

MILTON PEREIRA CORRÊA NETO

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA DE ARGININA NA CICATRIZAÇÃO
DAS ANASTOMOSES COLÔNICAS EM RATOS

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

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos L. Campos

Coodernador: Prof. Dr. Antonio Carlos L. Campos

CURITIBA

2008

C824e Corrêa Neto, Milton Pereira.
Efeito da suplementação dietética de arginina na cicatrização das anastomoses colônicas em ratos / Milton Pereira Corrêa Neto ; orient. Dr. Antonio Carlos L. Campos. - Curitiba : UFPR , 2008.
82 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Antonio Carlos L. Campos.
Dissertação (Mestrado em Clínica Cirúrgica) – Universidade Federal do Paraná

1. Cirurgia - Cicatrização. 2. Anastomoses intestinais. 3. Arginina.
4. Dissertação – Mestrado. I. Campos, Antonio Carlos L. II. Título.

CDD 617.91

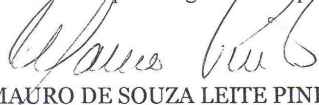
ATA

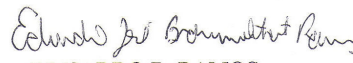



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA CIRÚRGICA
NÍVEIS: MESTRADO E DOUTORADO

Ata do julgamento da 32ª Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná, referente ao aluno **Milton Pereira Corrêa Neto** com o título EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA DE ARGININA NA CICATRIZAÇÃO DAS ANASTOMOSES COLÔNICAS EM RATOS, na **Linha de Pesquisa:** Cicatrização e Medidas de Resistência dos Tecidos na **Área de Concentração:** Nutrição e Cicatrização tendo como orientador Prof. Dr. **Antonio Carlos L. Campos**

Às sete horas e trinta minutos do dia cinco de dezembro de dois mil e oito, no auditório do 7º andar do prédio central sala 701 do Hospital de Clínicas, reuniu-se, em sessão pública, a Banca Examinadora de Avaliação composta pelos Professores Doutores Mauro de Souza Leite Pinho, Eduardo José B. Ramos e Renato Araújo Bonardi sendo este último Presidente da Banca. Aberta a sessão, foi apresentada pelo Prof. Dr. Antonio Carlos L. Campos, 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. O candidato foi considerado **APROVADO** 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 de Avaliação.


MAURO DE SOUZA LEITE PINHO


EDUARDO B. RAMOS


RENATO ARAÚJO BONARDI

TERMO DE APROVAÇÃO



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 DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluno **Milton Pereira Corrêa Neto**

Título da Dissertação EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA DE ARGININA NA CICATRIZAÇÃO DAS ANASTOMOSES COLÔNICAS EM RATOS.

CONCEITOS EMITIDOS:

Prof.Dr. Mauro de S. L. Pinho	conceito emitido	A	equivalência	9
Prof.Dr. Eduardo B. Ramos	conceito emitido	A	equivalência	9
Prof.Dr. Renato Araújo Bonardi	conceito emitido	A	equivalência	9

Conceito Final de Avaliação:

Conceito: A Equivalência: 9

Curitiba, 05 de dezembro de 2008.

Prof.Dr. Mauro de Souza Leite Pinho

Prof.Dr. Eduardo B. Ramos

Prof.Dr. Renato Araújo Bonardi

AGRADECIMENTOS

Como já seria esperado a elaboração desta tese envolveu a participação de inúmeras pessoas, porém algumas não poderia deixar de mencionar como farei a seguir:

Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Ligocki Campos, orientador desta dissertação, que com seu acolhimento, apoio e orientação permitiu a execução desta obra, além de meu crescimento pessoal e profissional.

Ao Prof. Dr. Mauro de Souza Leite Pinho, cirurgião e colega em Joinville, cujo incentivo e ajuda muito contribuíram na realização deste mestrado.

À Dra. Alessandra Borges Branco, cirurgiã cuja ajuda ao longo do trabalho, especialmente na fase experimental foi fundamental.

Ao Dr. Hercílio Fronza Júnior e Dra. Arlete Benta de Souza, patologistas cuja contribuição nos resultados foi imprecindível.

Aos acadêmicos de medicina Heloísa Nardi Koerner e Rafael Pepracca Pistori que com seus auxílios na fase experimental tiveram grande parcela de contribuição.

Aos colegas e cirurgiões Ricardo Lemos e Luis Carlos Ferreira companheiros de idas e vindas a Curitiba.

A Sra. Beni Becker pela contribuição na finalização do trabalho.

A Sra. Salete do Carmo Pelanda pelo auxílio com a estatística do trabalho.

A Sra. Regina Sass Marques, funcionária da Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica pelo ajuda ao longo de todo o mestrado.

A Ajinomoto do Brasil pela contribuição com a arginina para sua utilização no trabalho.

A UFPR e a CAPES pela vaga e a bolsa na Pós-Graduação.

RESUMO

Efeito da suplementação dietética de arginina na cicatrização das anastomoses colônicas em ratos

Introdução: A arginina, aminoácido semi-essencial, tem sido estudada por diversos autores nas últimas décadas. Sua participação em diversos processos fisiológicos já está bem definida, sendo a cicatrização e a função imune as mais estudadas. No presente trabalho procurou-se avaliar o efeito da suplementação por via oral com arginina na cicatrização colônica em ratos. **Material e Método:** Foram utilizados 47 ratos *Wistar* machos, adultos, com peso médio de $345,45 \pm 8,35$ g e alocados em gaiolas coletivas em grupos 5 ou 6 animais. Todos os animais receberam água e ração para ratos *ad libitum* e foram pesados a cada dois dias. Os animais foram randomizados para receberem suplementação com arginina a 10% (grupo arg) ou solução de aminoácidos a 10% (grupo aa), de forma isovolumétrica, isocalórica e isonitrogenada (1,5 g/kg/dia). Um terceiro grupo recebeu solução salina isotônica (grupo ssi). Receberam a suplementação por gavagem por 7 dias antes do procedimento operatório e 4 dias após o mesmo. Foram sacrificados no 5º dia de pós-operatório. Foram realizadas duas anastomoses colônicas término-terminais, confeccionadas 3 cm distais à válvula ileocecal e outra 5 cm. distais à primeira anastomose, em plano único com fio monofilamentar de nylon 5.0. No dia do sacrifício, as duas anastomoses foram ressecadas, sendo uma enviada em solução salina para medidas de tração e a outra enviada para estudos de patologia, para análise do colágeno e seus dois principais subtipos, além de estudos de imunoistoquímica para a pesquisa de miofibroblastos e neovascularização. Foram avaliados também parâmetros como o peso ao longo do experimento. A análise estatística foi realizada com os testes t de Student e de Mann-Whitney. **Resultados:** A comparação referente ao peso nos três grupos não evidenciou diferença significativa nos pesos iniciais mas esta foi observada entre os pesos finais nos grupos *ssi* e *aa* (324,7g vs. 298g, $p=0,04$). A tração máxima foi significativamente maior no grupo *aa* quando comparado ao grupo *ssi* (0,94kgf/cm² vs. 0,67 kgf/cm², $p=0,04$), mas não em relação ao grupo *arg* (0,94kgf/cm² vs. 0,70 kgf/cm², $p=0,09$). Quanto à força máxima de tração observamos uma diferença significativa entre o grupo *aa* e o grupo *ssi* (0,18kgf vs. 0,13 kgf, $p=0,04$) mas não em relação ao grupo *arg* (0,18kgf vs. 0,14 kgf, $p=0,08$). A força de ruptura total evidenciou um valor significativamente maior para o grupo *aa* quando comparado ao grupo *arg* (0,10kgf vs. 0,06 kgf, $p=0,05$), mas não em relação ao grupo *ssi* (0,10kgf vs. 0,09 kgf, $p=0,54$). Não foi observada diferença significativa quanto à concentração dos colágenos subtipo I e III e nem do Índice de Maturação de Colágeno (IMAC) nos três grupos. Não foi observada também diferença significativa em relação à contagem de vasos sanguíneos ou miofibroblastos pela imunoistoquímica entre os três grupos. **Conclusões:** Concluiu-se que a arginina influenciou positivamente as provas de tração das anastomoses colônicas, especialmente quando associada a outros aminoácidos.

Palavras-chave: Arginina, Cicatrização, Tensiometria, Colágeno, Angiogênese, Miofibroblastos.

ABSTRACT

Background: The arginine, semi-essential aminoacid, has been subject of many studies in the last decades. Its participation in many physiological processes is already well established, being the healing and the immune function the most studied ones. In the present study the effect of the oral supplementation with arginine in the healing of colonic anastomosis in rats was evaluated. **Method and Materials:** Forty seven adult male *Wistar* rats, with a weight of $345,45 \pm 8,35$ g were divided in cages of 5 or 6 animals. All rats had free access to water and standard rat chow diet. They were randomized to receive supplementation with 10% arginine (arg group), 10% aminoacid solution (aa group) and isotonic saline solution (iss group) in an isovolumetric, isocaloric and isonitrogenous way (1,5 grs/kg/day) among them. They were supplemented through and orogastric tube for 7 days before the operation and were killed 5 days after the operation. The anastomoses were end-to-end, 3 cm after the ileocecal valve, the first one, and the second, 5 cm. distal, in a single layer with a nylon line (5/0). On the day of the sacrifice, both anastomoses were resected, one was sent in saline solution to check the tensile strength and the other was sent to the pathological examination, specifically for the collagen study, including its two main subtypes. The specimens were also sent to immunohistochemical study to search for new blood vessels and myofibroblasts. The body weight was also analysed along the study. The statistical analysis was done with the Student's *t* test and the Mann-Whitney test. **Results:** The comparison among the three groups has not shown any significant difference in the initial weight, but in the final weight there was a difference between the iss and the aa groups (324,7g vs.298g, $p=0,04$). The maximum traction was significantly higher in the aa group when compared with the iss group ($0,94\text{kgf/cm}^2$ vs. $0,67\text{kgf/cm}^2$, $p=0,04$), but not when compared with the arg group ($0,94\text{kgf/cm}^2$ vs. $0,70\text{kgf/cm}^2$, $p=0,09$). It was observed a significant difference in the maximum traction power between the aa group and the iss group ($0,18\text{kgf}$ vs. $0,0,13\text{kgf}$, $p=0,04$) but not when compared with the arg group ($0,18\text{kgf}$ vs. $0,14\text{kgf}$, $p=0,08$). The total rupture force has been greater than the aa group compared to arg group ($0,10\text{kgf}$ vs. $0,06\text{kgf}$, $p=0,05$), but not when compared to the iss group ($0,10\text{kgf}$ vs. $0,90\text{kgf}$, $p=0,54$). It was not seen any significant difference in the collagen concentration and its subtypes, nor the Collagen Maturation Index (IMAC), among the three groups. It was not observed also significant differences in the blood vessels and myofibroblasts counts. **Conclusions:** We concluded that arginine influenced positively the traction tests in the colonic anastomosis, specially when associated with other aminoacids.

Key Words: Arginine, Healing, Tensiometry, Collagen, Angiogenesis, Myofibroblasts.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO METABOLISMO DA ARGININA	28
FIGURA 2 - CICLO DA URÉIA	29
FIGURA 3 - METABOLISMO DA ARGININA	30
FIGURA 4 - MÁQUINA UNIVERSAL DE ENSAIO MECÂNICO	41
FIGURA 5 - GRÁFICO DO ESTUDO DE TRAÇÃO NOS CORPOS DE PROVA	42
FIGURA 6 - FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DE CÓLON DE RATO CORADO PELO PICROSÍRIUS (200X)	44
FIGURA 7 - ACHADOS HISTOLÓGICOS DIGITALIZADOS PARA ANÁLISE DE DEPOSIÇÃO DE COLÁGENO NA ANASTOMOSE COLÔNICA	45
FIGURA 8 - FOTOMICROGRAFIA DOS MIOFIBROBLASTOS CORADOS EM MARROM PELA TÉCNICA AVIDINA-ESTREPTAVIDINA-DIAMINOBENZIDINA UTILIZANDO-SE ANTICORPO ANTI- α -ACTINA MUSCULAR LISA	48
FIGURA 9 - ACHADOS HISTOLÓGICOS DIGITALIZADOS PARA CONTAGEM DE MIOFIBROBLASTOS UTILIZANDO O SOFTWARE <i>IMAGE-PRO PLUS</i> ®	49
FIGURA 10 - FOTOMICROGRAFIA DOS VASOS SANGUÍNEOS COM A ÍNTIMA CORADA EM MARROM REVELANDO POSITIVIDADE PARA ANTI- α -ACTINA MUSCULAR LISA PELA TÉCNICA DA AVIDINA-ESTREPTAVIDINA-PEROXIDASE-DIAMINOBENZIDINA, MAGNIFICAÇÃO ORIGINAL 100X	50
FIGURA 11 - ACHADOS HISTOLÓGICOS DIGITALIZADOS PARA CONTAGEM DE VASOS SANGUÍNEOS UTILIZANDO O SOFTWARE <i>IMAGE-PRO PLUS</i> ®	51

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - MÉDIAS DO PESO INICIAL DOS GRUPOS SSI, AA E ARG.....	53
TABELA 2 - MÉDIAS DO PESO FINAL DOS GRUPOS SSI, AA E ARG.....	54
TABELA 3 - MÉDIAS DA TRAÇÃO MÁXIMA DOS GRUPOS SSI, AA E ARG	55
TABELA 4 - MÉDIAS DA FORÇA MÁXIMA DE TRAÇÃO DOS GRUPOS SSI, AA E ARG	56
TABELA 5 - MÉDIAS DA FORÇA DE RUPTURA TOTAL DOS GRUPOS SSI, AA E ARG	57
TABELA 6 - MÉDIAS DO COLÁGENO TIPO I DOS GRUPOS SSI, AA E ARG.....	58
TABELA 7 - MÉDIAS DO COLÁGENO TIPO III DOS GRUPOS SSI, AA E ARG ...	59
TABELA 8 - MÉDIAS DO IMAC DOS GRUPOS SSI, AA E ARG.....	60
TABELA 9 - MÉDIAS DA CONTAGEM DE VASOS SANGUÍNEOS DOS GRUPOS SSI, AA E ARG	61
TABELA 10 - MÉDIAS DA CONTAGEM DE MIOFIBROBLASTOS DOS GRUPOS SSI, AA E ARG	62

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - MÉDIAS DO PESO INICIAL DOS GRUPOS SSI, AA E ARG.....	54
GRÁFICO 2 - MÉDIAS DO PESO FINAL DOS GRUPOS SSI, AA E ARG.....	55
GRÁFICO 3 - MÉDIAS DA TRAÇÃO MÁXIMA DOS GRUPOS SSI, AA E ARG ...	56
GRÁFICO 4 - MÉDIAS DA FORÇA MÁXIMA DE TRAÇÃO DOS GRUPOS SSI, AA E ARG	57
GRÁFICO 5 - MÉDIAS DA FORÇA DE RUPTURA TOTAL DOS GRUPOS SSI, AA E ARG	58
GRÁFICO 6 - MÉDIAS DO COLÁGENO TIPO I DOS GRUPOS SSI, AA E ARG.....	59
GRÁFICO 7 - MÉDIAS DO COLÁGENO TIPO III DOS GRUPOS SSI, AA E ARG	60
GRÁFICO 8 - MÉDIAS DO IMAC DOS GRUPOS SSI, AA E ARG.....	61
GRÁFICO 9 - CONTAGEM DE VASOS SANGUÍNEOS DOS GRUPOS SSI, AA E ARG	62
GRÁFICO 10 - CONTAGEM DE MIOFIBROBLASTOS DOS GRUPOS SSI, AA E ARG	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A	-	alfa
aa	-	aminoácido
arg	-	arginina
cm	-	centímetro
cm ²	-	centímetro quadrado
EGF	-	fator de crescimento endotelial
ep	-	erro padrão
et al	-	e colaboradores
EUA	-	Estados Unidos da América
FGF	-	fator de crescimento dos fibroblastos
FMT	-	força máxima de tração
FRT	-	força de ruptura total
g	-	grama
Hg	-	mercúrio
IGF-1	-	fator de crescimento análogo a insulina 1
IL - 1	-	interleucina 1
IMAC	-	índice de maturação de colágeno
INMETRO	-	Instituto Nacional de Metrologia
iNOS	-	isoenzima sintetizadora do óxido nítrico
IPARDES	-	Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social
kg	-	quilograma
kgf	-	quilogramaforça
KGF	-	fator de crescimento queratinocítico
l	-	litro
LCD	-	monitor de cristal líquido

m	- média
mg	- miligrama
min	- minuto
min-max	- valores mínimo e máximo
mm	- milímetro
mm ²	- milímetro quadrado
n	- número de animais
NO	- óxido nítrico
NOS	- sintetase do óxido nítrico
OAT	- Ornithine Aminotransferase
ODC	- Ornithine Decarboxylase
p	- nível de significância estatística
PCS	- picrosirius
PDGF	- fator de crescimento derivado das plaquetas
PF - 4	- fator plaquetário 4
pH	- potencial de hidrogênio iônico
PR	- Paraná
rad	- unidade de radioatividade
RGB	- red, green and blue
RNA	- ácido ribonucléico
SC	- Santa Catarina
SP	- São Paulo
ssi	- solução salina isotônica
TECPAR	- Instituto de Tecnologia do Paraná
TGF- β	- fator de crescimento transformador β
TNF	- fator de necrose tumoral
TNF- α	- fator de necrose tumoral α

UFPR	-	Universidade Federral do Paraná
UNIVALI	-	Universidade do Vale do Itajaí
VEGF	-	fator de crescimento endotelial vascular
vs	-	versus
μm	-	micrometro
%	-	porcentagem
ω	-	ômega
®	-	marca registrada

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 OBJETIVOS	18
1.1.1 Objetivo geral	18
1.1.2 Objetivos específicos	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 PROCESSO CICATRICIAL	19
2.2 AVALIAÇÃO DO PROCESSO CICATRICIAL	22
2.2.1 Peso, Mortalidade e Aderências intra-abdominais	22
2.2.2 Parâmetros Mecânicos	23
2.2.2.1 Pressão de ruptura	23
2.2.2.2 Tensão de ruptura e Força de ruptura	24
2.2.3 Parâmetros Histológicos	25
2.2.3.1 Imunoistoquímica	26
2.3 A ARGININA	26
2.3.1 A fisiologia da arginina	27
2.3.2 Estudos experimentais com arginina	30
3 MATERIAL E MÉTODO	37
3.1 ANIMAIS	37
3.2 SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA	37
3.3 GRUPOS DE ESTUDO	38
3.4 PROCEDIMENTOS OPERATÓRIOS	38
3.4.1 Pré-operatório	38
3.4.2 Per-operatório	38
3.4.3 Pós-operatório	39
3.5 SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS	39
3.6 DADOS AVALIADOS	40
3.6.1 Mortalidade	40
3.6.2 Peso	40
3.6.3 Força de tração e de ruptura da anastomose colônica	40
3.6.4 Estudo histológico	43

3.6.5 Coloração imunoistoquímica	45
3.7 AVALIAÇÃO DO COLÁGENO, MIOFIBROBLASTOS E VASOS SANGÜÍNEOS	46
3.7.1 Morfometria do colágeno	46
3.7.2 Número de miofibroblastos	47
3.7.3 Número de vasos sanguíneos	49
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	51
4 RESULTADOS	53
4.1 ÓBITOS	53
4.2 PESO	53
4.3 VARIÁVEIS DE FORÇA E TRAÇÃO	55
4.4 ANÁLISE DO COLÁGENO	58
4.5 IMUNOISTOQUÍMICA	61
5 DISCUSSÃO	64
5.1 MÉTODO	64
5.1.1 Escolha do modelo experimental	64
5.1.2 Avaliação da arginina	65
5.2 AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS	65
5.2.1 Avaliação microscópica	68
6 CONCLUSÕES	72
REFERÊNCIAS	73
APÊNDICE	82

1 INTRODUÇÃO

Cicatrização adequada é considerada fundamental para o sucesso de qualquer intervenção cirúrgica, sendo uma falha na mesma o surgimento de deiscências das anastomoses intestinais e suas conseqüências. Em revisão bibliográfica ampla, HENDRIKS & MASTBOOM (1990) encontraram índices de complicações que variaram de 0 a 35%, influenciadas pelas diversas populações estudadas e pelos diversos fatores de risco presentes nestes pacientes. Trabalhos de diversos autores, como KORUDA & ROLANDELLI (1990) e CAMPOS, MEGUID e COELHO (1996) demonstraram que tais falhas elevam a duração do internamento em até duas vezes, o índice de mortalidade perioperatória em até três vezes e, conseqüentemente, elevação considerável nos custos do tratamento.

À medida em que o processo fisiológico da cicatrização tornou-se progressivamente compreendido, outros fatores que influenciam este processo foram sendo descobertos e avaliados. No que diz respeito às anastomoses intestinais, foram reconhecidas causas locais e sistêmicas. Desde as décadas de 50 e 60 do século passado, estudos têm sido realizados para avaliação de detalhes técnicos nas anastomoses intestinais. Alguns conceitos foram posteriormente universalmente aceitos, tais como a realização de anastomoses sem tensão, com boa vascularização, na ausência de infecção, com boa coaptação dos bordos da ferida e com a inclusão da submucosa nos pontos, por ser esta camada rica em colágeno (GETZEN & HOLLOWAY, 1966; CRONIN, JACKSON e DUNPHY, 1968).

Além de fatores locais, como os descritos acima, que possuem importância no sucesso do processo cicatricial, surgiram também estudos posteriores que demonstraram a influência sistêmica sobre o processo. O uso de anti-inflamatórios hormonais e não-hormonais, antibióticos, prostaglandinas, anti-neoplásicos, imunomoduladores, dietas específicas ou suplementos dietéticos e radiação ionizante foram estudados e definidos sua importância (ROLANDELLI, KORUDA, SETTLE e ROMBEAU, 1986; CAMPOS, MUCERINO, WAITZBERG, LOGULO, EL IBRAHIM, NADALIN e HABR-GAMA, 1994; SKINOVSKY, MALAFAIA, IOSHII e CAMPOS, 2001; VIZZOTO, NORONHA, SCHEFFEL e CAMPOS, 2001; COSTA, CAMPOS e COELHO, 2003; FERREIRA, 2004; BONIN, CAMPOS e COELHO, 2005).

Em face à dificuldade em estudar tais mecanismos de ação em condições clínicas, alguns modelos de experimentação foram sendo desenvolvidos com este objetivo (BLOMQUIST, JIBORN e ZEDERFELDT, 1984; BRASKEN, RENVALL e SANDBERG, 1991; GARCIA-OLMO & PAYA, 1996).

A arginina, aminoácido semi-essencial, possui papel fundamental no metabolismo de diversos componentes do organismo humano (THOMPSON & FUHRMAN, 2005). Possui papel importante como substrato na síntese protéica, proliferação celular, neurotransmissão, vasodilatação, imunidade e no processo de cicatrização. É precursora do óxido nítrico, creatina fosfato, uréia, ornitina, prolina e outras moléculas. Como precursora da prolina possui papel importante na síntese do colágeno e a arginina é recrutada nas fases agudas e crônicas da cicatrização. Sob situações de estresse sua demanda aumenta e ela se torna aminoácido essencial, juntamente com a glutamina, sendo sua suplementação dietética considerada como terapia adjuvante nas cicatrizações das feridas (STECHMILLER, CHILDRESS e COWAN, 2005). Estudos mais recentes corroboram a idéia de que a suplementação com arginina associa-se a aumento na deposição de colágeno nas feridas em cicatrização, além de haver melhor resposta imune nas mesmas (WITTE & BARBUL, 2003; FARRERAS, ARTIGAS e CARDONA, 2005).

O uso de produtos nutricionais enriquecidos com arginina mostrou-se efetivo em reduzir as infecções pós-operatórias e o tempo de internação. Em recente meta-análise incluindo 18 estudos prospectivos e randomizados, Waitzberg et al. também detectou redução das deiscências de anastomoses (WAITZBERG et al., 2006). Entretanto, como os suplementos nutricionais incluem outras substâncias além da arginina, como ácidos graxos ω -3 obtidos de óleo de peixe e nucleotídeos a partir de RNA, não foi possível definir especificamente qual substância seria responsável pelo efeito obtido. Vários trabalhos demonstraram o papel da arginina no metabolismo protéico, porém existem ainda controvérsias a respeito do seu uso na suplementação dietética.

Em 2008, Jones e Heyland em artigo de revisão, propuseram um novo paradigma: a fármacnutrição. Constataram que o grande número de trabalhos que enfocaram a imunonutrição possuem resultados conflitantes. Argumentaram que considerando o efeito dos diversos nutrientes ditos imunomoduladores, cada um teria suas indicações precisas e individualizadas nas diversas populações estudadas. Ao final, de acordo com este novo paradigma, propuseram a utilização

de nutrientes de forma isolada, dissociada do aspecto nutricional e que os estudos nesta direção fossem feitos em populações homogêneas e em séries amplas, rigorosamente delineadas para detecção de diferenças na mortalidade.

Assim, não fica claro se o efeito benéfico sobre a anastomose deva ser atribuído somente à arginina. Neste contexto, resta claro que seria necessário investigar se a suplementação da arginina isoladamente é capaz de conferir o mesmo efeito protetor em relação ao grupo controle com a solução salina do que a suplementação com pool de aminoácidos.

O presente estudo considerou especificamente o efeito no processo de cicatrização através de modelo já amplamente utilizado na linha de pesquisa de nutrição e cicatrização em cirurgia do Programa de Pós-graduação em Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná (SKINOVSKY et al., 2001; VIZZOTO et al., 2001; COSTA et al., 2003; CHIBATA, 2003; LEMOS et al., 2004; FERREIRA, 2004; BONIN et al., 2005; SKINOVSKY, 2005; ALVES, 2006; TRUBIAN et al., 2007).

1.1 OBJETIVO

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar a influência da suplementação dietética com a arginina na cicatrização de anastomoses colônicas em ratos.

1.1.2 Objetivos específicos

- a) Verificar o efeito da arginina no peso dos animais ao longo do experimento;
- b) Verificar o efeito da arginina na força de tração das anastomoses colônicas;
- c) Verificar o efeito da arginina no padrão histológico (Densitometria de Colágeno e Imunoistoquímica) das anastomoses;
- d) Comparar o efeito nos parâmetros acima entre arginina e solução de aminoácidos nestas anastomoses.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PROCESSO CICATRICIAL

O processo de cicatrização de feridas tem sido objeto de estudo ao longo do tempo, sendo CARREL(1910) um dos primeiros autores a descrever este processo, conforme experimento que utilizou cães, e dividiu a cicatrização em quatro períodos para fins didáticos. Posteriormente verificou-se que os diversos tecidos possuem etapas comuns no processo como um todo, mas algumas particularidades dependendo do tecido e também em função de fatores que o influenciam, tanto de ordem local quanto sistêmico. Exemplos desta diferenciação tecidual seriam o olho, fígado e tecidos esqueléticos, assim como fatores que influenciam a cicatrização dentre os quais pode-se citar, o estado nutricional, homeostasia local e fatores externos como infecções, drogas, radiação ionizante, entre outros (CAMPOS, GROTH e BRANCO, 2008; COSTA, 2002; BONIN, 2003; TRUBIAN, 2004; FERREIRA, 2004).

A primeira etapa do processo de cicatrização inicia-se logo após a injúria tecidual e é chamada de fase inflamatória, sendo também no início denominada como coagulação, pois o que se destaca então é a liberação de substâncias que provocam intensa vasoconstrição. Tal fase dura apenas alguns minutos, é mediada por tromboxane A₂, prostaglandina 2, entre outras, e visa a diminuição da perda sanguínea. O endotélio e as plaquetas lesadas iniciam então a cascata de coagulação, com a formação de um coágulo, formado por plaquetas, colágeno, trombina e fibronectina. Começa então a liberação de citocinas e fatores de crescimento, como o fator de crescimento transformador β (TGF- β), o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), o fator de crescimento dos fibroblastos (FGF) e o fator de crescimento endotelial (EGF), que irão atrair neutrófilos para o local e dar início à fase inflamatória propriamente dita. Esta migração, também chamada de quimiotaxia, tem por objetivo promover a limpeza do local da injúria de bactérias e seus produtos, restos celulares e corpos estranhos e dura de 24 a 48 horas. A quimiotaxia também é provocada por interleucina 1 (IL-1), fator de necrose tumoral (TNF), fator plaquetário 4 (PF4) e produtos das bactérias. A limpeza local acontece em função da ação de enzimas proteolíticas cáusticas. Após este

processo, ocorre a transformação de monócitos, que são células presentes exclusivamente na corrente sanguínea, em macrófagos que se localizam no interstício tecidual. Tal fase ocorre entre 48 e 96 horas após a injúria. A ativação dos macrófagos provoca uma série de efeitos, tais como, a promoção de angiogênese, fibroplasia e síntese de óxido nítrico. Os macrófagos produzem enzimas e citocinas, tais como a colagenase, que irão auxiliar na limpeza do local lesado, interleucinas e TNF que irão estimular fibroblastos e a angiogênese e o TGF, que estimulam os queratinócitos. Fatores de crescimento derivados dos macrófagos estimulam ainda a migração de células ao sítio da lesão, e irão produzir tecido conectivo baseado em redes de fibrina neo-formada (BROUGHTON et al., 2006).

Após esta primeira fase inicia-se então a fase proliferativa, que é marcada basicamente pela chegada dos fibroblastos ao local, e acontece normalmente por volta do quarto dia após a injúria. Os principais fenômenos desta fase são a angiogênese, a epitelização, a granulação, a formação tecidual e o depósito de colágeno. A angiogênese ocorre utilizando a matriz provisória como substrato. Os vasos recém-formados têm como principal função levar nutrientes às células do tecido de granulação. Tal fenômeno é estimulado pelo TNF- α . Fibroblastos e células endoteliais são os principais elementos celulares desta fase. Os fibroblastos são os responsáveis pela substituição da rede de fibrina formada na fase inflamatória por uma rede de colágeno no tecido de granulação e produzem também glicosaminoglicanos e proteoglicanos, maiores componentes da matriz extra-celular. A concentração de fibroblastos, que aumenta após o quarto dia de injúria, atinge o seu pico entre o sétimo e décimo-quarto dia. Fatores como o PDGF, TGF e FGF estimulam esta proliferação, sendo o primeiro o mais importante. O TGF- β possui também importância em função do estímulo à produção de colágeno do tipo I e a transformação dos fibroblastos em miofibroblastos. Nesta fase, diversos fatores de crescimento são também produzidos, tanto pelos fibroblastos, como FGF, TGF, PDGF, fator de crescimento análogo à insulina 1 (IGF-1) e fator de crescimento queratinocítico (KGF), como pelas células endoteliais, tais como fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), FGF, PDGF. Queratinócitos produzem ainda TGF- α , TGF- β e KGF. Todos estes fatores, juntos ou isoladamente, provocam diversos efeitos, tais como: proliferação celular, angiogênese, produção de proteínas e glicoproteínas da matriz extracelular, epitelização e quimiotaxia (CAMPOS, BRANCO e GROTH, 2007).

A formação e depósito de colágeno são as principais características da fase seguinte. A principal proteína do tecido conectivo é formada em uma fina rede paralela à superfície da ferida e que na derme normal possui espessura maior. Em feridas em cicatrização tais redes se dispõem de forma paralela ao longo das linhas de força máxima destas feridas. Estas finas redes são progressivamente agregadas pelos fibroblastos, e ocorre então progressiva substituição do colágeno mais imaturo (tipo III) pelo tipo maduro (tipo I). A presença do tipo III que chega a 30% em feridas imaturas reduz-se a 10% nas cicatrizes mais tardias. Esta substituição é acompanhada por aumento da resistência do tecido cicatricial. Fibroblastos produzem ainda colagenases, que promovem a substituição de material antigo por uma nova matriz extracelular na ferida em cicatrização. O equilíbrio entre a formação e a lise de colágeno é fator de grande importância neste processo (BROUGHTON, JANIS e ATTINGER, 2006).

A contração é então a última fase da cicatrização, na qual o principal evento é a agregação de fibras de colágeno em redes mais espessas, chegando a formar unidades contráteis, responsáveis pela diminuição de tamanho das áreas em cicatrização. A resistência destes tecidos em cicatrização não atingem valores semelhantes aos anteriores às injúrias, sendo esta resistência de 30% após 3 semanas e chegando a 80% após 3 meses (CAMPOS, GROTH e BRANCO, 2008).

O colágeno, principal proteína estrutural do mundo animal, é também o principal componente do processo de cicatrização de feridas. É formado por uma hélice tripla de cadeias polipeptídicas α compostas pelos aminoácidos prolina, hidroxiprolina e glicina. O procolágeno é a estrutura formadora do colágeno maduro e é secretado no espaço extra-celular pelos fibroblastos para que se forme o colágeno maduro. São classificados de acordo com sua hélice dominante e o tamanho da molécula em: colágeno fibrilar (tipos I, II, III, V e IX), não-fibrilar grande (tipos IV, VI, VII e XII) e colágeno de cadeia curta (tipos IX, X e XIII), (BRASKÉN, 1991). O tipo I é o mais abundante (90% de todo o colágeno) e encontra-se mais frequentemente em ossos e tendões, o tipo III, mais comum na derme, em fascias e vasos sanguíneos. Estes dois tipos são também os mais importantes no tecido de granulação e as suas quantidades relativas e também absolutas irão variar de acordo com o tecido e a fase do processo de cicatrização. Em uma fase inicial o predomínio é do tipo mais imaturo e menos resistente que é o tipo III, entretanto

após a primeira semana ocorre a substituição pelo tipo I que é a forma madura, definitiva e de maior resistência.

Durante todo o processo de cicatrização ocorre na verdade um balanço entre a síntese e a degradação do colágeno, sendo alguns fatores essenciais na síntese tais como a vitamina C e ferro. Já para a degradação, enzimas específicas da matriz tecidual são liberados por células endoteliais, fibroblastos e queratinócitos. Estas collagenases são divididas em metaloproteinases e collagenases séricas, como a catepsina C, a elastase e a proteinase neutra.

2.2 AVALIAÇÃO DO PROCESSO CICATRICIAL

A análise tanto quantitativa quanto qualitativa de diversos fatores tem sido pesquisada, e diversos parâmetros tem sido alvo de interesse. Pode-se dividi-los em clínicos, mecânicos, histopatológicos e bioquímicos, que são os mais comumente encontrados na literatura, embora outros menos freqüentes sejam também descritos, tais como parâmetros microbiológicos, radiográficos, microangiográficos e de microscopia eletrônica (VIZZOTTO JUNIOR et al., 2003; COSTA et al., 2003; BONIN et al., 2005).

2.2.1 Peso, Mortalidade e Aderências intra-abdominais

Os parâmetros clínicos avaliam a evolução pós-operatória e os achados ao finalizar o experimento e quantificam peso, mortalidade pós-operatória e de maneira subjetiva o estado da cavidade peritoneal no momento do sacrifício dos animais de experimentação. Verifica-se a presença ou não de abscessos, fístulas e/ou deiscências anastomóticas intracavitárias e subjetivamente avaliam-se as aderências intraperitoneais (VIZZOTTO JUNIOR et al., 2003; COSTA et al., 2003; BONIN et al., 2005).

2.2.2 Parâmetros Mecânicos

Desde que o interesse pela cicatrização de feridas adquiriu importância, diversos estudos procuram estabelecer o método ideal para avaliar a qualidade deste processo. Em 1853, Paget idealizou o primeiro método de estudo, ao analisar tendões de coelhos. Porém somente em 1929, Howes et al. sistematizaram o primeiro método reproduzível para efetuar tal análise (HOWES et al., 1929).

Naresse et al., em 1987, realizaram estudo que destaca a importância das propriedades mecânicas do tecido de granulação para o sucesso de uma anastomose intestinal. Os autores propuseram aparelho para medir a força de ruptura de anastomose em intestino de ratos. Posteriormente com o acoplamento de um computador a este aparelho, as medições passaram a ter maior precisão fazendo-se então a medida da força de ruptura, força máxima e tensão tecidual. Os parâmetros mais utilizados para esta avaliação tem sido a pressão de ruptura e força de ruptura (NARESSE et al., 1987).

2.2.2.1 Pressão de ruptura

A pressão de ruptura foi descrita inicialmente em 1899 por CHLUMSKY e ainda hoje é bastante utilizado em estudos experimentais de cicatrização (RABAU, EYAL, KLUGER e DAYAN, 1998). A avaliação é realizada no segmento intestinal contendo a anastomose, que se localiza no centro da peça a ser testada. Fecha-se então uma das extremidades do segmento a ser testado e a outra é conectada a uma bomba de insuflação. Promove-se a insuflação com ar ou líquido e tão logo ocorra a ruptura da anastomose a pressão é registrada em manômetro ou fisiógrafo. Tais medidas podem ser realizadas em animal vivo e anestesiado, sem a liberação de eventuais aderências intrabdominais ou em segmento intestinal ressecado. Os resultados assim obtidos serão diferentes, porém em ambos casos com validade científica.

Outra maneira de se obter tal pressão é através do fechamento similar de uma das extremidades da alça intestinal e a introdução de cilindro metálico na outra extremidade, por onde se irá conectar uma coluna de mercúrio. Promove-se então a insuflação de ar e o segmento com a anastomose imerso em água, marca-se então

a pressão que inicia-se o borbulhamento de ar em milímetros de mercúrio. Tal método foi idealizado em 1970 por Carril e posteriormente utilizado por diversos autores (ROCHA, 1989; SOUSA, SOARES e APRILI, 1991 e MARTINS, GUIMARÃES e FERREIRA, 1993).

2.2.2.2 Tensão de ruptura e Força de ruptura

A tensão de ruptura foi definida em 1969 por VAN WINKLE, como sendo a quantidade de força suportada de área de secção e pode ser expressa em libras/polegada² ou quilogramas/mm². Esta medida não leva em consideração o tamanho ou a área da amostra a ser avaliada e pode variar de acordo com o tecido em avaliação. Já a força de ruptura refere-se à força para romper um tecido sem levar em consideração suas dimensões, e portanto sujeita a influência de maior número de variáveis. Assim sendo, a força de ruptura seria a medida ideal para avaliar tecidos não homogêneos, como os estudados na maioria dos experimentos disponíveis na literatura (VAN WINKLE, 1969).

A força de ruptura de tecido intacto nunca é igual a de um tecido em cicatrização e estudos demonstram a evolução temporal desta força: após uma semana uma cicatriz possui apenas 3% da resistência do tecido íntegro, elevando-se para 20% após três semanas e chegando a 80% ao final de três meses, não ocorrendo alteração significativa a seguir (LEVENSON et al., 1965; BARBUL & REGAN, 1993).

FARHART et al. em 1958, apresentaram modelo experimental para medir a força necessária para promover a ruptura de segmento suturado da parede abdominal em ratos (FARHART et al., 1958). JONSSOON et al., em estudo de 1983, analisaram a força de ruptura em segmentos de jejuno e íleo utilizando aparelho em que a força era aumentada em intervalos regulares, BLOMQUIST, em 1984, utilizou um tensiômetro que aplicava a força de maneira contínua. NARESSE et al., em 1987, desenvolveram aparelho para medir esta força que utilizou um extensômetro de resistência elétrica (*Strain Gauge*) (JONSSOON et al., 1983; BLOMQUIST et al., 1984; NARESSE et al., 1987).

IKEUCHI et al., em 1999, realizaram estudo no qual procuraram definir a força mínima de ruptura, que corresponderia ao início da ruptura da anastomose e a força

máxima em que haveria a separação total dos segmentos anastomosados. Os autores concluíram que a força mínima seria a melhor medida da qualidade da cicatrização (IKEUCHI et al., 1999).

2.2.3 Parâmetros Histológicos

A avaliação histológica visa a análise microscópica das alterações que ocorrem no processo de cicatrização (TRUBIAN, 2007). Em vista dos inúmeros métodos de coloração existentes e do caráter subjetivo de suas análises, em 1964, SWEAT, PUCHTLER e ROSENTHAL sugeriram a coloração de picrosirius red F3BA (PCS) para estudo específico do colágeno pela técnica do ácido pícrico. Esta técnica se destacou pela seletividade por tecido conjuntivo e por utilizar luz polarizada em sua leitura microscópica (SWEAT et al., 1964). A coloração PCS é específica para colágeno, pois não cora intensamente as glicoproteínas além de magnificar as imagens de 700% da luz pela birrefringência do colágeno em comparação com controles, conforme JUNQUEIRA, BIGNOLAS, BRENTANI em 1979. Em estudo de 1989, DAYAN et al., definiram que o padrão de entrelaçamento e a espessura das fibras de colágeno indicam seu tipo. Na observação sob luz polarizada, de acordo com sua birrefringência, fibras com maior entrelaçamento e espessura apresentavam coloração laranja-avermelhada e foram classificadas como tipo I (maduro). As fibras menos espessas e entrelaçadas coraram em tons esverdeados e foram classificadas como tipo III (imaturo) (DAYAN et al., 1989). LEMOS em 2004, idealizou o índice de maturação de colágeno (IMAC) como sendo a razão entre as percentagens de colágeno do tipo I sobre o tipo III. Observou em seu estudo uma correlação negativa entre o IMAC e os testes tensiométricos no 7º dia pós-operatório na cicatrização da parede abdominal de ratos lactentes desnutridos e normonutridos e correlação positiva no 21º dia pós-operatório (LEMOS et al., 2004).

2.2.3.1 Imunoistoquímica

A imunoistoquímica é o método diagnóstico de avaliação microscópica que utiliza o princípio da detecção de um antígeno específico, seja ele celular ou tecidual, por anticorpos que aglutinam-se em torno deste. Os anticorpos normalmente estão associados a cromógenos que possibilitam a visualização por microscopia ótica. O método localiza o antígeno em estudo além de quantificar o mesmo (TORRES et al, 1998; WERNER, 2002).

Em estudos de cicatrização dois fenômenos são mais pesquisados no tecido de granulação dentre outros: a angiogênese e os miofibroblastos. A angiogênese pode ser pesquisada através de anticorpos específicos como o PAL-E, fator de coagulação VIII, também denominado de fator de Von Willebrand, e o CD 34, ressaltando-se que o último não é expresso em arteríolas (RUITER et al., 1993). Outros trabalhos utilizaram também este marcador (JERDAN, MICHELS e GLASER, 1991; CHIBATA, 2003; SKINOVSKY, 2005). Os miofibroblastos foram demonstrados em imunoistoquímica pela primeira vez por SKALLI et al. em 1986, utilizando-se o anticorpo anti- α -actina muscular lisa (actina α -sm) e posteriormente também utilizado por ALVES em 2006 (SKALLI et al., 1986; ALVES, 2006).

Em estudo experimental realizado por HINZ em 2001 e estudo de revisão de LORENA em 2002, relataram-se a correlação direta entre o nível de actina α -sm e a capacidade contrátil dos miofibroblastos, sendo a expressão da mesma o principal marcador bioquímico deste tipo celular (SCHURCH, SEEMAYER e GABBIANI, 1998; HINZ et al., 2001; LORENA et al., 2002).

2.3 A ARGININA

As proteínas são elementos constitucionais dos seres vivos que, além dos átomos de carbono, hidrogênio e oxigênio, que também compõe os carboidratos e lipídeos, possuem em sua estrutura átomos de nitrogênio. Os aminoácidos são as unidades (vinte nos seres humanos) que agrupadas formam as proteínas. Em 1949, ROSE propôs a classificação daqueles em essenciais, não-essenciais e semi-essenciais ou condicionalmente essenciais. Tal classificação se fez em função da capacidade do organismo humano de produzir o aminoácido pois senão há a

necessidade de haver a ingestão do mesmo. Os semi-essenciais são produzidos endogenamente em condições normais porém em situações especiais sua produção endógena não seria capaz de suprir as demandas, como período de crescimento do organismo, períodos de recuperação pós-traumático ou pós-cirúrgico, além de situações clínicas como desnutrição e sepse. Nos seres humanos adultos os aminoácidos semi-essenciais são a glutamina e a arginina (ROSE, 1949).

2.3.1 A fisiologia da arginina

A arginina, aminoácido dibásico, participa da constituição de diversas proteínas do organismo humano e está ligada a diversas vias metabólicas na síntese de uréia, óxido nítrico, poliaminas, agmatina e fosfato de creatina. Suas fontes podem ser exógenas ou endógenas, sendo seu maior precursor a citrulina, via absorção no intestino delgado da glutamina. Cerca de 50% da arginina absorvida é liberada na circulação portal e a outra metade é diretamente utilizada no próprio intestino delgado. A captação hepática da arginina e da citrulina é baixa, pois o fígado não possui grande quantidade do transportador catiônico para a arginina (sistema y+) e portanto a maior parte da arginina e da citrulina do sistema portal entra na circulação sistêmica diretamente para servir como substrato em outros tecidos. O rim produz arginina a partir da citrulina (eixo intestinal-renal) e a libera na circulação sistêmica (FIGURA 1).

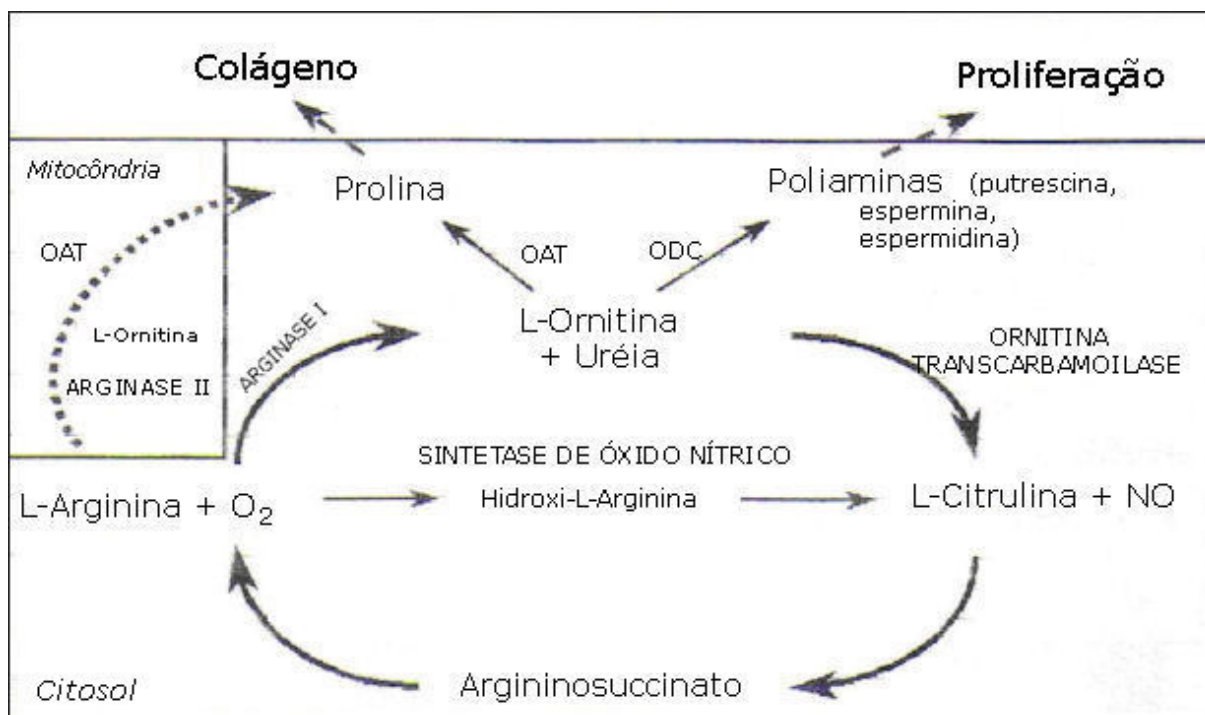


FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO METABOLISMO DA ARGININA

FONTE: adaptado de WITTE (2003)

NOTA: ODC = ornithine decarboxylase, OAT = ornithine aminotransferase, NO = óxido nítrico

O catabolismo da arginina em feridas em cicatrização ocorre por duas principais vias, as isoenzimas que sintetizam óxido nítrico (NOS) e as duas isoenzimas arginases.

As duas vias degradam arginina extracelular e são interrelacionadas de maneira a manter oferta constante de arginina em feridas em cicatrização. Produtos intermediários e finais destas vias catabólicas inibem-se reciprocamente e cada via possui citocinas que as estimulam, citando-se como exemplo o fator transformador de crescimento β que estimula a arginase mas inibe a forma induzível da isoenzima sintetizadora de óxido nítrico (iNOS). Esta última é a forma que gera a maior quantidade de óxido nítrico em tecidos em cicatrização, mais que as isoenzimas constitucionais dos tecidos e encontra-se mais abundantemente em macrófagos, mas também em fibroblastos, células endoteliais e queratinócitos. A função do óxido nítrico varia de acordo com a célula que o origina. Assim sendo, nos fibroblastos, promove a síntese de colágeno, nas células endoteliais estimula a angiogênese e

em macrófagos é citostático para as bactérias. A arginase possui duas isoformas. A arginase I é a forma hepática porém também encontrada nos fibroblastos dos tecidos em cicatrização. A arginase II é a forma mitocondrial extra-hepática e encontra-se em outras células e tecidos como macrófagos, rins, tecido mamário e enterócitos. As duas isoformas são codificadas por genes diferentes com regulação distinta. Ainda não está definido se alguma das formas predomina no tecido em cicatrização. A arginase gera ornitina, um aminoácido que pode ser metabolizado em prolina ou poliaminas e que são muito importantes no processo de síntese de colágeno e na proliferação celular. De todos os aminoácidos envolvidos no metabolismo da arginina, a ornitina é o único que possui função semelhante à arginina na cicatrização (WITTE & BARBUL, 2003) (FIGURA 2).

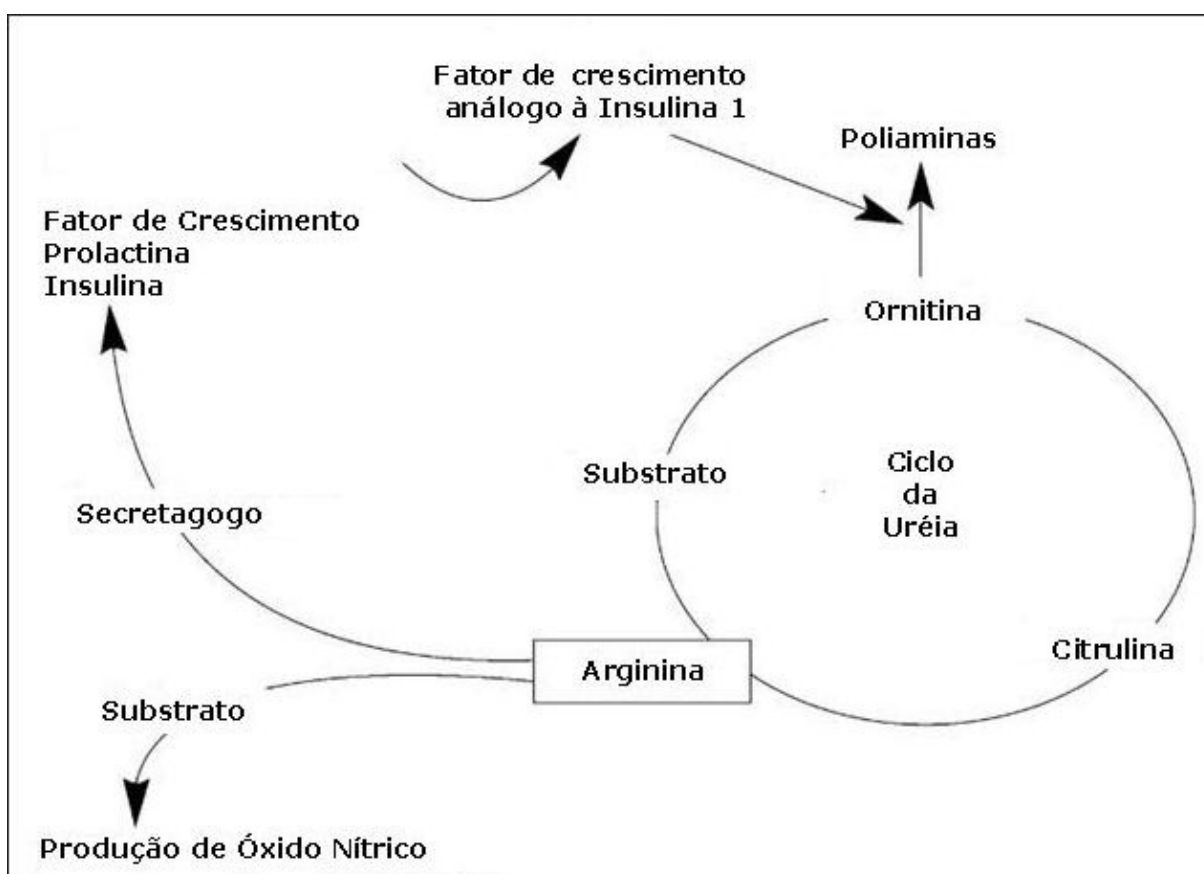


FIGURA 2 - CICLO DA URÉIA

FONTE: adaptado de STECHMILLER (2004)

Nas últimas duas décadas, vários estudos demonstraram os diversos efeitos da arginina, podendo citar, entre eles, a liberação de vários hormônios, a síntese de colágeno na cicatrização de feridas, atividade antitumoral e respostas imunes de várias células (EFRON & BARBUL, 2000) (FIGURA 3).

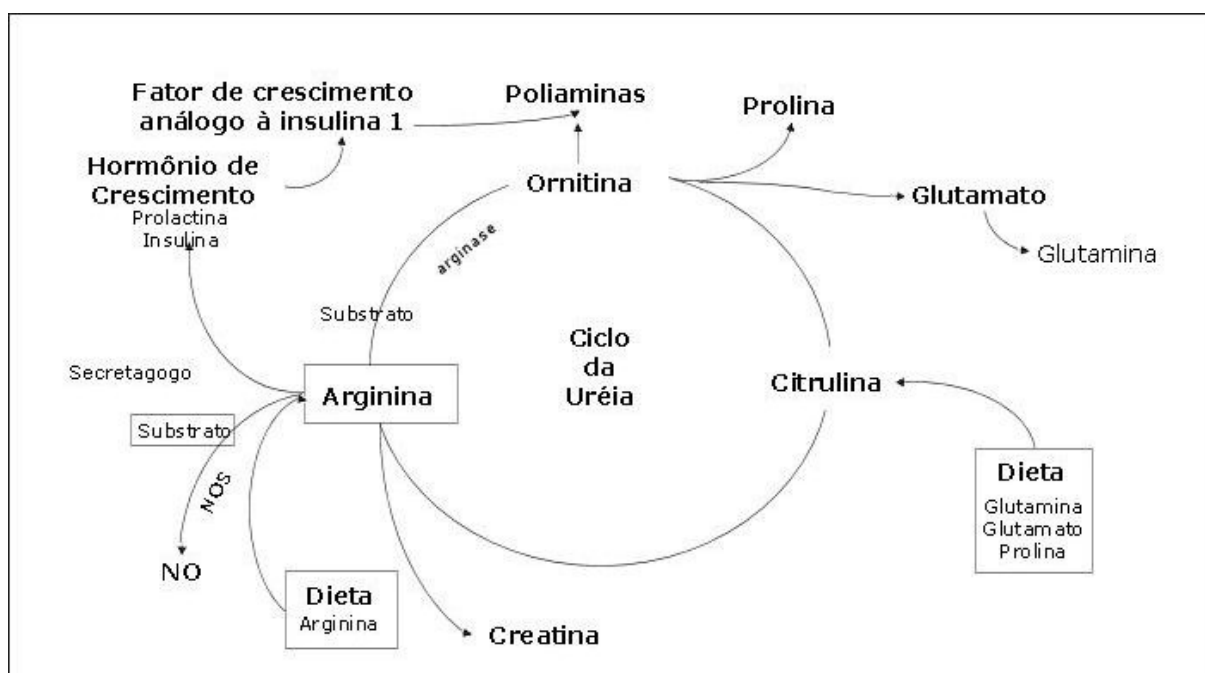


FIGURA 3 - METABOLISMO DA ARGININA

FONTE: adaptado de STECHMILLER (2005)

2.3.2 ESTUDOS EXPERIMENTAIS COM ARGININA

Em 1983 Barbul et al., partiram do princípio que a suplementação com arginina em ratos experimentalmente traumatizados diminuiria a perda de peso, aceleraria a cicatrização e provocaria aumento no timo destes animais. Avaliaram se interações arginina-pituitária estariam envolvidas por ser o aminoácido um secretagogo do hormônio do crescimento. Promoveram hipofisectomias em um grupo de ratos e compararam com grupo normal os efeitos na cicatrização de feridas provocadas e no peso do timo nos dois grupos. Concluíram ao final que a integridade do eixo hipotálamo-hipofisário seria necessário para o efeito benéfico da arginina em cicatrização de feridas e na função tímica, sugerindo inclusive que a

suplementação dietética com arginina poderia trazer efeitos positivos em seres humanos traumatizados e estressados não só no processo de cicatrização mas também na função do imune.

Em estudo experimental em ratos de 1984, Chyun e Griminger, analisaram em ratos de duas faixas etárias distintas os efeitos da suplementação dietética de arginina porém associaram glicina na fórmula. Após o implante de esponjas no subcutâneo dos animais (que após 3 e 7 dias são retiradas para medir-se a quantidade de hidroxiprolina) e controlando a ingesta de nitrogênio bem como sua eliminação, concluíram que a suplementação dietética dos dois aminoácidos provocou diminuição na perda nitrogenada assim como aumento na síntese de colágeno nos animais suplementados jovens e também nos adultos. Neste estudo, além da dosagem da hidroxiprolina nas esponjas, mediram-se também a relação entre os colágenos tipo I e tipo III nas mesmas (CHYUN & GRIMINGER, 1984).

Novamente Barbul et al. em 1985, apresentaram novo estudo com ratos, no qual a exemplo de experimento anterior, estudaram a cicatrização e a resposta imunológica. Utilizaram esponjas implantadas no dorso para medir a quantidade de hidroxiprolina e também pela medida da força de ruptura de segmentos de ferida provocada no dorso dos animais. Já a segunda é estudada pela pesagem do timo, pela contagem dos linfócitos tímicos e ainda pela reatividade destes linfócitos a estimulantes como fitohemaglutinina e concavalina. Estudaram o efeito de soluções intravenosas de arginina, sendo um grupo com quase o dobro da quantidade do aminoácido em relação ao outro. Obtiveram como resultado maior retenção de nitrogênio no grupo com menor reposição de arginina, porém no grupo que recebeu mais arginina houve maior deposição de hidroxiprolina, maior resistência à tração e também melhor resposta imune pela avaliação realizada conforme descrição acima. Tais dados levaram os autores a concluir ser a arginina aminoácido de grande importância na cicatrização de feridas, assim como na função imune também quando utilizada por via endovenosa, à semelhança da via oral (BARBUL et al., 1985).

Nirgiotis et al., em 1991, publicaram estudo experimental com ratos, em que avaliaram a cicatrização e a função imune mediante quantificação de hidroxiprolina, medida da força de ruptura de ferida em dorso, pesagem do timo e do baço. Diferentemente dos outros estudos os autores provocaram quadro séptico pela injeção intraperitoneal de bactéria (*Streptococcus pneumoniae*). Os resultados foram

favoráveis ao grupo suplementado com arginina, pois este grupo apresentou maiores níveis séricos de albumina e proteína, maiores dimensões de timo e peso do baço. As medidas de excreção total de nitrogênio, balanço nitrogenado e ganho de peso também indicaram maior retenção de nitrogênio no grupo suplementado com a arginina. Nas medições da hidroxiprolina obtidas nas esponjas cilíndricas implantadas no dorso não houve diferença significativa entre os grupos ao contrário das forças de ruptura que também evidenciaram vantagem no grupo suplementado com arginina. Medidas da imunidade, como a ativação de mitoses em linfócitos estimulada por fitohemaglutinina e concavalina, morte de bactérias por macrófagos peritoneais, índice de quimiotaxia de macrófagos, evidenciaram efeitos benéficos no grupo suplementado. A conclusão é que a suplementação é benéfica também em animais sob estresse e em estado crítico (NIRGIOTIS et al., 1991).

Em trabalho experimental em ratos de 1992, Kirk et al., conduziram dois experimentos. No primeiro, a sensibilidade retardada foi testada para avaliar a função imune dos linfócitos T, tanto *in vivo* quanto *in vitro*. No segundo experimento, a rejeição de enxerto de pele é avaliada para também verificar a função imune dos mesmos linfócitos T. Como o efeito da arginina já era conhecido previamente no timo, promovendo seu crescimento, o que se objetivou com estes experimentos foi avaliar se os efeitos da suplementação também ocorreriam em ratos sem timo nas respostas linfocitárias. Ao final concluíram que o timo intacto não é necessário para que os efeitos estimuladores de linfócitos provocados pela arginina também ocorressem, sugerindo a existência de um efeito direto desta sobre aqueles por aumento na produção de interleucina 2 (KIRK et al., 1992).

Em 1995, Gardiner et al., publicaram estudo experimental em ratos, no qual promoveram o desenvolvimento de sepse, mediante ligadura e punção de ceco ou da injeção intraperitoneal de lipopolisacarídeo obtido de cepas de *Escherichia coli*. Após o desenvolvimento da sepse observaram redução na absorção de aminoácidos, especialmente da arginina, e desta maneira explicaram a falta de benefícios da suplementação com arginina por via enteral, comparada com a via parenteral, em animais sépticos (GARDINER et al., 1995).

Gurbuz et al., em 1998, publicaram estudo experimental em ratos, nos quais após irradiarem o abdomen com 1100 rads., dividiram os mesmos em 3 grupos, sendo dois deles com suplementação com arginina em doses distintas e um grupo controle suplementado com glicina. Avaliaram a taxa de recuperação da mucosa

intestinal pós-enterite actínica, assim como a limpeza de bactérias e a translocação bacteriana. Os resultados demonstraram melhor recuperação da mucosa, maior limpeza de bactérias dos linfonodos mesentéricos além de menor bacteremia (demonstrando menor translocação bacteriana) no grupo suplementado com arginina em maiores doses. Tais resultados levaram os autores a sugerir o uso da arginina como parte do tratamento dos pacientes portadores de neoplasia e que fossem candidatos a radioterapia (GURBUZ et al., 1998).

Em 1999, Chen et al., apresentaram trabalho em que estudaram a cicatrização de feridas por queimadura em ratos divididos em seis grupos de estudo de acordo com a dose de arginina/glicina suplementada. Ao final concluíram que, nas doses entre 100 e 400 mg/kg/dia, a arginina diminuiu o tempo de reepitelização, aumentou a quantidade de hidroxiprolina depositada nas feridas e acelerou a síntese do colágeno nestes animais (CHEN et al., 1999).

Ainda em 1999, Shashidharan et al., publicaram trabalho no qual estudaram a cicatrização de anastomose de cólon de ratos através da medida da pressão de ruptura, análise microscópica do grau de inflamação e conteúdo de colágeno nas mesmas. Dividiram os animais em grupos com suplementação de arginina em doses diferentes (a 1% e 3%, além do grupo controle que não recebeu arginina) e o sacrifício em 6, 10 e 14 dias de pós-operatório. Ao final obtiveram melhores valores nos grupos que utilizaram a arginina porém o grupo que recebeu 3% não obteve melhores resultados que o grupo que recebeu a 1% e os melhores resultados foram obtidos no 10º dia de pós-operatório (SHASHIDHARAN et al., 1999).

Efron et al., em 1999, publicaram estudo no qual o objetivo foi avaliar a expressão e a função de uma das enzimas responsáveis pela síntese de óxido nítrico, a *inducible nitric oxide synthase* (inos), que é um dos produtos de degradação da arginina. A enzima foi estudada em anastomoses de cólon de ratos e após bloqueio da atividade da mesma foram medidas as pressões de ruptura das anastomoses, além das dosagens dos produtos de degradação do óxido nítrico (nitritos e nitratos). Ao final concluíram que a enzima estudada (inos) é produzida e possui importância na fase inflamatória, ou mais precoce, da cicatrização das anastomoses colônicas em ratos (EFRON et al., 1999).

Em 2000, Arbós et al., apresentaram trabalho experimental em ratos em que a suplementação com arginina foi comparada com grupo controle com finalidade de avaliar o implante de prótese de polipropileno em parede abdominal dos animais.

Após avaliação do colágeno nas suas formas mais estudadas (tipo I e III), concluíram que a arginina pode melhorar a incorporação de material sintético, especificamente em parede abdominal, levando os autores a sugerir até nova estratégia com intenção de diminuir a recorrência de hérnias neste local. Importante ressaltar neste estudo que o implante do material protético foi realizado em dois níveis na parede abdominal, com índices de cicatrização (dosagem plasmática de óxido nítrico, aminoácidos como arginina, ornitina e citrulina, métodos imunohistoquímicos para avaliação de colágeno e avaliação de infiltração celular, proliferação fibroblástica e angiogênese) mais exuberantes nos implantes mais superficiais (ARBÓS et al., 2000).

Utilizando um modelo experimental já amplamente testado, Shi et al., em 2000, em estudo com ratos compararam as respostas tanto em força de ruptura quanto em quantidade de hidroxiprolina em esponjas implantadas em dorso destes animais. Utilizaram ratos nos quais a enzima responsável pela síntese de óxido nítrico induzível por situações como injúria foi bloqueada, comparados com ratos com a atividade enzimática normal. Após suplementação por 14 dias os animais foram sacrificados e foram realizadas medidas da força de ruptura de incisões provocadas no dorso dos animais para implante de esponjas no início do experimento. Nestas esponjas são medidas as quantidades de hidroxiprolina, precursor do colágeno e utilizado como índice da síntese do mesmo. Os resultados demonstraram que a suplementação com arginina aumentou tanto a força de ruptura quanto a quantidade de hidroxiprolina nas esponjas dos ratos normais, porém nos ratos que possuíam a enzima supracitada bloqueada não obtiveram os mesmos efeitos da suplementação com a arginina. A conclusão final foi de que a síntese de óxido nítrico via a isoenzima induzível por injúria foi um dos mecanismos pelo qual a arginina promoveu melhor cicatrização de feridas (SHI et al., 2000).

Em 2002, Witte et al., em estudo experimental em ratos, induziram o surgimento de diabetes em um grupo destes animais, sete dias antes do trauma cirúrgico e iniciaram a suplementação com arginina em metade de cada grupo (diabéticos e não diabéticos) três dias antes deste trauma. O trauma cirúrgico foi o implante de esponjas em subcutâneo do dorso destes animais. Todos os animais foram sacrificados 10 dias após o trauma cirúrgico e foi então medida a tensão de ruptura da ferida no dorso dos animais, assim como a quantidade de hidroxiprolina nas esponjas, a concentração de nitrito/nitrato na ferida operatória, a atividade da

arginase e a composição de aminoácidos tanto na ferida operatória quanto no plasma. Os resultados demonstraram diminuição da tensão de ruptura e da concentração de nitrito/nitrato na ferida dos animais diabéticos. A suplementação com arginina restaurou os níveis de nitrito/nitrato a níveis normais, além de promover aumento da tensão de ruptura das feridas cirúrgicas nos ratos diabéticos. A atividade da arginase, assim como a concentração de ornitina nas feridas em cicatrização, encontraram-se diminuídas nos animais diabéticos, porém a suplementação com arginina não promoveu alterações nestes valores. Tais dados demonstraram que a diminuição na síntese de óxido nítrico nas feridas em cicatrização em diabéticos poderia ser parcialmente revertida com a suplementação com arginina, porém sem causar qualquer efeito na atividade da arginase. O mesmo grupo continuou com o mesmo experimento acima e publicou no ano seguinte novamente o experimento anterior porém com casuística maior de ratos e resultados semelhantes aos previamente encontrados (WITTE et al., 2002).

Em trabalho apresentado em 2003, Witte et al. estudaram as vias de degradação da arginina através de suas enzimas (as duas isoformas da arginase e a enzima responsável pela síntese de óxido nítrico). Após confeccionarem anastomoses em cólons de ratos, promoveram o sacrifício dos animais em diversos dias e analisaram a atividade das enzimas arginase (formas I e II) através da pesquisa da expressão do RNA mensageiro e também por imunoistoquímica. Encontraram picos de presença e atividade das enzimas entre o 10º e o 14º dias de pós-operatório. Realizaram também a dosagem dos aminoácidos envolvidos na síntese de colágeno e encontraram níveis elevados e por tempo mais prolongado destes aminoácidos (ornitina e prolina). Tais resultados levaram os autores a concluir da maior complexidade da vias de degradação da arginina, seja via arginase ou via *inos* e relataram a existência de novos estudos em curso sobre o assunto (WITTE et al., 2003).

Em 2006, Polat et al. publicaram estudo em que o efeito de inibidor da enzima indutora da síntese de óxido nítrico (N'-nitro-arginina metil-ester), assim como da pressão intraabdominal em seus vários níveis foram avaliadas na cicatrização de anastomoses colônicas em ratos. Após confeccionarem anastomoses nos cólons dos animais, provocaram pneumoperitôneos com pressões progressivamente maiores. Previamente às anastomoses induziram o bloqueio da enzima supracitada e no grupo controle não provocaram o bloqueio enzimático nem a pneumoperitôneo.

Como resultados, ao medirem a pressão de ruptura das anastomoses e exames histopatológicos, encontraram piores valores nos grupos submetidos a pressões maiores. Concluíram afirmando ser o bloqueio da enzima estudada benéfica nas anastomoses colônicas, especificamente após pressões intraperitoneais de 14 e 20 mm.de Hg (POLAT et al., 2006).

Shi et al., em 2007, apresentaram trabalho em que estudaram a cicatrização de feridas no dorso e o implante de esponjas neste local, conforme diversos outros trabalhos já realizados anteriormente. A diferença foi o grupo de estudo ter sido submetido a situações de estresse provocadas por choque hemorrágico e a suplementação de arginina ter sido realizada pela injeção intraperitoneal do aminoácido. A avaliação foi também realizada pela medida da força de ruptura das feridas dorsais, assim como a análise das esponjas implantadas no dorso dos animais. Obtiveram resultados semelhantes aos anteriores e concluíram igualmente ser a suplementação com arginina benéfica em situações de trauma/hemorragia para o processo de cicatrização (SHI et al., 2007).

3 MATERIAL E MÉTODO

As normas técnicas utilizadas neste trabalho seguiram as orientações do Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social – IPARDES contidas na 2.^a edição das Normas para Apresentação de Documentos Científicos da Universidade Federal do Paraná de 2007.

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados 47 ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia*), machos, adultos, provenientes do biotério do Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR) de Curitiba/PR (15 animais) e do biotério da Fundação Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI) em Itajaí/SC(32 animais). Foram alocados em caixas de polipropileno forradas com serragem em grupos de 5 ou 6 animais e após um período de aclimação de 7 dias, apresentavam um peso médio de $345,45 \pm 8,35$ gramas. Receberam água *ad libitum* e ração para ratos (NUVILAB-CR1®, Nuvital, Curitiba, Paraná). As condições ambientais do laboratório foram mantidas eletronicamente (Cronomat®, Mallory do Brasil, São Paulo) para temperatura média de 22 graus Celsius e ciclo claro-escuro de 12 horas. Os animais permaneceram no laboratório de cirurgia experimental da Pós-graduação em Cirurgia da Universidade Federal do Paraná (UFPR), onde também foram realizados todos os procedimentos experimentais.

3.2 SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA

A suplementação dietética foi realizada utilizando-se solução salina isotônica, solução de aminoácidos [AMINOPLASMAL L 10-A (sem carboidratos e sem eletrólitos), B.Braun, São Paulo - S.P.] a 10% e L-Arginina (Arginina®, Ajinomoto Interamericana do Brasil, São Paulo - SP) a 10%. Ambos os grupos que receberam suplementação de aminoácidos foram em doses de 1,5 gramas por quilograma de peso por dia.

3.3 GRUPOS DE ESTUDO

Após os sete dias de aclimação os animais foram pesados e divididos aleatoriamente em três grupos de acordo com o tipo de suplementação dietética que receberam durante o experimento. Diariamente os animais foram sedados pela inalação de éter etílico comercial (Farmanil Quima®, Curitiba, PR) em sistema fechado de campânula, pesados a cada dois dias e nos dias do procedimento cirúrgico e no dia do sacrifício. Foi realizada a sondagem oro-gástrica para a suplementação dietética. A sonda utilizada foi nº 8F, de 10 cm. de extensão e 2 mm. de diâmetro interno.

O grupo AA – suplementação com aminoácidos – (n=15) recebeu ração para ratos, água *ad libitum* e suplementação com solução de aminoácidos a 10% na dose de 1,5 g/kg/dia, injetada em dose única diária por 7 dias antes do procedimento cirúrgico e no pós-operatório por 5 dias.

O grupo ARG – suplementação com arginina – (n=16) recebeu água e ração da mesma forma que o grupo anterior e arginina a 10% também na dose de 1,5 g/kg/dia e injetada como o grupo AA.

O grupo SSI – suplementação com soro fisiológico – (n=16) recebeu água e ração também como os outros grupos além de soro fisiológico por sonda.

3.4 PROCEDIMENTOS OPERATÓRIOS

3.4.1 Pré-operatório

Todos os animais foram submetidos a jejum de 12 horas prévias ao procedimento cirúrgico.

3.4.2 Per-operatório

Anestesia: para indução anestésica foi utilizada a via inalatória com éter etílico comercial em sistema fechado de campânula, e para manutenção do plano

anestésico foram utilizados cloridrato de cetamina (Ketamina Agener a 10% ®, União Química Farmacêutica Nacional S.A., São Paulo – SP) a 10% na dose de 50 mg/kg de peso e cloridrato de xilazina (Xylasina Rompun ®, Bayer S.A., São Paulo – SP) a 2% na dose de 10 mg/kg de peso ambos por via intra-muscular, aplicados no músculo quadríceps e complementação com éter etílico em sistema aberto.

Ato Cirúrgico: após indução anestésica os animais foram pesados, complementada a anestesia, realizada a tricotomia abdominal ampla e fixados a mesa cirúrgica com elásticos, com os membros em extensão. Foram utilizados instrumentos cirúrgicos limpos porém não esterilizados. O acesso à cavidade abdominal foi obtido através de incisão na linha mediana do abdômen de cerca de 4 cm. Uma vez identificado o cólon, o mesmo foi seccionado a cerca de 3 cm da válvula íleo-cecal e novamente seccionado 5 cm da primeira secção. As anastomoses foram confeccionadas de maneira término-terminal em plano único com pontos separados de fio monofilamentar de nylon nº 5.0 (Mononylon® 5.0, Ethicon, São José dos Campos, SP). O fechamento da cavidade abdominal foi realizado em dois planos (sero-muscular e pele) utilizando-se de fio monofilamentar de nylon nº 3.0 (Mononylon® 3.0, Ethicon, São José dos Campos, SP) em ambos os planos.

3.4.3 Pós-Operatório

Após a recuperação anestésica cada animal foi colocado novamente em sua caixa e liberada água e ração após 12 horas de jejum. Foi realizada analgesia pós-operatória com dipirona (Dipirona®, Eurofarma, São Paulo, SP), por via oral na dose de 20 mg/kg de peso.

3.5 SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS

Os animais foram sacrificados após 5 dias de pós-operatório com inalação em sistema fechado com campânula de dose letal de éter sulfúrico comercial. Foi então realizada laparotomia pela incisão prévia e, após inspeção da cavidade peritoneal procedeu-se à retirada de dois segmentos do cólon, de cerca de 5 cm cada,

contendo as anastomoses. Os dois espécimes cirúrgicos foram conservados, em solução salina isotônica e formalina a 10 % para estudos de tração computadorizada e para estudo histológico, respectivamente.

Os animais nos quais ocorreu o rompimento fora da linha de anastomose do segmento colônico durante o teste de tração, bem como os que evoluíram a óbito durante o experimento foram excluídos das avaliações do estudo.

3.6 DADOS AVALIADOS

3.6.1 Mortalidade

Todos os animais que, durante o estudo, evoluíram a óbito, apesar de não serem incluídos na análise estatística dos parâmetros analisados, foram examinados para evidenciação da *causa mortis*.

3.6.2 Peso

Após os sete dias de aclimatação os animais foram pesados no dia inicial do experimento, a cada dois dias, nos dias da cirurgia e no dia do sacrifício. A balança eletrônica utilizada para tal aferição estava regulada de acordo com os padrões do INMETRO. Os valores do peso foram mensurados e registrados em gramas. O peso foi também utilizado para cálculo do volume a ser infundido diariamente como suplemento dietético nos três grupos de estudo, além da dose de anestésico administrado no dia da cirurgia.

3.6.3 Força de Tração e de Ruptura da Anastomose Colônica

A avaliação da força de tração e de ruptura da anastomose colônica foi realizada no laboratório de cirurgia experimental da Pós-graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Para avaliação desta variável, foi utilizada máquina universal de ensaio mecânico computadorizada, da marca

Emic®, modelo DL-500 MF, com garras de pressão ajustável manualmente e sistema eletrônico de aquisição de dados com utilização de *software* Tesc, versão 1.01 (*EMIC*®, São José dos Pinhais, PR) (FIGURA 4).



FIGURA 4 - MÁQUINA UNIVERSAL DE ENSAIO MECÂNICO

NOTA: MARCA *EMIC*®, MODELO DL-500 MF

O corpo de prova de cada animal foi armazenado em frascos contendo solução salina isotônica. O segmento colônico, contendo a sutura em sua porção média, foi fixado em suas extremidades às presilhas com ajuste manual. Todos os testes de tração foram feitos em um intervalo máximo de 1 hora após suas ressecções. A tração ocorreu com velocidade de 50 mm/min, utilizando-se carga de 10 kg, com sensibilidade de 50 g, com margem de erro de 0,5%, até a ruptura total

do corpo de prova. A força de tração foi constantemente mensurada através do computador anexo ao sistema de presilhas.

As variáveis consideradas no estudo foram: a força máxima de tração (FMT) em kgf/cm^2 e a força de ruptura total (FRT) em Kgf. A FMT foi considerada como a força máxima em que começou a haver a ruptura do tecido e a FRT como a última força medida pelo computador, antes da separação total dos cotos colônicos.

O programa demonstra um sistema de coordenadas cartesianas cujo eixo x representa 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 da 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 da queda de tensão ao nível zero; este ponto correspondeu à separação total dos cotos colônicos. (FIGURA 5).

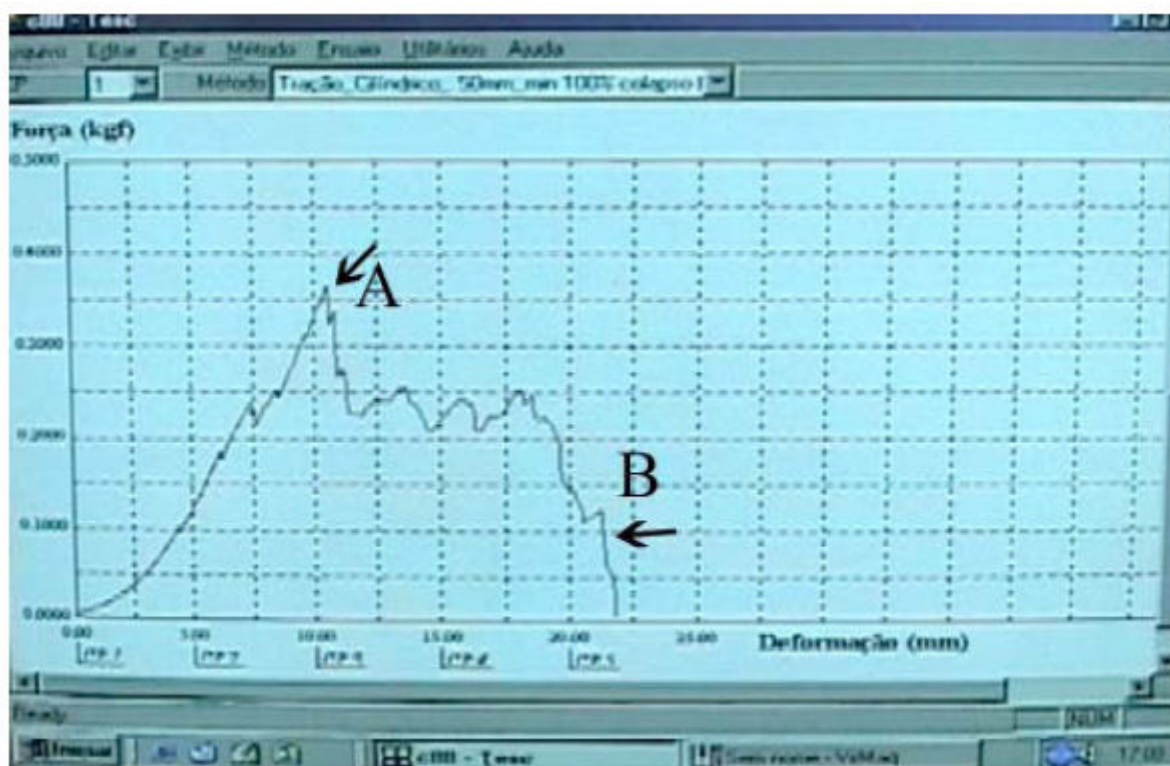


FIGURA 5 - GRÁFICO DO ESTUDO DE TRAÇÃO NOS CORPOS DE PROVA

NOTA: A. Ponto correspondente a FMT. B. Ponto correspondente a FRT.

As duas variáveis de forças (FMT e FRT) foram submetidas a análise estatística.

3.6.4 Estudo Histológico

Após a obtenção do segmento colônico de cada animal para análise histológica, o órgão foi aberto em seu sentido longitudinal, na borda anti-mesentérica, fixado em formalina a 10%, em papel filtro, para manter a peça o mais aberta possível e enviada então para o estudo. Secções perpendiculares ao maior eixo da sutura foram efetuadas e encaminhadas para o processamento histológico, que incluiu desidratação, diafanização e emblocamento em parafina histológica. Após microtomia a 3 μ m de espessura, os cortes histológicos foram corados pelas técnicas de coloração de hematoxilina-eosina e Masson, que foram utilizadas para avaliação geral e identificação da linha de sutura propriamente dita, a qual orientou a coloração imunoistoquímica. Além disso, foi realizada a coloração de picro-sírius (*picrosirius-red F3BA*). Esta técnica possibilita a identificação sob luz polarizada, dos dois tipos de colágeno (o tipo I e III) mais utilizados para verificação do desenvolvimento do processo de cicatrização, por serem o tipo maduro e o imaturo, respectivamente. Nesta técnica analisaram-se os cortes histológicos através de microscópio óptico da marca Nikon®, modelo E-200, em aumento de 400 vezes, em cinco campos distintos aleatoriamente, utilizando-se luz transmitida polarizada. As imagens foram captadas e digitalizadas por câmera Nikon®, modelo Coolpix 990 (FIGURA 6).

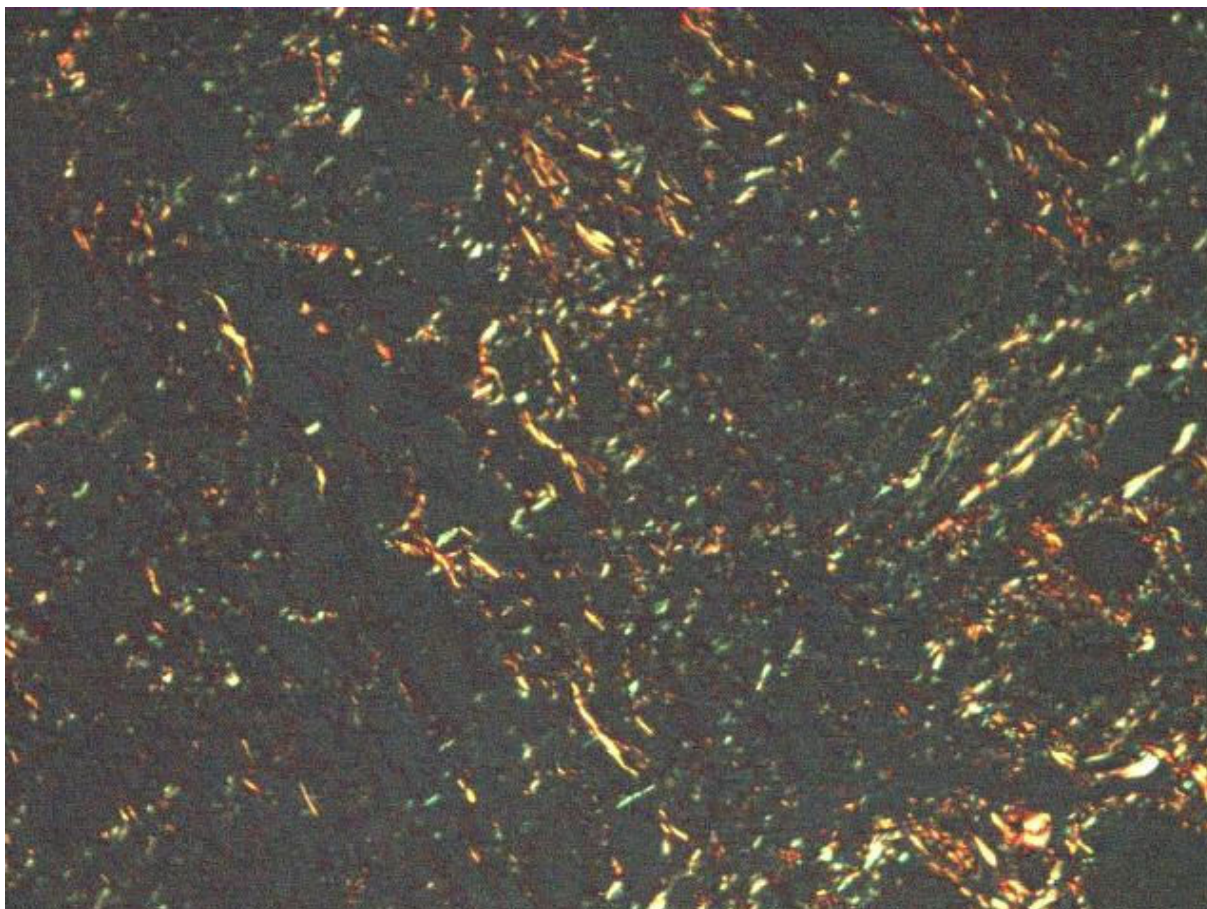


FIGURA 6 - FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DE CÓLON DE RATO CORADO PELO PICROSÍRIUS (200X), IDENTIFICANDO COLÁGENO TIPO I NA COLORAÇÃO AVERMELHADA E COLÁGENO TIPO III NA COLORAÇÃO ESVERDEADA.

Finalmente foi realizada a análise das imagens mediante o aplicativo Optimas 6.0 para Windows, em computador da linha DELL®. A calibração do sistema foi baseada na densidade óptica dos pontos de resolução (*pixels*) que formam as imagens, seleccionando-se o valor limite de melhor resolução. No sistema *RGB* (*Red, Green, Blue*) foram considerados valores para preto (fundo), para tons de vermelho a amarelo (colágeno tipo I) e para tons de verde (colágeno tipo III). Nos cortes histológicos analisados, determinou-se o campo microscópico sobre a linha de sutura, em cinco campos distintos, obtendo-se então as médias aritméticas. Calcularam-se as percentagens das áreas ocupadas pelas fibras que continham colágeno dos tipos I e III em relação à área total examinada, pelo software *Image Pro Plus* (Media Cybernetics, Califórnia, EUA) (FIGURA 7).

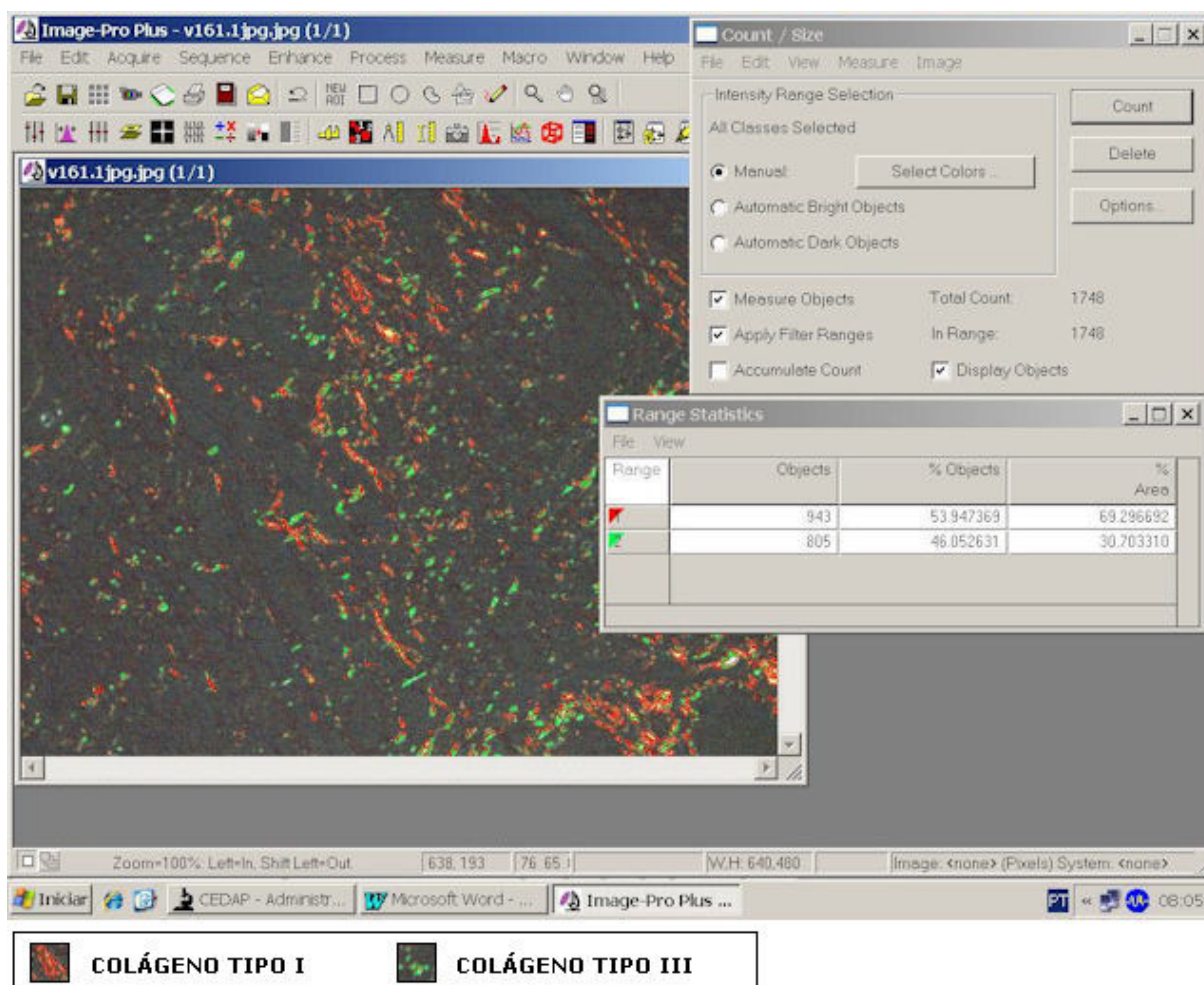


FIGURA 7 - ACHADOS HISTOLÓGICOS DIGITALIZADOS PARA ANÁLISE DE DEPOSIÇÃO DE COLÁGENO NA ANASTOMOSE COLÔNICA.

3.6.5 Coloração Imunoistoquímica

Para o estudo imunoistoquímico utilizou-se a técnica descrita por HSU (1981). Foram utilizadas lâminas silanizadas para se evitar o descolamento dos cortes histológicos durante a coloração. Os cortes foram submetidos à desparafinização e hidratação, sendo então imersos em tampão citrato, pH 6,1, para recuperação antigênica em banho-maria a 98°C sob pressão; em seguida foram imersos em tampão fosfato e submetidos a bloqueio da peroxidase endógena em metanol com peróxido de hidrogênio a 5%, seguido de bloqueio de biotina endógena utilizando leite em pó. Na seqüência, aplicou-se o anticorpo primário anti- α -actina muscular lisa na diluição de 1:300 (Monoclonal de rato, Código BSB 5032, Bio-SB– Santa Barbara, EUA), incubando-as por 2 horas à temperatura ambiente. Após banho em

tampão fosfato pH 7,2, seguiu-se à aplicação de anticorpo biotilado por 30 minutos, à temperatura ambiente. Após novo banho em tampão fosfato pH 7,2, seguiu-se à aplicação do complexo estreptavidina – peroxidase por 30 minutos, ainda à temperatura ambiente. Foi então realizado mais um banho em tampão fosfato pH 7,2 e revelação da reação imune com diaminobenzina, seguido de contracoloração com hematoxilina de Gill. Na seqüência, os cortes foram desidratados e montados com ENTELAN® e lamínulas de vidro. A positividade da coloração imunoistoquímica foi identificada nas áreas de pigmentação acastanhada. Controles positivos foram utilizados. As lâminas que foram analisadas continham apenas um código de cadastro da amostra, sem a identificação dos grupos dos animais.

3.7 AVALIAÇÃO DO COLÁGENO, MIOFIBROBLASTOS E VASOS SANGÜÍNEOS

3.7.1 Morfometria do Colágeno

Os cortes histológicos foram estudados em microscópio da marca Nykon® sob fonte de luz polarizada, com aumento de 400 vezes, em cinco campos aleatórios, na área de cicatrização, e foram captadas por câmara Nykon®, modelo Coolpix 990. As imagens foram previamente escolhidas em monitor lcd de 15 polegadas da marca DELL® e analisadas pelo aplicativo *Image Pro Plus* (Media Cybernetics, Califórnia, EUA) em ambiente Windows XP, que calcula a percentagem de deposição do tipo específico de colágeno. A análise foi realizada no Centro de Diagnósticos Anátomo-Patológicos de Joinville, Santa Catarina. A calibragem do sistema foi baseada na densidade óptica dos pontos de resolução (*pixels*) que formam a imagem. Todas as lâminas foram avaliadas sob as mesmas condições de regulagem, dentro dos parâmetros exigidos pelo referido aplicativo.

A percentagem de área ocupada pelo colágeno tipo I – maduro (fibras espessas e fortemente birrefringentes com coloração avermelhada a amarelada) e pelo colágeno tipo III – imaturo (fibras finas e dispersas, fracamente birrefringentes com coloração esverdeada) foi calculada para cada animal (figura 4), considerando-se que esta percentagem era proporcional à quantidade de cada tipo de fibra

presente nos cortes histológicos (JUNQUEIRA, COSSERMELLI e BRENTANI, 1978). Com base nas percentagens de colágeno tipo I e tipo III, COELHO (2003) criou o índice da maturação do Colágeno - IMaC definido como a razão entre essas percentagens. Este índice varia entre zero (percentagem de colágeno tipo I=0 e percentagem de colágeno tipo III=100) e mais infinito (percentagem de colágeno tipo I=100 e percentagem de colágeno tipo III=0). Valores maiores do que um indicam que a percentagem de colágeno tipo I é maior do que a percentagem de colágeno tipo III, como pode se verificar na equação 1.

EQUAÇÃO 1 – ÍNDICE DA MATURAÇÃO DO COLÁGENO (IMaC)

% de Colágeno Tipo I - Maduro

% de Colágeno Tipo III - Imaturo

ImaC = Percentual do Colágeno Tipo I

$$\text{ImaC} = \frac{\text{Percentual do Colágeno Tipo I}}{\text{Percentual do Colágeno Tipo III}}$$

3.7.2 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 campo de grande aumento (objetiva de 40X), em três campos distintos aleatoriamente na linha de sutura da parede abdominal, correspondendo a uma área de 17.726 μm^2 , expressas em médias aritméticas. 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 40 vezes. Utilizou-se um sistema constituído por microscópio óptico Olympus® BX50 (Olympus®, Tóquio, Japão), acoplado com câmera de vídeo Sony® DXC-970MD (Sony®, Tóquio, Japão),

conectada a computador da linha Pentium® e monitor colorido de alta resolução da marca Samsung® (Samsung®, Coréia do Sul).

A contagem foi realizada analisando-se as imagens individualmente, marcando-se os miofibroblastos por meio da ferramenta *Manual Tag* (FIGURAS 8 e 9).

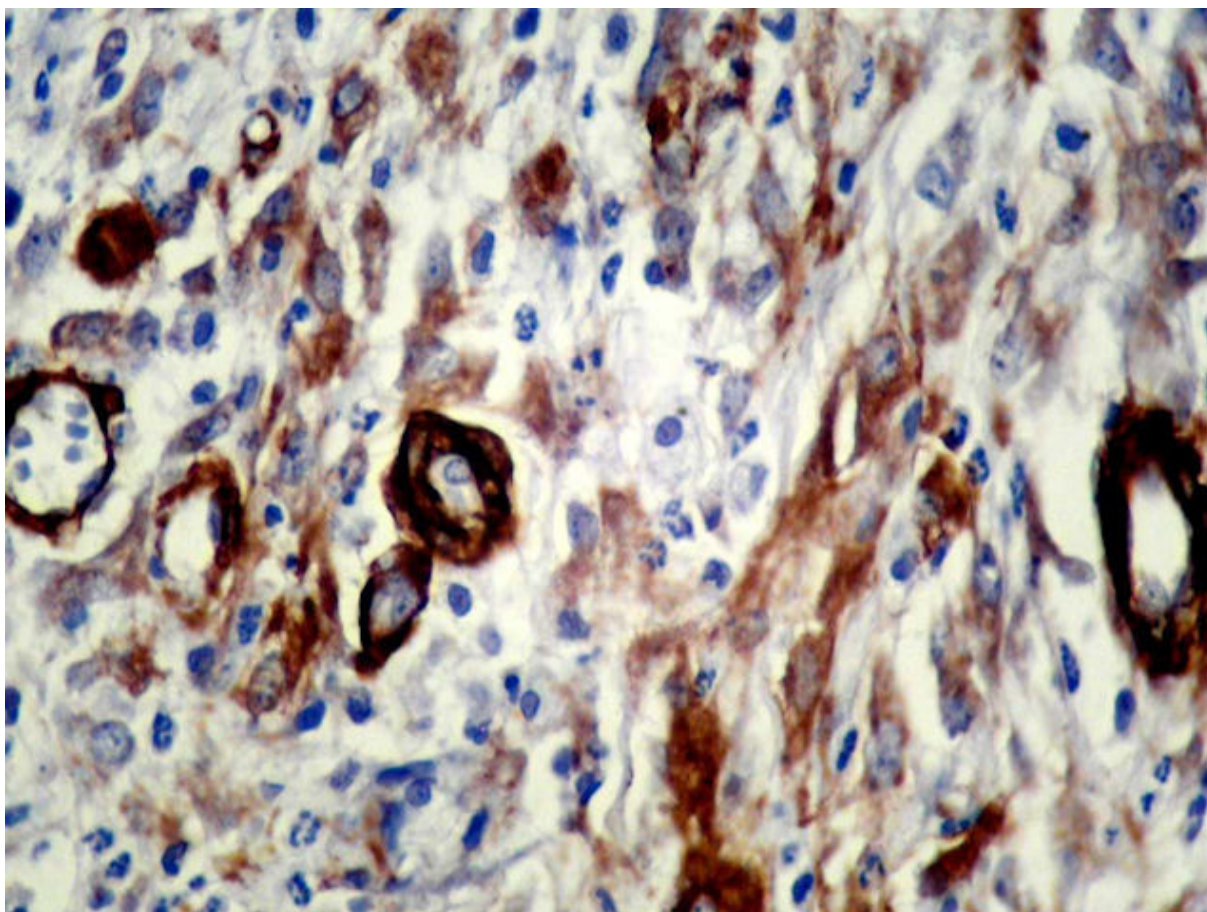


FIGURA 8 - FOTOMICROGRAFIA DOS MIOFIBROBLASTOS CORADOS EM MARROM PELA TÉCNICA AVIDINA-ESTREPTAVIDINA-PEROXIDASE-DIAMINOBENZIDINA UTILIZANDO-SE ANTICORPO ANTI- α -ACTINA MUSCULAR LISA.

NOTA: OS MIOFIBROBLASTOS APRESENTAM FORMATO POLIGONAL, COM PROJEÇÕES CITOPLASMÁTICAS E NÚCLEOS VESICULOSOS, MAGNIFICAÇÃO ORIGINAL 400X .

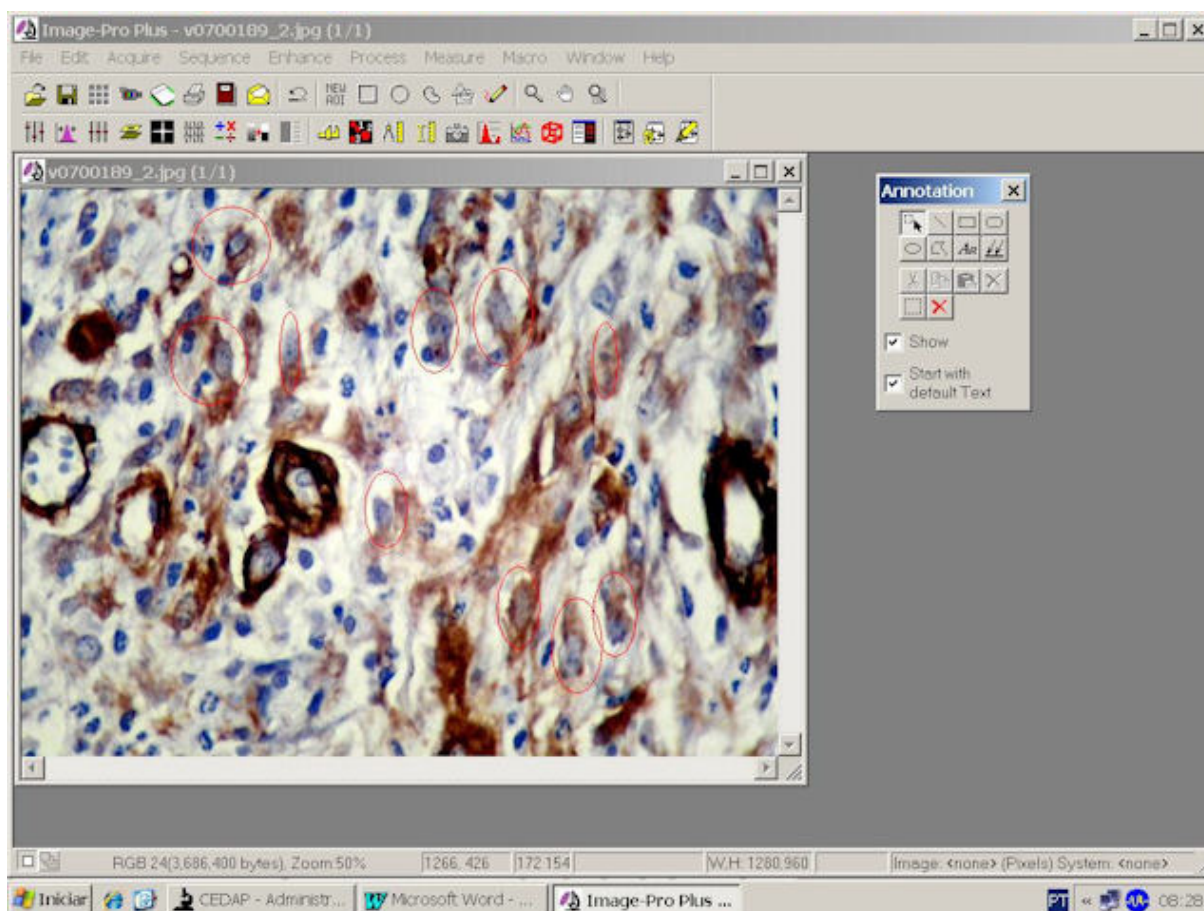


FIGURA 9 - ACHADOS HISTOLÓGICOS DIGITALIZADOS PARA CONTAGEM DE MIOFIBROBLASTOS UTILIZANDO O SOFTWARE *IMAGE-PRO PLUS*®

NOTA: A MARCAÇÃO EM CÍRCULOS VERMELHOS FOI REALIZADA COM O RECURSO *MANUAL TAG*.

3.7.3 Número de Vasos Sangüíneos

A identificação dos vasos sangüíneos foi efetuada contando-se o número de estruturas circulares coradas positivamente pelo anticorpo monoclonal anti- α -actina muscular lisa, que revela as células contráteis da camada íntima dos vasos. A contagem foi feita na área da sutura da parede abdominal em aumento de 40 vezes, em três campos distintos aleatoriamente, em área de $17.726\mu\text{m}^2$, expressas em médias aritméticas. Imagens de toda esta região foram capturadas por sistema acoplado ao microscópio óptico Zeiss® Axioscop (Carl Zeiss®, Alemanha), e

constituído por uma câmera de vídeo Sony® DXC-970MD (Sony®, Tóquio, Japão) (FIGURAS 10 e 11).

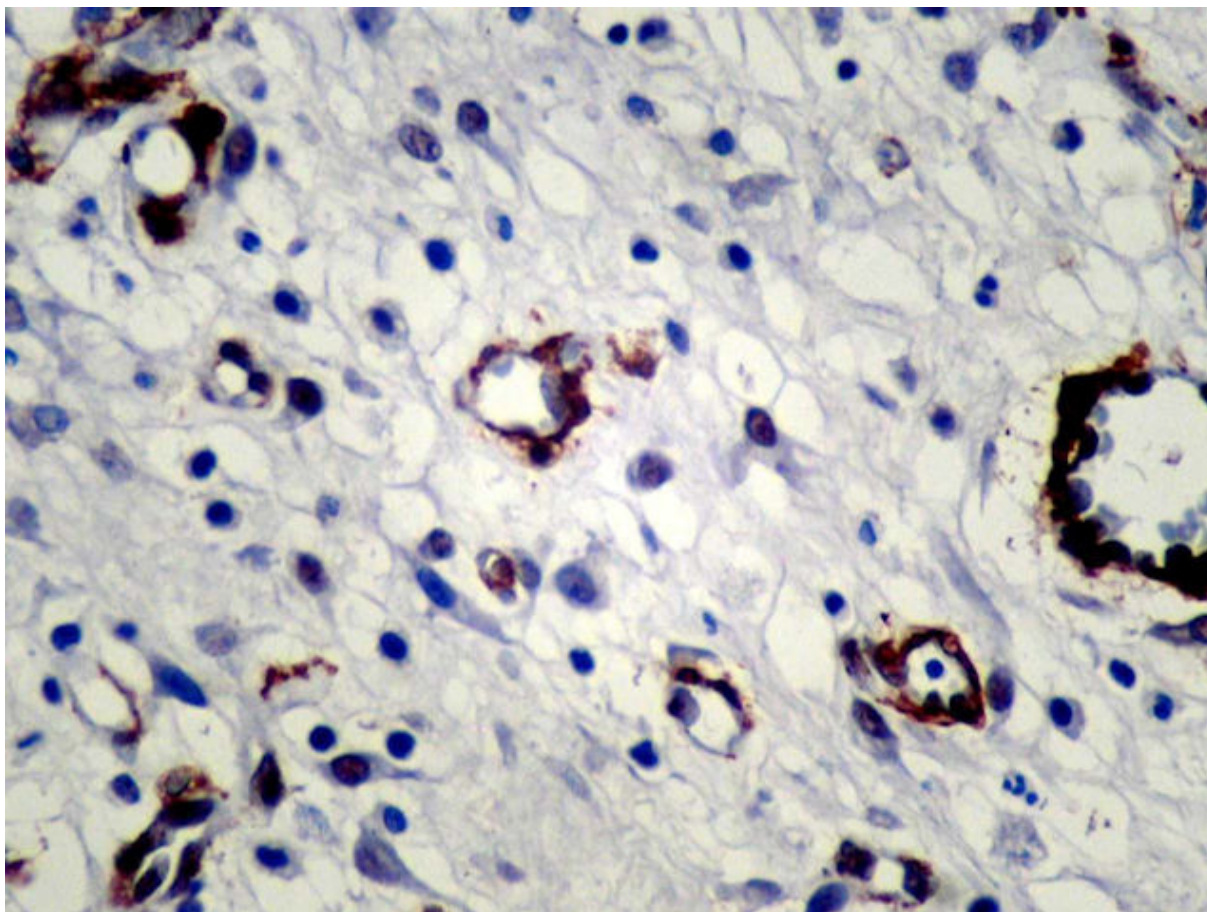


FIGURA 10 - FOTOMICROGRAFIA DOS VASOS SANGÜÍNEOS COM A ÍNTIMA CORADA EM MARROM REVELANDO POSITIVIDADE PARA ANTI- α -ACTINA MUSCULAR LISA, PELA TÉCNICA DA AVIDINA-ESTREPTAVIDINA-PEROXIDASE, MAGNIFICAÇÃO ORIGINAL 100X .

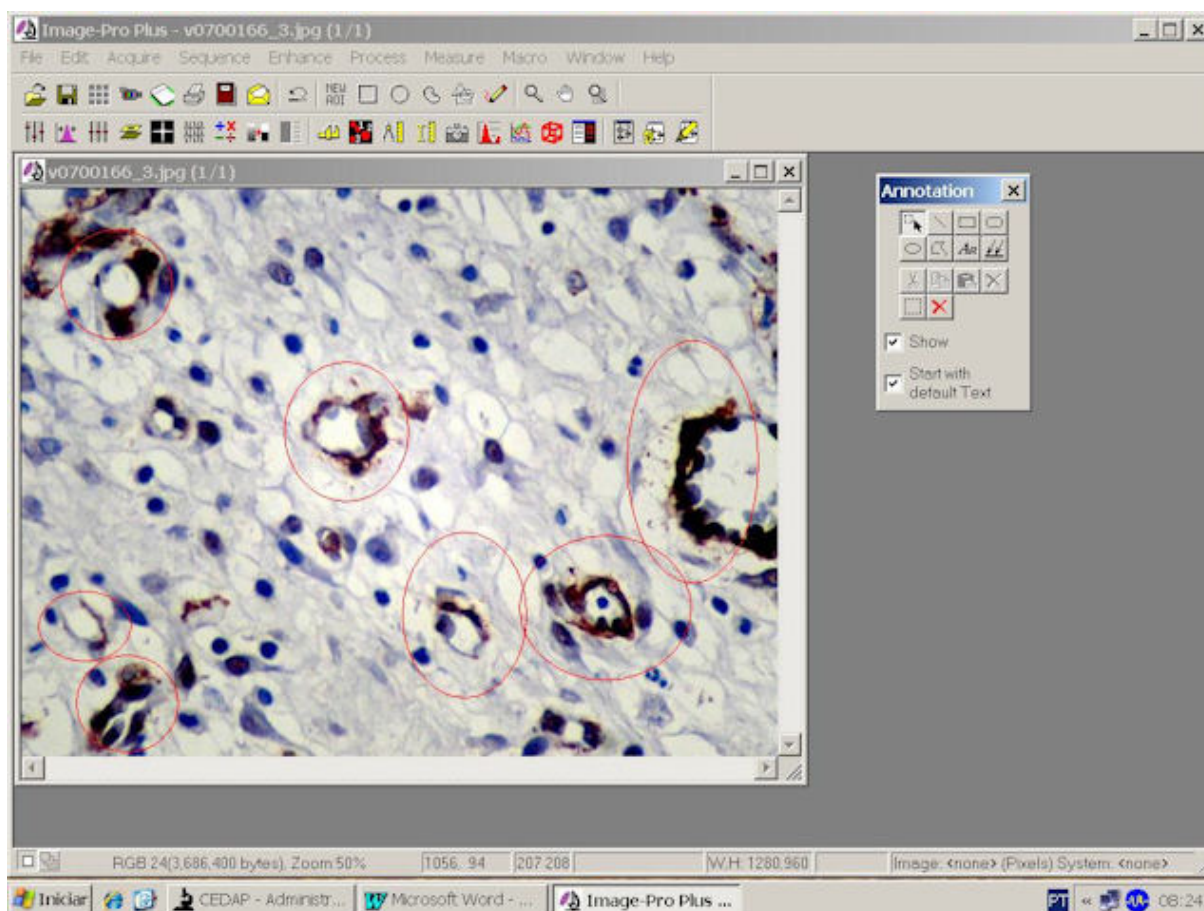


FIGURA 11 - ACHADOS HISTOLÓGICOS DIGITALIZADOS PARA CONTAGEM DE VASOS SANGUÍNEOS UTILIZANDO O SOFTWARE *IMAGE-PRO PLUS*®.

NOTA: A MARCAÇÃO EM CÍRCULOS VERMELHOS FOI REALIZADA COM O RECURSO *MANUAL TAG*.

Após digitalização da imagem microscópica com câmera fotográfica da marca Nikon® Digital Sight, modelo DS-SM, procedeu-se a análise computadorizada das mesmas com o software *Image Pro Plus* (Media Cybernetics, Califórnia, EUA).

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

De acordo com a natureza dos dados analisados procedeu-se ao tratamento estatístico julgado adequado nos Grupos Solução Salina Isotônica (SSI), Aminoácidos (AA) e Arginina (ARG). Observou-se o pré-requisito da distribuição normal (Gaussiana) das variáveis para a escolha do teste estatístico, com os

resultados expressos como média \pm erro-padrão. Na análise paramétrica utilizou-se o teste t de Student para as variáveis: pesos inicial e final nas comparações dentro e entre os grupos; tensão máxima, força máxima de tração e força de ruptura total; colágenos tipos I e III, entre os grupos; contagem de neovasos e contagem de miofibroblastos entre os grupos. Na análise não-paramétrica foi utilizado o teste de Mann-Whitney para as variáveis do IMAC, entre os grupos; contagem de neovasos entre os grupos SSI e ARG, AA e ARG. Em todos os testes estatísticos o nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 ÓBITOS

Dos 16 ratos do grupo controle que receberam solução salina isotônica por gavagem, 3 foram a óbito, sendo 1 no 3º dia do experimento ainda no pré-operatório, outro no 3º dia pós-operatório e houve outro óbito no 4º dia pós-operatório. No grupo suplementado por aminoácidos, composto por 15 animais, ocorreu 1 óbito no 1º dia pós-operatório. No grupo de 16 ratos suplementados com arginina, ocorreram 2 óbitos, sendo 1 no pós-operatório imediato e outro no 1º dia pós-operatório. Estes ratos que foram a óbito foram excluídos das análises estatísticas.

4.2 PESO

A avaliação da média dos pesos iniciais e finais foi realizada analisando a diferença entre os 3 grupos em seus pesos iniciais e finais.

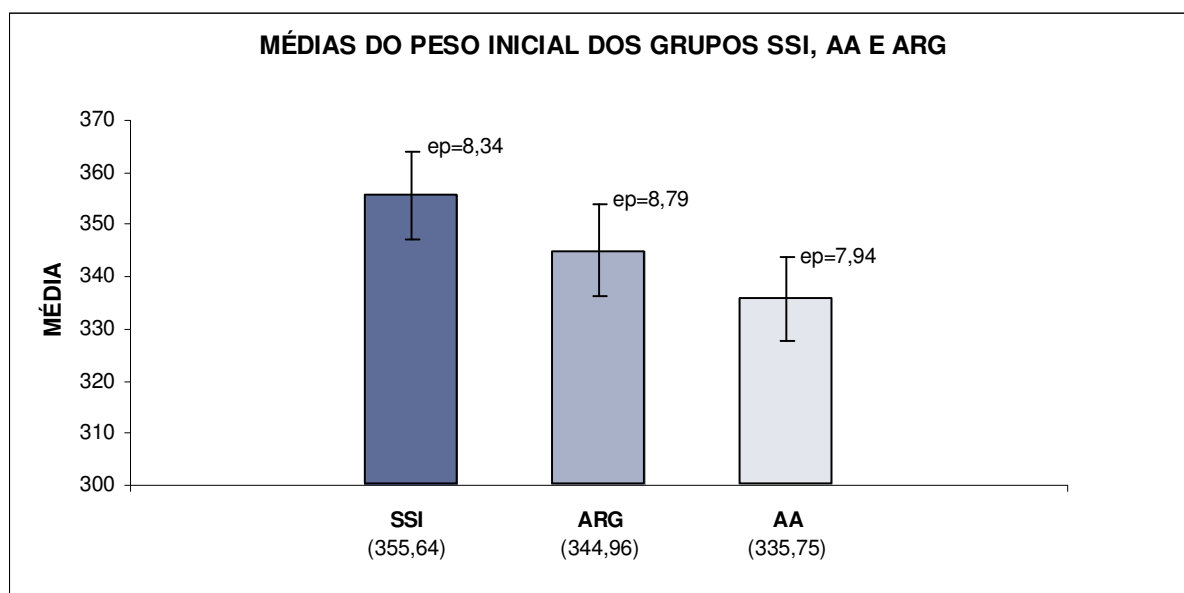
A comparação entre os três grupos de seus pesos iniciais, não evidenciou diferença significativa em qualquer um deles conforme demonstrado na TABELA 1 e no GRÁFICO 1.

TABELA 1- MÉDIAS DO PESO INICIAL DOS GRUPOS SSI, AA E ARG

GRUPOS	PESO INICIAL					p
	n	min-max	m	±	ep	
SSI	16	292,20-430,07	355,64	±	8,34	0,10
AA	15	301,80-402,45	335,75	±	7,94	
SSI	16	292,20-430,07	355,64	±	8,34	0,38
ARG	16	269,80-413,06	344,96	±	8,79	
AA	15	301,80-402,45	335,75	±	7,94	0,44
ARG	16	269,80-413,06	344,96	±	8,79	

Nota: n - número de animais, min-max - valores mínimo e máximo, m - média, ep- erro-padrão, p - nível de significância estatística

GRÁFICO 01



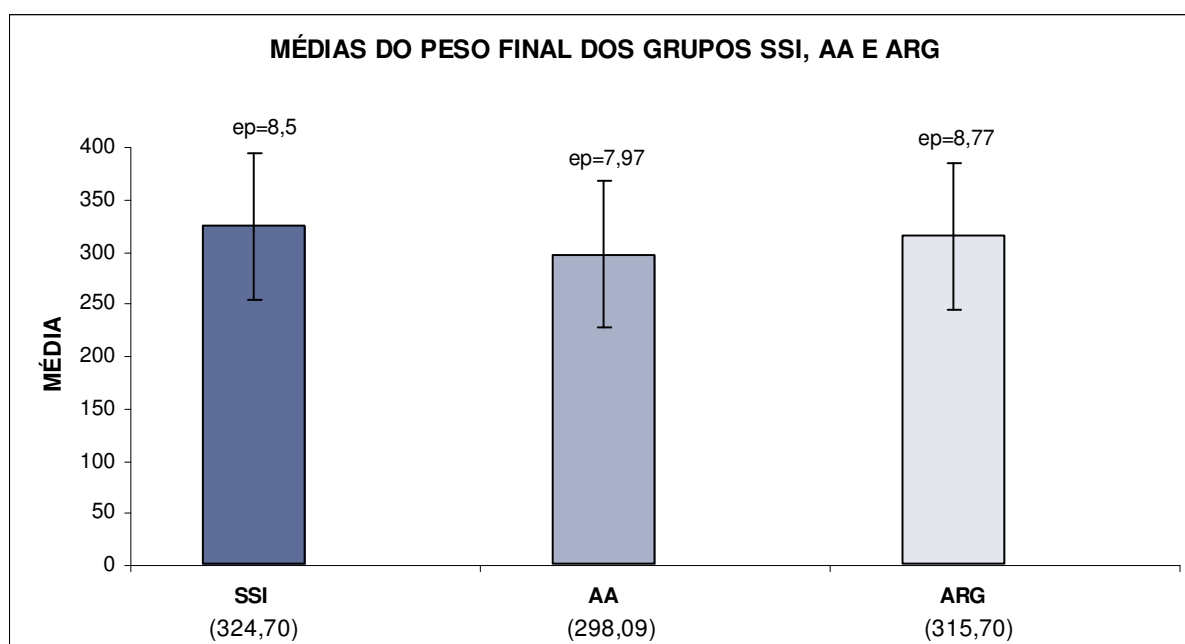
A mesma comparação com relação ao peso final, encontrou significância estatística na comparação entre os grupos soro e aminoácido apenas como demonstra a TABELA 2 e no GRÁFICO 2.

TABELA 2 - MÉDIAS DO PESO FINAL DOS GRUPOS SSI, AA E ARG

GRUPOS	PESO FINAL					p
	n	min-max	m	±	ep	
SSI	13	268,43-377,58	324,70	±	8,50	0,04
AA	14	231,81-355,70	298,09	±	7,97	
SSI	13	268,43-377,58	324,70	±	8,50	0,47
ARG	14	247,32-364,69	315,70	±	8,77	
AA	14	231,81-355,70	298,09	±	7,97	0,15
ARG	14	247,32-364,69	315,70	±	8,77	

Nota: n - número de animais, min-max - valores mínimo e máximo, m - média, ep - erro-padrão, p - nível de significância estatística

GRÁFICO 02



4.3 VARIÁVEIS DE FORÇA E TRAÇÃO

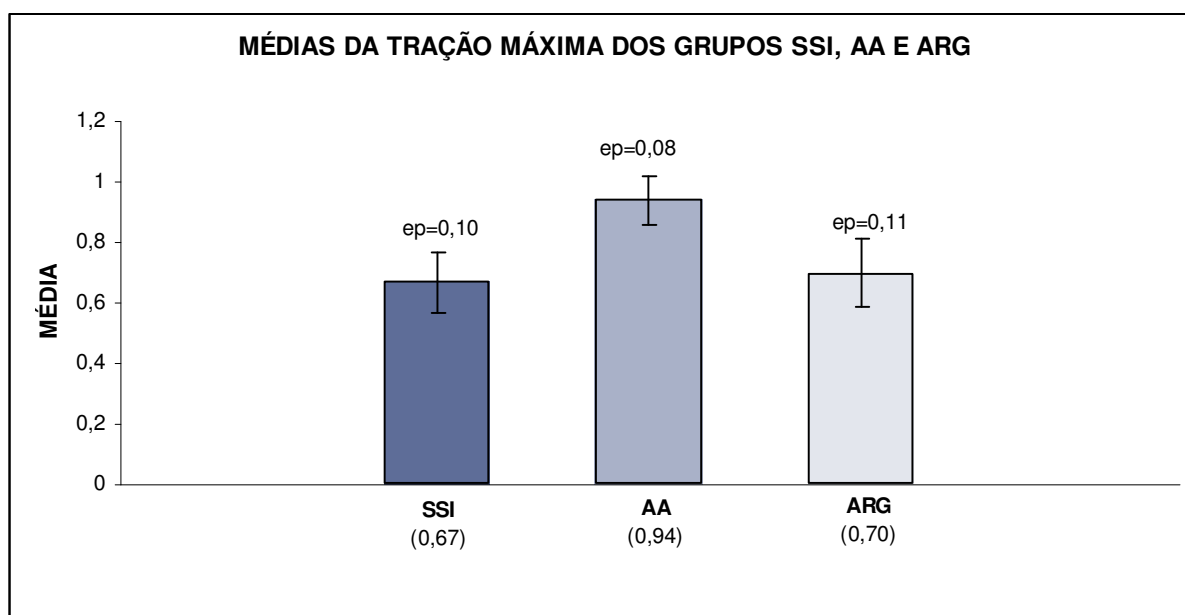
A análise das médias da tração máxima entre os grupos, demonstrou significância estatística apenas entre os grupos soro e aminoácidos, conforme a TABELA 3 e o GRÁFICO 3

TABELA 3 - MÉDIAS DA TRAÇÃO MÁXIMA DOS GRUPOS SSI, AA E ARG

GRUPOS	TRAÇÃO MÁXIMA					p
	n	min-max	m	±	ep	
SSI	10	0,19-1,08	0,67	±	0,10	0,04
AA	14	0,27-1,26	0,94	±	0,08	
SSI	10	0,19-1,08	0,67	±	0,10	0,86
ARG	12	0,16-1,58	0,70	±	0,11	
AA	14	0,27-1,26	0,94	±	0,08	0,09
ARG	12	0,16-1,58	0,70	±	0,11	

Nota: n - número de animais, min-max - valores mínimo e máximo, m - média, ep - erro-padrão, p - nível de significância estatística

GRÁFICO 03



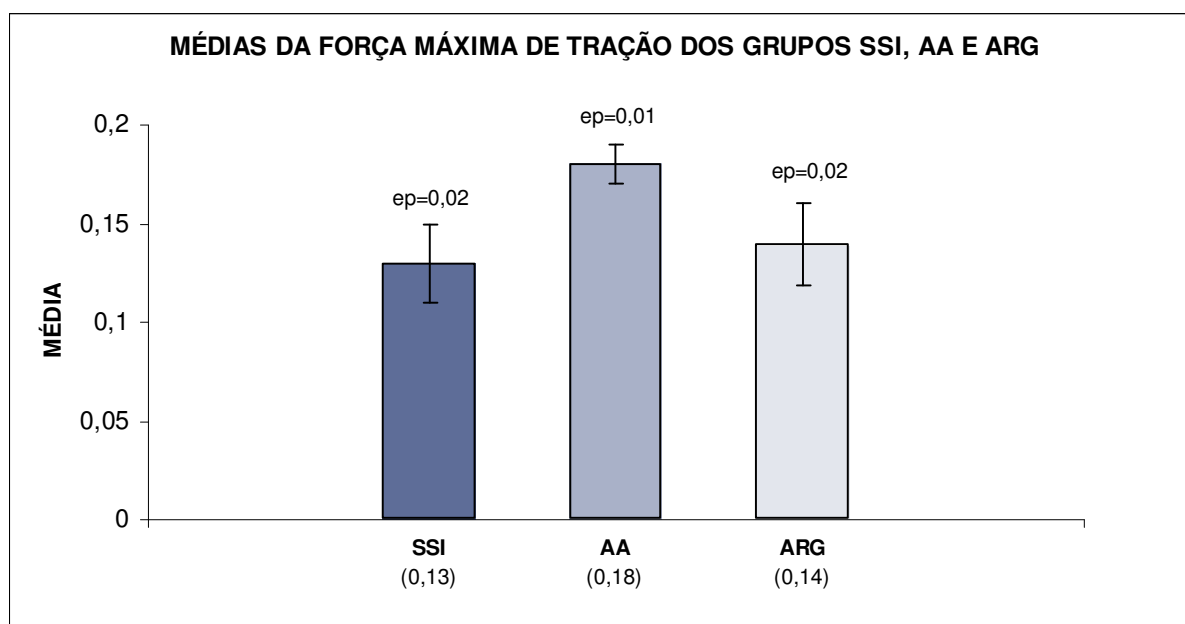
De forma similar, encontramos significância estatística na diferença da força máxima de tração entre os grupos soro e aminoácidos, como demonstra a TABELA 4 e GRÁFICO 4.

TABELA 4 - MÉDIAS DA FORÇA MÁXIMA DE TRAÇÃO DOS GRUPOS SSI, AA E ARG

GRUPOS	FORÇA MÁXIMA DE TRAÇÃO					p
	N	min-max	m	±	ep	
SSI	10	0,04-0,21	0,13	±	0,02	0,04
AA	14	0,05-0,25	0,18	±	0,01	
SSI	10	0,04-0,21	0,13	±	0,02	0,88
ARG	12	0,03-0,31	0,14	±	0,02	
AA	14	0,05-0,25	0,18	±	0,01	0,08
ARG	12	0,03-0,31	0,14	±	0,02	

Nota: n - número de animais, min-max - valores mínimo e máximo, m - média, ep - erro-padrão, p - nível de significância estatística

GRÁFICO 04



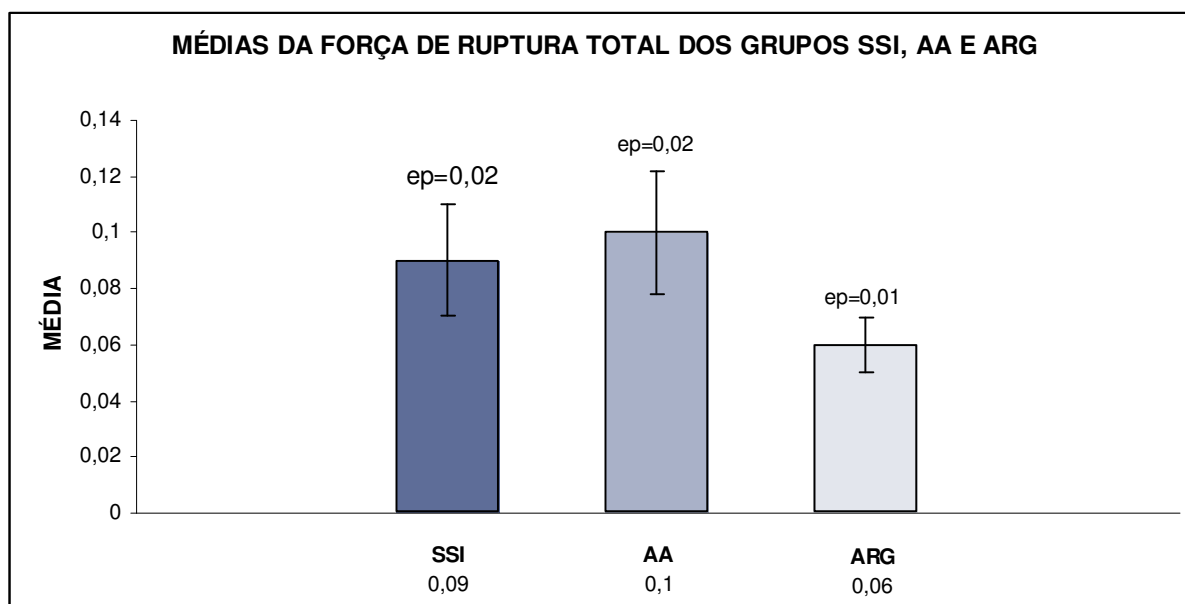
Finalmente a análise estatística das diferenças das médias da força de ruptura total entre os grupos demonstrou significância somente entre os grupos aminoácido e arginina, como demonstra a TABELA 5 e o GRÁFICO 5.

TABELA 5 - MÉDIAS DA FORÇA DE RUPTURA TOTAL DOS GRUPOS SSI, AA E ARG

GRUPOS	FORÇA DE RUPTURA TOTAL					p
	n	min-max	m	±	ep	
SSI	10	0,03-0,20	0,09	±	0,02	0,54
AA	14	0,02-0,23	0,10	±	0,02	
SSI	10	0,03-0,20	0,09	±	0,02	0,20
ARG	12	0,01-0,17	0,06	±	0,01	
AA	14	0,02-0,23	0,10	±	0,02	0,05
ARG	12	0,01-0,17	0,06	±	0,01	

Nota: n - número de animais, min-max - valores mínimo e máximo, m - média, ep - erro-padrão, p - nível de significância estatística

GRÁFICO 05



A ruptura fora das linhas de sutura ocorreu no grupo ssi em 3 casos (23,07%), 1 caso no grupo arginina (14,2%) e nenhum caso no grupo aa.

4.4 ANÁLISE DO COLÁGENO

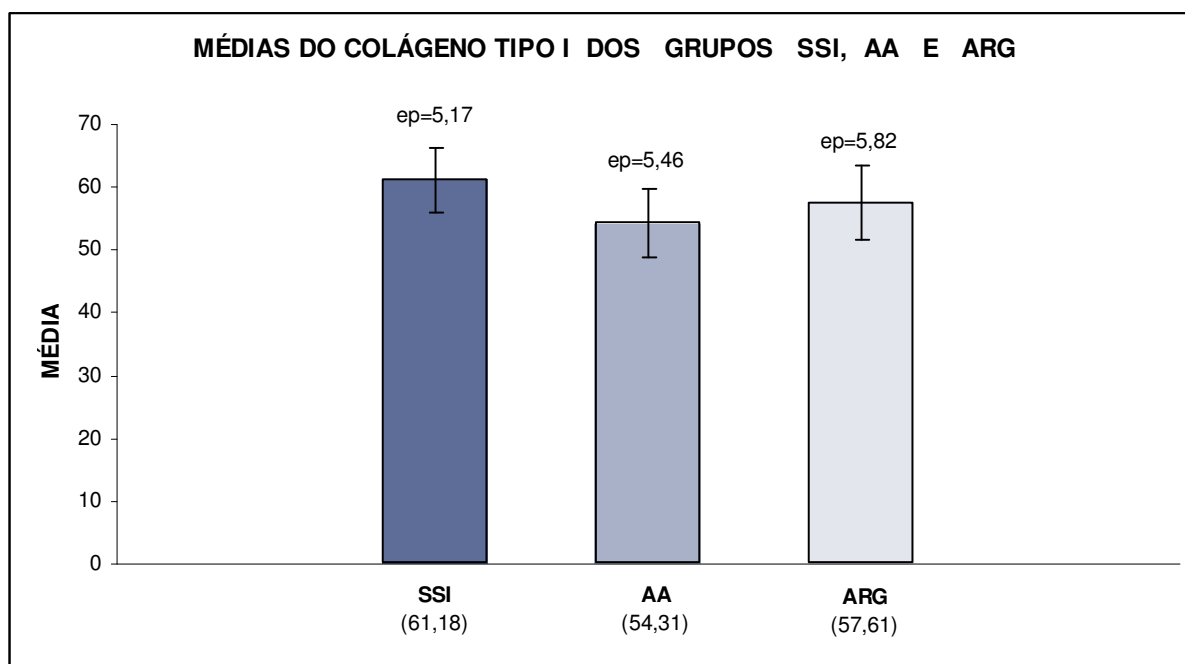
A deposição de colágeno do tipo I não apresentou preponderância entre os grupos e está demonstrada na TABELA 6 e no GRÁFICO 6.

TABELA 6 - MÉDIAS DO COLÁGENO TIPO I DOS GRUPOS SSI, AA E ARG

GRUPOS	COLÁGENO TIPO I					p
	n	min-max	m	±	ep	
SSI	12	36,11-91,27	61,18	±	5,17	0,37
AA	14	27,02-83,91	54,31	±	5,46	
SSI	12	36,11-91,27	61,18	±	5,17	0,65
ARG	14	23,86-92,95	57,61	±	5,82	
AA	14	27,02-83,91	54,31	±	5,46	0,68
ARG	14	23,86-92,95	57,61	±	5,82	

Nota: n - número de animais, min-max - valores mínimo e máximo, m - média, ep - erro-padrão, p - nível de significância estatística

GRÁFICO 06



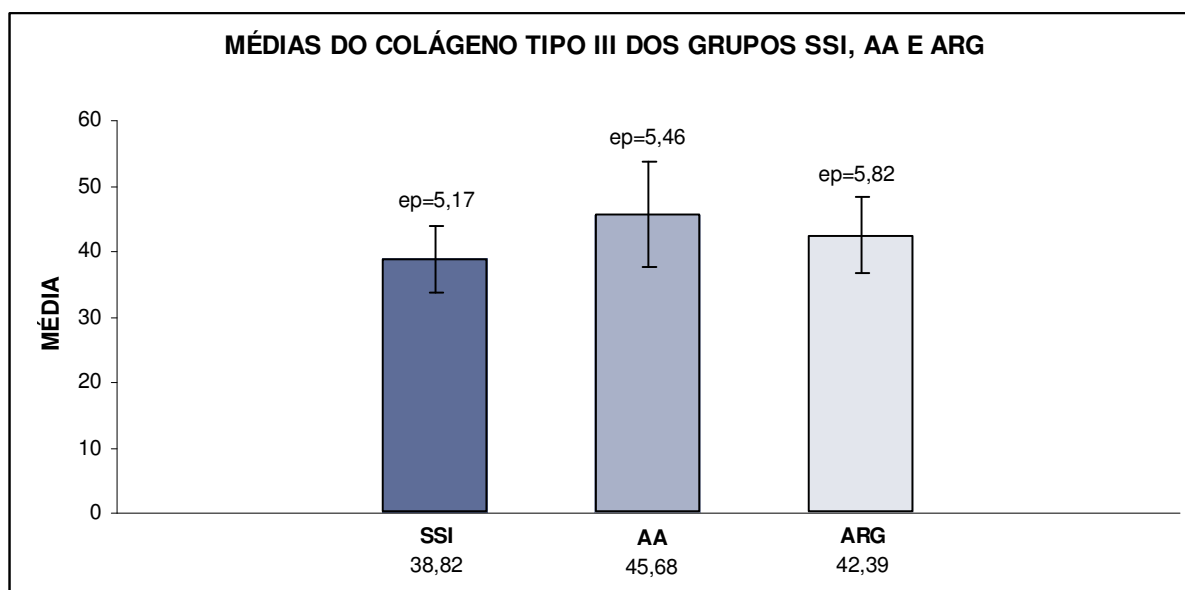
O colágeno do tipo III não apresentou maior deposição nos grupos suplementados com aminoácidos e arginina, conforme demonstrado na TABELA 7 e no GRÁFICO 7.

TABELA 7 - MÉDIAS DO COLÁGENO TIPO III DOS GRUPOS SSI, AA E ARG

GRUPOS	COLÁGENO TIPO III					p
	n	min-máx	m	±	ep	
SSI	12	8,73-63,88	38,82	±	5,17	0,37
AA	14	16,09-72,98	45,68	±	5,46	
SSI	12	8,73-63,88	38,82	±	5,17	0,65
ARG	14	7,05-76,13	42,39	±	5,82	
AA	14	16,09-72,98	45,68	±	5,46	0,68
ARG	14	7,05-76,13	42,39	±	5,82	

Nota: n - número de animais, min-max - valores mínimo e máximo, m - média, ep - erro-padrão, p - nível de significância estatística

GRÁFICO 07



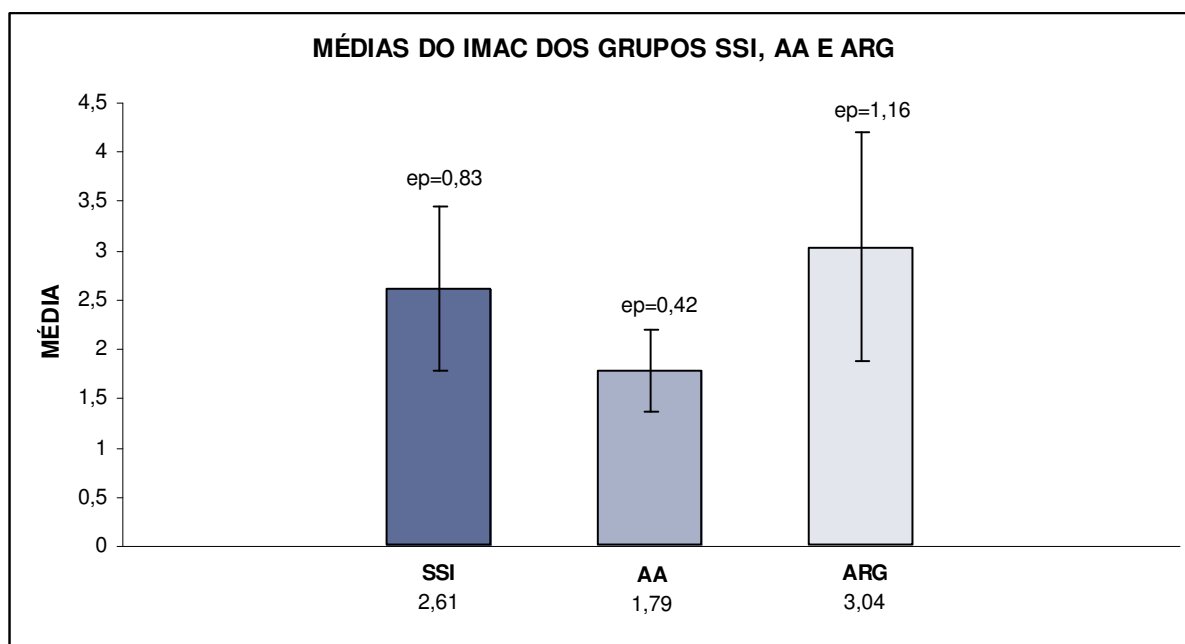
O Índice de Maturação de Colágeno (IMAC) apresentou resultados que estão demonstrados na TABELA 8 e no GRÁFICO 8, que inclui também a comparação entre os grupos.

TABELA 8 - MÉDIAS DO IMAC DOS GRUPOS SSI, AMINOÁCIDO E ARGININA

GRUPOS	IMAC					p
	n	min-max	m	±	ep	
SSI	12	0,56-10,45	2,61	±	0,83	0,41
AA	14	0,37-5,22	1,79	±	0,42	
SSI	12	0,56-10,45	2,61	±	0,83	0,64
ARG	14	0,31-13,18	3,04	±	1,16	
AA	14	0,37-5,22	1,79	±	0,42	0,70
ARG	14	0,31-13,18	3,04	±	1,16	

Nota: n - número de animais, min-max - valores mínimo e máximo, m - média, ep - erro-padrão, p - nível de significância estatística

GRÁFICO 08



4.5 IMUNOISTOQUÍMICA

A análise da cicatrização feita por técnicas de imunohistoquímica, avaliou através da contagem de vasos sanguíneos e de miofibroblastos e apresentou resultados que estão demonstrados nas TABELAS 9 e 10 e seus respectivos gráficos.

TABELA 9 - MÉDIAS DA CONTAGEM DE VASOS SANGUÍNEOS DOS GRUPOS SSI, AMINOÁCIDO E ARGININA

GRUPOS	CONTAGEM DE VASOS SANGUÍNEOS					p
	n	min-max	m	±	ep	
SSI	12	1,0-11,7	4,9	±	0,8	0,51
AA	14	1,7-7,3	4,3	±	0,5	
SSI	12	1,0-11,7	4,9	±	0,8	0,48
ARG	14	2,0-8,7	4,4	±	0,5	
AA	14	1,7-7,3	4,3	±	0,5	0,91
ARG	14	2,0-8,7	4,4	±	0,5	

Nota: n - número de animais, min-max - valores mínimo e máximo, m - média, ep - erro-padrão, p - nível de significância estatística

GRÁFICO 09

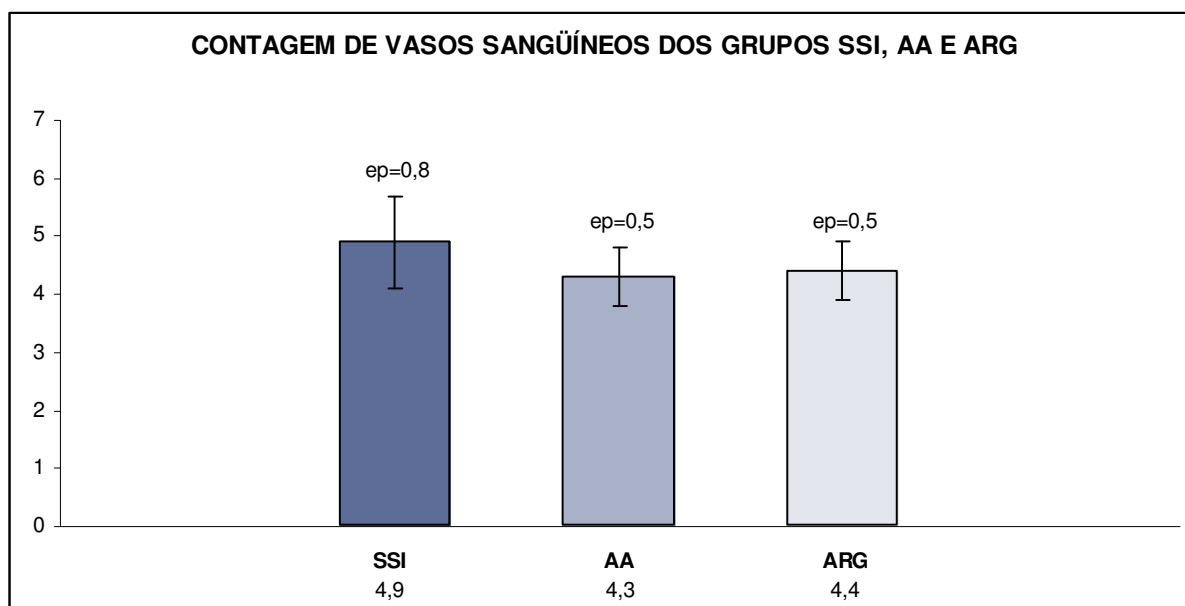
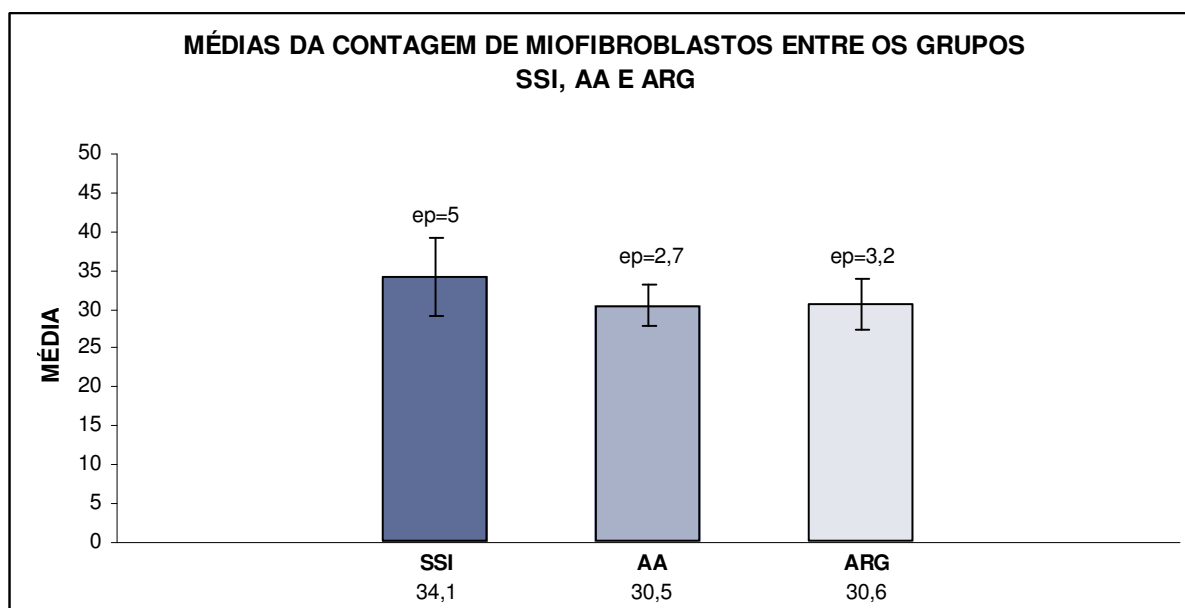


TABELA 10 - MÉDIAS DA CONTAGEM DE MIOFIBROBLASTOS ENTRE OS GRUPOS SORO, AMINOÁCIDO E ARGININA

GRUPOS	CONTAGEM DE MIOFIBROBLASTOS					p
	n	min-max	m	±	ep	
SSI	12	9,3-68,0	34,1	±	5,0	0,51
AA	14	17,0-51,0	30,5	±	2,7	
SSI	12	9,3-68,0	34,1	±	5,0	0,55
ARG	14	9,3-59,0	30,6	±	3,2	
AA	14	17,0-51,0	30,5	±	2,7	0,98
ARG	14	9,3-59,0	30,6	±	3,2	

Nota: n - número de animais, min-max - valores mínimo e máximo, m - média, ep - erro-padrão, p - nível de significância estatística

GRÁFICO 10



5 DISCUSSÃO

Neste estudo, realizaram-se duas anastomoses colônicas término-terminais em cólon de ratos, com o objetivo de avaliar o processo de cicatrização intestinal com suplementação oral de arginina e solução de aminoácidos como controle isonitrogenado, isocalórico e isovolumétrico, além de outro grupo controle com solução salina isotônica (ssi) como controle isovolumétrico apenas.

5.1 MÉTODO

5.1.1 Escolha do modelo experimental

A escolha do rato para a realização do experimento foi feita pelo fato de ser animal de pequeno porte, apresentar boa resistência ao meio ambiente, ser de fácil aquisição e manuseio, não requerer alojamento individual, e permitir a padronização de variáveis como raça, idade e sexo (HERMANN et al., 1964; JIBORN et al., 1980; LAW & ELLIS, 1990). Além disso, este animal 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. Alguns autores observaram semelhanças anatômicas e fisiológicas entre ratos e humanos, entretanto existe dificuldade inicial na confecção de anastomoses em estruturas de pequeno diâmetro. Apesar deste fato, após treinamento, as anastomoses são perfeitamente exequíveis sem auxílio de instrumentos de magnificação de imagem e com relativa agilidade. Todas estas vantagens levaram o autor a optar por este modelo animal.

Halsted (1887), citado por GETZEN et al. (1966), opinou que na anastomose término-terminal do intestino, somente um plano de sutura deve ser feito, relatando que a inversão causada pela sutura em 2 planos determina a formação de grande esporão interno, com diminuição da luz intestinal.

Fator importante e de grande interferência no processo de cicatrização é o material utilizado na confecção da anastomose: o fio de sutura. Apesar do progresso, ainda não se conhecem todos os fenômenos biológicos envolvidos na

cicatrização. A aplicação de fios de sutura interfere nesses fenômenos, daí a busca incessante de material que produza a menor reatividade biológica. Todavia não se chegou ao material ideal. Existem evidências de que os fios monofilamentares inabsorvíveis, tal como os de polipropileno e *nylon*, provoquem menor reação tecidual e, portanto, menor interferência no processo cicatricial (KORUDA & ROLANDELLI, 1990). A utilização do fio monofilamentar de *nylon* 5-0, no presente estudo, é justificada por se desejar mínima reação inflamatória tecidual pela presença do corpo estranho, pois esta poderia interferir no processo de cicatrização ocasionando eventuais erros na análise dos resultados.

5.1.2 Avaliação da arginina

O aminoácido semiessencial arginina foi alvo de estudos nas últimas décadas do século passado em razão de suas ações nos mecanismos fisiológicos de cicatrização e reparação de tecidos, bem como sua participação na imunidade de seres humanos (KIRK & BARBUL, 1990 e WITTE & BARBUL, 2003).

No processo de degradação da arginina alguns produtos destacam-se como as poliaminas e o óxido nítrico. As primeiras são essenciais à síntese protéica, como ocorre, por exemplo, na cicatrização de feridas, enquanto o último, possui importância na regulação dos linfócitos T (em baixas doses estimula sua atividade e em altas doses provoca efeitos inibitórios nos mesmos) (EFRON & BARBUL, 2000).

O presente estudo avaliou o efeito da arginina na cicatrização colônica em ratos utilizando dois grupos de controle. O primeiro complementou de forma isovolumétrica ssi e o segundo utilizou solução de aminoácidos de forma igualmente isovolumétrica e também isonitrogenada e isocalórica.

5.2 AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS

O conhecimento em cicatrização intestinal tem avançado consideravelmente e tem-se hoje compreensão do impacto de vários fatores, locais e sistêmicos, que influenciam o processo cicatricial. Ao contrário da cicatrização cutânea, na qual o progresso pode ser avaliado diariamente (em havendo uma complicação pode ser

instituído tratamento precoce), a cicatrização de uma anastomose intestinal não pode ser visualizada. Esta particularidade deixa ao cirurgião apenas os parâmetros de bem estar evolucionar do paciente para julgar o sucesso da operação (THORNTON e BARBUL, 1997). Muito do que se sabe até agora sobre cicatrização foi justamente estudado a nível de pele e extrapolado para outros tecidos. Há particularidades metabólicas inerentes a cada órgão, que se refletem em diferentes resultados durante o processo de cicatrização. A dificuldade em se avaliar clinicamente as anastomoses colônicas justifica a necessidade de modelos experimentais que estudem o processo cicatricial no tecido em questão (KORUDA e ROLANDELLI, 1990).

De acordo com HENDRIKS e MASTBOOM (1990), a investigação da cicatrização das anastomoses intestinais com intuito de melhorar seus resultados necessita de maneiras de quantificação. Este processo pode ser baseado em parâmetros clínicos, mecânicos, histológicos e imunoistoquímicos. A preferência é pela utilização de método mecânico, histológico ou imunoistoquímico. No presente estudo, optou-se pelo uso de um parâmetro clínico, de um método mecânico, de método histológico e de dois métodos imunoistoquímicos por motivos que serão expostos a seguir.

Os parâmetros clínicos, largamente utilizados na avaliação da evolução das anastomoses intestinais, possuem menor acurácia em relação aos outros parâmetros, e são considerados apenas adjuvantes nos estudos de cicatrização, principalmente por serem considerados parâmetros subjetivos de avaliação. Não traduzem diferença estatística significativa entre grupos de estudo onde parâmetros bioquímicos ou mecânicos mostram significância (KUZU et al., 1998; VIZZOTTO JUNIOR et al., 2003; COSTA et al., 2003; BONIN et al., 2005). No presente estudo, semelhante aos acima citados, não houve diferença na cicatrização entre os grupos quando avaliada sob o prisma clínico de evolução.

A aferição do peso é parâmetro clínico nutricional utilizado em vários estudos de cicatrização em anastomoses gastrointestinais (VIZZOTTO JUNIOR et al., 2003; COSTA et al., 2003). A desnutrição é deletéria para a cicatrização de anastomoses colônicas (LEITE et al., 1993). KARAHASANOGLU et al. (1998) evidenciaram perda ponderal de aproximadamente 15% do peso corpóreo inicial em ratos alimentados com dieta hipoprotéica por 10 dias antes da realização de anastomose colônica. Com isso, encontraram diminuição significativa nas pressões de ruptura nas

anastomoses dos animais desnutridos. VIZZOTTO JUNIOR et al. (2003) evidenciou perda de peso entre os animais durante estudo da cicatrização de anastomoses colônicas na vigência de quimioterapia intraperitoneal. Entretanto, não houve correlação com o decréscimo da força máxima de tração ou de ruptura total, sugerindo que o fator nutricional pode não ser preponderante no prejuízo da cicatrização das anastomoses colônicas induzido pela cisplatina intraperitoneal. No presente estudo a perda ponderal ocorreu em todos os grupos ao longo do experimento, sendo maior no grupo aminoácido, menor no grupo soro e o grupo arginina apresentou resultado intermediário, sendo de significância estatística a diferença de pesos finais quando comparada a diferença entre os grupos aminoácido e soro. Convém ressaltar que a perda ponderal é fato que se repete em grupos nos quais há necessidade de manipulação com sedação para se fazer a gavagem e também o período entre o procedimento cirúrgico e o sacrifício foi relativamente curto (5 dias). No estudo de COSTA et al. (2003), o autor sacrifica os animais com 3 e 8 dias de pós-operatório e nos grupos sacrificados com 3 dias houve também perda ponderal ao contrário dos grupos sacrificados aos 8 dias de pós-operatório. Tal fato demonstra que em nosso estudo a fase para o sacrifício seja talvez ainda precoce para a recuperação do trauma cirúrgico, porém como será visto mais adiante na discussão da análise das forças de tração a fase para se obter melhores resultados seria mesmo a partir do 4º dia de pós-operatório, segundo o mesmo autor.

A cicatrização ideal de uma ferida está relacionada com a proliferação fibroblástica e deposição de colágeno e outros elementos do tecido conectivo. A fibroplasia e a síntese do colágeno iniciam-se nas primeiras 24 horas do ferimento, seguindo-se em 48 a 72 horas pela migração endotelial. Ao redor do 4.º dia há a produção de fatores de crescimento que estimulam tanto a fibroplasia como a neovascularização (ORGILL e DEMLING, 1988). A força tênsil está relacionada com a multiplicação e maturação dos fibroblastos. Segundo HARVEY (1929), é necessário período de aproximadamente quatro dias para a maturação dos fibroblastos. No presente estudo, os intervalos utilizados para avaliar a angiogênese, formação dos miofibroblastos, deposição do colágeno e tensiometria foi 5 dias após o procedimento operatório. Da mesma forma que o parâmetro peso, os resultados de medidas tensiométricas mais significantes foram quando se compararam os grupos aminoácido e solução salina isotônica, com exceção da força de ruptura total

,que mostrou maior diferença na comparação entre os grupos arginina e aminoácido. Dados da literatura relatam que a boa cicatrização de uma ferida, com desenvolvimento de força tênsil adequada, está intimamente relacionada à proliferação e deposição do colágeno e outros elementos do tecido conectivo. A maioria dos dados disponíveis na literatura sugere que a síntese de colágeno atinge seu nível máximo nos primeiros 7 a 14 dias após a lesão, ocorrendo o pico de deposição dessa proteína no sítio de cicatrização do 21.º ao 28.º dia de evolução (PEACOCK, 1962; MADDEN e PEACOCK, 1968; DIEGELMANN, ROTHKOPF e COHEN, 1975; ORGILL e DEMLING, 1988). Os miofibroblastos são encontrados no tecido de cicatrização entre o quarto e sexto dias após a injúria, com maior proliferação entre o 8.º e 30.º dia do processo de cicatrização (CORNELISSEN, STOOP e HOOF, 2000).

No presente estudo escolheu-se o 5º dia para o sacrifício, pois conforme trabalhos da literatura até o quarto dia pós-operatório 100% das rupturas ocorreram na linha de sutura, sendo 54% de rupturas na linha de sutura quando a medida foi aferida nos dias 5, 7 e 14 de pós-operatório (IKEUCHI et al., 1999). Os resultados das forças de tração demonstraram uma maior resistência das anastomoses nos grupos aminoácido e arginina, especialmente o primeiro. Tais resultados podem ser justificados pelo fato da solução de aminoácidos apresentar em sua composição a arginina e o outro grupo a suplementação ter ocorrido apenas com arginina, comprovando o efeito dos outros aminoácidos na cicatrização das anastomoses colônicas. A única exceção foi na força de ruptura total que demonstrou um maior valor no grupo aminoácido, seguido pelo grupo soro e depois pelo grupo arginina. A ruptura fora das linhas de anastomose ocorreu em 3 casos (23,07%) no grupo ssi e 1 caso (14,2%) no grupo arginina. Tais resultados indicam etapa mais tardia nas rupturas fora das anastomoses e conseqüentemente processo mais retardado nos grupos suplementados com aminoácidos e arginina porém de melhor qualidade.

5.2.1 Avaliação Microscópica

Os cortes histológicos corados pelo picrossírius permitiram detectar o tipo de colágeno, bem como a sua quantificação nas amostras estudadas. Comparando-se diversos métodos de coloração para análise do colágeno, concluiu-se que o corante

picrosírius é mais seletivo, de fácil execução e interpretação, sendo específico para o estudo do colágeno tecidual, pois a quantidade de corante aderido é proporcional à quantidade da proteína presente, possibilitando o seu uso para a quantificação da mesma (SWEAT, PUTCHLER e ROSENTHAL, 1964; JUNQUEIRA, COSSERMELLI e BRENTANI, 1978). Nas preparações coradas pelo picrosírius, ao microscópio de luz polarizada, as fibras colágenas mais espessas, fortemente birrefringentes e que apresentam coloração em tons de amarelo a vermelho, representam o colágeno tipo I; as fibras mais finas e dispersas, fracamente birrefringentes e que apresentam coloração esverdeada representam o colágeno tipo III. Tais propriedades conferem ao picrosírius características de excelência para a diferenciação histológica do colágeno (JUNQUEIRA, COSSERMELLI e BRENTANI, 1978). A análise computadorizada, com o desenvolvimento de *softwares* específicos para a determinação do percentual de área ocupada, pelo tipo específico de colágeno, permite quantificar a deposição de cada um destes, de maneira objetiva e precisa. No presente estudo, os resultados da deposição de colágeno, demonstraram predominância do tipo I no grupo ssi e do tipo III no grupo aminoácidos, tais resultados nos fazem supor que o processo de deposição de colágeno já estivesse em fase mais adiantada ou final quando comparada com os grupos suplementados seja com arginina ou com aminoácidos. No IMAC os maiores valores foram os do grupo arginina, seguidos do grupo aminoácidos. Tais resultados podem significar que a suplementação com arginina e principalmente com aminoácidos provoquem deposição de colágeno de forma mais intensa e consistente, gerando portanto melhor cicatrização, apesar de tais resultados não apresentarem significância estatística.

Para o estudo dos miofibroblastos foi realizado estudo de imunistoquímica, utilizando-se para tal anticorpo anti- α -actina muscular lisa (anti- α -sm), estudado pela primeira vez por SKALLI et al. (1986), que demonstraram positividade para a identificação dessas células. As células foram identificadas e contadas manualmente após digitalização da imagem da microscopia.

Em estudo sobre a angiogênese na cicatrização de feridas, RUITER et al. (1993) utilizaram como antígeno a técnica imunistoquímica de *PAL-E*, que é altamente específica para endotélio de vaso sanguíneo, porém o fator VIII e o *CD 34* apresentam maior sensibilidade e são expressos também em arteríolas.

No presente estudo, a contagem dos vasos sangüíneos foi feita pela técnica imunistoquímica através do mesmo antígeno utilizado para a identificação dos miofibroblastos, pois a exemplo destes, células endoteliais também apresentam propriedades contráteis em sua estrutura. No presente estudo a coloração por imunistoquímica para anti- α -actina muscular lisa apresentou marcação para vasos sangüíneos da mesma forma que para miofibroblastos, conforme demonstrado nas fotomicrografias apresentadas no material e métodos. Os resultados mostraram maior número de vasos sangüíneos e miofibroblastos no grupo ssi que os demais, sem diferença entre os grupos aminoácido e arginina. Os referidos resultados podem indicar a exemplo da análise do colágeno que a suplementação seja com arginina, seja com aminoácidos promova um processo de cicatrização mais lento porém mais intenso levando em última análise a uma melhor qualidade deste processo. Uma possível explicação para este fenômeno seria o sacrifício dos animais ter sido realizado precocemente apesar de estudos na mesma linha de pesquisa desta instituição terem demonstrado ser o prazo de cinco dias de pós-operatório adequado. Outra possibilidade seria o aumento da amostra para obter dados mais significativos.

Importante ressaltar que os diversos trabalhos publicados visando o estudo do efeito da arginina em ratos, foram utilizados como controle solução salina isotônica (ARBÓS et al., 2000; WITTE et al., 2002; SHI et al., 2003; SHI et al., 2007), solução com outros imunutrientes, como ácidos graxos ω -3, ácido ribonucléico (QUIRINO et al., 2006), o aminoácido glicina (GURBUZ et al., 1998; NIRGIOTIS et al., 1991; CHYUN et al., 1984) ou água (KIRK et al., 1992). No presente estudo visando comparar o efeito da arginina isoladamente, empregaram-se dois controles, sendo um com solução salina isotônica e outro controle com solução de aminoácidos utilizada em nutrição parenteral, que inclui em sua fórmula a arginina, porém em concentração 10 vezes inferior a do grupo de estudo.

Após a coleta dos resultados, obtiveram-se evidências que a arginina promoveu uma melhora nas provas de tração e ruptura mesmo que o grupo aminoácido tenha obtido maiores valores, o que se justificaria, pois na solução de aminoácidos além da arginina diversos outros aminoácidos estão presentes e conseqüentemente exercem seu efeito nutricional. Da mesma forma, ao analisarmos o colágeno evidenciou-se deposição do mesmo mais precoce assim como substituição da forma imatura (tipo III) pela forma madura (tipo I) no grupo solução

salina isotônica (ssi). A análise por imunistoquímica também evidenciou maior número de vasos sanguíneos e miofibroblastos no grupo ssi, implicando igualmente em processo de cicatrização mais acelerado, porém encerrando-se mais precocemente.

Em recente trabalho publicado, Jones e Heyland, propuseram um novo paradigma: a farmaconutrição (JONES e HEYLAND, 2008). O conceito implica em indicar-se adequadamente cada imunonutriente, tais como glutamina, selênio, óleo de peixe (ácidos graxos ω -3) e arginina, a cada situação clínica, entre elas desnutrição, queimaduras, trauma, pacientes em estado crítico ou em síndrome de estresse respiratório agudo. Basearam sua argumentação no fato que os diversos estudos apresentados até o momento incorrem em erros metodológicos diversos, como seleção inadequada da amostra para estudo, uso de produtos para o estudo de produtos que associam diversos imunonutrientes (BEALE et al., 2008; PETROV et al., 2008; FINCO et al., 2007; CALDER, 2007; TSUJINAKA et al., 2007; ZHENG et al., 2007; TAKEUCHI et al., 2007; HELMINEN et al., 2007; PEARCE et al., 2006; KUDSK, 2006, ANDERSSON et al., 2006; STECHMILLER et al., 2004; HEYLAND et al., 2001; HEYS et al., 1999; BEALE et al., 1999). Waitzberg et al., em 2006, apresentou estudo em que tenta limitar o foco da amostra, apenas nos pacientes cirúrgicos, apesar de utilizar produto com diversos imunonutrientes. Conseguiu na metanálise definir a dose a ser utilizada (0,5 a 1L/dia) desta solução (IMPACT®), assim como a duração da suplementação (5 a 7 dias antes do procedimento operatório). Realizou ainda um estudo de custo-efetividade e ao final recomendou a utilização da solução em casos selecionados e no período indicado (WAITZBERG et al., 2006). A exemplo deste trabalho, outros estudos serão necessários para avaliação de cada um dos elementos presentes nas soluções comercialmente disponíveis e também em populações de estudo restritas.

6 CONCLUSÕES

- a) A utilização da arginina não evidencia benefícios na evolução dos pesos em ratos.
- b) A utilização da arginina não aumenta a tração máxima e a força máxima de tração quando comparada com o grupo controle. Quanto à força de ruptura total o grupo da arginina obtém a menor média.
- c) A deposição dos subtipos de colágeno, assim como o Índice de Maturação de Colágeno, não demonstram efeito significativo da arginina. Quanto a contagem de vasos sanguíneos e miofibroblastos o grupo da arginina também não demonstram efeito significativo.
- d) A utilização da arginina não promove efeitos benéficos nas anastomoses colônicas.

REFERÊNCIAS

- ALVES, M.R. **Influência da nicotina, durante a gestação e lactação, na cicatrização da parede abdominal de ratos lactentes: estudo tensiométrico, morfométrico e imunoistoquímico**. Curitiba, 2006. 142 f. Tese (Doutorado em Clínica Cirúrgica) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.
- ANDERSSON, R.; ANDERSSON, B.; ANDERSSON, E.; ECKERWALL, G.; NORDÉN, M.; TINGSTEDT, B. Immunomodulation in surgical practice. **J.Int.Hep.Pancreatic Biliary Association**, v.8(2), p.116-123, 2006.
- ARBÓS, M.A.; FERRANDO, J.M.; VIDAL, J.; QUILES, M.T.; HUGUET, P.; CASTELLS, J.; SEGARRA, A.; ARMENGOL, M.; SCHWARTZ, S. Early effects of exogenous arginine after the implantation of prosthetic material into the rat abdominal wall. **Life Sciences**, v. 67, p.2493-2512, 2000.
- BARBUL, A.; FISHEL, R.S.; SHIMAZU, S.; WASSERKRUG, H.L.; YOSHIMURA, N.N.; TAO, R.C.; EFRON, G. Intravenous hyperalimentation with high arginine levels improves wound healing and immune function. **J.Surg.Res.**, v. 38(4), p.328-334, 1985.
- BARBUL, A.; REGAN, M.C. Biology of wound healing. In: FISCHER, J.E. **Surgical Basic Science**, St. Louis: Mosby-Yearbook, 1993, p.67-89.
- BARBUL, A.; RETTURA, G.; LEVENSON, S.M.; SEIFTER, E. Wound healing and thymotropic effects of arginine: a pituitary mechanism of action. **The Am.J.Clin.Nutrition**, v.37, p.786-794, 1983.
- BEALE, R.J.; BRYG, D.J.; BIHARI, D.J. Immunonutrition in the critically ill: a systematic review of clinical outcome. **Crit.Care Med.**, v.27(12), p.2799-2805, 1999.
- BEALE, R.J.; SHERRY, T.; LEI, K.; CAMPBELL-STEPHEN, L.; McCOOK, J.; SMITH, J.; VENETZ, W.; ALTEHELD, B.; STEHLE, P.; SCHNEIDER, H. Early enteral supplementation with key pharmaconutrients improves sequential organ failure assessment score in critically ill patients with sepsis: outcome of a randomized, controlled, double-blind trial. **Crit.Care Med.**, v.36(1), p.131-144, 2008.
- BLOMQUIST, P.; JIBORN, H.; ZEDERFELDT, B. The effect of relative bowel rest on healing of colonic anastomosis: Breaking strenght and the collagen in the colonic wall following left colon resection and anastomosis in the rat. **Acta Chir. Scand.**, Oslo, v.150, p.671-675, 1984.
- BONIN, E.A., CAMPOS, A.C., COELHO, J.C., et al. Effect of pantoprazole administered subcutaneously on the healing of sutured gastric incisions in rats. **Eur Surg Res**, v. 37, p.250–256, 2005.
- BRASKEN, P. Healing of experimental colonic anastomosis **Eur. J. Surg.**, Stockholm, [S566], p.1-51, 1991.

- BRASKEN, P.; RENVALL, S.; SANDBERG, M. Fibronectin and collagen gene expression in healing experimental colonic anastomosis. **Br. J. Surg.**, London, v.78, p.1048-1052, 1991.
- BROUGHTON, G. 2nd; JANIS, J.E.; ATTINGER, C.E. Wound healing: an overview. **Plast.Reconstr.Surg.**, v.117 (7 suppl.), p.1e-S – 32e-S, 2006.
- BROUGHTON, G. 2nd; JANIS, J.E.; ATTINGER, C.E. The basic science of wound healing. **Plast.Reconstr.Surg.**, v.117 (7 suppl.), p.12S-34S, 2006.
- CALDER, P.C. Immunonutrition in surgical and critically ill patients. **Br.J.Nutr.**, v.98(1), p.133-139, 2007.
- CAMPOS, A.C.L.; BRANCO, A.B.; GROTH, A.K. Wound healing. **Arq.Brasil.Cir.Dig.**, v.20, p.51-58, 2007.
- CAMPOS, A.C.L.; GROTH, A.K.; BRANCO, A.B. Assessment and nutritional aspects of wound healing. **Curr.Opin.Clin.Nutr.Metab.Care**, v.11, p.281-288, 2008.
- CAMPOS, A.C.L.; MEGUID, M.M.; COELHO, J.C.U. Factors influencing outcome in patients with gastrointestinal fistula. **Surg. Clin. North Am.**, Philadelphia, v.76, n.5, p.1191-1198, 1996.
- CAMPOS, F.G.; MUCERINO, D.R.; WAITZBERG, D.L.; LOGULO, A.F.; EL IBRAHIM, R.; NADALIN, W.; HABR-GAMA, A. Efeitos protetores da glutamina e dieta elementar na enterocolite actínica aguda: avaliação histológica. **Rev. Ass. Med. Brasil**, São Paulo, v.40, n.3, p.143-149, 1994.
- CARREL, A. The treatment of wounds. **JAMA**, New York, v.55, p.2148-2150, 1910.
- CARRIL, C.S. **Anastomoses intestinais: métodos invaginantes e métodos por aposição em mesmo alinhamento: estudo experimental comparativo com apresentação de um processo original.** Ribeirão Preto, 1970, 75f. Tese (Docência-Livre) Faculdade Médica de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
- CHEN, X.; LI, Y.; CAI, X.; XU, W.; LU, S.; SHI, J. Dose-effect of dietary L-arginine supplementation on burn wound healing in rats. **Chinese Med.J.**, v.112(9), p.828-831, 1999.
- CHIBATA, M. **Nicotina subcutânea e cicatrização da parede abdominal em ratos; estudo histológico e tensiométrico.** Curitiba, 2003. Dissertação (Mestrado em Clínica Cirúrgica) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.
- CHLUMSKY, V. Experimentelle Untersuchungen über die verschiedenen Method der Darmvereingung. **Burns. Beitr.Klin.Chir.**, Berlin, v.25, p.539-600, 1899.
- CHYUN, J.H.; GRIMINGER, P. Improvement of nitrogen retention by arginine and glycine supplementation and its relation to collagen synthesis in traumatized mature and aged rats. **J.Nutr.**, v.114, p.1697-1704, 1984.

CORNELISSEN, A. M.; STOOP, R.; HOOF, H. W. V. Myofibroblasts and matrix components in healing palatal wounds in the rat. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 29, p. 1-7, 2000.

COSTA, M.A., CAMPOS, A.C., COELHO, J.C. Oral glutamine and the healing of colonic anastomoses in rats. **J Parenter Enteral Nutr**, v.27, p.182–185, 2003.

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

DAYAN, D.; HISS, Y.; HIRSBERG, A.; BUBIS, J.J.; WOLMAN, M. Are the polarization colors of picosirius red-stained collagen determined only by the diameter of the fibers? **Histochemistry**, Berlin, v.93, p.27-29, 1989.

DIEGELMANN, R. F.; ROTHKOPF, L. C.; COHEN, I. K. Measurement of collagen biosynthesis during wound healing. **J. Surg. Res.**, v. 19, p. 239-243, 1975.

EFRON, D.T.; BARBUL, A. Arginine and Immunonutrition: a reevaluation. **Nutrition**, v.16(1), p.73-74, 2000.

EFRON, D.T.; THORNTON, F.J.; STEULTEN, C.; TANTRY, U.S.; WITTE, M.B.; KIYAMA, T.; BARBUL, A. Expression and function of inducible nitric oxide synthase during rat colon anastomotic healing. **J.Gastrointest.Surg.**, v. 3(6), p.592-601, 1999.

FARHART, S.M.; AMER, N.S.; WEEKS, D.S.; MUSSELMAN, M.M. Effect of mechlorethamine hydrochloride (Nitrogen Mustard) on healing of abdominal wounds. **Arch.Surg.**, v.76, p.749-753, 1958.

FARRERAS, N.; ARTIGAS, V.; CARDONA, D., *et al.* Effect of early postoperative enteral immunonutrition on wound healing in patients undergoing surgery for gastric cancer. **Clin. Nutr.**, v.24, p.55-65, 2005.

FERREIRA, M. **Radioterapia pré e pós-operatória na cicatrização de anastomoses colônicas em ratos avaliada mediante estudo tensiométrico, histológico e da morfometria do colágeno.** Curitiba, 2004. 117 f. Dissertação (Mestrado) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

FINCO, C.; MAGNANINI, P.; SARZO, G.; VECCHIATO, M.; LUONGO, B.; SAVASTANO, S.; BORTOLIERO, M.; BARISON, P.; MERIGLIANO, S. Prospective randomized study on perioperative enteral immunonutrition in laparoscopic colorectal surgery. **Surg.Endosc.**, v.21, p.1175-1179, 2007.

GARCIA-OLMO, D.; PAYA, J.; GARCIA-OLMO D.C. Role of immediate postoperative feeding on colonic anastomosis resistance. An experimental study in a rat model. **Nutr. Hosp.**, [S1], v.11, n.5, p.279-285, 1996.

GARDINER, K.R.; GARDINER, R.E.; BARBUL, A. Reduced intestinal absorption of arginine during sepsis. **Critical Care Medicine**, v.23(7), p.1227-1232, 1995.

GETZEN, L.C.; ROE, R.D.; HOLLOWAY, C.K. Comparative study of intestinal anastomotic healing in inverted and everted closures. **Surg. Gynecol. Obstet.**, New York, p.1219-1227, 1966.

GURBUZ, A.T.; KUNZELMAN, J.; RATZER, E.E. Supplemental dietary arginine accelerates intestinal mucosal regeneration and enhances bacterial clearance following radiation enteritis in rats. **J.Surg.Research**, v.74(2), p. 149-154, 1998.

HARVEY, S. C.; The velocity of the growth of fibroblasts in the healing wound. **Arch. Surg.**, Chicago, v. 18, n. 4, p. 1227-1240, 1929.

HELMINEN, H.; RAITANEN, M.; KELLOSALO, J. Immunonutrition in elective gastrointestinal surgery patients. **Scandinavian Journal of Surgery**, v.96, p.46-50, 2007.

HENDRIKS, T.; MASTBOOM, W.J.B. Healing of experimental intestinal anastomosis: parameters for repair. **Dis. Colon Rectum**, Boston, v.33, p.891-901, 1990.

HERMANN, J. B.; WOODWARD, S. C.; PULASKI, E.J. Healing of colonic anastomosis in the rat. **Surg Gynecol Obstet**, New York, v. 119, p. 269-275, 1964.

HEYLAND, D.K.; NOVAK, F.; DROVER, J.W.; JAIN, M.; SU, X.; SUCHNER, U. Should immunonutrition become routine in critically ill patients?. **J.A.M.A.**, v.286, p.944-953, 2001.

HEYS, S.D.; WALKER, L.G.; SMITH, I.; EREMIN, O. Enteral nutritional supplementation with key nutrients in patients with critical illness and cancer. **Ann.Surg.**, v.229(4), p.467-477, 1999.

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.

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

HSU, S. M. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled anti-body (PAP) procedures. **J. Histochem. Cytochem.**, New York, v. 29, p. 577, 1981.

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.

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. Healing of experimental colonic anastomoses IV. Effect of suture technique on collagen metabolism in the colonic wall. **Am J Surg**, New York, v. 139, p. 406-413, 1980.

JONES, N.E.; HEYLAND, D.K. Pharmaconutrition: a new emerging paradigm. **Curr.Opin.Gastroenterol.**, v.24, p.215-222, 2008.

JÖNSSON, K.; JIBORN, H.; ZEDERFELDT, B. Breaking strength of small intestinal anastomoses. **Am.J.Surg.**, 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. **Histochemistry J.**, London, v.11, n.4, p.447-455, 1979.

JUNQUEIRA, L. C. U.; COSSERMELLI, W.; BRENTANI, R. R. Differential staining of collagen type I, II and III by sirius red and polarization microscopy. **Arch. Histol. JPN.**, v. 41, p. 267-274, 1978.

KARAHASANOGLU, T.; ALTINLI, E.; HAMZAOGLU, M.; PAKSOY, M.; YESILDERE, T.; ALEMDAROGLU, K. Effect of growth hormone treatment on the healing of the left colonic anastomoses in protein-malnourished rats. **Br J Surg**, London, v. 85, p. 931-33, 1998.

KIRK, S.J.; REGAN, M.C.; WASSERKRUG, H.L.; SODEYAMA, M.; BARBUL, A. Arginine enhances T-cell responses in athymic nude mice. **J.Par.Ent.Nutrition**, v.16(5), p.429-432, 1992.

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

KUDSK, K.A. Immunonutrition in surgery and critical care. **Annu.Rev.Nutr.**, v.26, p.463-479, 2006.

KUZU, M. A.; KOSKOY, C.; KALE, T.; DEMIPRENÇE, E.; RENDA, N. Experimental study of the effect of prooperative 5-fluorouracil on the integrity of colonic anastomoses. **Br J Surg**, London, v. 85, p. 236-239, 1998.

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

LEMOS, I.C., CAMPOS, A.C., ALMEIDA, M., et al. In utero malnutrition influences wound healing of newborn rats as measured by tensile strength and collagen deposition. **JPEN J Parenter Enteral Nutr**, v. 28, p.241–244, 2004.

LEVENSON, S.M.; GEEVER, E.V.; CROWLEY, L.V. et al. The healing of rat skin wounds. **Ann.Surg.**, v.161, p.293-298, 1965.

LORENA, D.; UCHIO, K.; COSTA, A.M.; DESMOLIERE, A. Normal scarring: importance of myofibroblasts. **Wound Repair Regen.**, Maiden, v.10, n.2, p.86-92, 2002.

MADDEN, J. W.; PEACOCK, E. E. Studies on the biology of collagen during wound healing. **Surgery**, St. Louis, v. 64, n. 1, p. 288-294, 1968.

MARTINS JR, A.; GUIMARÃES, A.S.; FERREIRA, A.L. Efeitos dos corticosteróides na cicatrização de anastomoses intestinais. **Acta Cir.Bras.**, São Paulo, v.7, p.28-30, 1993.

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

NIRGIOTIS, J.G.; HENNESSEY, P.J.; ANDRASSY, R.J. The effects of an arginine-free enteral diet on wound healing and immune function in the postsurgical rat. **J.Ped.Surg.**, v.26(8), p.936-941, 1991.

ORGILL, D.; DEMLING, R. H. Current concepts and approaches to wound healing. **Crit Care Med**, New York, v. 16, p. 889-907, 1988.

PEACOCK, E. E. Some aspects of fibrinogenesis during the healing of primary and secondary wounds. **Surg. Gynecol. Obstet.**, New York, v.115, n.4, p.408-414, 1962.

PEARCE, C.B.; SADEK, S.A.; WALTERS, A.M.; GOGGIN, P.M.; SOMMERS, S.S.; TOH, S.K.; JOHNS, T.; DUNCAN, H.D. A double-blind, randomized, controlled trial to study the effects of an enteral feed supplemented with glutamine, arginine, and omega-3 fatty acid in predicted acute severe pancreatitis. **J.O.P.**, v.7(4), p.361-371, 2006.

PETROV, M.S.; ATDUEV, V.A.; ZAGAINOV, V.E. Advanced enteral therapy in acute pancreatitis: is there a room for immunonutrition? A meta-analysis. **International Journal of Surgery**, v.6, p.119-124, 2008.

POLAT, C.; ARIKAN, Y.; GOKCE, C.; AKTEPE, F.; AKBULUT, G.; YILMAZ, S.; GOKCE, O. The effect of N²-nitro L-arginine methyl ester on colonic anastomosis after increased intra-abdominal pressure. **Langenbecks Arch.Surg.**, v. 392, p. 197-202, 2006.

QUIRINO, I.E.P.; CORREIA, M.I.T.D.; CARDOSO, V.N. The impact of arginine on bacterial translocation in an intestinal obstruction model in rats. **Clinical Nutrition**, v.26, p.335-340, 2007.

RABAU, M.; EYAL, A.; KLUGER, Y.; DAYAN, D. Bursting pressure in anastomotic healing in experimentally induced colitis in rats. **Dis.Colon Rectum**, Boston, v.41, n.4, p.468-472, 1998.

ROCHA, J.J.R. **Estudo comparativo entre sutura contínua e sutura com pontos separados em anastomoses colo-cólicas em plano único: trabalho experimental em cães**. Ribeirão Preto, 1989, 113f. Tese (Doutorado) – Faculdade Médica de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

ROLANDELLI, R.H.; KORUDA, M.J.; SETTLE, R.G.; ROMBEAU, J.L. The effect of enteral feedings supplemented with pectin on the healing of colonic anastomosis in the rat. **Surgery**, Philadelphia, v.99, n.6, p.703-707, 1986.

ROSE, W.C. Amino acid requirements of man. **Fed.Proc.**, v.8, p.546-552, 1949.

RUITER, D.J.; SCHLINGEMANN, R.O.; WESTPHAL, J.R.; DENIJN, M.; RIETVELD, F.J.; DE WAAL, R.M. Angiogenesis in wound healing and tumor metastasis. **Behring Inst.Mitt.**, v.92, p.258-272, 1993.

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.

SHASHIDHARAN, M.; LIN, K.M.; TERNENT, C.A.; SMYRK, T.C.; THORSON, A.G.; BLATCHFORD, G.J.; CHRISTENSEN, M.A. Influence of arginine dietary supplementation on healing colonic anastomosis in the rat. **Dis.Colon Rectum**, v. 42(12), p.1613-1617, 1999.

SHI, H.P.; EFRON, D.T.; MOST, D.; UDAYA, S.T.; BARBUL, A. Supplemental dietary arginine enhances wound healing in normal but not inducible nitric oxide synthase knockout mice. **Surgery**, Philadelphia, v.128(2), p.374-378, 2000.

SHI, H.P.; MOST, D.; EFRON, D.T.; WITTE, M.B.; BARBUL, A. Supplemental L-arginine enhances wound healing in diabetic rats. **Wound Rep.Reg.**, v.11(3), p.198-203, 2003.

SHI, H.P.; WANG, S.M.; ZHANG, G.X.; ZHANG, Y.J.; BARBUL, A. Supplemental L-arginine enhances wound healing following trauma/hemorrhagic shock. **Wound Rep.Reg.**, v. 15, p. 66-70, 2007.

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

SKINOVSKY, J.; MALAFAIA, O.; IOSHII, S.O.; CAMPOS, A.C.L. Nicotina interfere na cicatrização de anastomoses do intestino delgado em ratos. **Arq.Bras.Cir.Dig.**, São Paulo, v.14(4), p.151-154, 2001.

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

SOUSA, J.B.; SOARES, E.G.; APRILLI, F. Effects of diclofenac sodium on intestinal anastomotic healing: experimental study on the small intestine of rabbits. **Dis.Colon Rectum, Boston**, v.34, p.13-17, 1991.

STECHMILLER, J.K.; CHILDRESS, B.; COWAN, L. Arginine supplementation and wound healing. **Nutr. Clin. Pract.**, v.20, p.52-61, 2005.

STECHMILLER, J.K.; CHILDRESS, B.; PORTER, T. Arginine immunonutrition in critically ill patients: a clinical dilemma. **Am.J.Crit.Care**, v.13, p.17-23, 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.

TAKEUCHI, H.; IKEUCHI, S.; KAWAGUCHI, Y.; KITAGAWA, Y.; ISOBE, Y.; KUBOCHI, K.; KITAJIMA, M.; MATSUMOTO, S. Clinical significance of perioperative immunonutrition for patients with esophageal cancer. **World J.Surg.**, v.31, p.2160-2167, 2007.

THOMPSON, C.; FUHRMAN, M.P. Nutrients and wound healing: still searching for the magic bullet. **Nutr. Clin. Pract.**, v.20, p.331-347, 2005.

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. 1997.

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.

TRUBIAN, P.S., BRANCO, A.B., CAMPOS, A.C.L., et al. Effect of octreotide administered subcutaneously on the healing of gastric sutures in rats. **Arq Brasil Cir Dig**, v.20, p.172-178, 2007.

TSUJINAKA, T.; HIRAO, M.; FUJITANI, K.; MISHIMA, H.; IKENAGA, M.; SAWAMURA, T.; KURATA, M. Effect of preoperative immunonutrition on body composition in patients undergoing abdominal cancer surgery. **Surg Today**, v.37, p.118-121, 2007.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. Sistema de Bibliotecas. 2 ed. Curitiba: Editora UFPR, 2007 (Normas para apresentação de documentos científicos, 9v.).

VAN WINKLE, W. The tensile strenght of wounds and factors that influence it. **Surg.Gynecol.Obstet**, New York, v.129, n.3, p.819-842, 1969.

VIZZOTTO, A.O. Jr.; NORONHA, L.; SCHEFFEL, D.L.H.; CAMPOS, A.C.L. Effect of the cisplatin applied before and after the surgical procedure on the healing of colonic anastomoses in rats. **J. Bras. Pathol. Med. Lab.**, v.39, p.143–149, 2003.

WAITZBERG, D.L.; SAITO, H.; PLANK, L.D.; JAMIESON, G.G.; JAGANNATH, P.; HWANG, T.L.; MIJARES, J.M.; BIHARI, D. Postsurgical infections are reduced with specialized nutrition support. **World J.Surg.**, v.30, p.1592-1604, 2006.

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

WITTE, M.B.; BARBUL, A. Arginine physiology and its implication for wound healing. **Wound Repair Regen.**, v.11, p.419-423, 2003.

WITTE, M.B.; THORNTON, F.J.; TANTRY, U.; BARBUL, A. L-arginine supplementation enhances diabetic wound healing: involvement of the nitric oxide synthase and arginase pathways. **Metabolism**, v.51(10), p.1269-1273, 2002.

WITTE, M.B.; VOGT, N.; STUELTEN, C.; GOTOH, T.; MORI, M.; BECKER, H.D. Arginase acts as an alternative pathway of L-arginine metabolism in experimental colon anastomosis. **J.Gastrointest.Surg.**, v.7(3), p.378-385, 2003.

ZHENG, Y.; LI, F.; QI, B.; LUO, B.; SUN, H.; LIU, S.; WU, X. Application of perioperative immunonutrition for gastrointestinal surgery: a meta-analysis of randomized controlled trials. **Asia Pac.J.Clin.Nutr.**, v.16(1), p.253-257, 2007.

APÊNDICE

EVOLUÇÃO DOS PESOS (g) NOS DIVERSOS GRUPOS

Grupo Soro

Dia	01	03	05	07	Cirurgia	09	11	13
Rato01	361,55	362,95	353,53	357,45	342,42	342,42	324,82	307,67
02	393,71	392,44	388,81	395,87	373,2	373,2	367,87	351,9
03	385,2	-	-	-	-	-	-	-
04	366,37	365,75	361,23	364,32	346,16	346,16	337,73	325,69
05	430,07	429,64	425,37	421,92	402,9	402,9	398,61	377,58
06	338,9	339,39	339,81	349,22	345,6	335,28	-	-
07	306	310,81	315,87	327,5	324,3	315,3	298,3	289,26
08	376,1	379,72	384,57	393,85	389,9	374,62	365,6	354,9
09	349,3	360,55	358,5	367,17	359,5	346,51	331,4	328,2
10	350,1	358,12	356,43	360,7	360,2	349,86	332,6	331,2
11	340,6	346,1	350,92	354,52	352,9	350,67	344,7	-
12	344	348,8	348,89	355,06	346,63	334,13	320,07	317,71
13	369,5	371,28	377,5	388,77	380,14	362,6	359,5	356,2
14	326,6	327,65	326,08	332,05	322,8	313,54	303,4	293,49
15	292,2	292,87	296,64	303,26	293,9	284,53	275,3	268,43
16	360	360,19	358,42	360,75	353,6	344,54	335,2	318,83

Grupo Arginina

Dia	01	03	05	07	Cirurgia	09	11	13
Rato01	358,66	359,05	351,55	350,81	334,27	-	-	-
02	413,06	419,58	406,62	410,15	385,39	385,39	376,12	364,69
03	346,47	351,27	342,5	348,55	325,44	325,44	310,91	311,73
04	351,9	348,2	339,87	341,46	322,71	322,71	315,09	305,73
05	390,93	393,22	382,81	396,59	373,69	373,69	358,04	348,79
06	370,6	372,73	372,76	376,07	369,64	359,17	344,2	349,17
07	355,7	353,15	348,17	352,9	342,12	331,85	321,5	307,1
08	313	312,43	317,65	310,33	-	-	-	-
09	379,5	384,97	391,27	395,77	386,6	372,03	356,8	342,44
10	315,2	324	325,37	328,86	319,69	308,48	278	295,21
11	339,6	345,92	345,44	351,85	346,48	336,05	325,6	330,76
12	314,1	320,81	322,63	327,58	319,1	307,05	300,8	293,71
13	353,8	364,36	366,44	374,13	357,91	346,56	342,6	348,35
14	269,8	273,45	273,06	278,4	269,1	260,04	248,8	247,32
15	328	329,36	327,55	323,81	373,23	313,76	300,2	288,85
16	319	328,55	326,21	336,45	323,49	306,17	296,2	285,94

Grupo Aminoácido

Dia	01	03	05	07	Cirurgia	09	11	13
Rato01	387,55	393,06	384,33	387,31	364,93	364,93	356,18	337,13
02	332,37	332,02	331,06	331,08	312,22	312,22	304,53	292,69
03	358,03	355,55	354,8	353,4	334,5	334,5	327,38	312,44
04	363,51	364,93	359,16	356,03	335,37	335,37	332,35	327,35
05	402,45	407,71	395,6	396	369,97	369,97	365,04	355,7
06	307,5	307,02	314,66	316,87	308,98	297,32	292	231,81
07	331	327,6	333,2	338,5	332,53	320,49	308	297,66
08	313,2	318	323,5	329,09	313,13	303,4	296,5	287,33
09	339,4	341,83	347,71	347,85	340,7	327,17	309,8	303,43
10	307,6	310,15	312,33	318,31	313,03	301,27	284,4	284,1
11	302,3	303,69	305,39	311,5	304,2	290,25	284,1	285,77
12	341,5	343,7	346,14	352,67	-	-	-	-
13	332	331,96	334	341,8	330,15	319,25	309	297,76
14	316	313,75	315,75	310,71	310,71	302,53	293,1	273,52
15	301,8	298,59	303,32	304,17	296	266,7	271,4	286,62

Animais	Tração Máx.(kgf/cm ²)	F.Máxima(kgf)	F.Ruptura(kgf)
SSI 01	0,96	0,19	0,06
SSI 02	1,07	0,21	0,2
SSI 03	0,42	0,08	0,03
SSI 04	0,44	0,09	0,06
SSI 05	0,44	0,09	0,06
SSI 06	0,98	0,19	0,19
SSI 07	0,91	0,18	0,07
SSI 08	0,82	0,16	0,08
SSI 09	0,49	0,1	0,1
SSI 10	0,18	0,04	0,03
AA 01	1,26	0,25	0,08
AA 02	0,67	0,13	0,09
AA 03	1,02	0,2	0,1
AA 04	1,07	0,21	0,13
AA 05	1,24	0,24	0,18
AA 06	0,98	0,19	0,11
AA 07	0,98	0,19	0,15
AA 08	1,18	0,23	0,23
AA 09	0,99	0,2	0,03
AA 10	0,43	0,09	0,07
AA 11	1,1	0,22	0,08
AA 12	0,26	0,05	0,02
AA 13	0,84	0,17	0,16
AA 14	1,12	0,22	0,02
ARG 01	0,56	0,11	0,02
ARG 02	0,83	0,16	0,07
ARG 03	0,95	0,19	0,07
ARG 04	1,58	0,31	0,04
ARG 05	0,79	0,16	0,06
ARG 06	0,31	0,06	0,05
ARG 07	0,19	0,04	0,03
ARG 08	0,53	0,11	0,01
ARG 09	0,99	0,19	0,17
ARG 10	0,76	0,15	0,12
ARG 11	0,15	0,03	0,02
ARG 12	0,73	0,14	0,04

Contagem de neovaso			Contagem de miofibroblasto			
Cortes	1	2	3	1	2	3
151-arg	3	2	5	29	17	10
152-sf	9	6	6	40	39	8
153-aa	5	5	6	31	50	46
157-sf	8	2	4	4	15	9
158-arg	3	7	6	16	36	56
159-aa	4	2	2	25	31	32
160-aa	6	5	5	13	31	37
161-arg	7	8	8	66	54	57
162-aa	2	3	0	40	33	9
163-aa	8	3	1	48	27	11
164-aa	4	3	11	9	12	36
165-aa	4	10	7	33	61	33
166-arg	9	6	11	60	46	5
167-sf	5	4	8	51	25	58
168-arg	5	8	7	30	21	14
169-sf	3	3	2	28	35	36
170-sf	6	7	4	29	42	41
171-sf	3	5	3	58	50	96
172-sf	4	4	6	25	33	60
173-arg	4	3	1	78	33	18
174-sf	5	4	6	44	64	60
175-sf	4	4	3	34	44	39
176-aa	3	5	3	38	25	4
177-aa	2	1	2	30	46	40
178-arg	4	2	4	44	31	21
179-arg	3	4	4	18	30	39
180-arg	7	4	2	33	22	18
181-arg	4	4	4	29	32	46
182-aa	2	4	1	62	31	10
183-aa	3	6	3	42	68	43
184-arg	4	3	3	16	17	39
185-arg	2	2	2	25	18	27
186-aa	13	2	4	7	3	54
187-sf	3	3	4	10	6	20
188-sf	1	0	2	30	9	17
189-sf	11	6	18	15	36	18
190-arg	4	3	3	9	13	6
191-aa	2	10	10	10	54	16
192-arg	3	5	3	47	30	29
193-aa	3	3	3	11	16	24

MÉDIAS DOS CAMPOS	GRUPO	TIPO I	TIPO III	IMAC=TIPOI/TIPOIII
média de v0700193	AMINOÁCIDO	66,8816	33,1184	10,0809
média de v0700192	ARGININA	57,6188	42,3812	1,5496
média de v0700191	AMINOÁCIDO	70,2163	29,7837	4,7345
média de v0700190	ARGININA	92,9467	7,0533	56,3819
média de v0700189	SORO	48,0279	51,9721	1,0354
média de v0700188	SORO	73,9877	26,0123	7,2964
média de v0700187	SORO	85,8695	14,1305	7,5826
média de v0700186	AMINOÁCIDO	82,1297	17,8703	8,7894
média de v0700185	ARGININA	92,8265	7,1735	46,4182
média de v0700184	ARGININA	54,8877	45,1123	1,5965
média de v0700183	AMINOÁCIDO	58,1635	41,8365	1,8134
média de v0700182	AMINOÁCIDO	83,9124	16,0876	23,3400
média de v0700181	ARGININA	67,2580	32,7420	8,9798
média de v0700180	ARGININA	77,3888	22,6112	4,1220
média de v0700179	ARGININA	59,1989	40,8011	4,2161
média de v0700178	ARGININA	58,1321	41,8679	2,2875
média de v0700177	AMINOÁCIDO	77,3098	22,6902	16,3253
média de v0700176	AMINOÁCIDO	61,3808	38,6192	1,8487
média de v0700175	SORO	68,1690	31,8310	2,6988
média de v0700174	SORO	38,1103	61,8897	0,7258
média de v0700173	ARGININA	74,3763	25,6237	4,1767
média de v0700172	SORO	70,7050	29,2950	4,1143
média de v0700171	SORO	91,2693	8,7307	17,7627
média de v0700170	SORO	49,8158	50,1842	1,2822
média de v0700169	SORO	65,1963	34,8037	2,2256
média de v0700168	ARGININA	34,6908	65,3092	0,6575
média de v0700167	SORO	60,9787	39,0213	2,4006
média de v0700166	ARGININA	31,7116	68,2884	0,6718
média de v0700165	AMINOÁCIDO	42,4390	57,5610	1,1687
média de v0700164	AMINOÁCIDO	27,0201	72,9799	0,4295
média de v0700163	AMINOÁCIDO	29,9140	70,0860	0,4901
média de v0700162	AMINOÁCIDO	52,6714	47,3286	1,9665
média de v0700161	ARGININA	40,7308	59,2692	0,7447
média de v0700160	AMINOÁCIDO	27,6032	72,3968	0,4051
média de v0700159	AMINOÁCIDO	30,6689	69,3311	0,8391
média de v0700158	ARGININA	23,8646	76,1354	0,8911
média de v0700157	SORO	36,1152	63,8848	0,6385
média de v0700153	AMINOÁCIDO	50,1019	49,8981	1,0398
média de v0700152	SORO	45,9190	54,0810	1,1007
média de v0700151	ARGININA	40,8761	59,1239	0,7364