que a porcentagem de colágeno tipo I é maior do que a porcentagem de colágeno do tipo III.

$$\text{IMaC} = \frac{\% \text{ de colágeno maduro (tipo I)}}{\% \text{ de colágeno imaturo (tipo III)}}$$

QUADRO 5. ÍNDICE DE MATURAÇÃO DO COLÁGENO (IMaC)
 IMaC = Índice de Maturação do colágeno; % = porcentagem
 FONTE: LEMOS, 2002

3.2.6.7 Avaliação Imunoistoquímica

Para o estudo imunoistoquímico utilizou-se a técnica descrita por Hsu (1981). Foram utilizadas lâminas sinalizadas para se evitar o descolamento dos cortes histológicos durante a coloração. Os cortes foram submetidos a desparafinização e hidratação, sendo então imersos em tampão citrato, pH 6,0, para recuperação antigênica em banho-maria a 98°C; em seguida foram imersos em tampão fosfato e submetidos a bloqueio da peroxidase endógena em metanol com peróxido de hidrogênio a 3%. Na seqüência aplicaram-se os anticorpos primários antifator VIII (*Policlonal, Código 0082, DakoCytomatio, Carpinteria, EUA*) e anti- α -actina muscular lisa (*Monoclonal, Código M0851, DakoCytomation, Carpinteria, EUA*), em lâminas separadas, incubando-as “*overnight*” à temperatura de 4°C. Após banho em tampão fosfato, seguiu-se aplicação de anticorpo secundário biotilado por 30 minutos, à temperatura ambiente. Após novo banho em tampão fosfato, seguiu-se à aplicação do complexo estreptavidina – peroxidase por 30 minutos, ainda à temperatura ambiente. Foi então realizado mais um banho em tampão fosfato e revelação da reação imune com diaminobenzina, seguido de contracoloração com hematoxilina. Na seqüência os cortes foram desidratados e montados com bálsamo e lamínulas de vidro.

A positividade da coloração imunoistoquímica foi identificada nas áreas de pigmentação acastanhada. Controles positivos e negativos foram utilizados.

3.2.6.7.1 Número de Vasos Sangüíneos

A identificação dos vasos sangüíneos foi efetuada contando-se o número de estruturas circulares coradas positivamente pelo anticorpo policlonal antifator VIII (coradas em marrom), que revela as células endoteliais da camada íntima dos vasos. A contagem foi feita na área da anastomose, em uma extensão de 10 mm proximal e 10 mm distal a esta, em aumento de 40 vezes, em quatro campos distintos aleatoriamente, expressas em médias aritméticas.

Imagens de toda esta região foram capturadas por sistema acoplado a um microscópio óptico Zeiss ® Axioscop (*Carl Zeiss®*, Alemanha), e constituído por uma câmara de vídeo Sony® DXC-970MD (*Sony®*, Tokyo, Japão), conectado a computador da linha Pentium e monitor colorido de alta resolução da marca Compac® (*Compac®*, EUA). Figura 16.

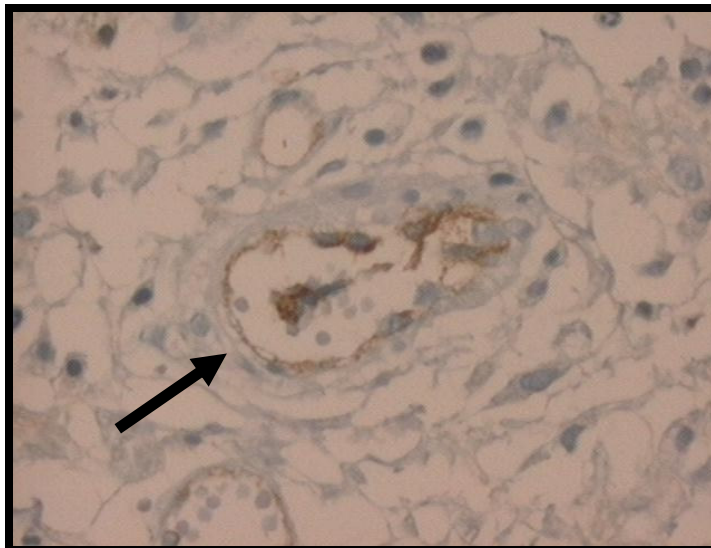


FIGURA 16. VASO SANGÜÍNEO COM ÍNTIMA CORADA EM MARRON REVELANDO POSITIVIDADE PARA O ANTICORPO ANTIFATOR VIII (SETA).

3.2.6.7.2 Número de Miofibroblastos

A identificação dos miofibroblastos foi realizada contando-se as células coradas positivamente pela coloração imunoistoquímica com anticorpo monoclonal anti- α -actina muscular lisa em um campo de grande aumento (objetiva de 40X). A contagem foi feita na área da anastomose, em uma extensão de 10 mm proximal e 10 mm distal a esta, em quatro campos distintos aleatoriamente, expressas em médias aritméticas. (Figura 17).

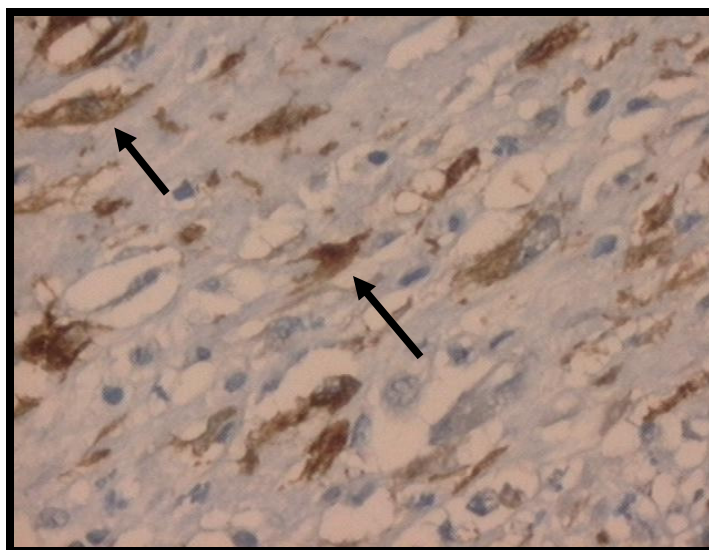


FIGURA 17. MIOFIBROBLASTOS CORADOS EM MARROM REVELANDO POSITIVIDADE PARA O ANTICORPO ANTI- α -ACTINA MUSCULAR LISA (SETAS)

As imagens digitalizadas foram capturadas e analisadas pelo programa Image Pro Plus (*Media Cybernetics, Califórnia, EUA*), para *Windows*, por meio da ferramenta “*Measures*”, calibrada previamente para objetiva de 40X. Utilizou-se um sistema constituído por microscópio óptico Olympus BX50 (*Olympus®, Tokyo, Japão*), acoplado com câmera de vídeo Sony® DXC-970MD (*Sony, Tokyo, Japão*), conectado a computador da linha Pentium® e monitor colorido de alta resolução da marca Samsung® (*Samsung, Coréia*). A contagem foi realizada analisando-se as imagens uma a uma, marcando os miofibroblastos por meio da ferramenta “*Manual Tag*” (Figura 18).

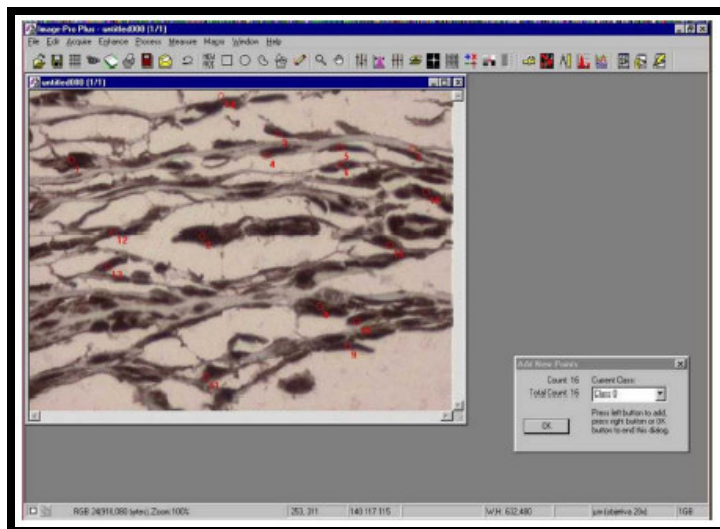


FIGURA 18. CONTAGEM DOS MIOFIBROBLASTOS UTILIZANDO-SE O PROGRAMA DE MORFOMETRIA IMAGE PRO PLUS. OS MIOFIBROBLASTOS CORADOS EM MARROM SÃO RECONHECIDOS E MARCADOS COM CURSOR DO COMPUTADOR (VERMELHO).

3.2.7. Análise Estatística

Os animais que evoluíram a óbito durante o experimento foram excluídos de todas as avaliações. As variáveis avaliadas no estudo foram: peso inicial, peso no 21^o dia, peso no momento da cirurgia, peso no sacrifício, albumina, leucócitos, plaquetas, bastonetes, proteína C reativa, fator de necrose tumoral, interleucina-6, percentual de colágeno imaturo (tipo III), percentual de colágeno maduro (I), índice de maturação do colágeno (IMaC), tensão máxima (TM), força máxima de tração (FMT), número de miofibroblastos e número de vasos sanguíneos.

Conforme a natureza dos dados analisados nos grupos C, DT e DRN, procedeu-se ao tratamento estatístico adequado. 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 verificação da diferença entre as médias dos pesos iniciais usou-se a análise da variância. Na análise não-paramétrica foi utilizado o teste de Mann-Whitney para as variáveis: pesos inicial, Proteína C reativa, Leucócitos, IMaC, número de vasos sanguíneos e Tensão Máxima. Nas demais comparações utilizou-se a análise paramétrica com o

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

4 RESULTADOS

Os 45 ratos estudados foram incluídos da análise estatística, em diferentes etapas e divididos em três grupos: grupo controle – C (N=15), grupo desnutrido toxêmico – DT (N=15) e grupo desnutrido toxêmico com nutrição perioperatória – DTN (N=15). Durante o experimento ocorreram 11 óbitos. Seis ocorreram no grupo desnutrido toxêmico. As causas incluíram 1 caso durante o processo de desnutrição, 1 óbito durante a indução de endotoxemia, 1 óbito após punção cardíaca e 3 óbitos por deiscências anastomóticas com peritonite fecal no pós-operatório. No grupo desnutrido toxêmico com nutrição perioperatória houve 5 óbitos: um óbito ocorreu durante a desnutrição, 1 óbito durante a indução de endotoxemia e 3 óbitos por deiscência anastomótica com peritonite fecal. Não houve óbitos no grupo controle. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão ($M \pm EP$).

4.1 PESO

A média de peso inicial dos animais avaliados foi 266,18g \pm 4,23, $p=0,86$. A média de peso no início do experimento, no 7º, 14º, 21º dia, no dia da cirurgia e no dia do sacrifício estão apresentadas na tabela e no gráfico abaixo.

TABELA 1. VARIAÇÃO DE PESO NOS GRUPOS C, DT E DTN DURANTE O EXPERIMENTO

PESO (g)	GRUPOS		
	C	DT	DTN
Inicial	269,00 \pm 3,04	266,31 \pm 6,14	263,25 \pm 10,96
21º dia	307,65 \pm 9,22	208,09 \pm 4,72	210,25 \pm 9,28
Cirurgia	287,93 \pm 7,80	197,53 \pm 5,86	253,73 \pm 9,99
Sacrifício	285,95 \pm 5,80	175,52 \pm 4,65	264,59 \pm 12,85

Nota: Dados expressos como $M \pm EP$, peso em g (gramas).

C=grupo controle; DT=grupo desnutrido toxêmico; DTN=grupo desnutrido toxêmico com nutrição perioperatória.

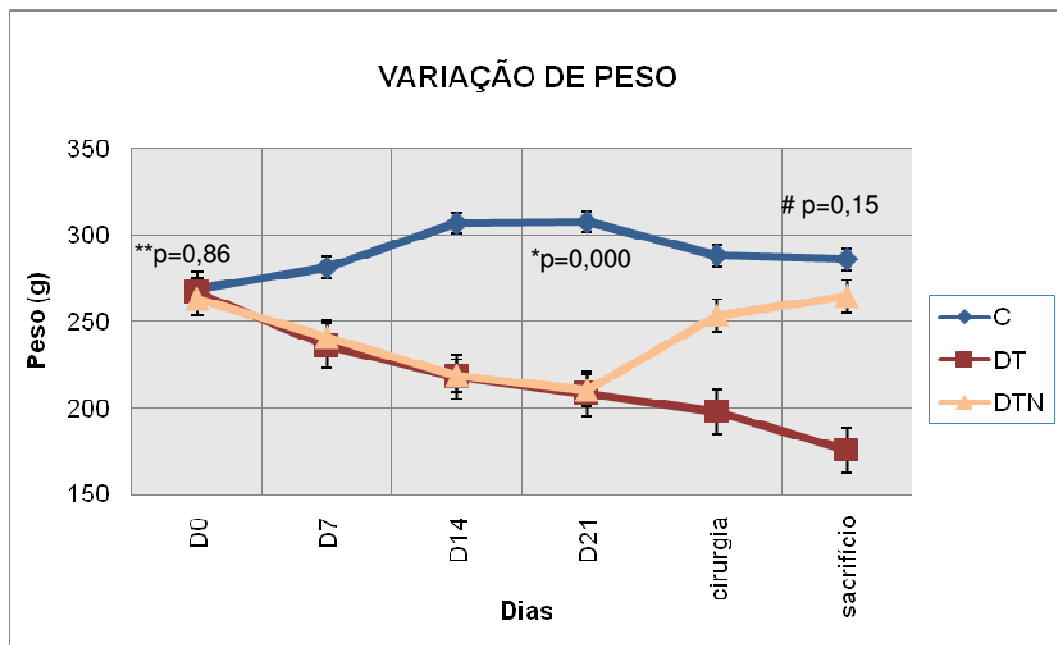


GRÁFICO 1. CURVA DE VARIAÇÃO DAS MÉDIAS DE PESOS DOS GRUPOS C, DT E DTN

Nota: Peso expresso em gramas, $M \pm EP$.

* Diferença estatística entre os grupos C e DT no 21º dia (processo de desnutrição).

Diferença estatística entre os grupos C e DTN no dia do sacrifício.

**Diferença estatística entre os três grupos (C, DT, DTN) no início do experimento.

Não houve diferença entre a média de pesos no dia 0 do experimento (C $269,00g \pm 3,04$ vs DT $266,31g \pm 6,14$ vs DTN $263,25g \pm 10,96$, $p=0,86$). Os animais no grupo desnutrido toxêmico (DT) e desnutrido toxêmico com nutrição perioperatória (DTN) apresentaram perda ponderal progressiva nos 21 dias iniciais do experimento. A redução da média de peso foi de 21,87% no DT e 20,12% no DTN comparativamente ao peso do início do experimento. A perda ponderal nos dois grupos submetidos ao processo de desnutrição (DT e DTN) foi significativa em relação ao grupo controle (C $307,65g \pm 9,22$ vs DT $208,09g \pm 4,72$, $p=0,0000$ e C $307,65g \pm 9,22$ vs DTN $210,25g \pm 9,28$, $p=0,0000$.)

No dia do procedimento cirúrgico, o grupo C reduziu seu peso de $307,65g \pm 9,22$ (no 21º dia) para $287,93g \pm 7,80$ (-6,40%). O grupo DT também reduziu o peso de $208,09g \pm 4,72$ para $197,53g \pm 5,86$ (-5,07%). Por outro lado, o grupo DTN apresentou um ganho de peso de 20,68% após 10 dias de nutrição perioperatória.

A análise no momento da cirurgia evidenciou que a média de peso foi maior no grupo DTN que DT ($253,73 \pm 9,99$ vs $197,53 \pm 5,86$, $p=0,0001$), porém inferior ao grupo C ($253,73 \pm 9,99$ vs $287,93 \pm 7,80$, $p=0,01$).

No momento do sacrifício, a média de pesos dos ratos do grupo DTN foi superior ao grupo DT ($264,59 \pm 12,85$ vs $175,52 \pm 4,65$, $p=0,0000$) e semelhante ao grupo C ($264,59 \pm 12,85$ vs $285,95 \pm 5,80$, $p=0,15$).

4.2 ALBUMINA

A albumina sérica foi mensurada no dia da cirurgia nos três grupos. Comparando os grupos, observou-se que o grupo DT apresentou média de albumina sérica estatisticamente inferior a do grupo DTN ($1,13 \text{ mg/dl} \pm 0,09$ vs $2,73 \text{ mg/dl} \pm 0,21$, $p=0,0000$) e grupo C ($1,13 \text{ mg/dl} \pm 0,09$ vs $3,23 \text{ mg/dl} \pm 0,19$, $p=0,0000$). Não houve diferença entre os grupos DTN e C ($2,73 \text{ mg/dl} \pm 0,21$ vs $3,23 \text{ mg/dl} \pm 0,19$, $p=0,09$). Tabela 2 e Gráfico 2.

TABELA 2. NÍVEL SÉRICO DE ALBUMINA NO DIA DO PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

GRUPOS	N	ALBUMINA	
		M \pm EP	p
C	15	$3,23 \pm 0,19$	*=0,0000
DT	12	$1,13 \pm 0,09$	#=0,0000
DTN	13	$2,73 \pm 0,21$	°=0,09

Nota: Dados expressos como M \pm EP, albumina em mg/dl.

* Nível de significância estatística entre os grupos controle (C) e desnutrido toxêmico (DT).

Nível de significância estatística entre os grupos desnutrido toxêmico (DT) e desnutrido toxêmico com nutrição perioperatória (DTN).

° Nível de significância estatística entre os grupos controle (C) e desnutrido toxêmico com nutrição perioperatória (DTN).

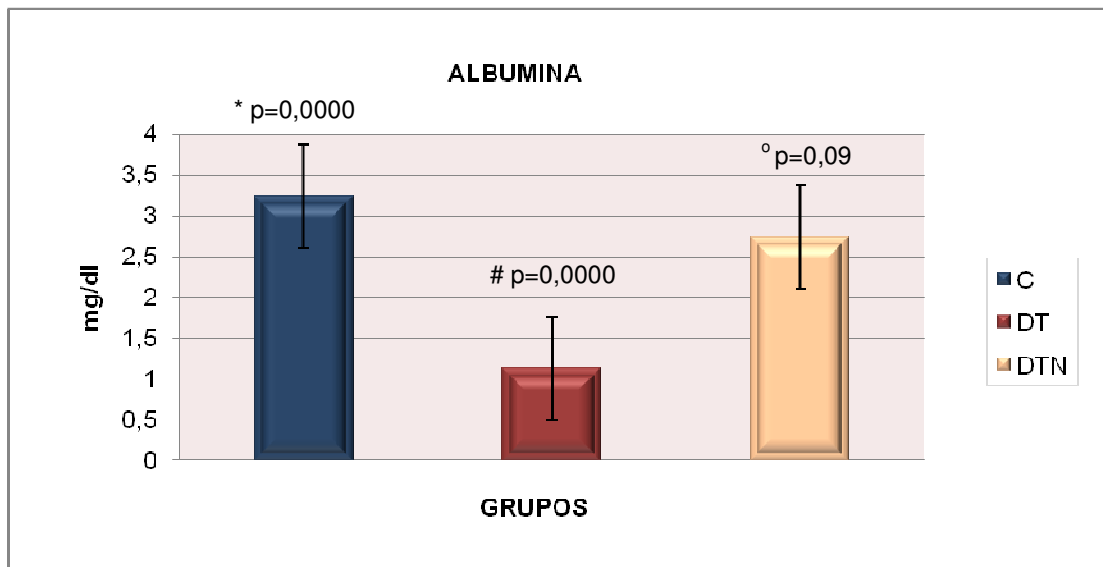


GRÁFICO 2. COMPARAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE ALBUMINA ENTRE OS GRUPOS (C, DT, DTN) NO DIA DA CIRURGIA

Nota: Valores de albumina média expresso em mg/dl. M ± EP= Média ± Erro Padrão.

* Nível de significância estatística entre os grupos controle (C) e desnutrido toxêmico (DT).

#Nível de significância estatística entre os grupos DT e desnutrido toxêmico com nutrição perioperatória (DTN).

° Nível de significância estatística entre os grupos C e DTN.

4.3 PROTEÍNA C REATIVA

A mensuração da proteína C reativa foi realizada em todos os grupos no momento do procedimento cirúrgico. No grupo DT foram encontrados valores superiores ao grupo DTN (44,58mg/dl±0,35 vs 1,41mg/dl±0,35, p=0,0000) e C (44,58mg/dl±0,35 vs 0,41mg/dl±0,11, p=0,0001). Tabela 3.

TABELA 3. NÍVEL SÉRICO DE PROTEÍNA C REATIVA DOS GRUPOS NO DIA DO PROCEDIMENTO CIRÚRGICO.

GRUPOS	N	PROTEÍNA C REATIVA	
		M±EP	p
C	15	0,41±0,11	*=0,0001
DT	12	44,58±0,35	#=0,0000
DTN	13	1,41±0,35	°=0,003

Nota: Dados expressos como M ± EP, em mg/dl

* Nível de significância estatística entre os grupos controle (C) e desnutrido toxêmico (DT).

Nível de significância estatística entre os grupos desnutrido toxêmico (DT) e desnutrido toxêmico com nutrição perioperatória (DTN).

° Nível de significância estatística entre os grupos controle (C) e desnutrido toxêmico com nutrição perioperatória (DTN).

4.4 FATOR DE NECROSE TUMORAL

Comparando os grupos entre si, observou-se que a média das aferições de fator de necrose tumoral foi superior no grupo DT quando comparado com o grupo DTN e C, respectivamente (757,67pg/ml \pm 30,06 vs 5,52pg/ml \pm 0,70, $p=0,0000$ e 757,67pg/ml \pm 30,06 vs 6,31pg/ml \pm 0,65, $p=0,000$). Não houve diferença entre os grupos DTN e C (5,52pg/ml \pm 0,70 vs 6,31pg/ml \pm 0,65, $p= 0,42$). Tabela 4.

TABELA 4. NÍVEL SÉRICO DE FATOR DE NECROSE TUMORAL DOS GRUPOS NO DIA DO PROCEDIMENTO CIRÚRGICO.

GRUPOS	N	FATOR DE NECROSE TUMORAL	
		M \pm EP	p
C	15	6,31 \pm 0,65	*=0,0000
DT	12	757,67 \pm 30,06	#=0,0000
DTN	13	5,52 \pm 0,70	^o =0,42

Nota: Dados expressos como M \pm EP, em pg/ml

* Nível de significância estatística entre os grupos controle (C) e desnutrido toxêmico (DT).

Nível de significância estatística entre os grupos desnutrido toxêmico (DT) e desnutrido toxêmico com nutrição perioperatória (DTN).

^o Nível de significância estatística entre os grupos controle (C) e desnutrido toxêmico com nutrição perioperatória (DTN).

4.5 INTERLEUCINA - 6

O nível de interleucina-6 foi superior nos grupos DT e DTN em relação ao grupo C, respectivamente (562,12pg/ml \pm 71,17 vs 26,12pg/ml \pm 3,01, $p=0,0000$ e 439,37pg/ml \pm 63,93 vs 26,12pg/ml \pm 3,01, $p=0,0000$). Não houve diferença estatística entre os grupos DT e DTN (562,12pg/ml \pm 71,17 vs 439,37pg/ml \pm 63,93, $p= 0,21$). Tabela 5.

TABELA 5. NÍVEL SÉRICO DE INTERLEUCINA-6 DOS GRUPOS NO DIA DO PROCEDIMENTO CIRÚRGICO.

GRUPOS	N	INTERLEUCINA-6	
		M±EP	p
C	15	26,12±3,01	*=0,0000
DT	12	562,12±71,17	#=0,21
DTN	13	439,37±63,93	^o =0,0000

Nota: Dados expressos como M ± EP, em pg/ml

* Nível de significância estatística entre os grupos controle (C) e desnutrido toxêmico (DT).

Nível de significância estatística entre os grupos desnutrido toxêmico (DT) e desnutrido toxêmico com nutrição perioperatória (DTN).

^o Nível de significância estatística entre os grupos controle (C) e desnutrido toxêmico com nutrição perioperatória (DTN).

4.8 LEUCÓCITOS, BASTONETES e PLAQUETAS

As dosagens séricas de leucócitos, bastonetes e plaquetas foram realizadas após o término do procedimento cirúrgico. As médias dos valores estão na Tabela 6.

TABELA 6. NÍVEL SÉRICO DE LEUCÓCITOS, BASTONETES E PLAQUETAS DOS GRUPOS NO DIA DO PROCEDIMENTO CIRÚRGICO.

	GRUPOS			p
	C	DT	DTN	
LEUCOCITOS x 10 ³ /mm ³	5,78±0,41	14,83±1,67	4,80±0,38	*0,0001 #0,0001 ^o 0,09
BASTONETES %	0,40±0,23	11,00±1,41	2,61±0,67	*0,0001 #0,0001 ^o 0,009
PLAQUETAS x 10 ³ /mm ³	467,07±33,64	71,50±6,60	337,61±30,55	*0,0000 #0,0000 ^o 0,008

Nota: Dados expressos como M ± EP.

* Nível de significância estatística entre os grupos controle (C) e desnutrido toxêmico (DT).

Nível de significância estatística entre os grupos desnutrido toxêmico (DT) e desnutrido toxêmico com nutrição perioperatória (DTN).

^o Nível de significância estatística entre os grupos controle (C) e desnutrido toxêmico com nutrição perioperatória (DTN).

A mensuração de leucócitos demonstrou valores superiormente significativos no grupo DT em relação aos grupos DTN e C ($14,83 \times 10^3 \pm 1,67$ vs $4,80 \times 10^3 \pm 0,38$, $p=0,0001$ e $14,83 \times 10^3 \pm 1,67$ vs $5,78 \times 10^3 \pm 0,41$, $p=0,0001$). Com relação aos bastonetes, houve diferença entre todos os grupos. O valor da média dos bastonetes

do grupo DT foi superior ao grupo DTN (11,00%±1,41 vs 2,61%±0,67, p=0,001). A mensuração do grupo DTN foi superior ao grupo C (2,61%±0,67 vs 0,40%±0,23, p=0,0001).

O grupo DT apresentou média de plaquetas inferior aos grupos DTN ($71,50 \times 10^3 \pm 6,60$ vs $337,61 \times 10^3 \pm 30,55$, p=0,0000) e C ($71,50 \times 10^3 \pm 6,60$ vs $467,07 \times 10^3 \pm 33,64$, p=0,0000). O grupo DTN apresentou valores inferiores ao grupo C ($337,61 \times 10^3 \pm 30,55$ vs $467,07 \times 10^3 \pm 33,64$, p=0,008).

4.7 FORÇA DE TRAÇÃO

A Tensão Máxima (TM) e a Força Máxima de Tração (FMT) foram analisadas e tiveram suas médias e erros-padrão calculados e comparados dentro dos grupos C, DT e DTN. Os dados obtidos estão representados na Tabela 7 e no Gráfico 3 e 4.

Quando foi comparada a tensão máxima das anastomoses colônicas, observou-se que esta foi maior no grupo DTN quando comparado com o grupo DT, com diferença estatística ($0,86 \pm 0,14 \text{ kgf/cm}^2$ vs $0,52 \pm 0,06 \text{ kgf/cm}^2$, p=0,04). Os valores de tensão máxima no grupo DTN foram similares ao grupo C ($0,86 \pm 0,14 \text{ kgf/cm}^2$ vs $0,89 \pm 0,06 \text{ kgf/cm}^2$, p=0,54).

Na análise da FMT, o grupo DTN apresentou média estatisticamente superior ao grupo DT ($0,32 \text{ Kgf} \pm 0,06$ vs $0,10 \text{ Kgf} \pm 0,01$; p=0,004). Também não se observou diferença estatística quando se comparou as médias da FMT entre o grupo DTN e C ($0,32 \text{ Kgf} \pm 0,06$ vs $0,18 \text{ Kgf} \pm 0,01$, p=0,36).

TABELA 7. COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DA TENSÃO MÁXIMA (TM) E FORÇA MÁXIMA DE TRAÇÃO (FMT) NO 5º DIA DE PÓS-OPERATÓRIO ENTRE OS GRUPOS (DT, DTN E C)

FORÇA DE TRAÇÃO			
GRUPOS	N	TM (Kgf/cm ²)	FMT (Kgf)
C	15	0,89±0,06	0,18±0,01
DT	9	0,52±0,06	0,10±0,01
		p=0,0001	p=0,0001
DT	9	0,52±0,06	0,10±0,01
DTN	10	0,86±0,14	0,32±0,06
		p=0,04	p=0,04
DTN	10	0,86±0,14	0,32±0,06
C	15	0,89±0,06	0,18±0,01
		p=0,54	p=0,36

Nota: Dados expressos como M ± EP

Grupo controle (C)

Grupo desnutrido toxêmico (DT)

Grupo desnutrido, toxêmico com nutrição perioperatória (DTN).

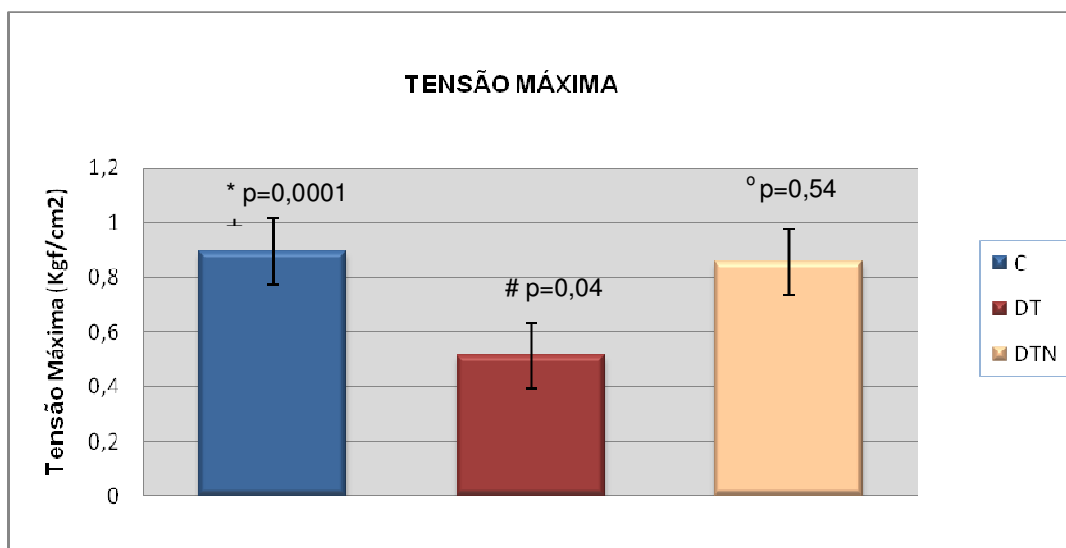


GRÁFICO 3. COMPARAÇÃO DA TENSÃO MÁXIMA NAS ANASTOMOSES ENTRE OS GRUPOS (C, DT, DTN) NO DIA DO SACRIFÍCIO.

Nota: Valores de Tensão Máxima expresso em M ± EP.

* Nível de significância estatística entre os grupos controle (C) e desnutrido toxêmico (DT).

#Nível de significância estatística entre os grupos DT e desnutrido toxêmico com nutrição perioperatória (DTN).

° Nível de significância estatística entre os grupos C e DTN.

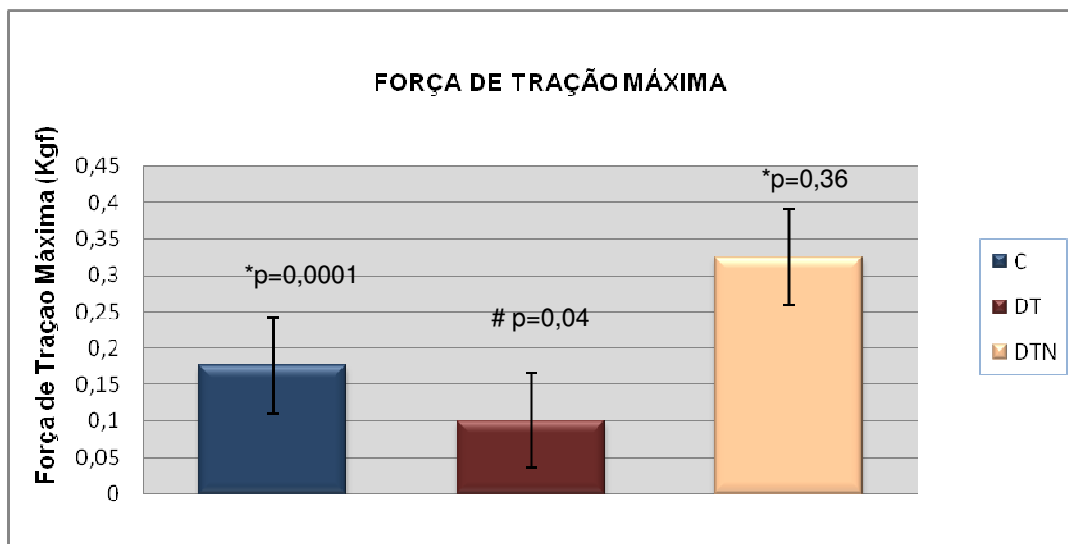


GRÁFICO 4. COMPARAÇÃO DA FORÇA DE TRAÇÃO MÁXIMA NAS ANASTOMOSES ENTRE OS GRUPOS (C, DT, DTN) NO DIA DO SACRIFÍCIO.

Nota: Valores de Força de Tração Máxima expresso em $M \pm EP$.

* Nível de significância estatística entre os grupos controle (C) e desnutrido toxêmico (DT).

#Nível de significância estatística entre os grupos DT e desnutrido toxêmico com nutrição perioperatória (DTN).

° Nível de significância estatística entre os grupos C e DTN.

4.9 DENSITOMETRIA DO COLÁGENO

Na avaliação da densitometria do colágeno, a Tabela 8 demonstra as médias das áreas percentuais ocupadas pelo colágeno tipo I, tipo III e as médias do IMaC nas anastomoses intestinais no 5º dia de pós-operatório.

Tabela 8. COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DO PERCENTUAL DO COLÁGENO MADURO (TIPO I), IMATURO (TIPO I) E ÍNDICE DE MATURAÇÃO DO COLÁGENO (IMaC) ENTRE OS GRUPOS (DT, DTR E C)

GRUPOS	AFERIÇÃO DAS MÉDIAS					
	TIPO I (%)	p	TIPO III (%)	p	IMaC	p
C	43,05±5,99	0,71	56,95±5,99	0,72	1,26±0,39	0,93
DT	40,32±4,31		59,67±4,31		0,75±0,15	
DT	40,32±4,31	0,64	59,67±4,31	0,45	0,75±0,15	0,41
DTN	35,32±4,90		64,67±4,90		0,64±0,15	
DTN	35,32±4,90	0,33	64,67±4,90	0,33	0,64±0,15	0,42
C	43,05±5,99		56,95±5,99		1,26±0,39	

Nota: Dados expressos como $M \pm EP$, em %

Grupo controle (C)

Grupo desnutrido toxêmico (DT)

Grupo desnutrido, toxêmico com nutrição perioperatória (DTN)

A média das áreas percentuais ocupadas pelo colágeno do tipo I nas anastomoses dos grupos DT e DTN foram semelhantes ($40,32\% \pm 4,31$ vs $35,32\% \pm 4,90$, $p=0,64$). Quando comparamos os grupos DT e DTN com grupo C, também não encontramos diferença, respectivamente ($40,32\% \pm 4,31$ vs $43,05\% \pm 5,99$, $p=0,71$ e $35,32\% \pm 4,90$ vs $43,05\% \pm 5,99$, $p=0,33$). Também não houve diferença significativa comparando-se as médias das áreas percentuais ocupadas pelo colágeno tipo III entre os grupos DT e DTN ($59,67\% \pm 4,31$ vs $64,67\% \pm 4,90$, $p=0,45$). Não encontramos diferença entre os grupos DT e DTN quando comparados ao grupo C ($59,67\% \pm 4,31$ vs $56,95\% \pm 5,99$, $p=0,72$ e $64,67\% \pm 4,90$ vs $56,95\% \pm 5,99$, $p=0,33$). Gráfico 5.

Com relação ao índice de maturação do colágeno (IMaC), foi observada média acima de 1 somente no grupo C ($1,26 \pm 0,39$). A média nos grupos DT e DTN foi semelhante, sem diferença estatística ($0,75 \pm 0,12$ vs. $0,64 \pm 0,15$; $p=0,41$).

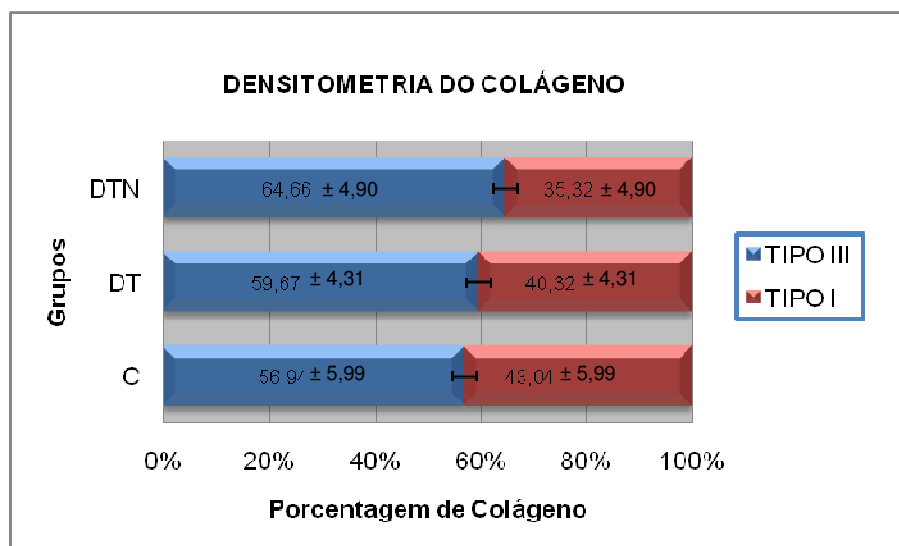


GRÁFICO 5. COMPARAÇÃO DA DENSITOMETRIA DO COLÁGENO NAS ANASTOMOSES ENTRE OS GRUPOS (C, DT, DTN) NO DIA DO SACRIFÍCIO.

Nota: Valores expresso em $M \pm EP$.

Grupo controle (C)

Grupo desnutrido toxêmico (DT)

Grupo desnutrido, toxêmico com nutrição perioperatória (DTN).

4.9 NÚMERO DE MIOFIBROBLASTOS

Com relação à variável número de miofibroblastos, observou-se que no grupo DTN a média do número de miofibroblastos foi superior estatisticamente em relação ao grupo DT ($6,17 \pm 0,46$ vs $4,06 \pm 0,77$, $p=0,03$). O grupo DTN mostrou valores menores que o grupo C ($6,17 \pm 0,46$ vs $7,62 \pm 0,28$, $p=0,02$). Tabela 9 e Gráfico 6.

TABELA 9. NÚMERO DE MIOFIBROBLASTOS PRESENTES NAS ANASTOMOSES DOS GRUPOS C, DT E DTN.

GRUPOS	N	Miofibroblastos	
		M \pm EP	p
C	15	7,62 \pm 0,28	*=0,001
DT	9	4,06 \pm 0,77	#=0,03
DTN	10	6,17 \pm 0,46	^o =0,02

Nota: Dados expressos como M \pm EP, em pg/ml

* Nível de significância estatística entre os grupos controle (C) e desnutrido toxêmico (DT).

#Nível de significância estatística entre os grupos desnutrido toxêmico (DT) e desnutrido toxêmico com nutrição perioperatória (DTN).

^o Nível de significância estatística entre os grupos controle (C) e desnutrido toxêmico com nutrição perioperatória (DTN).

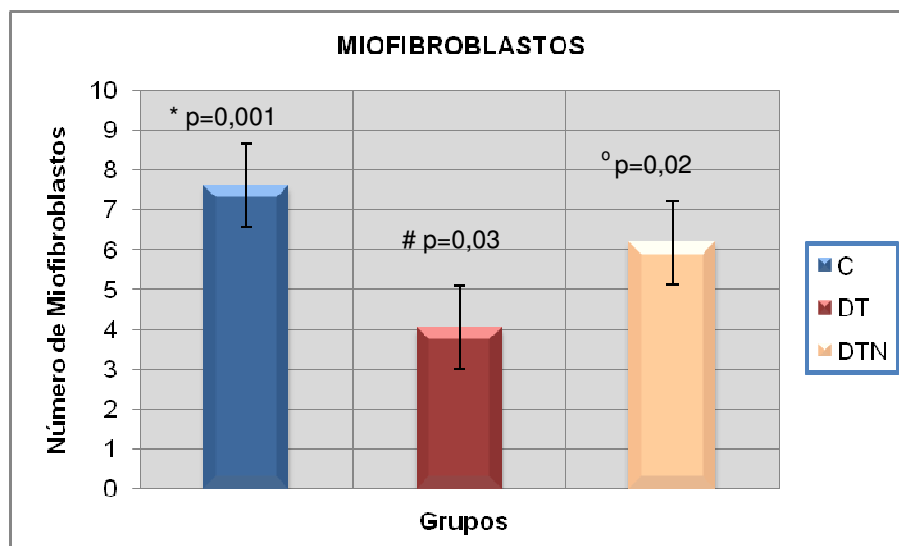


GRÁFICO 6. COMPARAÇÃO DO NÚMERO DE MIOFIBROBLASTOS NAS ANASTOMOSES ENTRE OS GRUPOS (C, DT, DTN) NO DIA DO SACRIFÍCIO.

Nota: Valores expresso em M \pm EP.

* Nível de significância estatística entre os grupos controle (C) e desnutrido toxêmico (DT).

#Nível de significância estatística entre os grupos desnutrido toxêmico (DT) e desnutrido toxêmico com nutrição perioperatória (DTN).

^o Nível de significância estatística entre os grupos controle (C) e desnutrido toxêmico com nutrição perioperatória (DTN).

4.10 NÚMERO DE VASOS SANGUÍNEOS

Analisando a média do número de vasos sanguíneos, não se observou diferença estatística entre os grupos DT e DTN ($8,11 \pm 0,35$ vs $8,35 \pm 0,73$, $p=0,59$). Entretanto, as médias dos grupos DT e DTN foram significativamente maiores que o grupo C ($8,11 \pm 0,35$ vs $4,33 \pm 0,39$, $p=0,0000$ e $8,35 \pm 0,73$ vs $4,33 \pm 0,39$, $p=0,0004$). Tabela 10 e Gráfico 7.

TABELA 10. NÚMERO DE VASOS SANGUÍNEOS PRESENTES NAS ANASTOMOSES DOS GRUPOS C, DT E DTN.

GRUPOS	N	Vasos Sanguíneos	
		M \pm EP	p
C	15	4,33 \pm 0,39	*=0,0000
DT	9	8,11 \pm 0,35	#=0,59
DTR	10	8,35 \pm 0,73	°=0,0004

Nota: Dados expressos como M \pm EP, em pg/ml

* Nível de significância estatística entre os grupos controle (C) e desnutrido toxêmico (DT).

#Nível de significância estatística entre os grupos desnutrido toxêmico (DT) e desnutrido toxêmico com nutrição perioperatória (DTN).

° Nível de significância estatística entre os grupos controle (C) e desnutrido toxêmico com nutrição perioperatória (DTN).

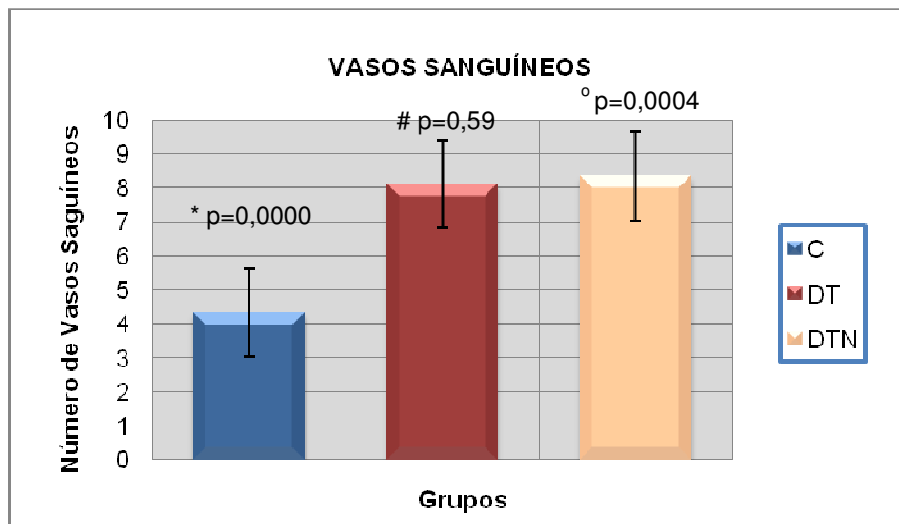


GRÁFICO 7. COMPARAÇÃO DO NÚMERO DE VASOS SANGUÍNEOS NAS ANASTOMOSES ENTRE OS GRUPOS (C, DT, DTN) NO DIA DO SACRIFÍCIO.

Nota: Valores expresso em M \pm EP.

* Nível de significância estatística entre os grupos controle (C) e desnutrido toxêmico (DT).

Nível de significância estatística entre os grupos desnutrido toxêmico (DT) e desnutrido toxêmico com nutrição perioperatória (DTN).

° Nível de significância estatística entre os grupos controle (C) e desnutrido toxêmico com nutrição perioperatória (DTN).

O resumo dos resultados encontra-se no quadro abaixo:

VARIÁVEIS	GRUPO DT	GRUPO DTN
PESO	↓	≈
ALBUMINA	↓	≈
PCR	↑	↓
TNF	↑	≈
IL-6	↑	↑
LEUCOCITOS	↑	↑
BASTONETES	↑	↑
PLAQUETAS	↓	↓
TM	↓	≈
FTM	↓	≈
COLÁGENO I, III e IMaC	≈	≈
MIOFIBROBLASTOS	↓	↓
VASOS SANGUÍNEOS	↑	↑

QUADRO 6. COMPARAÇÃO ENTRE AS VARIÁVEIS AVALIADAS NOS GRUPOS DT E DTN COM O GRUPO C.

LEGENDA: C=controle
 DT= desnutrido toxêmico
 DTN=desnutrido toxêmico com nutrição perioperatória
 PCR= Proteína C Reativa
 TM= tensão máxima
 FMT= Força Máxima de Tração
 IMaC= Índice de Maturação do Colágeno
 ↑= aumento
 ↓= redução
 ≈= semelhança

5. DISCUSSÃO

Vários estudos experimentais investigaram o efeito da desnutrição e/ou da sepse na cicatrização de anastomoses intestinais em ratos. Há poucos relatos na literatura pesquisada sobre o efeito da nutrição perioperatória sobre a cicatrização de anastomoses colônicas em ratos desnutridos e toxêmicos.

O rato foi escolhido por ser um animal de pequeno porte, de grande resistência ao meio ambiente, dócil em seu manuseio e criado em laboratório, podendo-se obter amostras homogêneas com relação à sua idade e peso. É um animal de custo relativamente baixo, que não exige tratamento diferenciado e tem transporte facilitado, podendo-se estudar grande número deles. Possui regime de alimentação rudimentar, o que permite a introdução de alterações dietéticas com certa facilidade, bem como a análise das variáveis desejadas de maneira simples e objetiva. 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 e com relativa agilidade (KORUDA; ROLANDELLI, 1988; COSTA, 2002; FERREIRA, 2004; GONÇALVES, 2005).

A grande maioria dos estudos utilizam animais adultos jovens e saudáveis como modelo experimental, sem comorbidades. Entretanto, no presente estudo, associou-se mais de uma situação adversa para poder simular a condição clínica esperada (desnutrição, toxemia e cicatrização). Dentre os trabalhos pesquisados para este estudo, o rato foi o animal utilizado com maior freqüência para a pesquisa dos efeitos da desnutrição e/ou da sepse na anastomose colônica. Foram utilizados ratos adultos e machos para evitar variações hormonais e possíveis diferenças no processo de cicatrização (ESMON 2004).

Muitos dos animais usados nos estudos de sepse são coprofágicos, podendo desenvolver resistência às fezes e mimetizar as reações da sepse (ESMON 2004). Por este motivo, no presente estudo, os ratos permaneceram na mesma gaiola (grupo de cinco ratos) somente no período de aclimação e, após, foram distribuídos em gaiolas metabólicas individuais. A utilização da gaiola

metabólica evitou a coprofagia e garantiu a mensuração exata da ingesta diária de ração de cada rato.

O cólon do rato apresenta seis partes principais: ceco, cólon proximal, flexura menor, flexura maior, cólon distal e reto, correspondendo, de acordo com a *Nomina Anatomica Veterinaria*, à seguinte denominação: *caecum*, *colon ascendens*, *flexura coli dextra*, *flexura coli sinistra*, *colon descendens* e *rectum*, respectivamente. No presente estudo, foram realizadas duas anastomoses em locais teoricamente heterogêneos (flexura menor e cólon distal). Utilizou-se o artifício da alternância das peças anastomóticas para análise mecânica e imunoistológica.

O período estudado na anastomose foi o 5º dia de pós-operatório e baseou-se nos estudos de Kiyama (1999 e 2000), Gonçalves (2005), Jiborn; Ahonen e Zederfeldt (1980), Hendricks e Mastboom (1990), Law e Ellis (1989), Martens e Hendricks (1991), Ekmektzoglou *et al.* (2006). Estes autores concluíram em seus trabalhos que a maioria das complicações na anastomose ocorrem até o sétimo dia de pós-operatório e que, após este período, a medida de força de ruptura e deposição de colágeno se assemelha ao grupo controle (tecido intacto), o que limita a análise deste parâmetro. O quinto dia de pós-operatório é um dia crucial, no qual a falência da anastomose é, na maioria das vezes, reconhecida na prática clínica. Assim, pode-se correlacionar os achados dos estudos experimentais com as complicações encontradas na prática diária que freqüentemente ocorrem antes de sete dias de pós-operatório.

No presente estudo foi utilizado nas anastomoses o fio monofilamentar de *nylon 6-0*. A escolha do fio é justificada por se desejar mínima reação inflamatória tecidual para não interferir na cicatrização, ocasionando eventuais erros na análise dos dados. Vizzoto Junior (2001), Soares (2001), Costa (2002), Ferreira (2004), Gonçalves (2005) e Ferreira *et al.*, 2006 realizaram secções completas do cólon dos animais nos seus respectivos experimentos, seguidas de confecção de anastomoses colo-colônicas término-terminais com sutura interrompida. No presente estudo, foi executado o mesmo padrão de confecção das anastomoses, permitindo a correlação e a comparação entre os estudos anteriores.

A manutenção anestésica no presente estudo foi realizada com Ketamina e Xilazina intra-muscular, assim como nos estudos realizados por Orlando *et al.* (1999), Boylu *et al.* (2005), Ekmektzoglou *et al.* (2006) e segundo protocolo anestésico descrito por Oliveira (2008). A maioria dos estudos que envolvem a

mesma linha de pesquisa de cicatrização da Pós-Graduação da Clínica Cirúrgica utilizam o protocolo descrito por Bacelar Junior (1998) (hidrato de cloral a 10%). No presente estudo optou-se por não utilizar anestésico por via intraperitoneal para não haver viés na análise de resultados, uma vez que a indução de toxemia também foi realizada por via intraperitoneal. A técnica anestésica foi considerada efetiva e não houve complicações que comprometessem a evolução pós-operatória do animal.

Vários estudos experimentais foram realizados com o objetivo de avaliar a influência da desnutrição na cicatrização. Entretanto, o método de desnutrição, e os parâmetros utilizados para sua avaliação não seguem o mesmo padrão, apresentando grandes diferenças entre os estudos realizados. A maioria dos experimentos utilizou dietas hipoprotéicas ou isenta de proteínas para promover a desnutrição. Entretanto, não existe uniformidade nos métodos, e a quantidade de proteínas varia de zero a 5,5% da constituição da dieta (ZAIZEN *et al.*, 1990; IRVIN; HUNT, 1974; WARD *et al.*, 1982; IRVIN, 1976). O modelo de desnutrição utilizado neste experimento baseou-se na restrição calórica de 50% da ingestão alimentar de ração padrão do grupo controle alimentado *ad libitum*, mantendo-se a concentração protéica habitual de 22% (*pair-feeding*).

Clinicamente é muito difícil encontrar casos puros de desnutrição calórica ou protéica, e a maioria dos pacientes apresentam uma combinação de desnutrição protéico-energética. Desta forma, a escolha da restrição alimentar de 50% da média ingerida pelo grupo controle objetivou simular a desnutrição encontrada em pacientes cirúrgicos. Ferreira, *et al.* (2006), Coelho-Lemos (2003), Gonçalves (2005), Schmitz (2006), Felgines *et al.* (1999) também utilizaram este método de desnutrição. Este método é também denominado de *pair feeding*, ou seja, alimentação pareada. O método de alimentação pareada possui vantagens sobre outros métodos, uma vez que não demanda dietas especializadas (com diminuição ou ausência de proteínas) e reproduz estados de deficiência de ingestão nutricional. Além disso, neste modelo o cálculo da ingestão alimentar do grupo controle foi mensurado diariamente. Desta forma, as possíveis variações temporais, ambientais e fisiológicas presentes no grupo controle eram transmitidas para o grupo de estudo. Assim, pelo já exposto, acredita-se que o método de desnutrição usado neste experimento tenha sido adequado para promover estado de desnutrição protéico-energética moderada.

Outro fato a ser considerado é o período de restrição calórica ou protéica necessário para promover desnutrição e alterações na cicatrização. As alterações significativas da cicatrização foram observadas em estudos experimentais em que o período de desnutrição excedeu 7 semanas, promovendo grau de desnutrição importante (presença de perda de peso acima de 1/3 do peso corporal normal) (IRVIN, 1978; ZAIZEN *et al.*, 1990). No presente estudo foi utilizado o período de desnutrição de 21 dias (3 semanas), com o intuito de promover grau moderado de desnutrição nos ratos (FERREIRA *et al.*, 2006; GONÇALVES, 2005; SCHMITZ, 2006; COELHO-LEMOS, 2003).

A aferição do peso é parâmetro clínico nutricional utilizado em vários estudos de cicatrização em anastomoses gastrintestinais e foi fundamental na avaliação do presente estudo, principalmente com o objetivo de correlacionar o estado nutricional com as alterações na cicatrização colônica. Irvin e Hunt (1984), Ward *et al* (1982), Karahasanoglu *et al.* (1998), Ferreira *et al.* (2006) também estudaram os efeitos da desnutrição em ratos e utilizaram o peso como parâmetro mais importante de avaliação da desnutrição.

No presente estudo, a média do peso inicial dos animais do grupos C, DT e DTN foram homogêneas no início do experimento ($p=0,86$). A indução de desnutrição protéico-energética por meio de restrição em 50% da dieta padrão, promoveu redução ponderal progressiva até o 21^o dia do experimento, representada pela redução da média de peso de 21,87% e 20,12% em relação à média inicial no grupo DT e DTN, respectivamente. A perda de peso dos grupos submetidos à *pair-feeding* foi efetiva em relação ao grupo controle no final dos 21 dias. Resultados semelhantes foram encontrados em trabalhos realizados por Ferreira *et al.* (2006) e Gonçalves (2005).

Após o período de 21 de indução de desnutrição, os ratos foram submetidos à indução de toxemia por quatro dias (DT e DTN) ou à injeção de solução salina (C). O grupo C reduziu seu peso em 6,40% do 21^o dia do experimento até o dia da cirurgia (26^o dia). Este fato ocorreu provavelmente devido às injeções diárias de solução fisiológica (manipulação). O grupo DT recebeu injeções diárias de LPS por um período de 4 dias e continuou, neste período, com restrição dietética de 50% do grupo controle até a cirurgia. No dia da cirurgia, este grupo também apresentou perda de peso (5,07%) comparando o 21^o dia do experimento com o dia da cirurgia. Ambos grupos perderam peso, o que mostra que a manipulação do animal com

placebo também pode contribuir como fator de anorexia. Ishumura *et al.* (2002) demonstraram que a perda de peso nos ratos que receberam 0,5mg/Kg de LPS intra-peritoneal não foi significativa quando comparada ao grupo controle, e não houve diferença na ingesta alimentar nos dois grupos, contrário ao observado no presente estudo.

Por outro lado, o grupo DTN que recebeu nutrição pré-operatória por 10 dias, juntamente com a indução da toxemia, apresentou ganho de peso de 17,13% em relação ao peso no 21º dia de experimento. A análise de peso no momento da cirurgia evidenciou que a média foi inferior nos grupos DT e DTN em relação ao grupo controle (C). Entretanto, a média de peso do grupo DTN foi maior que a do grupo DT. O ganho de peso do grupo DTN no dia da cirurgia não foi suficiente para alcançar os valores do grupo C (10 dias de nutrição). Resultados semelhantes foram encontrados em estudo sobre desnutrição e nutrição pré-operatória realizado por Gonçalves (2005) em ratos sem toxemia. Em contrapartida, evidenciou-se que o grupo DTN manteve peso superior ao grupo DT, no dia do sacrifício, e semelhante ao grupo C ($p=0,15$). Este dado demonstra que a nutrição pré-operatória por 10 dias associada aos 4 dias de nutrição pós-operatória foram suficientes para aumentar a média de peso dos ratos e, assim, alcançar a média do grupo controle. Giovambattista *et al.* (2000) também encontraram dados semelhantes em seu estudo, em que os ratos desnutridos e com toxemia (LPS) necessitaram de 15 dias de nutrição *ad libitum* para igualar o peso ao grupo controle.

Outro estudo que teve resultado semelhante foi realizado por Gonçalves (2005). A autora estudou os efeitos da nutrição pré-operatória na cicatrização de anastomoses colônicas em ratos desnutridos. Os ratos desnutridos foram alimentados com 50% da média de ingestão alimentar do grupo controle durante 21 dias (D) e o grupo com nutrição pré-operatória (PRÉ) foi alimentado com 50% da dieta do grupo controle durante 21 dias e após receberam nutrição pré-operatória com ração padrão *ad libitum* durante 7 dias. O grupo controle (C) foi alimentado com ração padrão *ad libitum* durante 21 dias. Os animais no grupo desnutrido (D) e nutrição pré-operatória (PRÉ) apresentaram perda ponderal progressiva nos 21 dias iniciais do experimento com redução da média de peso de 26,88% e 23,2% em relação à média inicial no grupo D e PRÉ. O grupo PRÉ apresentou ganho ponderal de 25,45% após 7 dias de nutrição pré-operatória. A análise do peso no momento da cirurgia evidenciou que a média foi maior no grupo controle (C) em relação ao grupo

D e PRÉ. Entretanto, a média de peso do grupo PRÉ foi maior que a do grupo D. Após a cirurgia, os grupos C e PRÉ apresentaram perda ponderal inicial discreta, seguida de ganho ponderal. No grupo D foi demonstrado aumento discreto do peso. Entretanto, não foi demonstrada diferença estatística significativa.

Outra variável observada no presente estudo foi a albumina. A análise da albumina sérica teve como objetivo confirmar a desnutrição. Irvin e Hunt (1974) também utilizaram níveis de albumina sérica em seus estudos e observaram que trata-se de um bom método de avaliação em ratos submetidos a longos períodos de desnutrição. No presente estudo, o tempo de desnutrição foi de 21 dias; a albumina foi coletada somente no dia do procedimento cirúrgico devido a sua meia-vida (em torno de 20-21 dias). Assim, acredita-se que a albumina seja um bom parâmetro, juntamente com o peso, para confirmar o estado nutricional dos ratos.

Vários trabalhos confirmam a correlação da albumina com a força da parede colônica e demonstram que esta é o melhor preditor de desnutrição na cicatrização colônica (IRVIN, 1978; LAW e ELLIS, 1990; WINDSOR, 1993; ARNOLD e BARBUL, 2006). O valor de albumina sérica no presente experimento foi estatisticamente inferior no grupo DT em relação ao grupo DTN e C. A nutrição pré-operatória de 10 dias aumentou o valor da média da albumina sérica para valores semelhantes ao grupo controle. Podemos, assim, observar que o ganho de peso no grupo DTN foi acompanhado da elevação de níveis séricos de albumina.

Os resultados encontrados no presente experimento foram semelhantes ao estudo realizado por Irvin e Hunt (1974). Estes autores estudaram ratos submetidos à dieta isenta de proteínas por períodos de 3, 5 e 7 semanas. Os ratos submetidos à desnutrição por período de 3 semanas apresentaram perda de peso de 25% em relação ao peso inicial, e o nível sérico de albumina no grupo desnutrido foi $3,02\text{mg/dl} \pm 0,07$ em comparação a $3,58\text{mg/dl} \pm 0,08$ no grupo controle. No estudo de Gonçalves (2005), a albumina sérica foi mensurada no 21º dia de experimento nos três grupos de experimento (C, D, PRÉ). Houve diferença significativa na média da albumina sérica entre os grupos. Comparando os grupos dois a dois, observou-se que os grupos D e PRÉ apresentaram média de albumina sérica estatisticamente inferior a do grupo C. Entretanto, não houve diferença significativa entre os grupos D e PRÉ.

No presente estudo foi realizada nutrição perioperatória por 14 dias, divididos em 10 dias no pré-operatório e 4 dias no pós-operatório. O período de 14

dias de nutrição perioperatória foi baseado nos trabalhos pesquisados para o presente estudo. Estudos clínicos sugerem que a nutrição parenteral ou enteral por 7 a 10 dias no pré-operatório reduzem a incidência de complicações pós-operatórias (DETSKY *et al.*, 1987; KLEIN *et al.*, 1997; SOETERS *et al.*, 2002). Giovambattista e colaboradores estudaram, em 2000, a influência da restrição crônica de dieta na resposta neuroendócrina e imune durante a fase aguda no choque séptico e o efeito da realimentação nesta condição (15 dias). LPS foi administrado intraperitonealmente em três grupos diferentes de ratas: (1) bem-nutridas/ controles; (2) desnutridas; (3) desnutridas realimentadas. Os autores concluíram que os efeitos induzidos pela desnutrição crônica podem ser revertidos com retorno ao peso corpóreo normal. Gonçalves (2005) em estudo experimental utilizou período de 7 dias de nutrição pré-operatória e evidenciou melhora dos parâmetros que avaliaram a cicatrização das anastomoses colônicas.

Outra condição associada no presente estudo foi a indução de toxemia. Existem várias formas de se induzir sepse peritonial e os autores discorrem sobre vantagens e desvantagens de cada método (DEITCH, 2005; WICHTERMAN *et al.*, 1980; BENJAMIN, 2001; REMICK *et al.*, 2005). No presente estudo, optou-se pela indução de toxemia por injeção intraperitoneal de lipopolissacarídeo (LPS). A escolha do modelo experimental levou em consideração a facilidade de seu uso e a possibilidade de aplicação da dosagem exata de LPS para todos os animais. A via de administração de LPS escolhida foi a intraperitoneal, por se aproximar de um quadro de sepse observado na clínica, como foi visto em vários estudos. (ISHIMURA *et al.*, 1998; SUKHOTNIK *et al.*, 2003; DING *et al.*, 2004).

A dose e o período de aplicação de LPS é variável nos estudos revisados. A dose utilizada no presente estudo foi de 1mg/Kg/dia (LEU *et al.*, 2005). Utilizou-se quatro dias de aplicações diárias, levando em conta o modelo esperado de toxemia crônica que deve ultrapassar um período superior a 48 horas (SIMONS *et al.*, 1996). Após a aplicação de LPS, os animais apresentaram-se letárgicos, com pêlos eriçados, com hiperemia ocular e blefarites, principalmente após 1 hora da injeção. Os sintomas apresentavam regressão gradual após cada dose diária de LPS. Estas manifestações sistêmicas também foram relatadas nos experimentos de Ding *et al.* (2004) e Fish e Spitzer (1984).

Os níveis séricos de leucócitos, bastonetes, plaquetas, proteína C reativa, fator de necrose tumoral e interleucina-6 foram dosados para comprovar o estado toxêmico dos ratos (KIYAMA *et al.*, 2000).

A medida sérica de leucócitos no grupo DT foi maior que nos grupos DTN e C. A leucocitose é freqüentemente interpretada como evidência de infecção. Contudo, a leucocitose não é um marcador específico ou sensível de infecção. O número de leucócitos pode aumentar após hemorragia gastrointestinal, transfusão sangüínea, cirurgia ou uso de corticosteróides (DALE, 1975). Por este motivo, outros exames foram coletados para confirmar a toxemia dos animais. A média de bastonetes também foi avaliada e foi superior no grupo DT em relação aos outros grupos.

A contagem de plaquetas está diminuída na maioria dos pacientes com sepse. Trombocitopenia costuma atingir até 40% dos pacientes com sepse, e uma diminuição de mais de 50% da contagem normal ocorre na maioria dos pacientes (CONSENSO BRASILEIRO DE SEPSE). O nível plasmático de plaquetas foi inferior no grupo DT em comparação com o grupo DTN. Os valores encontrados no grupo DTN foram inferiores ao grupo C, evidenciando que os ratos, mesmo após 10 dias de nutrição pré-operatória e após 6 dias sem indução de toxemia, ainda estavam plaquetopênicos.

A dosagem de PCR é tecnicamente fácil e de custo pouco elevado. Os níveis de PCR podem permanecer elevados por mais tempo que outros marcadores de inflamação em um processo de resolução do quadro séptico e podem elevar-se mesmo em infecções menores (MEISNER *et al.*, 1999). A medida da proteína C reativa, no grupo DT, no presente estudo, foi superior ao grupo DTN e ao grupo C. O grupo DTN teve níveis inferiores ao grupo DT, mas superiores ao grupo C, mesmo após 6 dias sem indução de toxemia, porém sabemos que o trauma cirúrgico isolado já pode ocasionar aumento de PCR.

Vários estudos foram conduzidos para relacionar a IL-6 com o prognóstico de pacientes sépticos. As medidas de concentrações plasmáticas de IL-6 têm sido sugeridas como um marcador para melhorar o diagnóstico precoce de sepse (CONSENSO BRASILEIRO DE SEPSE). Outro marcador importante na sepse é o fator de necrose tumoral, que é um dos mediadores precocemente liberado na sepse (BENJAMIN, 2001). No presente estudo os valores de TNF no grupo DT foram maiores estatisticamente quando comparados com o grupo DTN. Com relação à

dosagem de interleucina-6, não houve diferença quando se comparou os grupos DT e DTN, porém os valores dos grupos DT e DTN foram estaticamente maiores que o grupo controle. Alguns autores, como Ishimura (1998) reforçam a idéia de que o pico de IL-6 é de 6-12h após a indução de sepse, porém sabe-se que a desnutrição e o procedimento cirurgico podem induzir a liberação de muitos componentes pró-inflamatórios como a IL-6 e TNF, mesmo na ausência de sepse (LING *et al.*, 2004; YEH *et al.*, 2001). Portanto, os resultados dos exames de laboratório confirmam a indução da toxemia nos animais e demonstraram resultados ainda mais expressivos com a combinação de desnutrição e cirurgia. Possivelmente, os valores laboratoriais encontrados no grupo DTN se explicam pelo tempo decorrido entre a última aplicação de LPS e o momento da coleta de sangue.

A análise da cicatrização necessita de processos de quantificação de acordo com Hendriks e Mastboom (1990). Os principais parâmetros utilizados são: clínicos, mecânicos, bioquímicos e imunoistológicos. No presente estudo, optou-se pelo uso de parâmetros clínicos, método mecânico (força tênsil) e método imunoistológico: *picrosirius*, microscopia de polarização para análise da densitometria do colágeno e mensuração de miofibroblastos e vasos sanguíneos.

Os parâmetros clínicos possuem menor precisão na avaliação da cicatrização, uma vez que consideram variáveis subjetivas (VIZZOTTO JUNIOR, 2001; COSTA, 2002; BONIN, 2003). No presente estudo, semelhante aos acima citados, não houve diferença na cicatrização entre os grupos quando avaliada sob o prisma clínico de evolução. O número de óbitos como conseqüência da presença de deiscências das anastomoses colônicas também é medida indireta da deficiência da cicatrização destas anastomoses, provavelmente decorrente da desnutrição e da toxemia. No presente trabalho houve 11 óbitos; 6 ocorreram no grupo desnutrido toxêmico e 5 óbitos no grupo desnutrido toxêmico realimentado. Seis mortes ocorreram por deiscência de anastomose: três no grupo DT e três no grupo DTN, sem diferença estatística. Não houve nenhum óbito no grupo controle.

Os parâmetros mecânicos são utilizados com freqüência em estudos de cicatrização de suturas intestinais. Os dois métodos de avaliação mais empregados são: pressão de explosão/ruptura e força de tração/tensão. As duas técnicas se diferenciam fundamentalmente pela direção que as forças agem sobre as suturas. Existe controvérsia entre autores sobre qual método seria o mais fidedigno para se avaliar a resistência da anastomose. A força tênsil é uma importante determinante

da força da anastomose quando comparada à pressão de explosão, que avalia a integridade da anastomose como um todo, mas reflete a cicatrização de uma forma menos acurada. (EKMEKTZOGLOU *et al.*, 2006). O uso da força de ruptura na avaliação das anastomoses intestinais é mais recente (NARESSE *et al.*, 1987 e 1993; LEITE *et al.*, 1993), entretanto, demonstrou ser um parâmetro de avaliação preciso e caracterizado por fácil reprodutibilidade (VIZZOTO JUNIOR, 2001; COSTA, 2003; FERREIRA, 2004). Ikeuchi *et al.* (1999) demonstraram forte correlação entre os métodos pressão de ruptura e força de ruptura na avaliação da resistência das anastomoses. A correlação é maior após o quarto dia de pós-operatório. No presente estudo, a FMT foi considerada a variável de maior importância (padrão-ouro), com base em estudos já realizados na mesma linha de pesquisa deste Programa de Pós-graduação. O equipamento utilizado para o estudo de tração foi preciso e confiável e semelhante ao utilizado por Vizzoto Junior (2001), Soares (2001), Costa (2002), Bonin (2003), Ferreira (2004), Gonçalves (2005), Alves (2006).

Não ocorreram, no presente estudo, rupturas fora da linha anastomótica, durante os testes de tração. Em relação à força máxima de tração (FMT), os valores foram menores no grupo DT em relação aos grupos DTN e C. A FMT foi semelhante nos grupos DTN e C, sem diferença estatística. Na medida de tensão máxima (TM) das anastomoses, também encontramos valores inferiores no grupo DT quando comparados ao grupo DTN e C. Não houve diferença estatística entre os grupos DTN e C. Resultados semelhantes foram encontrados no estudo de Gonçalves (2005). Esta autora demonstrou em seu estudo que o grupo desnutrido (D) apresentou média de FMT estatisticamente inferior à do grupo controle (C). A FMT foi estatisticamente maior no grupo com nutrição pré-operatório (PRÉ) em relação ao grupo D. Comparando os grupos C e PRÉ, os valores foram muito semelhantes, não demonstrando diferença estatística significativa.

Sabe-se que outra situação que influencia negativamente a cicatrização das anastomoses colônicas é a sepse. Ahrendt *et al.* (1994) investigaram a cicatrização da anastomose de cólon em modelo experimental de sepse. A sepse resultou na piora da cicatrização da anastomose de cólon, refletida pela diminuição da pressão de explosão e diminuição da concentração de hidroxiprolina. Ishimura *et al.* (1998) avaliaram a integridade da cicatrização da parede intestinal após uma cirurgia digestiva sob condições sépticas e observaram a expressão local da IL-6 em volta

do segmento anastomótico. As medidas de pressão de explosão foram significativamente menores no grupo LPS que no grupo controle 7 dias após a cirurgia. Kiyama *et al.* (2000) estudaram a influência da nutrição pós-operatória precoce na cicatrização de anastomoses colônicas na presença de sepse intra-abdominal em ratos. A nutrição precoce resultou em aumento na pressão de explosão e na concentração de colágeno total no sítio das anastomoses, comparado com o grupo de nutrição tardia. Os autores concluíram que a nutrição precoce tem efeito positivo na cicatrização de anastomoses na presença de sepse intra-abdominal, semelhante aos resultados observados no presente estudo.

Os dados obtidos no presente estudo ressaltam efeitos benéficos da nutrição perioperatória no principal parâmetro de cicatrização de anastomoses colônicas em ratos, que é a resistência mecânica das anastomoses. A desnutrição protéico-energética associado à toxemia causou diminuição significativa da resistência mecânica da anastomose colônica (diminuição da TM e da FMT) em relação ao grupo controle. Em contraste, os ratos que receberam nutrição perioperatória durante 14 dias apresentaram aumento significativo da resistência mecânica, demonstrado por índices de TM e FMT semelhantes aos encontrados no grupo controle. Resultados semelhantes também foram encontrados no estudo de Ward *et al.*, em 1982 e Daly *et al.*, em 1972.

Ward *et al.* (1982) investigaram o efeito da reintrodução precoce de dieta via oral na anastomose colônica em ratos com desnutrição protéica moderada. Este estudo demonstrou que a reintrodução precoce de nutrição após a cirurgia pode reverter os efeitos da desnutrição nas anastomoses colônicas. DALY *et al.* (1972) também demonstraram que ratos privados de proteína por apenas uma semana demonstraram 17% de redução na média de força de explosão colônica quando comparados ao grupo controle.

A análise da quantificação da hidroxiprolina é utilizada em muitos estudos como avaliação do colágeno das anastomoses (MILLER e GAY, 1982; FERREIRA, 2006; ISHIMURA, 2002; CIHAN, 2004). Entretanto, vale ressaltar que os vários tipos de colágeno apresentam quantidades distintas de hidroxiprolina; dessa forma, a dosagem de hidroxiprolina é um método indireto de avaliar a deposição de fibras de colágeno, gerado durante o processo de cicatrização da anastomose (BEZUTI *et al.*, 2002). Mais recentemente, tem sido dada ênfase ao uso de métodos qualitativos de avaliação de colágeno (HENDRICKS e MASTBOOM, 1990; RABAU *et al.*, 1998). A

coloração de *picrosirius* com microscopia polarizada diferencia as fibras colágenas de acordo com a sua birrefringência; as fibras de maior espessura (colágeno do tipo I) aparecem fortemente birrefringentes e fibras de menor espessura (colágeno tipo III) aparecem fracamente birrefringentes. Esta diferenciação de cores permite análise qualitativa das fibras colágenas, obtendo-se a densitometria de fibras maduras (colágeno tipo I) e imaturas (colágeno tipo III) que, em última análise, reflete a proporção de entrelaçamento das fibras (SWEAT, PUCHTLER e ROSENTHAL, 1964; JUNQUEIRA, MONTES e SANCHES, 1982).

Com base em estudos progressos e pelas vantagens oferecida pelo método, foi utilizado no presente estudo a coloração de *picrosirius* através da microscopia polarizada (COSTA, 2002; BONIN, 2003; FERREIRA, 2004; GONÇALVES, 2005; ALVES, 2006 e SCHMITZ, 2006). Foi considerada a média de três medidas distintas (superior, média e inferior) visualizadas no campo microscópico da linha de sutura, como medida da porcentagem de fibras colágenas. Esta avaliação foi baseada no estudo de Biondo-Simões *et al.* (2001). Com o uso deste método, os diferentes tipos de fibras colágenas podem ser identificados e quantificados.

De acordo com a análise realizada pela coloração de *picrosirius* com microscopia polarizada, no presente estudo, os grupos DT e DTN não apresentaram diminuição do colágeno tipo I em relação ao grupo controle. Também não houve diferença na porcentagem de colágeno tipo III entre os três grupos. Entretanto, observou-se porcentagens maiores de colágeno tipo III em relação ao colágeno tipo I nos grupos DT e DTR, demonstrados por IMaC inferiores a 1. O grupo C apresentou IMaC superior a 1, mas sem significado estatístico quando comparado com grupos DT e DRT. Outros trabalhos encontraram resultados semelhantes. Rabau *et al.* (1998), utilizaram análise quantitativa e qualitativa (*picrosirius*) para avaliar a cicatrização de anastomoses intestinais em ratos, comparando grupo controle (sem anastomose) e grupo experimental (anastomose intestinal), sacrificados nos dias 4°, 7°, 10° e 21° de pós-operatório). Os autores verificaram que a análise quantitativa (concentração total de colágeno) não demonstrou alterações significativas nos grupos submetidos à anastomose intestinal. Coelho-Lemos *et al.* (2003), em estudo para verificar a influência da desnutrição intra-uterina na cicatrização da parede abdominal em ratos lactentes, idealizou o índice de maturação do colágeno (IMaC). Este índice foi definido como a razão entre as porcentagens de colágeno tipo I e tipo III. O achado de valores acima de 1 significa

predominância de colágeno tipo I. A autora observou predomínio de colágeno tipo I na fase inicial da cicatrização no grupo de ratos desnutrido no 7º dia de pós-operatório, com aumento estatisticamente significativo do percentual de colágeno tipo I em todos os animais (nutridos e desnutridos) no 21º dia de pós-operatório. A correlação entre o IMaC e os estudos de resistência à tração foi negativa no 7º dia de pós-operatório e positiva no 21º dia de pós-operatório.

Kiyama *et al.* (2000) estudaram a influência da nutrição pós-operatória precoce na cicatrização de anastomoses colônicas na presença de sepse intra-abdominal em ratos. A percentagem de colágeno total nas anastomoses foi 17,2% maior no grupo que recebeu nutrição precoce que no grupo que recebeu nutrição tardiamente no pós-operatório. A diferença foi devido ao maior conteúdo de colágeno maduro no grupo de nutrição precoce. Gonçalves (2005) em estudo de nutrição pré-operatória em ratos desnutridos avaliou a anastomose colônica no 5º dia de pós-operatório com *picrosirius* e microscopia polarizada, e demonstrou maior porcentagem de colágeno tipo III em todos os grupos (C, D, PRÉ), resultando em IMaCs inferiores a 1.

Tem sido relatado que a força tênsil de um tecido está relacionada à quantidade de colágeno encontrada (IRVIN, 1974). Entretanto, no presente estudo verificou-se que a tensão máxima e a força máxima de tração estavam aumentados no grupo DTN em comparação ao grupo DT. Estes achados não se repetiram na análise da densitometria do colágeno. Estes resultados confirmam observações de outros autores que não encontraram correlação entre as alterações da resistência mecânica e o conteúdo de colágeno na zona anastomótica (BLOMQUIST *et al.*, 1985; JIBORN, *et al.* 1978 a e b; HÖGSTRÖM *et al.*, 1985). O colágeno tipo III representa uma fração na estrutura do colágeno que é rapidamente perdida durante estados catabólicos como a sepse (AHRENDT, *et al.*, 1996). A sepse sistêmica ou a infecção intra-abdominal diminuem a cicatrização do cólon, provavelmente pela perda da estrutura do colágeno e pela diminuição na síntese de reparação do colágeno (KIYAMA *et al.*, 2000). Na desnutrição, ao que tudo indica, a falha na cicatrização poderá ser decorrente do depósito inadequado de colágeno, com prováveis alterações das ligações intra e intermoleculares (HOGSTROM, 1987). No presente estudo, a nutrição perioperatória por um período de 14 dias não foi suficiente para alterar as percentagens de deposição de colágeno na zona anastomótica.

Há poucos relatos na literatura pesquisada sobre a avaliação de miofibroblastos e angiogênese na cicatrização de anastomoses colônicas. Nenhum artigo foi encontrado sobre a utilização de anticorpos anti-actina e anti-fator VIII na avaliação da cicatrização de ratos desnutridos e/ou toxêmicos.

Os miofibroblastos são células produtoras de colágeno, predominantemente do tipo I e sua quantificação também pode ser usada com método de avaliação da cicatrização (CHAMSON; FREY e HIVERT, 1982; TIPTON; DABBOUS, 1995). O 5^o dia pós-operatório representa a fase precoce de fibroplasia e proliferação celular na cicatrização. Fibroblastos aparecem na ferida por volta do 3^o dia e proliferam em resposta ao fator de crescimento e começam a produzir colágeno (KIYAMA, 1998). No presente estudo encontrou-se valores superiores de miofibroblastos no grupo DTN (que recebeu 14 dias de nutrição perioperatória), comparativamente ao grupo DT, porém a média de miofibroblastos encontrados na anastomose colônica no grupo DTN não atingiu a média dos valores encontrados no grupo C.

Portanto, no presente estudo, a desnutrição e a toxemia podem ser causas da diminuição da proliferação de miofibroblastos, assim como a ação semelhante da nicotina em estudos de Skinovsky (2005) e Alves (2006). Em suma, a nutrição perioperatória aumentou o número de miofibroblastos em relação ao grupo desnutrido toxêmico, mas este incremento não alcançou os valores encontrados no grupo C. Os miofibroblastos são células produtoras de colágeno, predominantemente do tipo I, porém o aumento de seu número nas anastomoses do grupo DTN não trouxe repercussões na densitometria do colágeno.

A quantidade de vasos sanguíneos presentes na anastomose é outro parâmetro de avaliação da cicatrização. A angiogênese está relacionada com a liberação de fatores de crescimento produzidos por diversas células envolvidas no processo de cicatrização (ORGILL e DEMLING, 1988). Sabe-se que a sepse (toxemia) influencia diretamente a cicatrização de anastomoses e indiretamente a angiogênese pela liberação de óxido nítrico. A angiogênese é desencadeada quando o organismo percebe a necessidade de fluxo sanguíneo adicional em determinado local. Observou-se, no presente estudo, que os dois grupos submetidos à desnutrição e toxemia apresentaram um maior número de vasos sanguíneos (intensa neovascularização na zona anastomótica) em comparação ao grupo controle, independentemente da nutrição perioperatória.

6 CONCLUSÃO

A nutrição perioperatória em ratos desnutridos e toxêmicos demonstra ser benéfica no processo de cicatrização de anastomoses colônicas, no 5^o dia de pós-operatório, pois:

1. Aumenta a tensão máxima e a força máxima de tração comparado ao grupo desnutrido e toxêmico e é semelhante ao grupo controle;
2. Não modifica a deposição de colágeno tipo I (maduro) e tipo III (imaturo) comparado ao grupo desnutrido toxêmico e ao controle;
3. Não modifica a angiogênese quando comparado ao grupo desnutrido toxêmico.
4. Aumenta a proliferação de miofibroblastos comparado ao grupo desnutrido e toxêmico, porém inferior ao controle;

REFERÊNCIAS

AHRENDT, G. M.; GARDNER, K.; BARBUL, A. Loss of colonic structural collagen impairs healing during intra-abdominal sepsis. **Arch Surg**, Chicago, v. 129, n. 11, p. 1179-1183, nov. 1994.

AHRENDT, G. M.; TANTRY, U.; BARBUL, A. Sepsis impairs colonic reparative collagen synthesis. **Am J Surg**, New York, v. 171, p. 102-108, 1996.

ALVES, M. R. **Influência da nicotina, durante a gestação e lactação, na cicatrização da parede abdominal de ratos lactentes: estudo tensiométrico, morfométrico e imunoistoquímico**. 142f. Tese (Doutorado em Clínica Cirúrgica) – Setor Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

AMATI, L.; CIRIMELE, D.; PUGLIESE, V.; COVELLI, V.; RESTA, F.; JIRILLO, E. Nutrition and immunity: laboratory and clinical aspects. **Curr Pharm Des**, Netherlands, v. 9, p. 1924–1931, 2003.

AMERICAN COLLEGE OF CHEST PHYSICIANS/SOCIETY OF CRITICAL CARE MEDICINE. Consensus Conference: Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. **Crit Care Med**, New York, v. 20, n. 6, p. 864-874, 1992.

American Dietetic Association. American Academy of Family Physicians. Nutrition Screening Initiative. Nutrition statement of principle. 2002. Available at: http://www.eatright.org/cps/rde/xchg/ada/hs.xsl/login_search_ENU_HTML.htm?dosearch=1&search=Statement+of+Principle&x=14&y=13. Accessed March 2, 2006.

ANGUS, D. C.; WAX, R. S. Epidemiology of sepsis: an update. **Crit Care Med**, New York, v. 29, s. 7, p. S109-116, 2001a.

ANGUS, D.; LINDE-ZWIRBLE, W. T.; LIDICKER, J.; CLERMONT, G.; CARCILLO, J.; PINSKY, M.R. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated cost of care. **Crit Care Med**, New York, v. 29, p. 1303-1310, 2001.

ARNOLD, F.; WEST, D. C. Angiogenesis in wound healing. **Pharmacol Ther**, Oxford, v. 52, p. 407-422, 1991.

ARNOLD, M.; BARBUL, A. Nutrition and Wound Healing. **Plast Reconstr Surg**, Baltimore, v. 117, p. 42S-58S, jun. 2006.

ATTARD, J-A. P.; RAVAL, M. J.; MARTIN, G. R.; KOLB, J.; AFROUZIAN, M.; BUIE, W. D.; SIGALET, D. L. The Effects of Systemic Hypoxia on Colon Anastomotic Healing: An Animal Model. **Dis Colon Rectum**, New York, v. 48, n. 7, p. 1460-1470, jul. 2005.

- BAGBY, G. J.; PLESSLA, K. L.; WILSON, L. A.; THOMPSON, J. J.; NELSON, S. Divergent efficacy of antibody to tumor necrosis factor-alpha in vascular and peritonitis models of sepsis. **J Infect Dis**, Chicago, v. 163, p. 83-88, 1991.
- BARTLETT, J. G.; ONDERDONK, A. B.; LOUIE, T.; KASPER, D. L.; GORBACH, S. L. Lessons learned from an animal model of intra-abdominal sepsis. **Arch Surg**, Chicago, v. 113, p. 853-857, 1978.
- BARTON, M. H.; COLLATOS, C.; MOORE, J. N. Endotoxin induced expression of tumor necrosis factor, tissue factor and plasminogen activator inhibitor activity by peritoneal macrophages. **Equine Vet J**, London, v. 28, p. 382-389, 1996.
- BASILE-FILHO, A.; SUEN, V. M. M.; MARTINS, M. A.; COLETTI, F. A.; MARSON, F. Monitorização da resposta orgânica ao trauma e à sepse. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 34, p. 5-17, jan./mar. 2001.
- BATISTA FILHO, M.; RISSIN, A. A transição nutricional no Brasil: tendências regionais e temporais. **Cad Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 19 (Supl. 1), p. S181-S191, 2003.
- BATTEGAY, E. J. Angiogenesis: mechanistic insights, neovascular diseases and therapeutic prospects. **J Mol Med**, Amsterdam, v. 73, p. 333-346, 1995.
- BENBAREK, H.; DEBY-DUPONT, G.; CAUDRON, I.; DEBY, C.; LAMY, M.; SERTEYN, D. Failure of lipopolysaccharides to directly trigger the chemiluminescence response of isolated equine polymorphonuclear leukocytes. **Vet Res Commun**, Amsterdam, v. 21, n. 7, p. 477-482, 1997.
- BENBAREK, H.; DEBY-DUPONT, G.; CAUDRON, I.; GRULKE, S.; DEBY, C.; LAMY, M.; SERTEYN, D. Interactions between lipopolysaccharides and blood factors on the stimulation of equine polymorphonuclear neutrophils. **Vet Immunopathol**, Amsterdam, v. 64, n. 4, p. 313-322, 1998.
- BENJAMIM, C. F. Atualização sobre mediadores e modelos experimentais de sepse. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 34, p. 18-26, jan./mar. 2001.
- BEUTLER, B. Innate immune sensing of microbial infection: the mechanism and the therapeutic challenge. **Wien Med Wochenschr**, Wien, v. 152, p. 547-551, 2002.
- BEUTLER, B. Science review: key inflammatory and stress pathways in critical illness- the central role of the Toll-like receptors. **Crit Care**, London, v. 7, p. 39-46, 2003.
- BEUTLER, B.; GREENWALD, D.; HULMES, J. D.; CHANG, M.; PAN, Y. C.; MATHINSON, J.; CERAMI, A. Identity of tumor necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. **Nature**, London, v. 316, p. 552-554, 1985.
- BEUTLER, B.; RIETSCHHEL, E. T. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. **Nature**, London, v. 3, p. 169-176, feb. 2003.

BEYAERT, R.; FIERS, W. Tumor necrosis factor and lymphotoxin. In: MIRE-SLUIS, A.; THORPE, R. **Citokines**. California: Academic, 1998, p. 335-360.

BEZUTI, M. T.; FÉRES, O.; CAMPOS, A. D.; APRILLI, F.; DA ROCHA, J. J. R.; GARCIA, R. S.; JOVILIANO, O. F. D. Cicatrização de anastomoses colônicas na vigência de obstrução intestinal: estudo experimental em ratos. **Acta Cir Bras**, São Paulo, v. 17 (supl.3), p. 109-115, 2002.

BIRKE, H.; THORLACIUS-USSING, O.; HESSOV, I. Trophic effect of dietary peptides on mucosa in the rat small bowel. **JPEN**, Silver Spring, v. 14, p. 265, aug. 1990.

BLOMQUIST, P.; JIBORN, H.; ZEDERFELDT, B. The effect of relative bowel rest on healing of colonic anastomosis: Breaking strength and the collagen in the colonic wall following left colon resection and anastomosis in the rat. **Acta Chir Scand**, Stockholm, v. 150, p. 671-675, 1984.

BONIN, E. A. **Pantoprazol por via subcutânea e cicatrização de sutura gástrica em ratos**. Dissertação (Mestrado em Clínica Cirúrgica) – Setor Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2003.

BORNSTEIN, P.; SAGE, H. Structurally distinct collagen types. **Annu Ver Biochem.**, Palo Alto, v. 49, p. 957-1003, 1980.

BOYLU, S.; OZGUN, H.; TUNCYUREK, P.; YENISEY, C.; CULHACI, N.; ERPEK, H.; DEMIRKIRAN, A. E. Is synchronous bowel anastomosis safe? **Acta Chir Belg**, Bruxelles, v. 105, p. 649-652, 2005.

BOZA, J. J.; MOËNNOZ, D.; VUICHOUD, J.; JARRET, A. R.; GAUDARD-DEWECK, D.; FRITSCHÉ, R.; DONNET, A.; SCHIFFRIN, E. J.; PERRUISSEAU, G.; BALLÈVRE, O. Food deprivation and refeeding influence growth, nutrient retention and functional recovery of rats. **J Nutr**, Philadelphia, v. 129, p. 1340-1346, 1999.

BRASKÉN, P. Healing of experimental colonic anastomosis. **Eur J Surg Suppl**, Stockholm, suppl. 66, p. 1-51, 1991.

BROWN, P. Malnutrition leading cause of death in post-war Angola. **Bull World Health Organ**, Geneva, v. 81, p. 849-850, 2003.

BRUCE, J.; KRUKOWSKI, Z. H.; AL-KHAIRY, G.; RUSSEL, E. M.; PARK, K. G. M. Systematic review of the definition and measurement of anastomotic leak after gastrointestinal surgery. **Br J Surg**, Bristol, v. 88, p. 1157-1168, 2001.

BUCHMILLER-CRAIR, T. L. The effect of acute anemia on the healing of intestinal anastomoses in rabbit. **J Trauma**, Baltimore, v. 51, n. 2, p. 363-368, 2001.

BURNETT, G. W.; SCHUSTER, G. S. Microbiologia Oral e Enfermidade infecciosas. **Panamericana**, Buenos Aires, p. 31-70, 1982.

CAILLE, V.; BOSSI, P.; GRIMALDI, D.; VIEILLARD-BARO, A. Physiopathology of severe sepsis. **Presse Med**, Paris, v. 33, p. 256-261, feb. 2004.

CALDER, P. C.; JACKSON, A. A. Undernutrition, infection and immune function. **Nutr Res Rev**, Cambridge, v. 13, p. 3-29, 2000.

CAMPOS, A. C. L.; BORGES-BRANCO, A.; GROTH, A.K. Cicatrização de feridas. **Arq Bras Cir Dig**, São Paulo, v. 20, n. 1, p. 51-58, 2007.

CARSWELL, E. A.; OLD, L. J.; KASSEL, R. L.; GREEN, S.; FIORE, N.; WILLIAMSON, B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. **Proc Natl Acad Sci USA**, Washington, v. 72, p. 3666-3670, 1975.

CASEY, J.; FLINN, W. R.; YAO, J. S.; FAHEY, V.; PAWLOWSKI, J.; ABERGAN, J. J. Correlation of immune and nutritional status with wound complications in patients undergoing vascular operations. **Surgery**, St Louis, v. 93, p. 822-827, 1983.

CASEY, L. C.; BALK, R. A.; BONE, R. C. Plasma cytokine and endotoxin levels correlates with survival in patients with sepsis syndrome. **Ann Intern Med**, Philadelphia, v. 119, p. 771-778, 1993.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL: Increase in national hospital discharge survey rates for septicemia – United States, 1979-1987. **JAMA**, Chicago, v. 263, p. 937-938, 1990.

CHAMSON, A; FREY, J.; HIVERT, M. Effects of tobacco smoke extracts on collagen biosynthesis by fibroblast cell culture. **J Toxicol Environ Health**, Washington DC, v. 9, n. 5-6, p. 921-932, 1982.

CHIBATA, M. **Nicotina subcutânea e cicatrização da parede abdominal de ratos: estudo histológico e tensiométrico.** Dissertação (Mestrado em Clínica Cirúrgica) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2003.

CHOBAN, P. S., JACKSON, B., POPLAWSKI, S., BISTOLARIDES, P. Bariatric surgery for morbid obesity: why, who, when, how, where, and then what? **Cleve Clin J Med**, Cleveland, v. 69, n. 11, p. 897-903, 2002.

CIHAN, A.; OGUZ, M.; ACUN, Z.; UÇAN, B. H.; ARMUTCU, F.; GÜREL, A. Comparison of Early Postoperative Enteral Nutrients versus Chow on Colonic Anastomotic Healing in Normal Animal. **Eur Surg Res**, Basel, v. 36, p. 112-115, 2004.

COBB, J. P.; HOTCHKISS, R. S.; SWANSON, P. E.; CHANG, K.; QUI, Y.; LAUBACH, V. E.; KARL, I. E.; BUCHMAN, T. G. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene deficiency increases the mortality of sepsis in mice. **Surgery**, St Louis, v. 126, p. 438-442, 1999.

COELHO-LEMO, I. C.; CAMPOS, A. C.; DE ALMEIDA, M.; SCHULER, S. L.; GURMINI, J.; MALAFAIA, O.; ANDRADE, D. F. In utero malnutrition influences wound healing of newborn rats as measured by tensile strength and collagen deposition. **JPEN**, Silver Spring, v. 28, n. 4, p. 241-244, 2004.

COHEN, J. The immunopathogenesis of sepsis. **Nature**, London, v. 420, p. 885-891, dec. 2002.

COLEY, W. B. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas: with a report of ten original cases. **Am J Med Sci**, Philadelphia, v. 105, n. 487-511, 1893.

CONSENSO BRASILEIRO DE SEPSE. Disponível em:
<http://www.medicinaintensiva.com.br/consenso-sepse.htm> e em
<http://www.smaconsultores.com.br/sepse1/>. Acesso em 18/03/2008.

CONSTANTINE, V.S.; MOWRY, R.W. The selective staining of human dermal collagen. The use of Picrosirius Red F3BA with polarization microscopy. **J Invest Derm**, Baltimore, v.50, n.51, p.419-423, 1968.

COOPER, B. A.; PENNE, E.L.; BARTLETT, L. H.; POLLOCK, C. A. Protein malnutrition and hypoalbuminemia as predictors of vascular events and mortality in ESRD. **Am J Kidney Dis**, Philadelphia, v. 43, p. 61–66, 2004.

CORREIA, M. I.; CAMPOS, A.C. Prevalence of hospital malnutrition in Latin America: the multicenter ELAN study. **Nutrition**, Los Angeles, v. 19, n. 10, p. 823-825, 2003.

CORREIA, M. I.; WAITZBERG, D. L. The impact of malnutrition on morbidity, mortality, length of hospital stay and costs evaluated through a multivariate model analysis. **Clin Nutr**, New York v. 22, n. 3, p. 235-239, 2003.

COSTA, M. A. R. **Glutamina oral na cicatrização de anastomoses colônicas em ratos**. Dissertação (Mestrado em Clínica Cirúrgica) - Setor Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2002.

CRONIN, K.; JACKSON, D. S.; DUNPHY, J. E. Changing bursting strength and collagen content of the healing colon. **Surg Gynecol Obstet**, Chicago, v. 126, p. 747-753, 1968a.

CRONIN, K.; JACKSON, D. S.; DUNPHY, J. E. Specific activity of hydroxyprolin-tritium in the healing colon. **Surg Gynecol Obstet**, Chicago, v. 126, n. 5, p.1061-1065, 1968b.

CUNNINGHAM-RUNDLES, S.; MCNEELEY, D. F.; MOON, A.. Mechanisms of nutrient modulation of the immune response. **J Allergy Clin Immunol**, St. Louis, v. 115, n. 6, p. 1119-1128, jun. 2005.

CUTHBERTSON, D.P. Post-shock metabolic response. **Lancet**, London, v. 1, p. 433-437, 1942.

DA COSTA, M. A. R.; CAMPOS, A. C. L.; COELHO, J. C. U.; BARROS, A. M.; MATSUMOTO, H. M. Oral glutamine and the healing of colonic anastomoses in rats. **JPEN**, Silver Spring, v. 27, n. 3, p. 182-185, 2003.

DALY, J. M.; VARS, H. M.; DUDRICK, S. J. Effects of protein depletion on strength of colonic anastomoses. **Surg Gynecol Obstet**, Chicago, v. 134, p. 15-21, 1972.

DAMAS, P.; REUTER, A.; GYSEN, P.; DEMONTY, J.; LAMY, M.; FRANCHIMONT, P. Tumor necrosis factor end interleukin-1 serum level during severe sepsis humans. **Crit Care Med**, New York, v. 17, p. 975-978, 1989.

DE ANGELIS, R. C. Desnutrição calórico-proteica (Má nutrição calórica-proteica). In: **Fisiologia da nutrição**. 3. ed. São Paulo: Nobel, 1986, v. 2, p. 38-56.

DEITCH, E. A. Rodent models of intra-abdominal infection. **Shock**, Augusta, v. 24, s. 1, p. 19-23, 2005.

DERVENIS, C.; SMAILIS, D.; HATZITHEOKLITOS, E. Bacterial translocation and its prevention in acute pancreatitis. **J Hepatobiliary Pancreat Surg**, Tokyo, v. 10, p. 415-418, 2003.

DETSKI, A.; BAKER, J. P.; O'ROURKE, K.; GOEL, V. Perioperative Parenteral Nutrition: A Meta-Analysis. **Ann Inter Med**, Philadelphia, v. 107, p. 195-203, 1987.

DICKHAUT, S. C.; DELEE, J. C.; PAGE, C. P. Nutritional status: Importance in predicting wound-healing after amputation. **J Bone Joint Surg Am**, Boston, v. 66, p. 71-75, 1984.

DIKS, S. H.; RICHEL, D. J.; PEPPELENBOSCH, L. P. S. Signal Transduction: The Picture is Becoming More Complex . **Curr Top Med Chem**, Netherlands, v. 4, p. 1115-1126, 2004.

DING, L. A.; LI, J. S.; L, Y. S.; ZHU, N. T.; LIU, F. N.; TAN, L. Intestinal barrier damage caused by trauma and lipopolysaccharide. **World J Gastroenterol**, Beijing, v. 10, n. 16, p. 2373-2378, aug. 2004.

DIROSA, M.; PAPADIMITRIOU, J. M.; WILLOUGHBY, D. A histopathological and pharmacological analysis of the mode of action on non-steroidal anti-inflammatory drugs. **J Pathol**, London, v. 105, p. 239-256, 1971.

DULGER, H.; ARIK, M.; SEKEROGLU, M. R.; TARAKCIOGLU, M.; NOYAN, T.; CESUR, Y.; BALAHOROGLU, R. Pro-inflammatory cytokines in Turkish children with protein energy malnutrition. **Mediators Inflamm**, Sylvania, v. 11, p. 363-365, 2002.

EKMEKTZOGLOU, K. A.; ZOGRAFOS, G. C.; KOURKOULIS, S. K.; DONTAS, I. A.; GIANNOPOULOS, P. K.; MARINO, K. A.; POULAKOU, M. V.; PERREA, D. N. Mechanical behavior of colonic anastomosis in experimental settings as a measure of wound repair and tissue integrity. **World J Gastroenterol**, Beijing, v. 12, n. 35, p. 5668-5673, sep. 2006.

ELLIS, H. The aetiology of post-operative abdominal adhesions. An experimental study. **Br J Surg**, London, v. 50, p.10-16, 1962.

EMERY, W.; SANDERSON, P. Effect of dietary restriction on protein synthesis and wound healing after surgery in the rat. **Clin Sci**, London, v. 89, p. 383-388, 1995.

ENESTVEDT, C. K.; THOMPSON, S. K.; CHANG, E. Y.; JOBE, B. A. Clinical review: Healing in gastrointestinal anastomoses, Part II. **Microsurgery**, New York, v. 26, n. 3, p. 137-143, 2006.

ERRIDGE, C.; BENNETT-GUERRERO, E.; POXTON, I. R. Structure and function of lipopolysaccharides. **Microbes Infect**, Paris, v.4, n. 8, p.837-851, jul. 2002.

ESMON, C. T. Why do animal models (sometimes) fail to mimic human sepsis? **Crit Care Med**, New York, v. 32, s. 5, p. 219-222, may. 2004.

FARHAT, S.M.; AMER, N.S.; WEEKS, D.S. e MUSSELMAN, M.M. Effect of mechlorethamine hydrochloride (nitrogen mustard) on healing of abdominal wounds. **AMA Arch Surg**, Chicago, v.76, n.5, p.749-51, 1958.

FECHINE-JAMACARU, F. V.; FECHINE-JAMACARU JR, U.; MORAIS FILHO, M. O. Modelo de angiogênese inflamatória em córnea de coelho induzida pela cauterização alcalina pontual. **Acta Cir Bras**, São Paulo, v. 20, n. 1, p. 64-73, 2005.

FELGINES, C.; SAVANOVITCH, C.; FARGES, M. C.; CYNOBER, L.; VASSON, M. P. Protein metabolism in rats during long-term dietary restriction: Influence of aging. **JPEN**, Silver Spring, v. 23, n. 1, p. 32-37, jan/feb. 1999.

FERREIRA M. M.; SCIALOM, J. M.; CAMPOS, A. D.; RAMALHO, L. L. Z.; MARCHINI, J. S.; FÉRES, O.; ROCHA, J. J. R. Efeito da desnutrição na cicatrização de anastomoses colônicas: estudo experimental em ratos. **Rev bras Coloproct**, Rio de Janeiro, v. 26, n. 3, p. 239-243, 2006.

FERREIRA, M. **Radioterapia pré e pós-operatória na cicatrização de anastomoses colônicas em ratos avaliada mediante estudo tensiométrico, histológico e da morfometria do colágeno.** 139f. Dissertação (Mestrado em Clínica Cirúrgica) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

FINK, M. P.; HEARD, S.O. Laboratory Models of Sepsis and Septic Shock. **J Surg Res**, Philadelphia, v. 49, p. 186-196, 1990.

FISH, R. E.; SPITZER, J. A. Continuous infusion of endotoxin from an osmotic pump in the conscious-unrestrained rat: A unique model of chronic endotoxemia. **Circ Shock**, New York, v. 12, p.135, 1984.

FOCK, R. A. **Avaliação de aspectos da resposta inflamatória desencadeada pelo lipopolissacarídeo (LPS) em desnutrição protéica experimental. Quantificação do receptor de LPS (CD14/TLR4) e do fator de transcrição NFkB.** 218f. Dissertação (Doutorado) - Área de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, 2005.

- FOLKMAN, J. Clinical Applications of Research on Angiogenesis. **N Engl J Med**, Boston, v. 333, n. 26, p. 1757-1763, dez. 1995.
- FOLKMAN, J.; SHING, Y.; Angiogenesis. **J Biol Chem**, Baltimore, v. 267, p. 10931-10934, 1992.
- FOSTER, S.; MCCORMICK, L. M.; NTOLOSI, B. A.; CAMPBELL, D. Production of TNF alpha by LPS-stimulated murine, rat and human blood and its pharmacological modulation. **Agents Actions**, Basel, v. 38, s. 2, p. C77-79, 1993.
- FRIEDMAN, G.; SILVA, E.; VINCENT, J. L. Has the mortality of septic shock changed with time? **Crit Care Med**, New York, v. 26, p. 2078-2086, 1998.
- FURCHT, L. T. Editorial. Critical factors controlling angiogenesis: cell products, cell matrix, and growth factors. **Lab Invest**, New York, v. 55, p. 505-509, 1986.
- GALLUCCI, R.M.; SIMEONOVA, P.P.; MATHESON, J.M.; KOMMINENI, C.; GURIEL, J.L.; SUGAWARA, T.; LUSTER, M.I. Impaired cutaneous wound healing in interleukin-6-deficient and immunosuppressed mice. **FASEB J**, Bethesda, v.14, p. 2525-2531, 2000.
- GARDLUND, B.; SJOLIN, J.; NILSON, A.; ROLL, M.; WICKERTS, C.; WRETLIND, B. Plasma levels of cytokines in primary septic shock in humans: correlation with disease severity. **J Infect Dis**, Chicago, v. 172, p. 296-301, 1995.
- GETZEN, L.C.; ROE, R.D.; HOLLOWAY, C.K. Comparative study of intestinal anastomotic healing in inverted and everted closures. **Surg Gynecol Obstet**, Chicago, v. 126, n. 6, p.1219-1227, 1966.
- GIACOMETTI, A.; CIRIONI, O.; GHISELLI, R.; ORLANDO, F.; KAMYSZ, W.; ROCCHI, M.; D`AMATO, G.; MOCCHIEGIANNI, F.; SILVESTRI, C.; LUKASIAK, J.; SABA, V.; SCALISE, G. Effects of pexiganan alone and combined with betalactams in experimental endotoxic shock. **Peptides**, New York, v. 26, n. 2, p. 207-216, 2005.
- GIOVAMBATTISTA, A.; CHISARI, A. N.; CORRO, L.; GAILLARD, R. C.; SPINEDI, E. Metabolic, Neuroendocrine and Immune Functions in Basal Conditions and during the Acute-phase Response to Endotoxin Shock in Undernourished Rats. **Neuroimmunomodulation**, New York, v. 7, p. 92-98, 2000.
- GIRARDIN, E.; GRAU, G. E.; DAYER, J.; ROUX-LOMBARD, P. Tumor necrosis factor and IL 1 in the serum of children with severe infectious purpura. **N Engl J Med**, Boston, v. 319, p. 397-400, 1988.
- GLUCK, T.; OPAL, S. M. Advances in sepsis therapy. **Drugs**, New York, v.64, n. 8, p.837-859, 2004.
- GONÇALVES, C. **Cicatrização de anastomose colônica e nutrição pré-operatória em ratos desnutridos: estudo tensiométrico e de deposição do colágeno**. 80 f. Dissertação (Mestrado) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

GONÇALVES, C. G.; CAMPOS, A. C. GROTH, A. K.; FERREIRA, M.; COELHO, J. C. U.; MENGUID, M. M. Influence of Preoperative Feeding on the Healing of Colonic Anastomosis in Malnourished Rats. **JPEN**, Silver spring, v. 29, suppl 2, p. 9-16, 2006.

GOSH, S.; BALTIMORE, O. Activation in vitro of NF κ B by phosphorylation of its inhibitor I κ B. **Nature**, London, v. 344, p. 678, 1990.

GRINNELL, F. Fibroblasts, myofibroblasts and wound contraction. **J Cell Biol**, New York, v. 124, n. 4, p. 401-404, 1994.

HAY, E. D. Extracellular matrix. **J Cell Biol**, New York, v. 91, p. 205-223, 1981.

HENDRICKS, T.; MASTBOOM, W. J. B. Healing of experimental intestinal anastomosis: aprameters for repair. **Dis Colon Rectum**, New York, v.33, p.891-901, 1990.

HENDRIKS, T.; VEREECKEN, T. H. L. B.; HESP, F.; et al. Loss of collagen from experimental intestinal anastomoses: early events. **Exp Mol Pathol**, New York, v. 42, p. 411-418, 1985.

HERRMANN, J.B.; WOODWARD, S.C. e PULASKI, E.J. Healing of Colonic Anastomoses in the Rat. **Surg Gynecol Obstet**, Boston, v.119, p.269-75, 1964.

HESP, F.; HENDRIKS, T.; SCHILLING, P.H.; et al. Histological features of wound repair: a comparison between experimental ileal and colonic anastomoses. **Br J Exp Pathol**, London, v. 66, p. 511-518, 1985.

HESSE, D. G.; TRACEY, K. J.; FONG, Y.; MANOGUE, K. R.; PALLADINO, M. A. J.; CERAMI, A.; SHIRES, G. T.; LOWRY, S. F. Cytokine appearance in human endotoxemia and primate bacteremia. **Surg Gynecol Obstret**, Boston, v. 166, p. 147-153, 1988.

HILL , A. G.; HILL, G. L. Metabolic response to severe injury. **Br J Surg**, Bristol, v. 85, p. 884-890, 1998.

HINZ, B.; CELETTA, G.; TOMASEK, J. J.; GABBIANI, G.; CHAPONNIER, C. Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. **Mol Biol Cell**, Bethesda, v. 12, p. 2730-2741, 2001.

HINZ, B; MASTRANGELO, D.; ISELIN, C. E.; CHAPONNIER, C.; GABBIANI, G. Mechanical tension controls granulation tissue contractile activity and myofibroblast differentiation. **Am J Pathol**, Bethesda, v. 159, n. 3, p. 1009-1020, 2001.

HÖGSTRÖM, H. Mechanisms and prevention of decrease in wound margin strength. **Acta Chir Scand**, Stockholm, v. 239, p. 1-63, 1987.

HÖGSTRÖM, H.; JIBORN, H.; ZEDERFELDT, B.; HAGLUND, U. Influence of Intraperitoneal Escherichia coli with Septicemia on the Healing of Colonic Anastomoses and Skin Wounds. **Eur Surg Res**, Basel, v. 17, p. 128-132, 1985.

HOWES, E.L. The strength of wounds sutured with catgut and silk. **Surg, Gynecol. Obstet.**, New York, v. 57, p. 309, 1933. In: VAN WINCKLE, W. The tensile strength of wounds and factors that influence it. **Surg Gynecol Obstet**, Boston, v.129, n.3, p. 819-842, 1969.

HOWES, E.L.; SOOY, J.W.; HARVEY, S.C. The healing of wounds determined by their tensile strength. **JAMA**, Chicago, v.92, p.42-45, 1929.

HUBBARD, W. J.; CHOUDHRY, M.; SCHWACHA, M. G.; KERBY, J. D.; RUE, L. W III.; BLAND, K. I.; CHAUDRY, I. H. Cecal ligation and Puncture. **Shock**, Augusta, v. 24, s.1, p. 52-57, 2005.

HURLEY, J. V.; EDWARDS, B.; HAM, K. N. The response of newly formed blood vessels in healing wounds to histamine and other permeability factors. **Pathology**, Abingdon, v. 2, p. 133-145, 1970.

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. **Dig Surg**, Basel, v. 16, p. 478-485, 1999.

IRVIN, T. Collagen Metabolism in Infected Colonic Anastomoses. **Surg Gynecol Obstet**, Boston, v. 143, p. 220-224, aug. 1976a.

IRVIN, T. T. The effect of methionine on colonic wound healing in malnourished rats. **Br J Surg**, Bristol, v. 63, n. 3, p. 237-240, 1976b.

IRVIN, T. T. Effects of malnutrition and hyperalimentation on wound healing. **Surg Gynecol Obstet**, Boston, v. 146, p. 33-37, 1978.

IRVIN, T. T. Wound healing. Principles and practice. **Chapman and Hall**, London, 1981.

IRVIN, T. T.; GOLIGHER, J. C. A etiology of disruption of intestinal anastomoses. **Br J Surg**, Bristol, v. 60, p. 461, 1973.

IRVIN, T. T.; HUNT, T. K. Effect of malnutrition on colonic healing. **Ann Surg**, Philadelphia, v. 180, n. 5, p. 765-772, 1974.

ISHIMURA, K.; TSUBOUCHI, T.; OKANO, K.; MAEBA, T.; MAETA, H. Wound healing of intestinal anastomosis after digestive surgery under septic conditions: participation of local interleukin-6 expression. **World J Surg**, New York, v. 22, n. 10, p. 1069-1076, oct. 1998.

ISHIMURA, K; MOROGUCHI, A.; OKANO, K.; MAEBA, T; MAETA, H. Local expression of Tumor Necrosis Factor- α and Interleukin-10 on Wound Healing of Intestinal Anastomosis During Endotoxemia in Mice. **J Surg Res**, Philadelphia, v. 108, p. 91-97, 2002.

JACOBI, J. Pathophysiology of sepsis. **Am J Health Syst Pharm**, Bethesda, v. 15, n. 59, s. 1, p. 3-8, 2002.

JERDAN, J. A.; MICHELS, R. G.; GLASER, B. M. Extracellular matrix of newly forming vessels – an immunohistochemical study. **Microvasc Res**, New York, v. 42, p. 255-265, 1991.

JIBORN, H.; AHONEN, J.; ZEDERFELDT, B. Bursting strength of the colon after left colon resection and anastomosis. **Am J Surg**, New York, v. 136, p. 587-594, 1978a.

JIBORN, H.; AHONEN, J.; ZEDERFELDT, B. Healing of experimental colonic anastomosis. Effect of suture technique on collagen concentration in the colonic wall. **Am J Sug**, New York, v. 135, p. 333-340, 1978b.

JIBORN; H., AHONEN; J., ZEDERFELDT; B. **Healing of Experimental Colonic Anastomoses III: Collagen Metabolism in the Colon after Left Colon Resection.** Am. J. Surg, New York, v. 139, p. 398-405, 1980.

JOHNSTON, T. D.; HAMPTON, W. H.; FRY, D. E. E. coli endotoxin produces hyperdynamic hemodynamic in the rats. **Circ Shock**, Baltimore, v. 27, p. 320, 1989.

JONSSON, K.; JIBORN, H.; ZEDERFERLDT, B. Breaking strength of small intestinal anastomoses. **Am J Surg**, New York, v. 145, p. 800-803, 1983.

JUNQUEIRA, L. C. U.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R. R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **Histochem J**, London, v. 11, n. 4, p. 447-455, 1979.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. Tecido Conjuntivo. In: **Histologia básica**. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1995, p. 69-84.

JUNQUEIRA, L. C. U.; MONTES, G. S.; SANCHEZ, E. M. The influence of tissue thickness on the study of collagen by the picrosirius-polarization method. **Histochemistry**, Berlin, v. 74, s.1, p. 153-156, 1982.

KALFARENTZOS, F.; KEHAGIAS, J.; MEAD, N.; KOKKINIS, K.; GOGOS, C. A. Enteral nutrition is superior to parenteral nutrition in severe acute pancreatitis: Results of a randomized prospective trial. **Br J Surg**, Bristol, v. 84, p. 1665, 1997.

KARAHASANOGLU, T.; ALTINLI, E.; HAMZAOGLU, I.; PAKSOY, M.; YESILDERE, T.; ALEMDAROGLU, K. Effect of growth hormone treatment on the healing of left colonic anastomoses in protein-malnourished rats. **Br J Surg**, Bristol, v. 85, n. 7, p. 931-933, 1998.

KAY, S. P.; MORELAND, J. R.; SCHMITTER, E. Nutritional status and wound healing in lower extremity amputations. **Clin Orthop Relat Res**, Philadelphia, v. 217, p. 253, 1987.

KIYAMA, T.; EFRON, D. T.; TANTRY, U.; BARBUL, A. Effect of nutritional route on colonic anastomotic healing in the rat. **J Gastrointest Surg**, St. Louis, v. 3, p. 441-446, 1999.

KIYAMA, T.; ONDA, M.; TOKUNAGA, A.; YOSHIYUKI, T.; BARBUL, A. Effect of early postoperative feeding on the healing of colonic anastomoses in the presence of intra-abdominal sepsis in rats. **Dis Colon Rectum**, New York, v. 43, n. 10, p. S54-58, oct. 2000.

KIYAMA, T.; WITTE, M. B.; THORNTON, F. J.; BARBUL, A. The route of nutrition support affects the early phase of wound healing. **JPEN**, Silver Spring, v. 22, n. 5, p. 276-279, 1998.

KLEIN, S.; KINNEY, J.; JEEJEEBHOY, K.; ALPERS, D.; HELLERSTEIN, M.; MURRAY, M. e TWOMEY, P. Nutrition support in clinical practice: review of published data and recommendations for future research directions. National Institutes of Health, American Society for Parenteral and Enteral Nutrition, and American Society for Clinical Nutrition. **JPEN**, Silver Spring, v.21, n.3, p.133-56,1997.

KORUDA, M. J.; ROLANDELLI, R. H. Experimental studies on the healing of colonic anastomoses. **J Surg Res**, Philadelphia, v. 48, n. 5, p. 504-515, 1990.

KUVIBIDILA, S.; YU, L.; ODE, D.; WARRIER, R. P. The immune response in protein-energy malnutrition and single nutrient deficiencies. **Nutrition and Immunology**, Tokyo, v. 8, p. 121-155, 1993.

LANGEMO, D.; ANDERSON, J.; HANSON, D.; HUNTER, S.; THOMPSON, P.; POSTHAUER, M. E. Nutritional Considerations in Wound Care. **Adv Skin Wound Care**, Philadelphia, v.19, n. 6, p. 297-303, jul-aug. 2006.

LAUAND, F.; FÉRES, O.; ROCHA, J. J. R.; CAMPOS, A. D.; CARVALHO, F. G. Efeito da hipovolemia sobre a cicatrização de anastomoses colônicas. Estudo experimental em ratos. **Rev bras Coloproct**, São Paulo, v. 24, n. 4, p. 317-321, 2004.

LAW, N. W.; ELLIS, H. Revised model for the study of colonic anastomotic healing in protein malnourished rats. **Eur Surg Res**, Basel, v. 21, n. 3-4, p. 218-223, 1989.

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

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 Cir Bras**, São Paulo, v. 8, n. 4, p. 145-150, 1993.

LEITE, C. V. S.; NARESSE, L. E.; RODRIGUES, M. A. M.; KOBAYASI, S. Intestinal healing in protein malnutrition and peritoneal infection in rats. **Acta Cir Bras**, São Paulo, v. 10, n. 1, p. 9-12, jan./mar. 1995.

- LEU, T.; CHAROENFUPRASERT, S.; YEN, C.; FAN, C.; MAA, M. Lipopolysaccharide-induced c-Src expression plays a role in nitric oxide and TNF α secretion in macrophages. **Molecular Immunology**, Oxford, v. 43, n. 4, p. 308 – 316, 2005.
- LING, P. R.; SMITH, R. J.; KIE, S.; BOYCE, P.; BISTRAN, B. R. Effects of protein malnutrition on IL-6-mediated signaling in the liver and the systemic acute-phase response in rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, Bethesda, v. 287, n. 4, p. R801-808, oct. 2004.
- LORENA, D.; UCHIO, K.; COSTA, A. M.; DESMOLIERE, A. Normal scarring: importance of myofibroblasts. **Wound Repair Regen**, St. Louis, v. 10, n. 2, p. 86-92, 2002.
- LUNDBERG, C.; GERDIN, B. The role of histamine and serotonin in the inflammatory reaction in an experimental model of open wounds in the rat. **Scand J Plast Reconstr Surg**, Stockholm, v. 8, n. 2, p 175-180, 1984.
- MARCHANT, A.; DEVIÈRE, J.; BYL, B.; DE GROOTE, D.; VINCENT, J.; GOLDMAN, M. Interleukin-10 production during septicaemia. **Lancet**, London, v. 343, p. 707-708, 1994.
- MARTIN, G. S.; MANNINO, D. M.; EATON, S.; ET AL. Epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. **N Engl J Med**, Boston, v. 348, p. 1546-1554, 2003.
- MAURY, C. P. Monitoring the acute phase response: comparison of tumour necrosis factor (cachectin) and C-reactive protein responses in inflammatory and infectious diseases. **J Clin Pathol**, London, v. 42(10), p. 1078-1082, 1989.
- MEISNER, M.; TSCHAIKOWSKY, K.; PALMAERS, T.; SCHMIDT, J. Comparison of procalcitonin (PCT) and C-reactive protein (CRP) plasma concentrations at different SOFA scores during the course of sepsis and MODS. **Critical Care**, London, v. 3(1), p. 45-55. 1999.
- MILLER, E. J.; GAY, S. Collagen: an overview. **Method enzymol**, New York, v. 82, p.3-32,1982.
- MIYAKE, K. Innate recognition of lipopolysaccharide by CD14 and toll-like receptor-4. MID-2: unique roles for MD-2. **Int Immunopharmacol.**, Amsterdam, v. 3, p. 119-128, 2003.
- MUROI, M. TANAMOTO, K. The polysaccharide portion plays an indispensable role in Salmonella lipopolysaccharide-induced activation of NF κ B through human Toll-like receptor 4. **Infect Immun**, Bethesda, v. 70, p. 6043-6047, 2002.
- NARESSE, L. E.; LEITE, C. V. S.; RODRIGUES, M. A. M.; ANGELELI, A. Y. O.; MINOSSI, J. G.; KOBAYASI, S. Efeito da peritonite fecal na cicatrização do cólon distal no rato: avaliação anatomopatológica, estudo da força de ruptura e da hidroxiprolina tecidual. **Acta cir. bras**, São Paulo, v. 8, n. 2, p. 48-53, abr./jun. 1993.

NARESSE, L. E.; LUCCHIARI, P. H.; ANGELELI, A.Y. O.; BURINI, R. C.; RODRIGUES, M. A. M.; CURI, P. R.; KOBAYASI, S. Estudo comparativo de anastomoses no intestino delgado de cão: estudos da força de ruptura, hidroxiprolina tecidual e anatomopatológico. **Acta Cir. Bras**, São Paulo, v. 3, p. 106-112, 1988.

NARESSE, L. E.; LUCCHIARI, P. H.; KOBAYASI, S. Estudo da resistência (força de ruptura) das anastomoses intestinais em plano único e em dois planos. **Rev Bras Cir**, Rio de Janeiro, v. 78, n. 4, p. 247-250, 1988.

NARESSE, L.E.; MENDES, E.F.; CURI, P.R.; LUCCHIARI, P.H. e KOBAYASI, S. Aparelho para a medida da força de ruptura das anastomoses intestinais. **Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo**, São Paulo, v.42, p.204-208, 1987.

NISENGARD, R. J.; NEWMAN, M. G. Oral Microbiology and Immunology. 2. Ed. Philadelphia: Saunders, 1994.

OGIKUBO, Y.; NORIMATSU, M.; SASAKI, Y.; YASUDA, A.; SAEGUSA, J.; TAMURA, Y. Effect of lipopolysaccharide (LPS) injection on the immune responses of LPS-sensitive mice. **J Vet Med Sci**, Tokyo, v. 66, n. 10, p. 1189-1193, oct. 2004.

OLIVEIRA, H. **Protocolos Anestésicos - Comitê de ética em Experimentação Animal**. Disponível em: http://www.ufmg.br/bioetica/cetea/index2.php?option=com_content&do_pdf=1&id=22 Acesso em 23/03/2008.

ORGILL, D.; DEMLING, R. H. Current concepts and approaches to wound healing. **Crit Care Med**, New York, v. 16, n. 9, p. 899-907, 1988

ORLANDO, M. C.; CHENDRASEKHAR, A.; BUNDZ, S.; BURT, E. T.; MOORMAN, D. W.; TIMBERLAKE, G. A. The effect of peritoneal contamination on Wound Strength of small bowel and colonic anastomoses. **Am Surg**, Atlanta, v. 65, n. 7, p. 673-676, jul. 1999.

OTTESEN, L. H.; HARRY, D.; FROST, M.; DAVIS, S.; KHAN, K.; HALLIWELL, B.; MOORE, K. Increased formation of S-nitrothiols and nitrotyrosine in cirrhotic rats during endotoxemia. **Free Radic Biol Med**, New York, v. 31, n. 6, p. 790-798, sep. 2001.

PACHECO, P. E. L. **Tratamento da endotoxemia eqüina**. Monografia apresentada para obtenção do título de especialista Lato Sensu em Diagnóstico e Cirurgia em Eqüinos da Faculdade de Jaguariúna. São Paulo, 2007.

PEREIRA JUNIOR, G. A.; MARSON, F.; ABEID, M., OSTINI, F. M.; SOUZA, S. H.; BASILE-FILHO, A. Fisiopatologia da sepse e suas implicações terapêuticas. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 31, p. 349-362, jul./set. 1998.

PETROIANU, A., CARVALHO E CARNEIRO, B. G. M.; RODRIGUES, F. H. O. C.; ROCHA, R. F. Avaliação da reinfecção peritoneal após peritonite fecal em ratos. **Rev. Col. Bras. Cir**, Rio de Janeiro, v. 31, n. 2, p. 90-94, mar./abr. 2004.

PETTET, G. J.; BYRNE, H. M.; MCELWAIN, D. L.; NORBURY, J. A. Model of wound healing angiogenesis in soft tissue. **Math. Biosc.**, v. 136, n. 1, p. 35-63, 1996.

POULLAIN, M. G.; CEZARD, J. P.; MARCHÉ, C.; MACRY, J.; ROGER, L.; GRASSET, E.; BROYART, J. P. Effects of whey proteins, their peptides or amino-acids on the ileal mucosa of normally fed and starved rats. **Clin Nutr**, Edinburgh, v. 11, p. 48-53, 1991.

POULLAIN, M. G.; CEZARD, J. P.; ROGER, L.; MENDY, F. Effects of whey proteins their oligopeptides hydrolisates, and free amino acid mixture on growth and nitrogen retention in feed and starved rats. **JPEN**, Silver Spring, v. 13, n. 2, p. 382-386, feb. 1989.

POVOA, P.; ALMEIDA, E.; MOREIRA, P.; FERNANDES, A.; MEALHA, R.; ARAGAO, A.; et al. C-reactive protein as an indicator of sepsis. **Intensive Care Med**, Berlin, v. 24, n. 10, p. 1052-1056, 1998.

POWELL, D. W.; MIFFLIN, R. C.; VALENTICH, J. D.; CROWE, S. E.; SAADA, J. I.; WEST, A. B. Myofibroblasts. Intestinal subepithelial myofibroblasts. **Am J Physiol**, Washington, v.14, p. 183-201, 1999.

PRESTERL, E.; STAUDINGER, T.; PETTERMANN, M.; LASSNIGG, A.; BURGMANN, H.; WINKLER, S. et al. Cytokine profile and correlation to the APACHE III and MPM II scores in patients with sepsis. **Am J Respir Crit Care Med**, New York, v. 156, p. 825-832, 1997.

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

RAINA, N.; LAMARRE, J.; LIEW, C-C.; LOFTI, A. H.; JEEJEEBHOY , K. N. Effect of nutrition on tumor necrosis factor receptors in weight-gaining and losing rats. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, Bethesda, v. 277, n. 3, p. E464-E473, sep. 1999.

REMICK, D. G.; STRIETER, R. M.; LYNCH, J. P. D.; NGUYEN, D.; ESKANDARI, M. L.; KUNKEL, S. L. In vivo dynamics of murine tumor necrosis factor-alpha gene expression. Kinetics of dexamethasone-induced suppression. **Lab Invest**, New York, v. 60, p. 766-771, 1989.

REMICK, D. G.; WARD, P. A. Evaluation of endotoxin models for the study of sepsis. **Shock**, Augusta, v. 24 (Suppl. 1), p. 7-11, dec. 2004.

RENVALL, S.; JARVINEN, M. Energy metabolism of the peritoneal membrane in silica induced peritonitis. **Acta Chir Scand**, Stockolm, v. 146, p. 177-183, 1980.

ROSS, R; ODLAND, G. Human wound repair: II Inflammatory cells, ephitelial-mesenchymal interrelations, and fibrogenesis. **J Cell Biol**, New York, v. 39, p. 152-168, 1968.

RUITER, D. J.; SCHLINGEMANN, R. O.; WESTPHAL, J. R.; DENIJN, M.; RIETVELD, F. J.; DE WALL, R. M. Angiogenesis em cura de ferida e metástase de tumor. **Behring Inst Luva**, v. 92, p. 258-272, 1993.

SALES JR., J. A. L.; DAVID, C. M. N.; HATUM, R. M.; JAPIASSU, A. M.; PINHEIRO, C. T. S.; FRIEDMAN, G.; DA SILVA, O. B.; KOTERBA, E.; DIAS, F. S.; PIRAS, C.; SOUZA, P. C. S. P.; LUIZ, R. R.; DIAS, M. A. Sepsis Brasil: Estudo Epidemiológico da Sepsis em Unidades de terapia intensiva Brasileiras. **RBTI**, São Paulo, v. 18, n. 1, jan./mar. 2006.

SALLES, M. J. C.; SPROVIERI, S. R. S.; BEDRIKOW, R.; PEREIRA, A. C.; CARDENUTO, S. L.; AZEVEDO, P. R. C.; SILVA, T. M.; GOLIN, V. Síndrome da resposta inflamatória sistêmica/sepsis - revisão e estudo da terminologia e fisiopatologia. **Rev Assoc Med Bras**, São Paulo, v. 45, n. 1, jan./mar. 1999.

SANTOS JR., J. C. M. Peritonite : Infecção Peritoneal e Sepsis. **Rev bras colo – proctol**. Rio de Janeiro, v. 21, n. 1, p. 33-41, 2001.

SATO, M.; SAWAMURA, D.; INA, S.; YAGUCHI, T.; HANADA, K.; HASHIMOTO, I. In vivo introduction of the interleukin 6 gene into human keratinocyte: induction of epidermal proliferation by the fully spliced form of interleukin 6, but, not by the alternatively spliced form. **Arch Dermatol Res**, New York, v. 291, p. 400-404, 1999.

SAVASSI-ROCHA, P.R.; LOPES, R.L.C. **Anastomoses intestinais: bases da cicatrização e análise dos diferentes tipos**. In: Tópicos em Gastroenterologia, número 5, CASTRO, L.P.; SAVASSI-ROCHA, P.R.; CUNHA-MELLO, J.R, Rio de Janeiro, 1994, p. 493-521.

SCHENTAG, J. J.; O'KEEFFE, D.; MARMION, M.; WELS, P. B. C-reactive protein as an indicator of infection relapse in patients with abdominal sepsis. **Arch Surg**, Chicago, v. 119, n. 3, p. 300-304, 1984.

SCHMITZ, L. D. **Nutrição perioperatória suplementada com glutamina na cicatrização de anastomose colônica de ratos desnutridos** 89 f. Dissertação (Mestrado) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

SCHURCH, W.; SEEMAYER, T.; GABBIANI, G. The myofibroblast. A quarter century after its discovery. **Am J Surg Pathol**, New York, v. 22, n. 2, p. 141-147, 1998.

SEIFERT, W. F.; VERHOFSTAD, A. A.; WOBES, T.; LANGE, W.; RIJKEN, P. F.; VAN DER KOGEL, A. J.; HENDRIKS, T. Quantitation of angiogenesis in healing anastomoses of the rat colon. **Exp Mol Pathol**, New York, v. 64, n. 1, p. 31-40, feb. 1997.

SERINI, G.; GABBIANI, G. Mechanisms of myofibroblast activity and phenotypic modulation. **Exp Cell Res**, New York, v. 250, p. 273- 283, 1999.

SILVA, E.; PEDRO, M. A.; SOGAYAR, A. C. B.; MOHOVIC, T.; SILVA, C. L. O.; JANISZEWSKI, M.; CAL, R. G. R.; DE SOUSA, E. F.; ABE, T. P.; DE ANDRADE, J.; DE MATOS, J. D.; REZENDE, E.; ASSUNÇÃO, M.; AVEZUM, A.; ROCHA, P. C. S.; DE MATOS, G. F. J.; BENTO, A. M.; CORRÊA, A. D.; VIEIRA, P. B.; KNOBEL, E. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). **Critical Care**, London, v. 8, n. 4, p. R251-R260, aug. 2004.

SIMONS, R. K.; JUNGER, W. G.; LOOMIS, W. H.; HOYT, D. B. Acute lung injury in endotoxemic rats is associated with sustained circulating IL-6 levels and intrapulmonary CINC activity and neutrophil recruitment--role of circulating TNF-alpha and IL-beta? **Shock**, Augusta, v. 6, n. 1, p. 39-45, jul. 1996.

SINGER, A. J.; CLARK, R. A. Cutaneous wound healing. **N Engl J Med**, Boston, v. 341, p. 738-746, 1999.

SKALLI, O; ROPRAZ, P.; TRZECIAK, A; BENZONANA, G.; GILLESSEN, D.; GABBIANI, G. A monoclonal antibody against α - smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. **J Cell Biol**, New York, v. 103, n. 6, p. 2787-2796, 1986.

SKINOVSKY, S. **A influência da nicotina na cicatrização de anastomoses do intestino delgado em ratos: Angiogênese e Miofibroblastos**. 84f. Tese (Doutorado em Clínica Cirúrgica) – Setor Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

SMITH, E. F.; SLIVAK, M. J.; EGAN, J. W.; GAGNON, R.; ARLETH, A. J.; ESSER, K. M. Fluid resuscitation improves survival of endotoxemic and septicemic rats: possible contribution of tumor necrosis factor. **Pharmacology**, Basel, v. 46, p. 254-267, 1993.

SMITH, R. P.; LIPWORTH, B. J.; CREE, I. A.; SPIERS, E. M.; WINTER, J. H. C-reactive protein. A clinical marker in community-acquired pneumonia. **Chest**, Chicago, v. 108, n. 5, p. 1288-1291, 1995.

SOETERS, P. B.; DE ZOETE, J. P.; DE JONG, C. H.; WILLIAMS, N. S.; BAETEN, C. G. Colorectal surgery and anastomotic leakage. **Dig Surg**, Basel, v. 19, n. 2, p. 150-155, 2002.

SPANHEIMER, R. G.; PETERKOFISKY, B. A specific decrease in collagen synthesis in acutely fasted, vitamin C-supplemented, guinea pigs. **J Biol Chem**, Baltimore, v. 260, p. 3955, 1985.

SPINAS, G. A.; BLOESCH, D.; KELLER, U.; ZIMMERLI, W.; CAMMISULI, S. Pretreatment with ibuprofen augments circulating tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6, and elastase during acute endotoxemia. **J Infect Dis**, Chicago, v. 163, p. 89-95, 1991.

STELTER, F. Structure/function relationships of CD 14. **Chem Immunol**, Basel, v. 74, p. 25-41, 2000.

STEWART, D.; FULTON, W. B.; WILSON, C.; MONITTO, C. L.; PAIDAS, C. N.; RREVES, C. N.; DE MAIO, A. Genetic contribution to septic response in a mouse model. **Shock**, Augusta, v. 18, p. 342-347, 2002.

STINNETT, J. D. Nutrition and the immune response. **CRC Press**, Boca Raton, p. 150, 1983.

SUKHOTNIK, I.; KRAUSZ, M. M.; SABO, E.; RESNICK, M. .; HIRSH, M.; MANNHEIM, D.; SHILONI, E. Endotoxemia Inhibits Intestinal Adaptation in a Rat Model of Short Bowel Syndrome. **Shock**, Augusta, v. 19, n. 1, p. 66-70, jan. 2003.

SUKHOTNIK, I.; MOGILNER, J.; KRAUSZ, M. M.; LURIE, M.; HIRSH, M.; CORAN, A. G.; SHILONI, E. Oral arginine reduces gut mucosal injury caused by lipopolysaccharide endotoxemia in rat. **J Surg Res**, Philadelphia, v. 122, n. 2, p. 256-262, dec. 2004.

SWEAT, F.; PUCHTLER, H.; ROSENTHAL, S. I. Sirius red F3BA as a stain for connective tissue. **Arch Pathol**, Chicago, v. 78, p. 69-72, 1964.

SWEET, M. J.; HUME, D. A. Endotoxin signal transduction in macrophages. **J Leukoc Biol**, New York, v. 60, p. 8-26, 1996.

TANG, G. J. Similarity and synergy of trauma and sepsis: role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6. **Acta Anaesthesiol Sin**, Taipei, v. 34, n. 3, p. 141-149, sep. 1996.

TELLES, J. E. Q. Contribuição da imunohistoquímica em patologia cirúrgica: experiência de 10 anos. **Rev Med Paraná**, Curitiba, v. 56, n. 2/2, p. 31-38, 1998.

THIJS, L. G.; Hack, C. E. Time course of cytokine levels in sepsis. **Intensive Care Med**, Berlin, v. 21 (Suppl. 2), p. 258-263, 1995.

THOMPSON, S. K.; CHANG, E. Y.; JOBE, B. A. Clinical review: Healing in Gastrointestinal anastomoses, part I. **Microsurgery**, New York, v. 26, p. 131-136, 2006.

THORNTON, F.J.; BARBUL, A. Healing in the gastrointestinal tract. In: Wound healing. BARBUL, A. **Surg Clin North Am**, Philadelphia, v. 77, n. 3, p. 549 - 573 1997.

TIPTON, D. A.; DABBOUS, M. K. Effects of nicotine on proliferation and extracellular matrix production of human gingival fibroblasts in vitro. **J Periodontol**, Chicago, v. 66, n. 12, p. 1056-1064, 1995.

TIZARD, I. R. Macrófagos: A segunda população de Células Fagocíticas. In: TIZARD, I. R. **Imunologia Veterinária: uma introdução**. 5. ed. São Paulo: Rocca, 1998, p. 32-44.

- TOMASEK, J. J.; GABBIANI, G.; HINZ, B.; CHAPONNIER, C.; BROWN, R. A. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodeling. **Nat Rev Mol Cell Biol**, London, v. 3, p. 349-363, 2002.
- TONNESEN, M. G.; FENG, X.; CLARK, R. A. F. Angiogenesis in wound healing. **J Investig Dermatol Symp Proc**, Cambridge, v. 5, n. 1, p. 40-46, 2000.
- TORRES, L. F. B.; SLUMINSKY, B. G.; TIRONI, F. A.; NORONHA, L.; GIRON, R. L.; TELLES, J. E. Q. Contribuição da imunohistoquímica em patologia cirúrgica: experiência de 10 anos. **Rev Med Paraná**, Curitiba, v. 56, n. 2/2, p. 31-38, 1998.
- TRANTAFILOU, M.; TRANTAFILOU, K. Invited review: The dynamics of LPS recognition: complex orchestration of multiple receptors. **J Endotoxin Res**, Edinburgh, v. 11, n. 1, p. 5-11, 2005.
- TURNBULL, I. R.; WIZOREK, J. J.; OSBORNE, D.; HOTCHKISS, R. S.; COOPERSMITH, C. M.; BUCHMAN, T. G. Effects of age on mortality and antibiotic efficacy in cecal ligation and puncture. **Shock**, Baltimore, v. 19, p. 310-313, 2003.
- UDOBI, K. F.; CHILDS, E. W. Sepsis/Acute respiratory Distress Syndrome. **Clinics in Family Practice**, v. 6, n. 1, p. 101-126, 2004.
- VAN WINCKLE, W. The tensile strength of wounds and factors that influence it. **Surg Gynecol Obstet**, Chicago, v. 129, n. 3, p. 819-842, 1969.
- VAN WINCKLE, W. The tensile strength of wounds and factors that influence it. **Surg Gynecol Obstet**, Chicago, v. 129, n. 3, p. 819-842, 1969.
- VIZZOTO JUNIOR, A.O.; CAMPOS, A.C.L.; VIEIRA, J.F.C.; SILVA, E.S.; MALAFAIA, O.; CZECZKO, N.G.; NORONHA, L. Influence of cisplatin given pre and postoperatively on the tensile strength of colonic anastomosis in rats. **ABCD**, São Paulo, v. 15, n. 2, p. 49-53, 2002.
- WAAGE, A.; HALSTENSEN, A.; ESPEVIK, T. Association between tumour necrosis factor in serum and fatal outcome in patients with meningococcal disease. **Lancet**, London, v. 1, p. 355-357, 1987.
- WAITZBERG, D. L. **Nutrição Oral, Enteral e Parenteral na Prática Clínica**. São Paulo: Editora Atheneu, 2004.
- WAITZBERG, D. L.; CAIAFFA, W. T.; CORREIA, M. I. Hospital malnutrition: the Brazilian national survey (IBRANUTRI): a study of 4000 patients. **Nutrition**, Burbank, v. 17, n. 7-8, p. 573-580, jul-aug. 2001.
- WAITZBERG, D. L.; CAIAFFA, W. T.; CORREIA, M. I. T.D. Inquérito Brasileiro de Avaliação Nutricional Hospitalar (Ibranutri). **Rev Bras Nutr Clin**, São Paulo, v. 14, n. 2, p. 124-134, 1999. Errata em **Rev Bras Nutr Clin**, São Paulo, v. 14, n. 3, p. 169, 1999.

WANG, M.; MENG, X.; TSAI, B.; WANG, J.; TURRENTINE, M.; BROWN, J.; MELDRUM, D. Preconditioning up-regulates the soluble TNF receptor I response to endotoxin. **J Surg Res**, Philadelphia, v. 121, n. 1, p. 20-24, 2004.

WARD, M. W. N.; DANZI, M.; LEWIN, M. R.; RENINE, M. J.; CLARCK, G. G. The effects of subclinical malnutrition and refeeding on the healing of experiment colonic anastomoses. **Br J Surg**, Bristol, v. 69, p. 308-310, 1982.

WARREN, H. S. Toll-like receptors. **Crit Care Med**, New York, v. 33 (Suppl 12), p. S457-459, dec. 2005.

WEINSTEIN, W. M.; ONDERDONK, A. B.; BARTLETT, J. G.; GORBACH, S. L. Experimental intra-abdominal abscesses in rats: development of an experimental model. **Infect Immun**, Bethesda, v. 10, p. 1250-1255, 1974.

WERNER, B. **Indicações e contribuição diagnóstica da imuno-histoquímica em patologia cirúrgica**. Curitiba, 2002. Tese (Mestrado em Clínica Cirúrgica) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

WHO – **WORLD HEALTH ORGANIZATION**. Disponível em: <http://www.who.int/en/>. Acesso em 04.03.08

WICHTERMAN, K. A.; BAUE, A. E.; CHAUDRY, I. H. Sepsis and septic shock: a review of laboratory models and a proposal. **J Surg Res**, Philadelphia, v. 29, p. 189-201, 1980.

WINDSOR, J.A.; KNIGHT, G.S.; HILL, G. L. Wound healing response in surgical patients: recent food intake is more important than nutritional status. **Br J Surg**, Bristol, v. 75, p. 135-137, 1998.

XING, Z.; GAULDIE, J.; COX, G.; BAUMANN, H.; JORDANA, M.; LEI, X.; ACHONG, M. K. IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. **J Clin Invest**, New Haven, v. 101, p. 3110-3120, 1998.

YEH, S. L.; YEH, C. L.; LIN, M. T.; LO, P. N.; CHEN, W. J. Effects of Glutamine-Supplemented Total Parenteral Nutrition on Cytokine Production and T Cell Population in Sepsis Rats. **JPEN**, Silver Spring, v. 25, n. 5, p. 269-274, 2001.

YENTIS, S. M.; SONI, N.; SHELDON, J. C-reactive protein as an indicator of resolution of sepsis in the intensive care unit. **Intensive Care Med**, Berlin, v. 21(7), p. 602-605, 1995.

YOUNG, M. E. Malnutrition and wound healing. **Heart Lung**, St. Louis, v. 17, n. 1, p. 60-67, 1988.

YUE, D. K.; SWANSON, B.; MCLENNAN, S.; MARSH, M.; SPALIVIERO, J.; DELBRIDGE, L.; REEVE, T.; TURTLE, J. R. Abnormalities of granulation tissue and collagen formation in experimental diabetes, uraemia and malnutrition. **Diabet Med**, Chichester, v. 3, n. 3, p. 221-225, 1986.

ZANTL,N.; UEBE, A.; NEUMANN, B.; SIEWERT, J. R.; HOLZMANN, B.; HEIDECKE, C. D.; PFEFFER, K. Essential role of [gamma]- interferon in survival of colon ascendants peritinitis, a novel murine model of abdominal sepsis. **Infect Immun**, Bethesda, v. 66, p. 2300-2309, 1998.

ZELLWEGER, R.; WICHMANN, M. W.; AYALA, A.; STEIN, S.; DEMASO, M. S.; CHAUNDRY, I. H. Females in proestrus state maintain splenic immune functions and tolerate sepsis better than male. **Crit Care Med**, New York, v. 25, p. 106-110, 1997.

ZIMECKI, M.; ARTYM, J.; CHODACZEK, G.; KOCIEBA, M.; KRUZEL, M. L. Protective effects of lactoferrin in Escherichia coli-induced bacteremia in mice: relationship to reduced serum TNF alpha level and increased turnover of neutrophils. **Inflamm Res**, Basel, v. 53, n. 7, p. 292-296, jul. 2004.

DOCUMENTOS CONSULTADOS

NORMAS para apresentação de documentos científicos. Universidade Federal do Paraná, Sistema de Bibliotecas. 2. ed. Curitiba: UFPR, 2007. v. 2: Teses, dissertações, monografias e outros trabalhos acadêmicos.

NORMAS para apresentação de documentos científicos. Universidade Federal do Paraná, Sistema de Bibliotecas. 2. ed. Curitiba: UFPR, 2007. v. 3: Citações e notas de rodapé.

NORMAS para apresentação de documentos científicos. Universidade Federal do Paraná, Sistema de Bibliotecas. 2. ed. Curitiba: UFPR, 2007. v. 4: Referências.

NORMAS para apresentação de documentos científicos. Universidade Federal do Paraná, Sistema de Bibliotecas. 2. ed. Curitiba: UFPR, 2007. v. 9: Redação e editoração.

PUBMED: a service of the National Library of Medicine and the National Institutes of Health. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez/>>. Último acesso em: 18/05/2008.

INMETRO: Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial Disponível em: <<http://www.inmetro.gov.br/index.asp>>. Último acesso em: 05/11/2007.

ANVISA: Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/>>. Último acesso em: 05/11/2007.

AVMA: AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION. Disponível em: <<http://www.avma.org/>>. Último acesso em: 17/05/08.

ANEXO I

INGESTA DIÁRIA DE RAÇÃO DO GRUPO CONTROLE

DIA	1		2		3		4	
	RAÇÃO	RESTO	RAÇÃO	RESTO	RAÇÃO	RESTO	RAÇÃO	RESTO
Rato 1	50,91	19,78	51,8	16,24	50,16	16,01	50,46	23,93
Rato 2	51,05	23,23	50,47	26,36	51,46	31,72	50,38	27,91
Rato 3	50,34	20,46	51,13	21,07	50,16	27,7	50,87	31,81
Rato 4	50,02	21,6	51,55	13,92	50,54	12,65	50,08	11,82
Rato 5	50,66	19,52	50,29	30,06	50,5	26,52	50,86	27,64
Rato 6	51,63	36,42	50,12	29,2	50,73	30,94	50,3	28,87
Rato 7	50,25	26,95	50,41	27,78	50,33	30,68	50,05	29,59
Rato 8	50,07	23,17	50,52	46,08	50,44	45,59	51,08	39,58
Rato 9	51,05	23,23	50,62	29,71	50,12	29,59	50,14	28,85
Rato 10	50,42	27,06	51,37	25,46	50,01	24,18	50,76	25,76
Rato 11	50,37	21,77	50,9	22,09	50,77	25,29	50,19	20,5
Rato 12	50,64	20,48	50,49	17,87	50,48	26,81	50,73	24,55
Rato 13	51,36	19,11	50,36	22,43	50,16	29,32	50,12	21,41
Rato 14	51,52	18,6	50,05	27,5	50,16	26,79	50,88	23,52
Rato 15	50,76	19,26	50,18	21,69	50,91	32,66	50,34	24,78
MÉDIA	50,74	22,71	50,68	25,16	50,46	27,76	50,48	26,03
Pair Feeding		14,01		12,76		11,35		12,22

LEGENDA:

RAÇÃO: quantidade de ração ofertada ao rato em gramas

RESTO: quantidade de ração que não foi ingerida pelo rato

Pair Feeding: Média da dieta ingerida (ração ofertada – resto)/2.

Óbito: óbito do rato submetido à desnutrição

5		6		7		8		9
RAÇÃO	RESTO	RAÇÃO	RESTO	RAÇÃO	RESTO	RAÇÃO	RESTO	RAÇÃO
50,1	13,69	50,38	21,71	51,02	29,72	50,44	24,56	50,46
50,21	25,16	50,11	26,09	50,43	27,9	50,65	28,79	50,74
50,6	41,24	50,05	47,45	50,08	39,08	50,02	40,8	50,03
50,31	8,82	50,08	20,17	50,18	18,08	50,62	15,51	50,87
50,35	26,3	50,82	25,81	51,13	29,19	50,04	26,87	50,71
50,89	28,23	50,85	42,42	50,41	32,76	51,25	33,06	50,04
50,72	26,69	50,29	25,74	50,01	28,41	51,41	26,18	50,59
50,25	50,25	50,79	48,48	50,05	44,14	50,27	43,29	50,02
51,07	25,68	50,59	26,96	50,21	18,78	50,32	31,41	51,25
50,53	25,67	50,09	26,71	50,03	27,12	50,84	27,84	50,65
50,36	20,53	50,68	27	50,53	20,19	50,34	17,7	51,06
50,63	19,39	50,8	28,92	50,62	29,26	50,39	22,12	50,78
50,69	20,84	50,8	20,86	50,77	23,61	50,31	22,91	50,63
50,79	19,34	50,42	26,7	50,72	25,73	50,04	23,67	50,44
50,9	25,9	50,43	24,29	50,9	28,65	51	29,61	50,76
50,56	25,18	50,48	29,29	50,47	28,17	50,53	27,62	50,60
	12,69		10,60		11,15		11,45	

	10		11		12		13	
RESTO	RAÇÃO	RESTO	RAÇÃO	RESTO	RAÇÃO	RESTO	RAÇÃO	RESTO
22,04	50,94	23,11	50,31	20,33	50,9	21,14	50,46	25,16
28,33	50,17	26,34	50,43	25,4	50,4	24,69	50,44	19,71
41,07	50,73	39,98	50,89	30,1	50,35	41,25	50,36	31,78
3,37	55,75	5,67	50,97	8,62	50,79	5,4	61,31	19,75
24,77	50,11	23,12	50,67	30,26	50,04	22,72	50,67	25,13
28,47	50,32	27,89	50,56	19,62	50,26	22,64	50,02	25,98
28,33	50,04	26,78	50,2	25,1	50,21	21,11	50,09	26,42
46,36	50,94	48,76	50,45	44,12	50,73	44,43	50,05	47,32
26,69	50,51	29,64	50,42	32,77	50,39	17	50,02	18,96
27,5	50,49	26,87	50,12	28,14	50,22	22,66	50,04	28,09
20,44	51,4	19,6	50,03	15,55	50,6	20,24	50,33	17,63
20,72	51,01	27,83	50,58	28,47	50,73	18,97	50,1	21,01
20,41	50,73	22,45	50,48	15,3	51,03	17,2	50,99	22,4
23,71	50,65	30,7	50,94	23,03	50,75	22,21	50,01	25,15
24,27	50,6	28,9	50,06	20,32	50,07	21,47	50,36	26,4
25,77	50,96	27,18	50,47	24,48	50,50	22,88	51,02	25,39
12,42		11,89		13,00		13,81		12,81
14		15		16		17		18

	19		20		21		22	
RESTO	RAÇÃO	RESTO	RAÇÃO	RESTO	RAÇÃO	RESTO	RAÇÃO	RESTO
22,98	50,84	26,43	50,67	23,7	50,05	23,63	50,05	19,69
25,17	50,67	31,86	51,02	27,75	50,57	43,37	50,93	45,97
34,66	50,68	46,85	51,02	42,86	50,22	22,41	50,22	25,17
14,32	50,03	15,8	51,01	12,28	50,33	1,23	59,01	32,06
18,46	50,49	29,53	50,33	24,79	50,03	16,49	50,93	30,33
20,22	51,02	31,44	50,85	27,02	50,06	26,33	50,65	28,05
25,54	50,74	33	50,08	25,78	50,44	31,22	51,48	30,41
38,04	50,87	45,03	50,54	43,19	50,88	39,43	50,62	40,81
19,35	50,27	30,44	50,07	22,46	50,66	17,51	51,2	28,28
27,73	50,29	29,47	50,18	25,76	50,05	22,92	50,54	30,77
19	50,03	21,87	50,89	20,02	51,01	22,73	51,51	28,87
19,64	50,69	35,67	50	34,89	50,47	33,12	50,12	40,74
22,05	50,47	Óbito	50,72		50,74		50,01	
27,13	50,42	29,79	50,13	15,34	50,81	26,54	50,79	32,5
28,44	50,4	24,07	50,63	31,26	50,92	18,75	50,54	31,59
24,18	50,53	30,80	50,54	26,94	50,48	24,69	51,24	31,80
13,67		9,86		11,80		12,90		9,72

23	24		25		26		27	
RAÇÃO	RESTO	RAÇÃO	RESTO	RAÇÃO	RESTO	CIRUR	RAÇÃO	RESTO
51,88	40,94	50,05	29,55	50,88	11,86		50,74	32,84
51,4	46,75	51,28	46,01	50,35	8,15		51,6	40,06
50,84	23,03	50,83	20,15	51,77	21,31		50,69	37,83
52,84	30,33	50,17	20,4	50,99	25,88		51,32	32,62
50,45	24,58	50,23	27,38	50,24	25,47		51,43	37,08
50,33	31,91	50,55	26,62	51,05	16,23		50,79	42,62
50,03	27,33	50,29	30,76	50,62	30,39		50,13	Óbito
50,09	42,86	50,59	46,93	51,08	18,1		50,12	46,57
50,66	22,52	50,09	22,87	50,06	28,77		50,51	47,39
50,79	30,24	50,13	24,36	50,55	26		51,68	47,54
50,38	31,99	50,82	30,2	50,33	12,19		50,15	31,07
50,74	40,02	50,47	41,9	50,56	25,5		50,31	
51,58		50,16		51			50,3	
50,16	26,4	50,35	24,62	50,56	24,95		50,64	41,02
51,09	34,2	50,05	27,6	50,41	19,44		50,59	30,05
50,88	32,36	50,40	29,95	50,70	21,02		50,73	38,89
	9,26		10,23		14,84			5,92

28		29		30		31
RAÇÃO	RESTO	RAÇÃO	RESTO	RAÇÃO	RESTO	Sacrifício
50,31	29,02	50,62	27,18	50,38	24,1	
50,02	35,56	50,41	27,47	51,19	29,02	
50,54	25,17	50,71	25,33	50,12	25,81	
50,63	Óbito	50,91		51,22		
51,09	25,47	51,05	31,73	51,37	16,69	
50,32	37,01	50,93	Óbito RD	51,18		
50,66	48,98	50,39	38,53	51,3	37,22	
50,5	27,01	50,35	22,56	50,01	18,12	
50,44		50,57		50,33	34,35	
51,65	41,22	50,16	Óbito RD	51,6		
50,34	30,4	50,87	29,38	50,02	23,23	
50,7		51,56		51,42		
51,03	25,55	50,34	27,88	51,17	26,94	
51,7	38,11	51,28	29,59	51,59	28,41	
50,71	33,05	50,73	28,85	50,92	26,39	
	8,83		10,94		12,27	

ANEXO II

EXAMES LABORATORIAIS

Avaliações hematológicas

- Contagem de leucócitos e plaquetas

Foi utilizado método automatizado através do equipamento Cell-dyn® 3200 System (Abbott).

- Contagem de bastonetes

Foi utilizado método microscópico por contagem porcentual de bastonetes após a coloração de May-Grunwald-Giemsa.

Dosagem de albumina

Foi utilizado o método colorimétrico, com o verde de bromocresol. A albumina presente na amostra reage com o verde de bromocresol em meio ácido, formando um complexo colorido que é quantificado espectrofotometricamente. A absorvância do complexo formado, medida em 630 nm, é diretamente proporcional à concentração da albumina na amostra analisada.

Dosagem de Proteína C Reativa

Foi utilizado o método ultrasensível.

Dosagem imunoenzimática dos níveis séricos do Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF α)

Esta dosagem emprega a técnica imunoenzimática quantitativa na qual um anticorpo monoclonal específico anti-TNF α é fixado em placa de Terazaki para posterior captura do antígeno TNF α . Foi empregado o conjunto de reativos BIOTRA

Tumor Necrosis Factor ELISA System (Amersham Pharmacia code RPN 2718[®]). As amostras de plasma eram distribuídas em cada um dos orifícios da placa, em volumes de 50 µl, a seguir eram incubadas por 2 horas à temperatura ambiente. Realizaram-se três lavagens totais com tampão fosfatos pH 7,5. Realizou-se então a adição do anticorpo de detecção (anticorpo monoclonal anti-TNF α conjugado à peroxidase), em cada um dos orifícios e incubação por 1 hora à temperatura ambiente. Esvaziar o conteúdo da placa por inversão e lavar três vezes com tampão fosfatos pH7,5. Foi distribuído 20 µl de peróxido de hidrogênio a 30%, em cada um dos orifícios e 10 µl de Ortofenilendiamino (50mg em 25ml de tampão citrato pH5,0) e incubar por 15 minutos. Após esta etapa, foi adotada solução 10N de ácido sulfúrico (*stop solution*), para interromper a reação. Realizou-se leitura a 450nm e os valores obtidos para as amostras foram comparadas com curva padrão, que utilizou IL-6 liofilizada de rato. O desenvolvimento da cor indica a presença do TNF α na amostra, que será diretamente proporcional à leitura espectrofotométrica.

Dosagem imunoenzimática dos níveis séricos da Interleucina-6 (IL-6)

Para determinação da produção de citocina, o sangue dos ratos foi coletado em tubos de EDTA, para separação do plasma. Na determinação da interleucina-6, utilizou-seo kit específico para ELISA (BD OptEIA [™], Pharmigen).

As amostras foram pipetadas sobre as escavações de placas de 96 poços (Maxisorp F-96, Nunc) cobertas previamente com anticorpo de captura específico para a interleucina (anticorpo monoclonal anti-rato IL-6), seguido de diversas lavagens e da adição de diluente. Após a colocação das amostras nas escavações, as placas foram incubadas por duas horas à temperatura ambiente. Realizaram-se cinco lavagens totais. Realizou-se então a adição do anticorpo de detecção (anticorpo monoclonal anti-rato IL-6 biotilado) e incubação por uma hora a temperatura ambiente. Após remoção do excesso do segundo anticorpo, adicionou-se a enzima peroxidase (*avidin-horseradish peroxidase conjugate*). Esta peroxidase se ligou ao anticorpo de detecção para completar a reação. Após a lavagem para remoção de toda a enzima não ligada, colocou-se solução de substrato (tetrametilbenzidina e peróxido de hidrogênio) e as amostras foram inoculadas por

30 minutos a temperatura ambiente, no escuro. Após esta etapa, foi adotada solução 2N de ácido sulfúrico (*stop solution*), para interromper a reação. Realizou-se leitura a 450nm e os valores obtidos para as amostras foram comparadas com curva padrão, que utilizou IL-6 liofilizada de rato.

ANEXO III

PESO DOS GRUPOS DURANTE O EXPERIMENTO

C	D0	D7	D14	D21	Cirurgia	Sacrificio
1	274,37	285,44	315,53	320,4	295,4	309,6
2	275,58	296,59	325,38	294,2	265,5	273,94
3	267,37	225,83	235,09	202,51	221,7	233,58
4	283,04	302,63	340,73	350,01	330,1	324,52
5	243,57	265,54	285,78	304,8	286,7	293,08
6	260,45	251,59	277,78	284,01	272,8	266,86
7	269,89	288,36	316,71	332,3	311,4	273,67
8	285,32	327,04	328,59	345,49	331,7	313,61
9	274,37	286,6	323,36	337,6	316,4	285,97
10	258,05	269,94	291,83	303,35	282,4	265,42
11	268,79	293,38	324,01	323,2	300,8	289,31
12	284,17	291,98	320,76	283,8	240,2	304,64
13	274,54	290,4	317,49	318,64	293,7	288,11
14	254,79	264,49	291,67	297,5	284,6	285,22
15	260,73	283,98	310,26	316,92	285,5	281,73

DT	D0	D7	D14	D21	Cirurgia	Sacrificio
1	267,5	246,15	152,64			
2	240,17	238,55	201,52	182,34		
3	304,4	277,44	252,47	244,04	234,67	191,53
4	283,04	227,78	219,11	203,7		
5	248,12	219,89	218,45	210,5	175,35	175,92
6	282	250,25	235,23	216,16	209,4	182,99
7	275,02	237,5	224,28	204,53	198,7	171,23
8	247,04	221,76	220,72	204,37	181,2	
9	284,79	251,28	250,07	227,82	217	200,03
10	226,78	215,6	194,79	190,14	178,63	166,9
11	261,73	214,4	215,09	195,4	182,6	
12	304,35	268,25	244,72	235,97	222,63	154,83
13	261	227,49	214,72	199,19	193,4	165,65
14	274,33	236,27	212,67	207,03	203,82	170,59
15	234,32	204,68	209,72	192,13	173	

DTN	D0	D7	D14	D21	Cirurgia	Sacrifício
1	226,46	226,33	207,26	202,19		
2	242,45	247,91	210,69	194,25	256	282,79
3	248,6	247,1	227,87	227,16	272,28	198,04
4	253,98	238,25	187,36	175,99	242,48	247,35
5	237,41	214,84	177,07	167,54	179,5	
6	245,38	205,98	177,32	169,78	223,57	243,77
7	232,89	155,1				
8	347,52	321,56	284,7	266,25	312,68	343,69
9	245,01	233,42	220,73	217,18	248,98	269
10	257,72	225,14	185,46	181,57	244,22	267,55
11	338,63	300,35	273,55	265,54	294,56	308,61
12	314,5	279,48	250,38	234,86	273,76	
13	229,2	214,52	195,5	190,75	237,84	251,76
14	218,01	210,99	196,22	194,24	219,13	233,37
15	310,94	288,16	266,77	256,23	293,45	

LEGENDAS

C: grupo controle

DT: grupo desnutrido toxêmico

DTN: grupo desnutrido toxêmico com nutrição perioperatória

D0: dia inicial

D7: sétimo dia

D14: décimo quarto dia

D21: vigésimo primeiro dia

ANEXO IV

RESULTADOS

C	Alb	PCR	Leucócitos	Plaquetas	Bastonetes	TNF	IL-6
1	3,8	0,83	6,21	381	0	12,1	32,5
2	3,3	0,12	5,56	550	0	8,5	21,2
3	3,4	0,36	4,72	356	3	5,7	34
4	3,5	0,58	7,83	463	0	6,9	56,1
5	2,9	0	5,96	222	1	4,2	23,6
6	3,3	0	4,53	631	0	3,8	12,9
7	3,1	0,62	8,81	618	0	2,3	35,4
8	4,6	0,17	6,55	544	0	5,7	17,3
9	3,8	0,85	5,16	361	2	6,3	14
10	3,3	0,96	8,06	451	0	7,4	21,5
11	2,6	0,45	5,41	364	0	8,1	19,6
12	4,4	0	6,39	647	0	5,3	12,7
13	2,1	1,26	4,56	483	0	3,6	36
14	2,2	0	3,23	325	0	9,4	31,8
15	2,2	0	3,71	610	0	5,3	23,5

DT	Alb	PCR	Leucócitos	Plaquetas	Bastonetes	TNF	IL-6
1							
2							
3	1,03	46	19,65	87	12	716	218,66
4							
5	1,41	37	20,14	65	5	733	263,7
6	1,25	44	19,11	78	9	831	331,54
7	1,23	23	23,33	67	5	623	508,42
8	1,06	51	9,61	55	11	725	712,15
9	1,33	72	8,57	48	18	902	626,39
10	1,27	66	8,93	67	6	775	759,03
11	1,14	31	19,85	89	9	682	441,24
12	0,35	48	19,24	126	14	986	884,66
13	1,51	28	11,54	52	8	648	338,54
14	1,18	51	9,62	43	16	723	947,61
15	0,83	38	8,34	81	19	748	713,48

DTN	Alb	PCR	Leucóцитos	Plaquetas	Bastonetes	TNF	IL-6
1							
2	4,4	0,83	5,39	253	3	9,1	611,41
3	2,8	1,26	4,15	284	2	6,6	544,62
4	3,7	1,35	2,54	326	3	5,7	206,35
5	2,8	0,34	6,41	436	6	3,5	364,26
6	3,2	0,26	3,72	346	4	7,2	981,19
7							
8	1,4	0,41	5,83	554	0	2,3	478,78
9	2,8	1,83	5,97	373	0	3,5	602,91
10	2,4	4,55	6,65	261	6	2,4	163,52
11	2,3	3,48	3,39	136	5	7,6	226,43
12	2,6	1,14	4,23	484	5	5,9	305,1
13	2,7	1,31	4,15	269	0	9,4	291,22
14	2,5	0,67	6,36	383	0	2,2	306,75
15	1,9	0,89	3,64	284	0	6,4	629,33

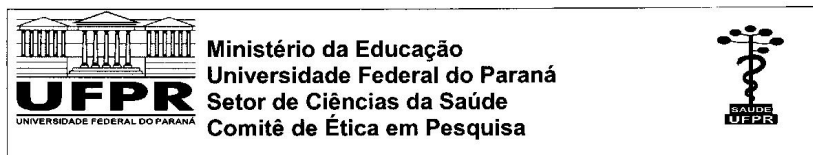
C	Colag. I	Colag. III	IMAc	Miofibrob	Vasos	TM	FMT
1	61,8	38,19	1,62	7	3,5	1,1741	0,23
2	81,48	18,51	4,40	7,5	3,75	0,851	0,21
3	52,53	47,46	1,11	8,25	4,5	0,6307	0,17
4	36,52	63,47	0,58	6,5	7,5	0,6385	0,13
5	83,49	16,5	5,06	8,5	5	1,3622	0,27
6	27,79	72,2	0,38	9,25	5,75	0,6695	0,18
7	64,05	35,94	1,78	7,75	2,5	0,7281	0,14
8	29,39	70,69	0,42	7,5	2,75	0,654	0,13
9	12,46	87,53	0,14	9,25	4,25	0,789	0,15
10	13,04	86,95	0,15	6,75	2	1	0,12
11	16,06	83,93	0,19	5,75	5	0,955	0,19
12	41,5	58,49	0,71	9,25	3	0,8664	0,17
13	23,95	76,04	0,31	6,75	6,5	0,9494	0,19
14	53,77	46,22	1,16	7,25	4,25	0,9605	0,19
15	47,88	52,11	0,92	7	4,75	0,8742	0,17

DT	Colag. I	Colag. III	IMAc	Miofibrob	Vasos	TM	FMT
1							
2							
3							
4	25,99	74	0,35	5,5	7	0,5787	0,11
5							
6	50,67	49,32	1,03	7,75	10	0,8078	0,16
7	24,22	75,77	0,32	1,25	6,75	0,3286	0,06
8	29,84	70,15	0,43	7,25	8,75	0,6462	0,13
9							
10	55,54	44,45	1,25	2	8,5	0,46	0,09
11	53,99	46	1,17	2,5	8,25	0,4437	0,09
12							
13	47,61	52,38	0,91	2,75	7	0,2567	0,05
14	46,67	53,32	0,88	3,5	8,5	0,4493	0,09
15	28,34	71,65	0,40	4	8,25	0,6617	0,13

DTN	Colag. I	Colag. III	IMAc	Miofibrob	Vasos	TM	FMT
1	42,12	57,87	0,73	7	10,25	0,8388	0,16
2	14,98	85,01	0,18	5,25	8,75	0,369	0,83
3	52,17	47,82	1,09	5	10,75	0,3962	0,18
4							
5	26,65	73,34	0,36	7,5	4,5	1,7783	0,45
6							
7	35,59	64,4	0,55	7,5	9	1,0203	0,3
8	18,5	81,49	0,23	6,25	6	0,4913	0,2
9	25,38	74,61	0,34	8	6,5	0,5135	0,2
10	26,87	73,12	0,37	3,25	6,5	1,2969	0,36
11							
12	49,19	50,8	0,97	5,25	10,5	0,8432	0,27
13	61,76	38,23	1,62	6,75	10,75	1,0214	0,3
14							
15							

LEGENDA:**C: controle****DT: desnutrido e toxêmico****DTN: desnutrido e toxêmico com nutrição perioperatória****Alb: albumina****PCR: Proteína C Reativa****TNF: Fator de Necrose Tumoral****IL-6: Interleucina-6****Colag. I: Colágeno I****Colag. III: Colágeno III****Vasos: número de vasos sanguíneos****Miofibrob: miofibroblastos****TM: tensão máxima****FTM: força de tração máxima**

ANEXO V



Curitiba, 31 de outubro de 2008.

Ilmo (a) Sr. (a)
Antonio Carlos Ligocki Campos
Nicolas Galat
Nesta

Prezado(a) Pesquisador(a),

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado “**Influência desnutrição e realimentação na cicatrização colônica de ratos sépticos**” está de acordo com as normas éticas orientadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR, em reunião realizada no dia 06 de agosto de 2008 e apresentou pendência(s). Pendência(s) apresentada(s), documento(s) analisado(s) e projeto aprovado em 22 de outubro de 2008.

Registro **CEP/SD**: AN.012.003.08.07

Conforme a Resolução CNS 196/96, solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

Data para entrega do relatório final ou parcial: 22/04/2009.

Atenciosamente

Profª. Drª. Liliana Maria Labronici
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde

Profª. Dra. Liliana Maria Labronici
Coordenador do Comitê de Ética
em Pesquisa - SD/UFPR