

**CHRISTIANO MACHADO**

**A INFLUÊNCIA DA NICOTINA NA CICATRIZAÇÃO DE SUTURAS  
VESICAIS EM COELHOS**

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

Orientador: Prof. Dr. Renato Tâmbara Filho

Co-orientador: Prof. Dr. Sérgio Ossamu Ioshii

Coordenador: Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias

**CURITIBA**

**2005**



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 COMISSÃO EXAMINADORA  
DA AVALIAÇÃO DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

Aluno: **CHRISTIANO MACHADO**

Título da Dissertação "A INFLUÊNCIA DA NICOTINA NA CICATRIZAÇÃO DE SUTURAS VESICAIS EM COELHOS".

**CONCEITOS EMITIDOS:**

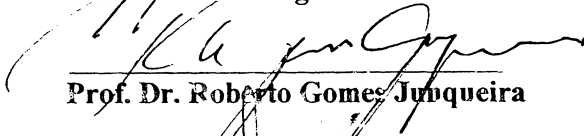
Prof. Dr. Roberto Gomes Junqueira	Conceito emitido <u>B</u>	Equivalência <u>8,5</u>
Prof. Dr. Luiz Sergio Santos	Conceito emitido <u>A</u>	Equivalência <u>9.0</u>
Prof. Dr. Luiz Carlos de Almeida Rocha	Conceito emitido <u>A</u>	Equivalência <u>9.0</u>

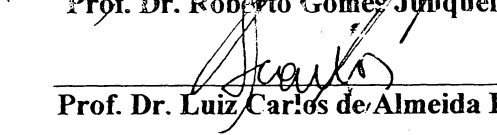
Conceito Final de Avaliação:

Conceito: B Equivalência 8,8

Curitiba, 28 de novembro de 2005

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Luiz Sergio Santos

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Roberto Gomes Junqueira

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Luiz Carlos de Almeida Rocha

À Deus, fonte de toda sabedoria e verdade

Para Arnaldo, Iraídes, Ana Paula e Christiano Filho,  
Que me iluminam e me alentam.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Renato Tâmbara Filho, médico e professor exemplar, orientador deste trabalho, pela confiança em mim depositada e incentivo constante.

Ao Prof. Dr. Sérgio Ossamu Ioshii, pelo exemplo de dedicação à pesquisa e pela valiosa execução e análise dos exames histológicos.

Ao Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias, Coordenador do Programa de Pós - Graduação em Clínica Cirúrgica da UFPR, pela constante porta aberta, amiga e conselheira.

Aos Drs. Luciano Stunitz e Andrei Amatuzzi, pelo apoio durante a realização deste trabalho.

Ao LACTEC, ao engenheiro Sérgio Luiz Henke e ao técnico Sérgio W. Santos, pela valiosa colaboração e boa vontade.

Ao IPEM e ao funcionário João Britto de Freitas, pela indispensável ajuda no desenvolvimento desta pesquisa.

À estudante Aline Von Bathen, pelo inestimável auxílio e voluntariedade.

À Ângela da Matta , pela análise estatística.

Às funcionárias do Programa de Pós - Graduação Regina Aparecida Sass Marques e Marili Dress, pela assistência.

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

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	vi
<b>LISTA DE GRÁFICOS</b> .....	vii
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	viii
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	ix
<b>RESUMO</b> .....	X
<b>ABSTRACT</b> .....	vi
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 OBJETIVOS.....	2
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	3
2.1 CICATRIZAÇÃO.....	3
2.2 TABAGISMO E NICOTINA.....	6
2.3 NICOTINA E CICATRIZAÇÃO.....	7
<b>3 MATERIAL E MÉTODO</b> .....	10
3.2 AMBIENTE DE EXPERIMENTAÇÃO.....	10
3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	11
3.4 ETAPAS EXPERIMENTAIS.....	11
3.4.1 Administração de nicotina ou solução fisiológica pré-operatórias.....	11
3.4.2 Preparo e procedimento operatório.....	12
3.4.3 Anestesia.....	12
3.4.4 Preparo da pele e posicionamento na mesa operatória.....	13
3.4.5 Procedimento operatório.....	13
3.4.6 Pós-operatório.....	14
3.4.7 Eutanásia e aferições.....	15
3.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	19

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	19
<b>4 RESULTADOS</b> .....	20
4.1 AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS .....	20
4.2 AVALIAÇÃO DA PORCENTAGEM OCUPADA POR COLÁGENO DOS TIPOS I E III.....	24
4.3 ANÁLISE DA FORÇA DE TENSÃO TECIDUAL.....	26
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	28
5.1 SOBRE O MÉTODO.....	28
5.1.1 Escolha do animal de experimentação.....	28
5.1.2 Escolha do fio de sutura.....	28
5.1.3 Uso da nicotina.....	29
5.1.4 Tempo de aferição.....	30
5.1.5 Teste de tração .....	31
5.1.6 Avaliação microscópica.....	31
5.2 SOBRE OS RESULTADOS.....	32
5.2.1 Aferição: Aspectos microscópicos.....	32
5.2.1.1 Processo inflamatório agudo.....	32
5.2.1.2 Processo inflamatório crônico .....	33
5.2.1.3 Proliferação fibroblástica.....	33
5.2.1.4 Porcentagem da área de sutura ocupada por colágeno tipo I e III.....	33
5.2.2 Análise do teste de tração.....	34
5.3 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	35
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	36
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	37
<b>APÊNDICE</b> .....	41

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ADMINISTRAÇÃO DA NICOTINA NO DORSO DO ANIMAL.....	12
FIGURA 2 - EXPOSIÇÃO E ABERTURA DA BEXIGA DA BEXIGA (A e B)....	14
FIGURA 3 – AVALIAÇÃO DO NÚMERO DE NEUTRÓFILOS NO 4º DIA.....	16
FIGURA 4 - AVALIAÇÃO DO NÚMERO DE PLASMÓCITOS NO 4º DIA.....	17
FIGURA 5 - AVALIAÇÃO DO NÚMERO DE FIBROBLASTOS.....	18
FIGURA 6 - ANÁLISE DO COLÁGENO I e III ATRAVÉS DA TÉCNICA DE PICROSIRIUS-RED F3BA.....	25
FIGURA 7 - ESTUDO DA FORÇA DE TENSÃO (TESTE DE TRAÇÃO) (A e B ).....	27

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - CÉLULAS INFLAMATÓRIAS E FIBROBLASTOS, NOS GRUPOS DE ESTUDO - <b>4º DIA</b> .....	22
GRÁFICO 2 - CÉLULAS INFLAMATÓRIAS E FIBROBLASTOS, NOS GRUPOS DE ESTUDO - <b>7º DIA</b> .....	22
GRÁFICO 3 - COLÁGENO I E III, NOS GRUPOS DE ESTUDO.....	25
GRÁFICO 4 - TESTE TRAÇÃO, NOS GRUPOS DE ESTUDO.....	27



## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - ESTATÍSTICA DESCRITIVA E ANÁLISE COMPARATIVA DAS CÉLULAS INFLAMATÓRIAS E PROLIFERAÇÃO FIBROBLÁSTICA ENTRE OS GRUPOS DE ESTUDO.....	21
TABELA 2 - ESTATÍSTICA DESCRITIVA E ANÁLISE COMPARATIVA DAS CÉLULAS INFLAMATÓRIAS E PROLIFERAÇÃO FIBROBLÁSTICA INTRA-GRUPO.....	23
TABELA 3 - ESTATÍSTICA DESCRITIVA E ANÁLISE COMPARATIVA DO COLÁGENO ENTRE OS GRUPOS DE ESTUDO.....	24
TABELA 4 - ESTATÍSTICA DESCRITIVA DO TESTE DE TRAÇÃO NOS GRUPOS DE ESTUDO.....	26

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\mu\text{g}$  = micrograma

ng = nanograma

kgf = quilograma-força

## RESUMO

Devido ao pouco conhecimento do efeito da nicotina sobre a cicatrização de feridas em bexiga urinária, foi realizado um estudo a fim de observar a ação desta droga sobre células inflamatórias, deposição de colágeno I e III e sua provável interferência sobre a força tecidual em suturas vesicais de coelhos. Para tanto, foram utilizados 20 coelhos Nova Zelândia, divididos de maneira aleatória em dois grupos N e C, conforme o tratamento proposto. Cada grupo foi subdividido em dois subgrupos, de acordo com o intervalo de tempo utilizado para avaliação. No grupo N, composto de 10 animais, foi administrada nicotina na dose de 2 mg/kg de peso do coelho por via subcutânea, diluída em 1 ml de solução fisiológica a 0,9% em 1 aplicação diária; a droga foi administrada por 28 dias prévios à cirurgia, sendo mantida por quatro ou sete dias conforme o subgrupo do animal. No grupo C, também composto de 10 animais, foi administrada solução fisiológica a 0,9%, nas mesmas condições e intervalos de tempo do grupo da nicotina, sendo utilizado como controle para o experimento. Todos os animais foram submetidos à cistotomia com sutura contínua da parede vesical após 28 dias da administração de nicotina ou solução fisiológica. As aferições foram realizadas no 4º e 7º dia em cada grupo após cistectomia e eutanásia dos animais. Uma parte da bexiga era retirada e enviada para teste de tração para avaliar a força tecidual da sutura e um fragmento era enviado para exame histológico. A análise histológica era realizada através das técnicas de hematoxilina e eosina, com o intuito de avaliar alterações do processo inflamatório e proliferação de fibroblastos, e picrosirius-red F3BA, para identificar a porcentagem de deposição de colágeno tipo I e III. Os resultados permitiram concluir que houve uma diminuição do número de neutrófilos no 4º dia pós-operatório e aumento de plasmócitos no 7º dia após a cirurgia nos animais que receberam nicotina em relação ao grupo controle. Não ocorreu diferença estatística nas demais variáveis.

**Palavras-chave:** Bexiga; Colágeno; Nicotina; Suturas; Coelhos; Cicatrização de Feridas

## ABSTRACT

Due to limited knowledge of the nicotine effects on the urinary bladder wound healing, a study was performed on the bladders of rabbits in order to observe the action of this drug on inflammatory cells, deposition of collagen type I and III and its likely interference on tissue strength at vesical sutures in rabbits. Thus, 20 New Zealand rabbits were used, randomly divided into two groups N and C, according to the proposed treatment. Each group was subdivided into two subgroups, according to the time interval used in the evaluation. Group N, made up of 10 animals, received a nicotine dose of 2mg/kg by subcutaneous injection, diluted in 1 ml of 0.9% saline solution and administered once a day; the drug was given during a 28 day period prior to surgery and it was maintained for four or seven days according to the animal subgroup. In group C, made up of 10 animals, a saline solution at 0.9% was administered under the same conditions and time intervals as the nicotine group, being used as control for the experiment. All the animals underwent a cystotomy with continuous suture of the bladder wall after 28 days of nicotine or saline solution administration. Measurements were performed on the days four and seven in each group after the cystectomy and euthanasia of the animals. A fragment of the bladder was removed and sent for a tensile strength test to evaluate the tissue strength of the suture, and another fragment was sent for a histological examination. The histological analysis was performed using the hematoxylin and eosin techniques, with the objective of evaluating changes in the inflammatory process and the proliferation of fibroblasts, and picosirius-red F3BA, to identify the percentage deposition of collagen type I and III. The results allowed us to conclude that there was a decrease in the number of neutrophils on the day 4 after the surgery and an increase of plasmocytes on the day 7 after surgery in animals that received nicotine in relation to the control group. There were no statistical differences in the other variables.

**Key words:** Bladder; Collagen; Nicotine; Sutures; Rabbits; Wound Healing

## 1 INTRODUÇÃO

Atualmente o tabagismo é um dos principais problemas de saúde pública em todo o mundo, devido a sua associação com diversas doenças. Entre elas, de importância para urologia, destaca-se o câncer de bexiga, reconhecidamente associado ao hábito de fumar. Além disso, o fumo pode estar relacionado diretamente com o aumento da prevalência dos sintomas do trato urinário baixo (KOSKIMAKI et al., 1998).

Segundo REUS et al. (1984), existem aproximadamente cinco mil componentes no tabaco, dentre os mais tóxicos destaca-se a nicotina, substância alcalóide inodora e incolor que ao ser inalada ou injetada pode liberar catecolaminas e resultar em vasoconstrição com diminuição da perfusão tecidual.

Após uma lesão tecidual inicia-se o processo de restauração da integridade do tecido através de uma série de eventos celulares, fisiológicos e bioquímicos altamente dinâmicos e integrados. WITTE e BARBUL (1997), SINGER e CLARK (1999) dividiram didaticamente a cicatrização em três fases distintas, porém relacionadas: 1) fase inflamatória, 2) fase proliferativa e 3) fase de maturação. Cada uma destas fases desempenha papel importante na cicatrização, com destaque ao colágeno, principal proteína encontrada no tecido conjuntivo e responsável pela força mecânica tecidual (WITTE; BARBUL, 1997).

Estas fases da cicatrização foram descritas de forma extensa na cicatrização cutânea e também se aplicam na compreensão do reparo de outros tecidos (MAST, 1997). Apesar disto, cada órgão sofre reparo tissular com algumas variações e a bexiga pode apresentar características diferentes do trato gastro-intestinal, por exemplo, quanto à taxa de deposição de colágeno e recuperação da força mecânica (EDLICH; RODEHEAVER; THACKER, 1996).

Dentre os diversos fatores que podem afetar a cicatrização de feridas, a nicotina aparece como um dos fatores que podem interferir negativamente no processo cicatricial, STADELMANN et al. (1998) citam a vasoconstrição decorrente do emprego da nicotina como uma das causas de seu efeito deletério sobre a cicatrização.

Apesar do efeito da nicotina ser alvo de trabalhos científicos com relação à cicatrização em várias especialidades, como dermatologia, odontologia e cirurgia geral (KNUUTINEN et al., 2002; MARTINEZ, SILVÉRIO; ROSSA JR, 2002; MEDEIROS et al., 2003a) ainda não há estudos pertinentes ao trato urinário, inclusive bexiga. Este fato, aliado ao grande número de intervenções cirúrgicas envolvendo suturas e anastomoses vesicais, despertou o interesse em se idealizar esta pesquisa, com a finalidade de se avaliar as eventuais interferências da nicotina na cicatrização da parede vesical.

## 1.1 OBJETIVO

O objetivo do presente estudo é avaliar a influência da nicotina no processo cicatricial de suturas vesicais em coelhos submetidos à cistotomia, em relação aos seguintes aspectos:

1. Alterações histológicas
2. Quantidade de colágeno tipo I (maduro) e tipo III (imaturo)
3. Análise da força de tensão tecidual.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 CICATRIZAÇÃO

A cicatrização é um fenômeno relacionado a vários eventos, ocorrendo de modo dinâmico, complexo e que ao final resulta na restauração da barreira epitelial. O processo de cicatrização envolve mediadores solúveis, células sanguíneas e do parênquima, além da matriz extracelular. Didaticamente, a cicatrização pode ser dividida em três fases distintas: inflamação, proliferação e maturação ou remodelagem, as quais se sobrepõem em tempo e não devem ser vistas como uma série simples de passos seqüenciais (SINGER; CLARK, 1999).

#### Inflamação

Ocorre do momento da lesão até o 4º e 5º dia. Segundo WITTE e BARBUL (1997), é caracterizada pelo aumento da permeabilidade vascular, quimiotaxia de células da circulação, liberação de citocinas e fatores de crescimento, e ativação das células de migração. Após a exposição de colágeno subendotelial às plaquetas, ocorre agregação plaquetária e ativação da parte intrínseca da cascata de coagulação. O contato entre colágeno e plaquetas, tanto quanto a presença de trombina, fibronectina e seus fragmentos, resultam na liberação de citocinas e fatores de crescimento. A formação de coágulos serve de suporte para a infiltração de células como neutrófilos, monócitos, fibroblastos e células endoteliais.

Segundo SINGER e CLARK (1999), os neutrófilos são as primeiras células a migrar para o sítio da lesão e servem para limpar a área da ferida de partículas estranhas e bactérias. Em seguida, os monócitos infiltram o sítio da ferida em resposta a fatores quimiotáticos específicos (fragmentos de proteínas da matriz extracelular, fator de crescimento transformador- $\beta$  e proteína 1 quimiotática de monócitos), transformam-se em macrófagos ativados que liberam fatores de crescimento como o fator de crescimento derivado de plaquetas e fator de crescimento endotelial vascular, os quais iniciam a formação do tecido de granulação. Os fatores de crescimento derivados de

monócitos e macrófagos são certamente necessários para o início e propagação da formação de novos tecidos em feridas, de modo que os macrófagos têm papel fundamental na transição entre inflamação e reparo.

### Proliferação

De acordo com WHELAN, STEWART e SCHWARTZ (2005), os eventos da proliferação iniciam-se em torno do 4º dia e persistem até aproximadamente o 14º dia após a injúria. Caracteriza-se por 3 processos: angiogênese, proliferação fibroblástica e epitelização. Fibroblastos e células endoteliais são as células primárias proliferando nesta fase. Os fibroblastos migram dos tecidos adjacentes para o local da ferida e as células endoteliais proliferam das vênulas intactas próximas do local da lesão e formam novos capilares pelo processo de angiogênese.

Aproximadamente 2 dias após a lesão, queratinócitos começam a proliferar na borda da ferida. Proteínas da membrana basal são formadas e se deslocam da borda da ferida para o centro e servem como matriz provisória para guiar a proliferação de queratinócitos. Quando a ferida é coberta, os queratinócitos retornam ao seu fenótipo normal, aderindo à derme subjacente e membrana basal, permitindo à ferida cicatrizar em sua forma original.

### Maturação

EDLICH, RODEHEAVER e THACKER (1996) deixaram claro que na fase de maturação, a deposição de colágeno na ferida é o principal fator. A qualidade, o grau de velocidade e a quantidade total de depósito na matriz determinam a força da cicatriz. O conhecimento da estrutura molecular e organização do colágeno é essencial para a compreensão das propriedades físicas e anatômicas de cicatrizes da derme. Há quatro níveis distintos de organização molecular do colágeno da derme. Primeiro, diz respeito à seqüência precisa do arranjo de aminoácidos. A glicina corresponde a um terço dos aminoácidos na molécula e o restante, prolina e hidroxiprolina. Segundo, a molécula de colágeno consiste de três cadeias de peptídeos de comprimento aproximadamente iguais, cada um contendo cerca de 1000 aminoácidos.



Terceiro, refere-se ao arranjo espacial das três cadeias na molécula que tem a configuração de hélice, chamada tropocolágeno. O quarto nível é a maneira pela qual o tropocolágeno está agregado em uma unidade biológica estável de força mecânica, já que suas moléculas estão orientadas na mesma direção e unidas por ligações covalentes intra e intermoleculares criando um forte polímero, a fibra colágena.

WITTE e BARBULL (1997) citam a existência de mais de uma dezena de tipos específicos de colágenos, sendo que o colágeno tipo I (sintetizados pelos fibroblastos) e o colágeno tipo III são predominantes na derme intacta, compondo em 80 a 90 % e 10 a 20 % da proteína colágena, respectivamente. Segundo CRONIN, JACKSON e DUNPHY (1968), o colágeno tipo III é depositado precocemente no tecido de granulação e caracteriza um colágeno imaturo; mais tarde com a remodelação surge o tipo I, de características maduras. BASKIN et al. (1993), através de estudos *in vitro*, demonstraram que as células musculares lisas da bexiga sintetizam predominantemente colágenos tipo I e III, e fibronectina.

De acordo com WHELAN, STEWART e SCHWARTZ (2005), após 1 semana de cicatrização ocorre contração da ferida com a aproximação dos seus bordos. Neste período ocorre uma mudança no fenótipo dos fibroblastos que passam a expressar grande quantidade de actino-microfilamentos ao longo de suas membranas citoplasmáticas e conexões extracelulares. GABBIANI, CHAPONNIEL e HUTTNER (1978) evidenciaram em estudo experimental em ratos e coelhos que durante a cicatrização da ferida de pele, células epidérmicas e fibroblastos de tecido de granulação (miofibroblastos) desenvolvem um aparato citoplasmático extenso. Paralelamente, a proporção da superfície de células epidérmicas ocupadas por junções GAP aumenta quando comparada à pele normal, e junções GAP recentemente formadas aparecem entre os miofibroblastos, sugerindo que a migração de células epiteliais e a contração do tecido de granulação constituem um fenômeno sincronizado.

HASTINGS et al. (1975) demonstraram que a bexiga de cães tem um grande potencial de reparo, com uma velocidade de síntese de colágeno atingindo um pico no quinto dia, sendo que no décimo quarto dia a ferida vesical apresenta 100% da força do tecido normal. O exame das feridas de

cistotomia mostrou formação de cicatriz típica sem evidência de regeneração de músculo liso na ferida, o que leva a crer que a cicatrização da parede vesical ocorreu por síntese, deposição e remodelagem do colágeno para formar a cicatriz. De maneira diversa, FAGGIAN et al. (1998) documentaram a formação de tecido de músculo liso *de novo* via incorporação de células intersticiais em bandas de músculo liso crescentes após a indução de uma lesão localizada sobre a parede vesical de coelhos. Ademais, WU et al. (1999) determinaram a origem de células musculares lisas em enxertos acelulares vesicais que foram recobertos através da desdiferenciação, migração e rediferenciação de células musculares maduras, considerando improvável que fibroblastos do tecido periférico sejam induzidos pelo epitélio e matriz a formar músculo liso.

## 2.2 TABAGISMO E NICOTINA

De acordo com READ (1984), o uso compulsivo de tabaco é observado em todas as culturas nas quais a sua utilização foi introduzida. Durante a Segunda Guerra Mundial, milhões de soldados americanos ganharam cigarros, o que levou a um grande aumento do consumo nos Estados Unidos, expondo estes veteranos a uma das drogas que mais produz dependência, morbidade e mortalidade.

O hábito de fumar é uma causa bem conhecida de diversas doenças e várias formas de câncer, inclusive câncer de bexiga. De acordo com HIJJAR e COSTA E SILVA (1991), estima-se que no Brasil o tabaco esteja relacionado à morte de 80 a 100 mil pessoas anualmente e que 2,5 milhões de pessoas morrem por ano no mundo em consequência do hábito de fumar .

Segundo estudos de REUS et al. (1984) a fumaça do cigarro é uma mistura complexa de muitas substâncias tóxicas, contendo mais de 5 mil componentes, dos quais os mais tóxicos são o monóxido de carbono, óxido nítrico, amoníaco e nicotina.

A dificuldade em parar de fumar é atribuída em grande parte às propriedades aditivas da nicotina, que nas concentrações da fumaça do cigarro é uma potente droga psicoativa (KUMAR; LADER, 1981). BENOWITZ (1988)

afirma que a nicotina é uma amina terciária composta de um anel de piridina e pirrolidina. O tabaco contém nicotina-S levorotatória, mas a fumaça do cigarro também contém o isômero R em quantidades de até 10 % do total de nicotina presente, provavelmente por racemização durante o processo de combustão. A nicotina é uma base fraca com um pKa de 8,0 e num pH fisiológico cerca de 31% está não-ionizada, podendo facilmente cruzar membranas celulares. O pH da fumaça do cigarro normalmente é ácido, o que dificulta a absorção da nicotina na boca, porém ao ser inalada alcança as vias aéreas inferiores aonde é facilmente absorvida, independente do pH. Após isso, a nicotina entra rapidamente no cérebro e logo seus níveis declinam, à medida que é distribuída aos outros tecidos corporais. A nicotina é metabolizada primariamente no fígado, e em pequena quantidade pelo pulmão. O nível de excreção renal depende do pH urinário e fluxo da urina, respondendo por 2 a 35% da eliminação total. Os principais metabólitos da nicotina são a cotidina e o óxido-N-nicotínico, além da hidroxicotidina que é abundante na urina e serve como indicador de exposição à nicotina. A nicotina tem efeito sobre vários órgãos e sistemas, entre eles o sistema cardiovascular, levando ao aumento do fluxo cardíaco e vasoconstrição periférica, em decorrência da elevação dos níveis de catecolaminas circulantes, por estímulo direto da nicotina nas supra-renais e gânglios simpáticos periféricos.

### 2.3 NICOTINA E CICATRIZAÇÃO

MOSELY e FINSETH foram os primeiros a descrever em 1977 os efeitos nocivos do tabagismo sobre a cicatrização de feridas, observando um retardo na cicatrização de uma ferida de mão em um fumante com aterosclerose. A partir de então, começou a se estudar mais profundamente a relação entre tabaco e cicatrização.

Em 1978, MOSELY, FINSETH e GOODY, estudaram 8 coelhos submetidos a uma lesão cutânea na orelha, os quais receberam nicotina intraperitoneal na dose de 2 mg/kg, 2 vezes ao dia por 5 dias previamente à cirurgia e por mais 21 dias no período de observação. Os resultados foram comparados com o grupo controle de 8 animais. Realizou-se aferição

macroscópica da área cruenta a cada dois dias, havendo retardo na cicatrização do 6º ao 10º dia. Entretanto, a taxa de cicatrização foi a mesma a partir desta data.

JONSSON et al. (1991) estudaram feridas subcutâneas em 33 pacientes cirúrgicos no pós-operatório, medindo a tensão de oxigênio e deposição de colágeno. A deposição de colágeno foi direta e significativamente proporcional à tensão de oxigênio e às medidas de perfusão. JENSEN et al. (1991) demonstraram em 8 voluntários que a tensão de oxigênio no subcutâneo cai rapidamente em resposta ao fumo, permanecendo baixa por 30 a 50 minutos, paralelamente à estabelecida farmacocinética da nicotina. Isto sugere que a vasoconstrição causada pela nicotina, através de seus efeitos adrenérgicos, pode contribuir com a diminuição da tensão de oxigênio subcutânea, o que poderia afetar a cicatrização de feridas.

SILVERSTEIN (1992) enfatiza que a nicotina exerce vários efeitos específicos que podem afetar a cicatrização, levando à diminuição da proliferação de hemácias, fibroblastos e macrófagos. Além disso, ocorre aumento da adesividade plaquetária, que causa micro-coágulos e diminui a micro-perfusão.

Em estudo experimental em anastomoses do intestino delgado de ratos, SKINOVSKY (2000) observou nos animais em que foi administrada nicotina na dose de 2 mg/kg em 2 aplicações diárias por 28 dias, menor proliferação de fibroblastos no 7º dia pós-operatório e menor área ocupada por colágeno imaturo no 28º dia pós-operatório em relação ao grupo controle.

CAMPOS et al. (2001) estudaram a ação da nicotina sobre retalhos cutâneos em ratos, sendo que a droga foi administrada na dose de 2 mg/kg, 2 vezes ao dia durante 4 semanas. Após isso, os animais foram submetidos a um retalho isquêmico de pele e, em seguida, um grupo recebeu a nicotina por 1 semana e outro utilizou soro fisiológico durante igual período. Este estudo teve um terceiro grupo que recebeu soro fisiológico nas mesmas condições. Observou-se um aumento na área de necrose nos retalhos cutâneos nos grupos utilizando nicotina e piora do quadro com a continuidade do seu uso no pós-operatório.

MARTINEZ, SILVÉRIO e ROSSA JÚNIOR (2002) observaram em culturas celulares de uma linhagem contínua de fibroblastos, expostas a

diferentes quantidades de nicotina (0=controle, 10µg, 100 µg, 0,5 mg e 1 mg) e tempos de condicionamento (1 e 24 h), que a nicotina pode alterar, *in vitro*, a viabilidade e a morfologia de fibroblastos de forma proporcional à dose e ao tempo de exposição.

MEDEIROS et al. (2003a) estudaram 16 ratos submetidos à laparotomia, oito animais receberam nicotina na dose de 5 mg/kg/dia em dias alternados através de disco de nicotina (Nicotinell TTS ®) implantado no espaço subcutâneo do dorso dos animais, e oito animais no grupo controle que utilizaram discos de celulose. Foi avaliada a tensão do oxigênio tecidual em líquido seroso colhido no subcutâneo por um tubo de silicone, a resistência à tração da camada músculo-aponeurótica e a análise quantitativa da densidade dos elementos da reação inflamatória, fibroblastos, neutrófilos, neovasos, tecido de granulação e colágeno. Após a avaliação destes dados, observou-se uma diminuição de todos os parâmetros no grupo utilizando nicotina.

WONG et al. (2004) avaliaram experimentalmente o efeito do equivalente da fumaça de cigarro inalada pelo fumante passivo em culturas de fibroblastos embrionários e observaram alterações cito-esqueléticas nos fibroblastos que podem levar à diminuição da migração destas células. Além disso, neste trabalho ocorreram alterações da endomembrana com vacuolização do citosol, fragmentação do retículo endoplasmático, diminuição do complexo de Golgi. O mesmo achado foi observado com o uso de nicotina apenas, fazendo crer que esse efeito seja decorrente da ação da nicotina, encontrada em níveis elevados na fumaça inalada por fumantes passivos.

### 3 MATERIAL E MÉTODO

Aplicaram-se nesse trabalho as Normas para Apresentação de Documentos Científicos da Universidade Federal do Paraná (2000) e utilizou-se a *Nomina Anatomica Veterinaria* (1975). O trabalho foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da Sociedade Evangélica Beneficente de Curitiba, protocolado sob número 4803/05. Os procedimentos experimentais foram realizados no Centro de Pesquisas Cirúrgicas do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade do Paraná, no Instituto de Pesquisas Médicas - IPEM e no Instituto Tecnológico do Laboratório Central de Pesquisa e Desenvolvimento do Paraná – LACTEC e seguiram as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação em Animais (COBEA).

#### 3.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Para a realização deste experimento utilizaram-se 20 coelhos machos (*Oryctolagus cuniculus*), raça Nova Zelândia branco, pesando entre 2600 a 3750 g, com idade variando de 90 a 110 dias e procedentes do Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR).

#### 3.2 AMBIENTE DE EXPERIMENTAÇÃO

Os animais foram alojados isoladamente, em gaiolas de polipropileno, de dimensões padronizadas, sendo mantidos em ciclo de 12 horas de claridade por 12 horas de escuridão e na temperatura ambiente constante de 24 graus Celsius. Durante todo o experimento os coelhos foram alimentados com ração própria para a espécie (Supra, Campinas, SP) e com livre acesso à água.

### 3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os coelhos foram divididos aleatoriamente em dois grupos: Grupo N, com 10 animais, submetidos à aplicação de nicotina e Grupo C, com 10 animais, para submeterem-se à aplicação de solução fisiológica a 0,9%; cada grupo foi dividido em dois subgrupos, contendo 5 coelhos cada. Os subgrupos foram denominados, segundo o tempo de avaliação pós-operatória (4º e 7º dia pós-operatório), em N4, N7, C4 e C7.

### 3.4 ETAPAS EXPERIMENTAIS

#### 3.4.1 Administração de nicotina ou solução fisiológica pré-operatórias

Nos animais do grupo N foi administrada nicotina (Nicotine di-tartrate salt, Sigma, Saint Louis, Missouri, USA), durante um período de 28 dias prévios ao procedimento cirúrgico, por via subcutânea (figura 1) e na dosagem de 2 mg por quilo de peso, uma vez ao dia, diluída em solução fisiológica a 0,9% para completar 1 ml e ajustada para pH 7,4.

No grupo C, os animais foram submetidos à aplicação de solução fisiológica a 0,9%, no volume de 1 ml, 1 vez ao dia, por via subcutânea e sendo ajustada para pH 7,4, por um período igual ao grupo da nicotina. A administração das soluções foi realizada na região dorsal do animal, através de agulha 13 x 4,5 e os coelhos foram pesados semanalmente e a dosagem de nicotina ajustada, quando necessário.

FIGURA 1 – ADMINISTRAÇÃO DA NICOTINA NO DORSO DO ANIMAL



#### 3.4.2 Preparo e procedimento operatório

No 28º dia de aplicação da solução os animais foram submetidos à retirada da ração pelas 12 horas prévias à operação, mantendo-se água com livre acesso. O procedimento ocorreu no dia seguinte.

#### 3.4.3 Anestesia

Os coelhos receberam indução anestésica através da associação de Xilasina 10 mg por quilo de peso e Quetamina 25 mg por quilo de peso, administradas por via intra-muscular. Quando os animais não apresentavam reação ao manuseio foram considerados anestesiados. A dose anestésica aplicada foi considerada adequada através da observação da amplitude e frequência dos movimentos respiratórios de cada animal. Após a indução anestésica foram anotados na ficha de protocolo o grupo e subgrupo de cada animal, assim como a data da operação.



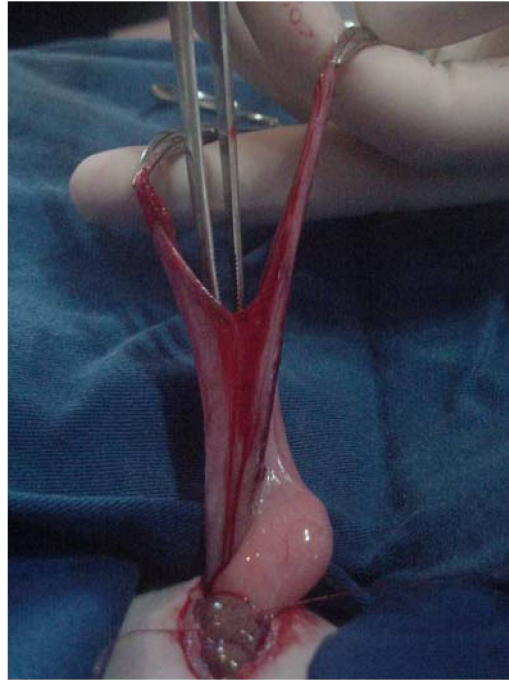
#### 3.4.4 Preparo da pele e posicionamento na mesa operatória

Procedeu-se à tricotomia da parede abdominal ventral. Em seguida, à fixação do animal com fita adesiva, na mesa operatória, em posição de decúbito dorsal com os membros em extensão. Realizou-se então a anti-sepsia abdominal com solução de polivinilpirrolidona-iodo a 10 % e a delimitação do abdome com campos cirúrgicos esterilizados.

#### 3.4.5 Procedimento operatório

Utilizando técnica asséptica durante todo o procedimento, realizou-se uma incisão mediana de 5 cm de extensão, com bisturi de lâmina 15, iniciando-se logo acima do púbis e dirigindo-se cranialmente, interessando todos os planos da parede abdominal ventral, obtendo desta forma o acesso à cavidade peritoneal. Após a identificação da bexiga, esta era mobilizada externamente, aspirado o seu conteúdo com seringa de 10 ml e agulha 30 x 0,80 e realizado incisão sagital da sua parede na região da cúpula (figura 2), seguido por fechamento da cistotomia através de sutura contínua da mesma com fio categut cromado 5-0 (agulha 1/2, 2cm). Após isso, a bexiga era recolocada na cavidade abdominal e a parede abdominal era fechada em 2 planos, através de sutura contínua do plano peritônio-músculo-aponeurótico e da pele, empregando-se para tanto o fio nylon 2-0.

FIGURA 2 – EXPOSIÇÃO E ABERTURA DA BEXIGA (A e B)

**A** - bexiga exposta**B** - abertura da bexiga

### 3.4.6 Pós-operatório

Os animais foram transferidos para suas gaiolas para acompanhamento pós-operatório. Os coelhos receberam livre acesso à água e ração após o procedimento operatório.

A administração de nicotina ou solução fisiológica manteve-se por todos os dias até completar quatro ou sete dias conforme o subgrupo do animal.

Nas avaliações diárias observaram-se as condições gerais e aspecto da ferida operatória, sangramento, infecção, deiscência da sutura da pele e/ou evisceração.

### 3.4.7 Eutanásia e aferições

Ao completar os dias de pós-operatório de cada grupo era realizada a eutanásia dos animais de cada subgrupo. Após indução anestésica, colocação do animal na mesa cirúrgica e anti-sepsia abdominal conforme descrito anteriormente, obtinha-se acesso à cavidade abdominal através da mesma incisão anterior. Em seguida, eram desfeitas eventuais aderências à bexiga e procedia-se à cistectomia após secção da sua base. A bexiga era depositada em um frasco contendo solução fisiológica a 0,9% e então o coelho era submetido à eutanásia através da administração intra-cardíaca de fentanil na dose de 10 ml.

A bexiga era então aberta, de maneira que a sutura pudesse permanecer na posição central e transversal, para submeter-se ao teste de tração. Após isso, retirou-se um fragmento de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> para análise histológica, com área da sutura e adjacências, que era colocado em formalina a 10 % e fixada a um fragmento de cortiça para evitar retração da amostra.

- Análise histológica:

A amostra encaminhada para análise histológica foi submetida à desidratação, diafanização e emblocamento em parafina histológica. Após microtomia a 4 micrômetros de espessura, os cortes histológicos foram corados pela técnica de hematoxilina e eosina e também submetidos à coloração de picrosirius – red F3BA.

As secções histológicas foram examinadas em microscópio óptico marca Olympus, modelo BH-2, com lentes apocromáticas (*Olympus, Tokio, Japan*).

Os parâmetros histológicos analisados foram: intensidade de infiltrado inflamatório agudo, intensidade de inflamatório crônico, intensidade da proliferação fibroblástica e deposição de colágeno.

Os dados obtidos foram observados por meio da contagem do número de células presentes no campo microscópico, utilizando-se para isto o *software*

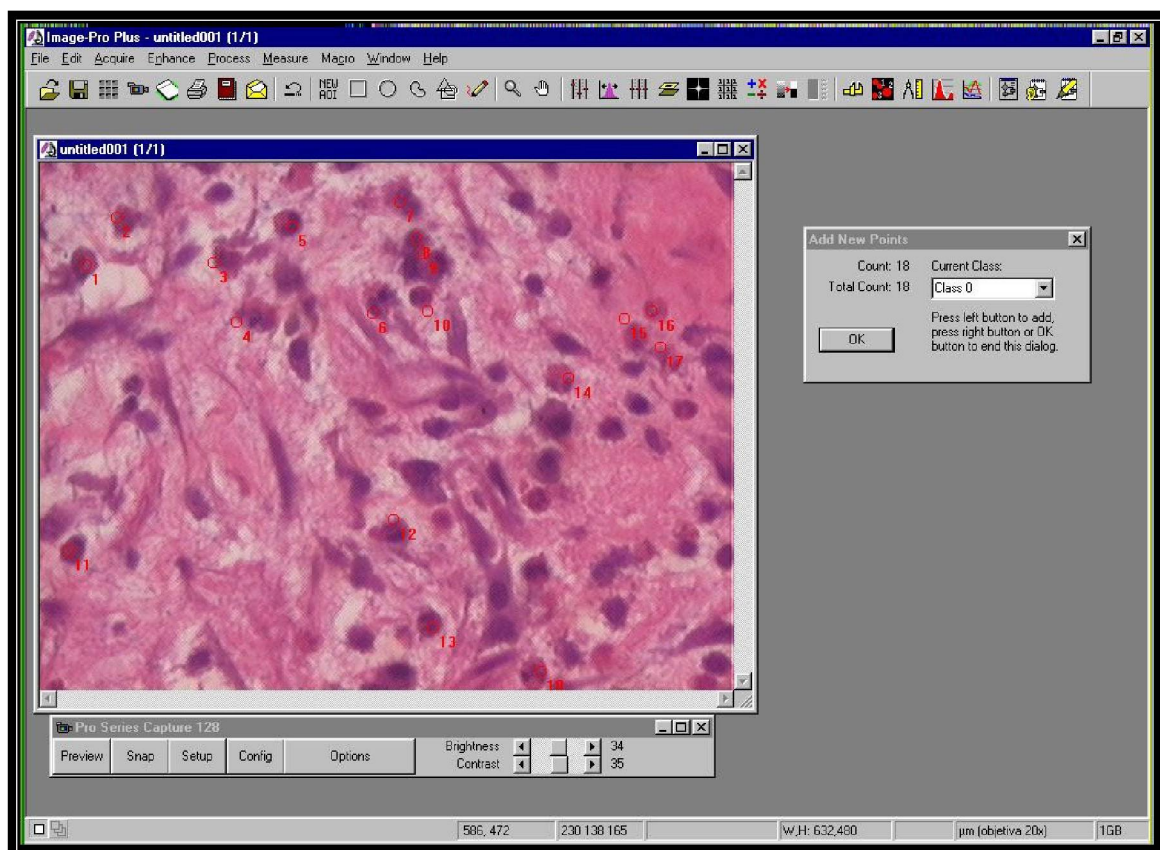
Image Pro Plus em computador linha Pentium, e em seguida tabulados para análise.

Descrição dos parâmetros histológicos:

- Intensidade do infiltrado inflamatório agudo.

Foi analisado o número total de polimorfonucleares neutrófilos na área de sutura, avaliados em 5 campos diferentes, e realizado o cálculo da média de células por campo microscópico (figura 3).

FIGURA 3 – AVALIAÇÃO DO NÚMERO DE NEUTRÓFILOS NO 4º DIA

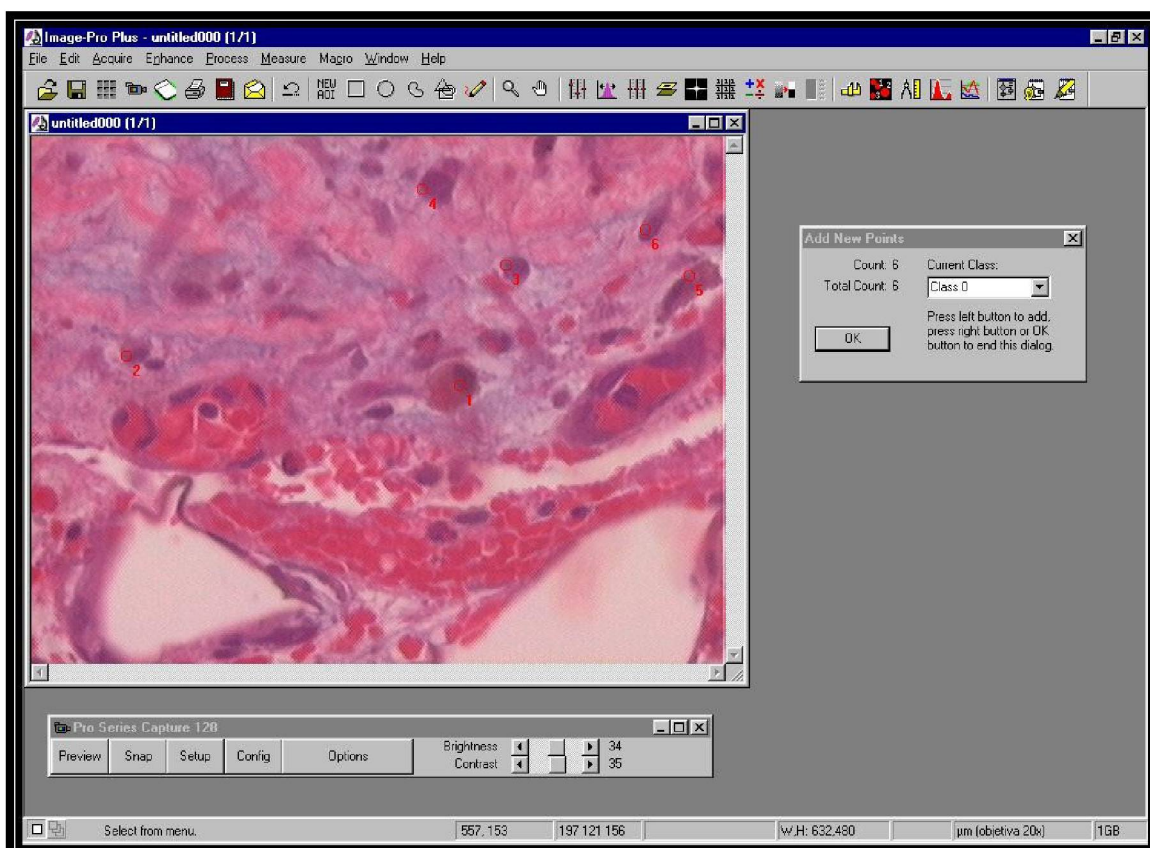


nota: corte histológico com contagem do número de neutrófilos realizada na tela do computador.

- Intensidade do infiltrado inflamatório crônico.

Foi analisado o número total de linfócitos e plasmócitos presentes na área de sutura, avaliados em 5 campos diferentes, e realizado o cálculo da média de células por campo microscópico (figura 4).

FIGURA 4 – AVALIAÇÃO DO NÚMERO DE PLASMÓCITOS NO 4º DIA

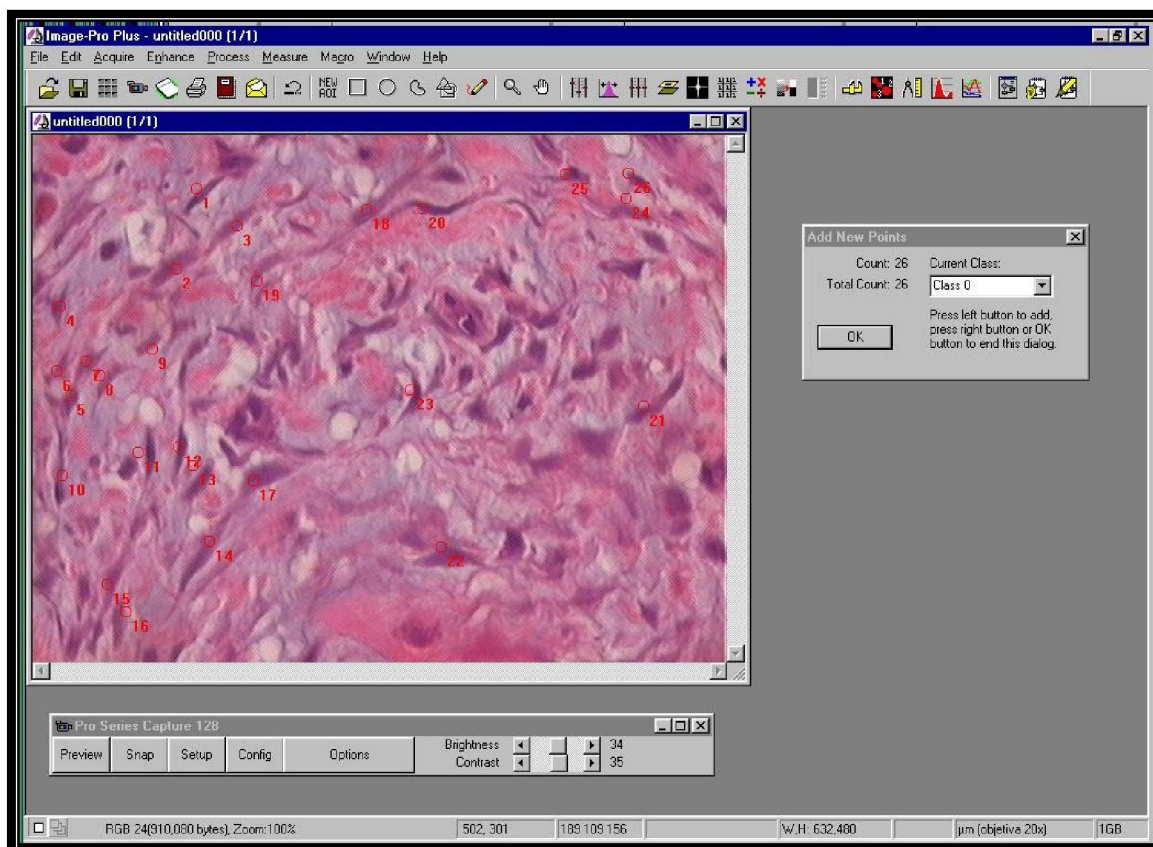


nota: corte histológico demonstrando contagem do número de plasmócitos realizada na tela do computador.

- Intensidade da proliferação fibroblástica.

Foi analisado o número total de fibroblastos proliferados na linha de sutura, avaliados em 5 campos diferentes, e realizado o cálculo da média de células por campo microscópico (figura 5).

FIGURA 5 – AVALIAÇÃO DO NÚMERO DE FIBROBLASTOS



nota: corte histológico demonstrando contagem de fibroblastos realizada na tela do computador.

- Deposição de colágeno.

Para identificação do colágeno maduro e imaturo os cortes histológicos foram submetidos à coloração de picrossirius-red F3BA por técnica de microscopia com luz polarizada e análise morfométrica computadorizada. Nesta técnica analisaram-se os cortes histológicos através de microscópio óptico marca Olympus, modelo BX50 (Olympus, Tokyo, Japan), em aumento de 400 vezes, utilizando-se luz polarizada. As imagens foram captadas por uma câmera Sony CCD 101 (Sony, Tokyo, Japan), transmitidas a um monitor colorido Triniton Sony, congeladas e digitalizadas através de placas Oculus TCX. Finalmente foi realizada a análise das imagens através do aplicativo Optimas 6.0 para Windows em computador da linha Pentium. A calibração do sistema foi baseada na densidade óptica dos pontos de resolução (*pixels*) que

formam as imagens, selecionando-se o valor limite de melhor resolução. No sistema RGB (*red, green, blue*) foram considerados os valores para preto (fundo), para tons de vermelho (colágeno tipo I) e para tons de verde (colágeno tipo III). Nos cortes histológicos analisados determinou-se o campo microscópico sobre a linha de anastomose, em 5 campos distintos, obtendo-se então as médias aritméticas. Calculou-se a percentagem da área ocupada pelas fibras que continham colágenos dos tipos I e III.

#### - Teste de Tração:

O segmento vesical retirado para o teste de tração media aproximadamente 15 mm de largura e 5 mm de espessura, foi mantido em imersão em solução fisiológica a 0,9 % e logo em seguida submetido à análise da força de tensão tecidual máxima antecedendo a ruptura, expressa em kgf, através de uma máquina de tração computadorizada, marca Instron, modelo 4467, com garras de pressão pneumáticas, protegidas com papel filtro e capacidade para 3 toneladas. Para este estudo foi utilizada uma célula de carga para 10 kg, com sensibilidade de 50 g, tracionada na velocidade de 100 mm por min.

### 3.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídas do presente estudo as amostras nas quais não foi possível a análise de todas as variáveis previamente determinadas.

### 3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Recorreu-se à análise descritiva dos dados através de tabelas e gráficos. Para a comprovação dos objetivos levantados neste trabalho foram utilizados os testes paramétrico “t de Student”, para amostras independentes e pareado e os não paramétricos “Mann-Whitney” e “Wilcoxon (dados pareados)” através do *software* “Primer of Biostatistics”. O nível de significância (probabilidade de significância) adotado foi menor que 5 % ( $p < 0,05$ ).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS

Na comparação entre os grupos, com relação às células inflamatórias e proliferação de fibroblastos, não foi observado diferença significativa em nenhum dos momentos analisados. No entanto, ressalta-se que no 4º dia o número de neutrófilos foi menor no grupo da Nicotina ( $p=0,079$ ) e no 7º dia o número de plasmócitos foi maior no grupo da Nicotina ( $p=0,053$ ) (probabilidades limítrofes que indicam tendência) (tabela1) (gráficos 1 e 2).

Em relação à análise intra-grupo (mesmo grupo em momentos diferentes), quanto à avaliação das células inflamatórias e proliferação fibroblástica, foi observado diferença significativa apenas no grupo do Soro Fisiológico, para o número de neutrófilos que foi menor no 7º dia ( $p=0,045$ ) (tabela 2).



TABELA 1 – ESTATÍSTICA DESCRITIVA E ANÁLISE COMPARATIVA DAS CÉLULAS INFLAMATÓRIAS E PROLIFERAÇÃO FIBROBLÁSTICA ENTRE OS GRUPOS DE ESTUDO

DADOS	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIANA	VALOR DE p <sup>(1)</sup>
<b>4º DIA</b>						
• Linfócitos	1,0	<sup>(3)</sup> 0,5	0,4	2,0	0,9	0,583
• Soro Fisiológico	1,1	<sup>(3)</sup> 0,6	0,6	2,0	0,8	
• Nicotina	0,9	<sup>(3)</sup> 0,5	0,4	1,6	1,0	
• Plasmócitos	3,7	<sup>(3)</sup> 1,2	2,2	5,8	3,2	0,375
• Soro Fisiológico	3,4	0,9	2,2	4,6	-	
• Nicotina	4,1	<sup>(3)</sup> 1,4	3,0	5,8	3,2	
• Neutrófilos	2,1	<sup>(3)</sup> 0,8	0,4	3,2	2,2	0,079
• Soro Fisiológico	2,5	0,6	1,8	3,2	-	
• Nicotina	1,6	<sup>(3)</sup> 0,8	0,4	2,2	2,0	
• Fibroblastos	8,0	<sup>(3)</sup> 2,8	4,4	13,4	7,4	0,491
• Soro Fisiológico	8,7	<sup>(3)</sup> 2,9	6,0	13,4	7,8	
• Nicotina	7,4	<sup>(3)</sup> 2,8	4,4	10,8	6,8	
<b>7º DIA</b>						
• Linfócitos	1,5	<sup>(3)</sup> 0,7	0,8	3,0	1,2	0,515
• Soro Fisiológico	1,3	<sup>(3)</sup> 0,4	0,8	2,0	1,2	
• Nicotina	1,6	<sup>(3)</sup> 0,9	1,0	3,0	1,0	
• Plasmócitos	4,2	0,9	2,8	6,2	-	<sup>(2)</sup> 0,053
• Soro Fisiológico	3,6	0,6	2,8	4,2	-	
• Nicotina	4,7	0,9	4,0	6,2	-	
• Neutrófilos	2,2	<sup>(3)</sup> 2,0	0,2	7,0	1,3	0,115
• Soro Fisiológico	1,2	<sup>(3)</sup> 0,8	0,2	2,4	1,2	
• Nicotina	3,2	<sup>(3)</sup> 2,4	1,0	7,0	3,4	
• Fibroblastos	7,9	2,1	4,8	11,6	-	0,187
• Soro Fisiológico	8,8	0,7	8,0	9,8	-	
• Nicotina	7,0	<sup>(3)</sup> 2,7	4,8	11,6	6,2	

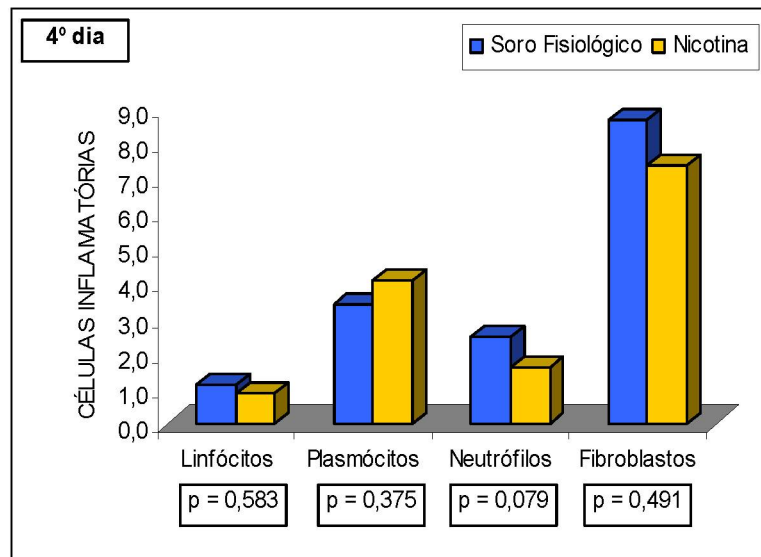
NOTA: O número de animais em cada grupo é de cinco.

(1) "Mann-Whitney".

(2) "t de Student".

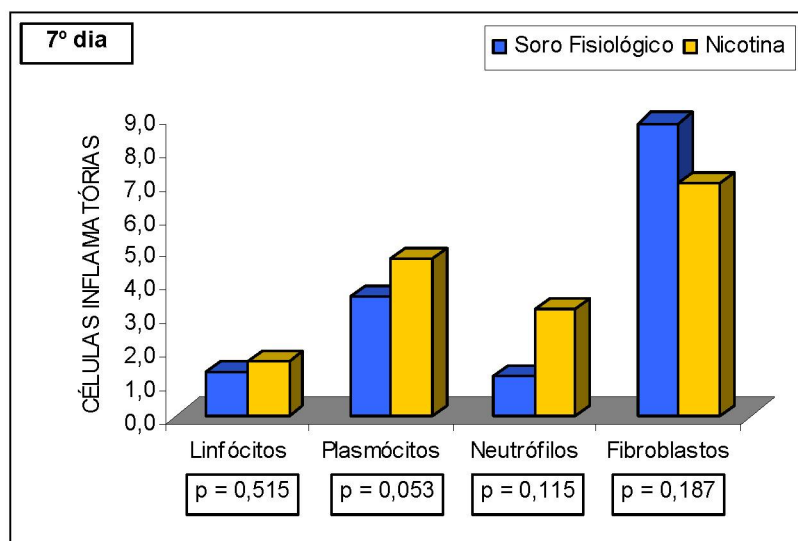
(3) Desvio padrão muito elevado, recomenda-se utilizar a mediana.

GRÁFICO 1- CÉLULAS INFLAMATÓRIAS E FIBROBLASTOS, NOS GRUPOS DE ESTUDO - 4º DIA



FONTE: Tabela 1

GRÁFICO 2 - CÉLULAS INFLAMATÓRIAS E FIBROBLASTOS, NOS GRUPOS DE ESTUDO - 7º DIA



FONTE: Tabela 1

TABELA 2 – ESTATÍSTICA DESCRITIVA E ANÁLISE COMPARATIVA DAS CÉLULAS INFLAMATÓRIAS E PROLIFERAÇÃO FIBROBLÁSTICA INTRA-GRUPO

DADOS	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIANA	VALOR DE p <sup>(1)</sup>
<b>SORO FISIOLÓGICO</b>						
• Linfócitos						0,508
• 4º Dia	1,1	<sup>(3)</sup> 0,6	0,6	2,0	0,8	
• 7º Dia	1,3	<sup>(3)</sup> 0,4	0,8	2,0	1,2	
• Plasmócitos						<sup>(2)</sup> 0,717
• 4º Dia	3,4	0,9	2,2	4,6	-	
• 7º Dia	3,6	0,6	2,8	4,2	-	
• Neutrófilos						0,045
• 4º Dia	2,5	0,6	1,8	3,2	-	
• 7º Dia	1,2	<sup>(3)</sup> 0,8	0,2	2,4	1,2	
• Fibroblastos						0,955
• 4º Dia	8,7	<sup>(3)</sup> 2,9	6,0	13,4	7,8	
• 7º Dia	8,8	0,7	8,0	9,8	-	
<b>NICOTINA</b>						
• Linfócitos						0,235
• 4º Dia	0,9	<sup>(3)</sup> 0,5	0,4	1,6	1,0	
• 7º Dia	1,6	<sup>(3)</sup> 0,9	1,0	3,0	1,0	
• Plasmócitos						0,346
• 4º Dia	4,1	<sup>(3)</sup> 1,4	3,0	5,8	3,2	
• 7º Dia	4,7	0,9	4,0	6,2	-	
• Neutrófilos						0,291
• 4º Dia	1,6	<sup>(3)</sup> 0,8	0,4	2,2	2,0	
• 7º Dia	3,2	<sup>(3)</sup> 2,4	1,0	7,0	3,4	
• Fibroblastos						0,826
• 4º Dia	7,4	<sup>(3)</sup> 2,8	4,4	10,8	6,8	
• 7º Dia	7,0	<sup>(3)</sup> 2,7	4,8	11,6	6,2	

NOTA: O número de animais em cada grupo é de cinco.

(1) "Wilcoxon", para amostras relacionadas.

(2) "t de Student", para amostras pareadas.

(3) Desvio padrão muito elevado, recomenda-se utilizar a mediana.

## 4.2 AVALIAÇÃO DA PORCENTAGEM OCUPADA POR COLÁGENO DOS TIPOS I E III

Nas comparações entre os grupos, dos valores de colágeno I e III, não foi observado diferença estatística em nenhum dos momentos analisados (tabela e gráfico 3).

TABELA 3 – ESTATÍSTICA DESCRITIVA E ANÁLISE COMPARATIVA DO COLÁGENO ENTRE OS GRUPOS DE ESTUDO

DADOS	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIANA	VALOR DE p <sup>(1)</sup>
<b>TIPO I (MADURO)</b>						
• 4º Dia	4,18	<sup>(3)</sup> 3,64	0,37	12,92	3,56	0,352
• Soro Fisiológico	3,04	<sup>(3)</sup> 2,76	0,37	6,40	1,68	
• Nicotina	5,32	<sup>(3)</sup> 4,36	1,97	12,92	3,82	
• 7º Dia	8,72	<sup>(3)</sup> 7,33	1,46	22,56	7,02	0,349
• Soro Fisiológico	11,03	<sup>(3)</sup> 8,62	1,72	22,56	11,07	
• Nicotina	6,41	<sup>(3)</sup> 5,78	1,46	15,10	4,95	
<b>TIPO III (IMATURO)</b>						
• 4º Dia	95,81	3,64	87,07	99,62	-	<sup>(2)</sup> 0,352
• Soro Fisiológico	96,95	2,76	93,59	99,62	-	
• Nicotina	94,67	4,36	87,07	98,02	-	
• 7º Dia	91,27	7,33	77,43	98,53	-	<sup>(2)</sup> 0,349
• Soro Fisiológico	88,96	8,62	77,43	98,27	-	
• Nicotina	93,58	5,78	84,89	98,53	-	

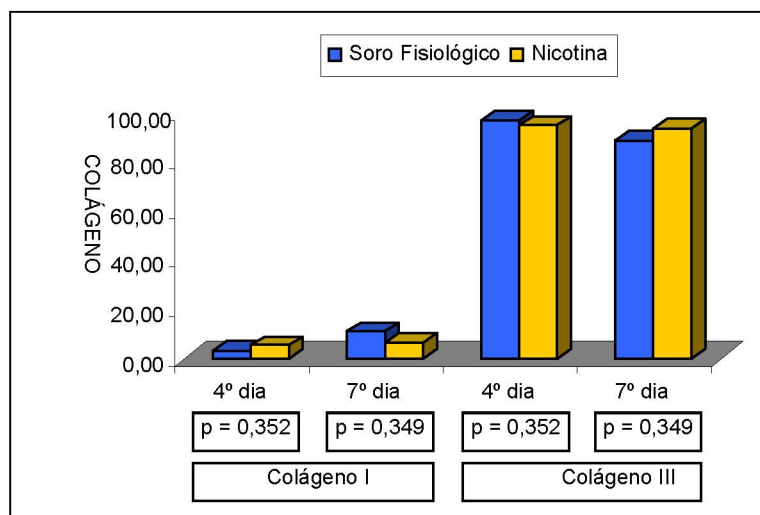
NOTA: O número de animais em cada grupo é de cinco.

(1) "Mann-Whitney".

(2) "t de Student".

(3) Desvio padrão muito elevado, recomenda-se utilizar a mediana.

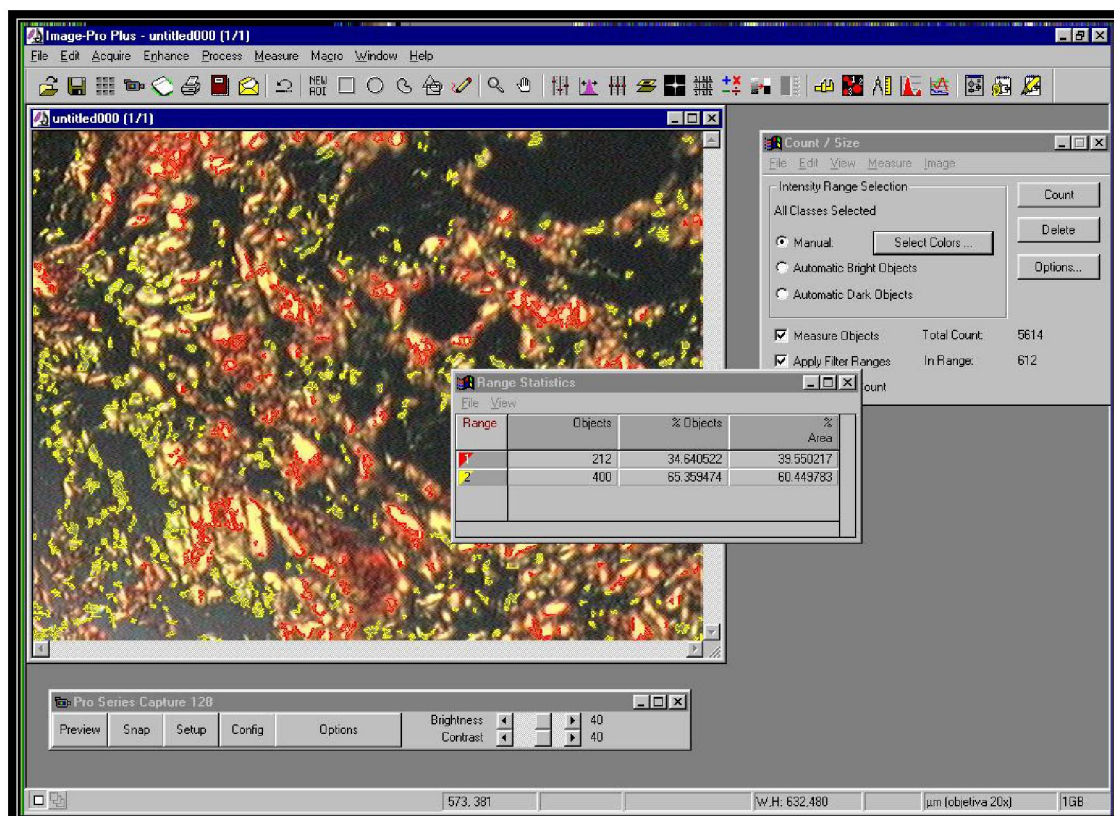
GRÁFICO 3 – COLÁGENO I E III, NOS GRUPOS DE ESTUDO



FONTE: Tabela 3

Em relação à análise intra-grupo (mesmo grupo em momentos diferentes), quanto à avaliação do colágeno maduro e imaturo, não foi observado diferença significativa (figura 6).

FIGURA 6 – ANÁLISE DO COLÁGENO I e III ATRAVÉS DA TÉCNICA DE PICROSIRIUS-RED F3BA



### 4.3 ANÁLISE DA FORÇA DE TENSÃO TECIDUAL

Na comparação entre os grupos submetidos ao teste de tração, não foi observado diferença significativa em nenhum dos momentos analisados (tabela 4).

Em relação à análise intra-grupo (mesmo grupo em momentos diferentes) foi observado que o grupo com Soro Fisiológico, apresentou tração maior no 7º dia ( $p=0,028$ ) (gráfico 4). No grupo da Nicotina, não foi observado diferença significativa (figura 7).

TABELA 4 - ESTATÍSTICA DESCRITIVA DO TESTE DE TRAÇÃO NOS GRUPOS DE ESTUDO

DADOS	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIANA	VALOR DE p <sup>(1)</sup>
<b>ENTRE GRUPOS</b>						
• 4º Dia	0,262	<sup>(3)</sup> 0,103	0,106	0,476	0,240	0,483
• Soro Fisiológico	0,237	<sup>(3)</sup> 0,097	0,106	0,355	0,223	
• Nicotina	0,287	<sup>(3)</sup> 0,114	0,187	0,476	0,256	
• 7º Dia	0,433	0,115	0,283	0,637	-	0,958
• Soro Fisiológico	0,435	0,064	0,332	0,503	-	
• Nicotina	0,431	<sup>(3)</sup> 0,160	0,283	0,637	0,388	
<b>INTRA-GRUPO</b>						
• Soro Fisiológico						<sup>(2)</sup> 0,028
• 4º Dia	0,237	<sup>(3)</sup> 0,097	0,106	0,355	0,223	
• 7º Dia	0,435	0,064	0,332	0,503	-	
• Nicotina						<sup>(2)</sup> 0,150
• 4º Dia	0,287	<sup>(3)</sup> 0,114	0,187	0,476	0,256	
• 7º Dia	0,431	<sup>(3)</sup> 0,160	0,283	0,637	0,388	

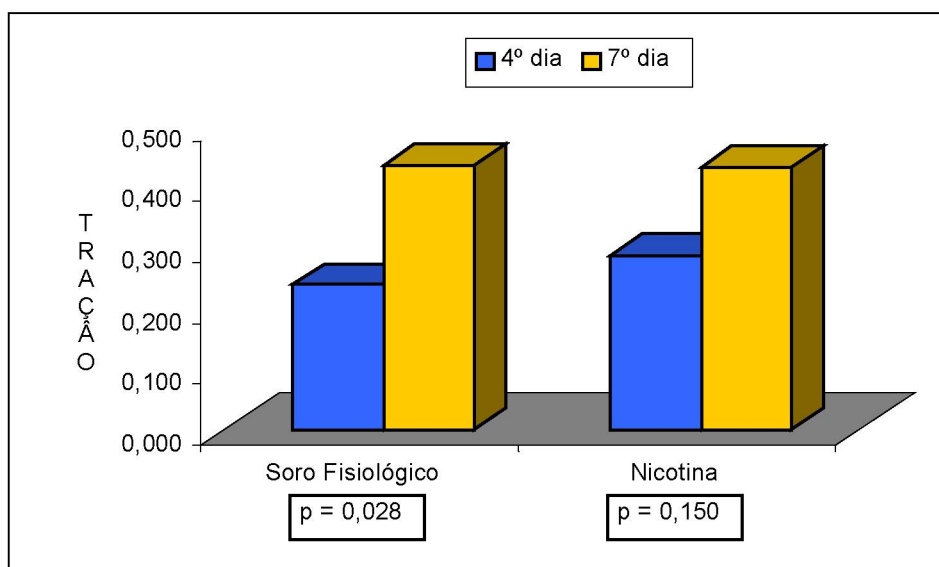
NOTA: O número de animais em cada grupo é de cinco.

(1) "Mann-Whitney", para amostras independentes.

(2) "Wilcoxon", para amostras relacionadas.

(3) Desvio padrão muito elevado, recomenda-se utilizar a mediana.

GRÁFICO 4 – TESTE TRAÇÃO, NOS GRUPOS DE ESTUDO



FONTE: Tabela 4

FIGURA 7 – ESTUDO DA FORÇA DE TENSÃO (TESTE DE TRAÇÃO) (A e B)

A



B



Nota: corpo de prova apresentando ruptura ao teste de tração no local da anastomose.

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 SOBRE O MÉTODO

#### 5.1.1 Escolha do animal de experimentação

Optou-se neste trabalho pela utilização do coelho como animal de experimentação por este animal ser de médio porte e apresentar a bexiga de dimensões ideais para realização do experimento, apesar de necessitar de alguns cuidados adicionais, como alojamento individual. Além disso, com o uso de coelhos podem-se obter amostras homogêneas com linhagens bem definidas.

Para evitar variações hormonais e possíveis diferenças no processo cicatricial, empregaram-se animais de idades semelhantes e machos.

A maioria dos trabalhos experimentais que estudam a função da bexiga urinária utiliza ratos ou coelhos. DAMASER et al. (2000), ao comparar a fisiologia e bioquímica da bexiga de coelhos e ratos, demonstraram que a bexiga do coelho tem uma capacidade em torno de 50 ml enquanto a bexiga do rato tem capacidade de aproximadamente 1 ml. Porém, a tensão da parede vesical e a pressão vesical nos ratos foram 6,7 vezes e 5,6 vezes maiores que nos coelhos. Portanto, além do tamanho, há uma diferença funcional entre a bexiga destes animais.

BUTTYAN, CHEN e LEVIN (1997) relatam uma predileção pelo uso do coelho como animal modelo quando se estuda obstrução infra-vesical, já que a resposta da bexiga de coelhos frente à obstrução mimetiza a humana. LIPSKI et al. (1998) desenvolveram um modelo de derivação urinária utilizando coelhos jovens com 3 semanas de idade, visto que as bexigas destes animais são consideradas comparáveis às bexigas na infância.

#### 5.1.2 Escolha do fio de sutura

Ao definir o melhor material para sutura da bexiga, examinam-se alguns fatores: interação entre material e tecido, ganho de força tecidual durante



cicatrização em relação à perda de força tênsil da sutura com o tempo, taxa de degradação ou absorção e o potencial litogênico dos diferentes materiais.

Existe um consenso de não utilizar fios inabsorvíveis em bexiga posto que sejam altamente litogênicos. Existem 5 grupos principais de fios de sutura absorvíveis: categut cromado, ácido poliglicólico (daxon®), poliglactina (vicryl®), poligliconato (maxon®), polidioxanona (PDS®). Historicamente, o fio categut cromado é o mais utilizado e apresenta menor potencial na formação de cálculos, além de não apresentar maior grau de inflamação e fibrose quando comparado com polidioxanona e polipropileno (MORRIS et al., 1986). Segundo PAL (1998), em urina alcalina, infectada por *Proteus sp*, suturas de polidioxanona e ácido poliglicólico perdem grande parte de sua força original no prazo de 10 dias, enquanto o categut cromado perde pouco de sua força de ruptura neste período. De acordo com este autor o categut cromado deve ser o material de sutura preferível utilizado em bexiga, pois apresenta custo menor e nenhum outro se mostrou superior em estudos clínicos.

ROCHA (1998), estudando o uso de adesivos biológicos (butil-2-cianoacrilato) no fechamento vesical de ratos, encontrou grau de fibrose cicatricial semelhante entre o grupo da cola biológica e do grupo do categut, porém houve uma menor quantidade de necrose, inflamação, tecido de granulação e metaplasia escamosa, no grupo cola biológica em relação ao fio de categut.

Em vista disto, neste trabalho foi utilizado o fio de categut 5-0 para a sutura da parede vesical, já que a urina do coelho é alcalina e nesta condição este fio apresenta melhores resultados que os outros. Além disso, não se dispõe de informações suficientes quanto ao uso de cola biológica nestas situações.

### 5.1.3 Uso da nicotina

Há vários métodos de administração de nicotina utilizados em animais de experimentação na tentativa de produzir níveis sistêmicos semelhantes ao observado em fumantes humanos. Inalação da fumaça do cigarro foi utilizada por UENG et al. (1997), e apesar de aproximar-se mais do hábito de fumar

humano, é de difícil realização, os níveis de nicotina são imprevisíveis e o método não isola a nicotina como único fator. Vias alternativas para administrar nicotina foram utilizadas, tais como: via oral, utilizada por BALFOUR (1980), via intraperitoneal por MOSELY, FINSETH e GOODY (1978), endovenosa por VALENTINE et al. (1997); implante de nicotina subcutânea por MEDEIROS et al. (2003b).

SIPE III, BUCK e HOLLINGER (2000), compararam o uso de nicotina através de adesivos dérmicos e aerossol intra-nasal em coelhos, nas doses de 2,5, 5 e 10 mg e dosaram a cotidina e nicotina sérica em 15 minutos, 8 e 24 horas após a administração. Com isso, observaram que a nicotina intra-nasal apresentava rápida absorção, porém após 8 horas não era detectável no sangue, enquanto a nicotina em forma de adesivos de 5 e 10 mg produziu níveis séricos previsíveis em torno de 5 a 25 ng/ml, que são consistentes com a média dos níveis diários de um fumante de cigarros.

FORREST, PANG e LINDSAY (1987), utilizando injeções subcutâneas diárias, demonstraram que as alterações na cicatrização provocadas pela nicotina são tempo e dose dependentes, ocorrendo após o uso da droga por 28 dias antes da cirurgia.

Desta forma, nesta pesquisa foi utilizada injeção subcutânea de nicotina na dose de 2 mg por kg, com uma dose total que variou de 5,2 a 7,5 mg, para que todos os animais recebessem uma dosagem padronizada a fim de produzir níveis de nicotina semelhantes a de um fumante crônico, durante um período de 28 dias prévios ao procedimento cirúrgico para observar os efeitos deletérios à cicatrização.

#### 5.1.4 Tempo de aferição

O momento da aferição depende da fase de cicatrização, sendo que as fases inflamatória e proliferativa se sobrepõem no 4º dia após a lesão. HEPERLEN et al. (1975), demonstraram que a epitelização de cistotomias fechadas de modo primário ocorre em três dias. De acordo com SUTHERLAND et al. (1996), que utilizaram um modelo de ampliação vesical com matriz acelular em ratos, ocorre recobrimento celular de toda a superfície da matriz em quatro dias. Além disso, na cicatrização da bexiga, segundo HASTING et al

(1978), a taxa de deposição de colágeno atinge um pico no 5º dia pós-operatório.

Neste trabalho foi realizado aferição das amostras no 4º e 7º dias para acompanhar as alterações inflamatórias e deposição de colágeno que pudessem alterar a cicatrização e a força de ruptura da sutura.

#### 5.1.5 Teste de tração

Segundo MAST (1997), a força da cicatrização da linha de sutura é um indicativo da qualidade e quantidade do processo reparatório. Através da medida da força necessária para romper a incisão pode-se avaliar experimentalmente a cicatrização. De acordo com LICHTENSTEIN et al. (1970), a maneira mais adequada de avaliar experimentalmente a integridade da ferida é através da determinação do ponto máximo que antecede a ruptura da linha de cicatriz durante o teste de tração. Isto é explicado porque os tecidos elásticos suportam uma carga de esforço máximo até o seu limite de elasticidade, quando ocorre deformação seguida de queda da resistência tecidual, de modo que a força necessária para romper o tecido é sempre inferior à força máxima aplicada ao mesmo.

Assim, no presente experimento foi utilizado a análise da força máxima de ruptura para avaliação da qualidade de cicatrização da bexiga.

#### 5.1.6 Avaliação microscópica

A reação inflamatória foi determinada através da coloração dos cortes histológicos por hematoxilina e eosina. Para evitar a subjetividade da avaliação através de um escore semi-quantitativo amplamente utilizado por patologistas, que costuma variar de 0 (ausência de células inflamatórias) a 4 (muito intenso), optou-se por uma análise mais objetiva, expressa em número de células por área, validado por DE BOER et al. (2001).

O tipo de colágeno e sua quantificação foram determinados nos cortes histológicos pela coloração de picosirius-red F3BA. Esta coloração tem sido

empregada há aproximadamente 30 anos desde sua primeira utilização por SWEAT, PUTCHTLER e ROSENTHAL (1964). A molécula do corante interpõe-se na estrutura dos colágenos tipos I e III e confere uma tonalidade cor-de-rosa à maioria dos tecidos quando observada sob luz branca. Entretanto, os colágenos tipo I e III são fortemente bi-refringentes sob luz polarizada e os mesmos são diferenciados entre si pela cor decorrente da bi-refringência, ou seja, verde para o colágeno tipo III e vermelho para o colágeno tipo I.

GRIMM et al. (2003) utilizaram coloração de picosirius red na avaliação de fibrose intersticial renal após transplante de rins, sendo considerado um marcador promissor para predizer a nefropatia crônica do enxerto.

## 5.2 SOBRE OS RESULTADOS

### 5.2.1 Aferição: Aspectos microscópicos

#### 5.2.1.1 Processo inflamatório agudo

Observa-se na avaliação da variável processo inflamatório agudo, através da contagem do número de neutrófilos por campo, um maior número de neutrófilos no grupo soro fisiológico em relação ao grupo nicotina no 4º dia, porém com diferença estatística limítrofe ( $p=0,079$ ), podendo tratar-se de uma tendência. Na análise intra-grupo do soro fisiológico houve uma diminuição de neutrófilos entre o 4º e o 7º dia ( $p=0,045$ ). O mesmo não foi observado na avaliação intra-grupo da nicotina.

Este fato pode ser explicado através da diminuição da quimiotaxia celular, podendo diminuir o aporte celular dos neutrófilos ao sítio da ferida. CORBERAND et al. (1980), ao pesquisar *in vitro* o efeito de diversos componentes da fumaça do tabaco sobre a função de polimorfonucleares, observou que a nicotina exerce um efeito deletério sobre a motilidade destas células.

### 5.2.1.2 Processo inflamatório crônico

Na avaliação da variável do processo inflamatório crônico, não foi encontrado diferença significativa na contagem de linfócitos e plasmócitos entre as amostras dos dois grupos. Porém houve um aumento de plasmócitos no 7º dia no grupo da nicotina, com diferença estatística limítrofe ( $p=0,053$ ).

Os plasmócitos são células inflamatórias derivadas dos linfócitos B, cuja principal função é a produção de anticorpos contra antígenos. De acordo com HOLT e KEAST (1977), a fumaça do tabaco, em quantidades semelhantes a de um fumante, pode, em animais, produzir estímulo da imunidade humoral à exposição moderada e causar depressão quando houver exposição prolongada.

### 5.2.1.3 Proliferação fibroblástica

Na análise da variável proliferação fibroblástica, avaliada no 4º e sétimo dia, não foi observado alteração estatística em relação aos grupos estudados. O fibroblasto é a célula do tecido conectivo responsável pela deposição de colágeno no sítio de lesão, e a fibroplasia já é observada de maneira intensa nos primeiros sete dias.

Na amostra estudada, a nicotina não apresentou redução da proliferação fibroblástica, ao contrário de outros estudos, que demonstraram uma ação inibidora da nicotina sobre a viabilidade fibroblástica em culturas celulares (CHANG et al., 2001; MARTINEZ et al., 2002).

### 5.2.1.4 Porcentagem da área de sutura ocupada por colágeno tipo I e III

Na avaliação da porcentagem de colágenos tipo I e III na área de anastomose, com a coloração pelo picosirius red F3BA, não houve diferença com significância estatística entre os grupos estudados. Ademais, apesar de ter ocorrido um decréscimo de colágeno tipo III e aumento de colágeno tipo I em

ambos os grupos do 4º para o 7º dia, esta alteração não foi estatisticamente significativa.

O colágeno fornece uma estrutura para todas as matrizes extracelulares, sendo fundamental no processo cicatricial. No início há uma preponderância de colágeno tipo III, sendo paulatinamente substituído por colágeno tipo I, responsável pela força tênsil (WITTE; BARBUL, 1997). No presente estudo não foi possível observar claramente esta situação, ficando demonstrado que a nicotina não influenciou na deposição de colágenos I e III em nenhum momento estudado.

De modo diverso, SKINOVSKI (2000) observou uma diminuição de colágeno imaturo em anastomoses de intestino delgado de ratos no 28º dia. Este resultado discordante em relação ao presente estudo pode ser decorrente de diferente comportamento tissular do intestino em relação à bexiga.

### 5.2.2 Análise do teste de tração

Na avaliação da força tênsil através do teste de tração não houve diferença entre os grupos controle e nicotina no mesmo período, porém no grupo controle houve um incremento na força de tensão do 4º para o 7º dia ( $p=0,028$ ). Na avaliação do grupo da nicotina, apesar de ter ocorrido elevação da força tênsil no período do 4º para o 7º dia, este aumento não foi estatisticamente significativo.

De acordo com EDLICH, RODEHEAVER e THACKER (1987), a bexiga tem um grande potencial para reparo, atingindo 100% de sua força em 14 a 21 dias, de modo que a força de tensão vesical recupera-se rapidamente, ao contrário do que ocorre com outros órgãos.

MEDEIROS et al. (2003a), avaliando a ação da nicotina no reparo da parede abdominal de ratos, demonstraram que a nicotina diminui a força de tensão da parede abdominal, em relação ao grupo controle, o que não foi demonstrado no presente estudo.

### 5.3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho foi idealizado com a expectativa de se comprovar uma possível interferência da nicotina na cicatrização da bexiga de coelhos. Os resultados, em parte não corresponderam ao esperado, uma vez que a bexiga não foi suficientemente estudada, segundo a literatura, com relação às suas reações do ponto de vista histológico, quando exposta à ação da nicotina.

As alterações histológicas que ocorrem na cicatrização de outros órgãos nem sempre podem ser extrapoladas para a bexiga, podendo um tecido responder à ação de uma substância de forma diferente. A ação da nicotina pode se dar de duas maneiras, por ação direta sobre o colágeno ou por modo indireto sobre os componentes do processo cicatricial. Nesta pesquisa houve reações inflamatórias frente à nicotina, tanto do processo inflamatório agudo quanto crônico, porém sem significância estatística, representando uma tendência, mas que pode significar uma ação da droga no sistema imune.

Não foi observado, neste experimento, influência da nicotina sobre a proliferação fibroblástica, produção de colágeno e força de tensão, os quais refletem melhor o resultado final da cicatrização. Isto faz crer que, possivelmente, as alterações inflamatórias provocadas pela nicotina, ou sua ação direta, não foram suficientes para causar deficiência estrutural na cicatrização da sutura vesical nos momentos analisados e nas condições do presente estudo.

Face à dificuldade de se encontrar experimentos envolvendo nicotina e aparelho urinário de coelhos, novos estudos necessitam ser realizados para se conhecer mais profundamente as reações histológicas uroteliais frente a este componente do tabaco.

## 6 CONCLUSÕES

A análise dos resultados deste trabalho permite concluir que a nicotina, na dose de 2 mg/kg de peso do animal, em administrações diárias, quando comparada a animais de grupo controle, demonstrou na sutura vesical de coelhos, as seguintes alterações:

1. Diminuição do número de neutrófilos no 4º dia pós-operatório e aumento do número de plasmócitos no 7º dia após a cirurgia.
2. Ausência de diferença estatística entre os grupos com relação à porcentagem de colágenos tipo I e III.
3. Ausência de diminuição estatisticamente significativa da força de tensão tecidual entre os grupos.



## REFERÊNCIAS

- BALFOUR, D. J. F. Studies on the biochemical and behavioral effects of oral nicotine. **Arch.Int. Pharmacodyn. Ther.**, Gent, v.245, n.1, p.95-103, 1980.
- BASKIN, L.S. et al. Bladder smooth muscle cells in culture: Identification and characterization. **J. Urol.**, Baltimore, v.149, n.1, p.190-197, 1993.
- BENOWITZ, N.L. Pharmacologic aspects of the cigarette smoking and nicotine addiction. **N. Engl. J.Med.**, Boston, v.319, n.20, p.1318-1330, 1988.
- BUTTYAN, R.; CHEN, M.W.; LEVIN, R.M. Animal models of bladder outlet obstruction and molecular insight into the basis for the development of bladder dysfunction. **Eur. Urol.**, Basel, v.33, s.1, p.32-39, 1997.
- CAMPOS, H. et al. Efeitos da nicotina nos retalhos cutâneos em ratos. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v.16, n.4, p.206-210, 2001.
- CHANG, Y.C. et al. Adverse effects of aerocoline and nicotine in human periodontal ligament fibroblasts in vitro. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v.28, p.277-282, 2001.
- CORBERAND, J. et al. In vitro effect of tobacco smoke components on the functions of normal human polymorphonuclear leukocytes. **Infect. Immun.**, Washington, v.30, n.3, p.649-655, 1980.
- CRONIN, K.; JACKSON, D.S.; DUNPHY, J.E. Specific activity of hydroxyproline-tritium in the healing colon. **Surg. Gynecol. Obstet.**, Chicago, v.126, n.5, p.1061-1065, 1968.
- DAMASER, M.S. et al. Comparative physiology and biochemistry of rat and rabbit bladder. **Br. J. Urol. Int.**, Oxford, v.85, n.4, p.519-525, 2000.
- DE BOER, W. I. et al. Image analysis and quantification in lung tissue. **Clin. Exp. Allergy**, Oxford, v.31, p.504-508, 2001.
- EDLICH, R.F.; RODEHEAVER, G.T.; THACKER, J.G. Considerations in the choice of sutures for wound closure of the genitourinary tract. **J. Urol.**, Baltimore 137, n.3, p.373-379, 1987.
- EDLICH, R.F.; RODEHEAVER, G.T.; THACKER, J.G. Biology of wound repair and infection. In: GILLENWATER, J.Y et al. (Ed.). **Adult and pediatric urology**. 3.ed. St. Louis: Mosby-Year Book, 1996. p.219-287.
- FAGGIAN, L. et al. Phenotypic changes in the regeneration of rabbit bladder muscle. Role of interstitial cells and innervation on smooth muscle cell differentiation. **Histochem. Cell Biol.**, Berlin, v.109, p.25-39, 1998.

FORREST, C.R.; PANG, C.Y.; LINDSAY, W.K. Dose and time effects of nicotine treatment on the capillary blood flow and viability of random-pattern skin flaps in the rat. **Br. J. Plast. Surg.**, Edinburgh, v. 40, n.3, p.295-299, 1987.

GABBIANI, G.; CHAPONNIEL, C; HUTTNER, I. Cytoplasmic filaments and GAP junctions in epithelial cells and myofibroblasts during wound healing. **J. Cell Biol.**, New York, v.76, p.561-568, 1978.

GRIMM, P.C. et al. Computerized image analylis of sirius red-stained renal allograft biopsies as a surrogate marker to predict long-term allograft function. **J. Am. Soc. Nephrol.**, Baltimore, v.14, p.1662-1668, 2003.

HASTING, J. C. et al. The effect of suture materials on healing wounds of the bladder. **Surg. Gynecol. Obstet.**, Chicago, v.140, p.933-937, 1975.

HEPPERLEN, J.W. et al. Epithelization after cystotomy. **Invest. Urol.**, Baltimore, v.12, p.269-271, 1975.

HIJJAR, M.A; COSTA e SILVA, V.L. Epidemiologia do tabagismo no Brasil. **J. B. M.**, Rio de Janeiro, v. 60, n.1, p. 50-71,1991.

HOLT, P.G.; KEAST, D. Environmentally induced changes in immunological function: Acute and chronic effects of inhalation of tobacco smoke and other atmospheric contaminants in man and experimental animals. **Bacteriol. Rev.**, Washington, v.41, n.1, p.205-216, 1977.

JENSEN, J.A. et al. Cigarrete smoking decreases tissue oxygen. **Arch. Surg.**, Chicago, v.126, p.1131-1134, 1991.

JONSSON, K. et al. Tissue oxygenation, anemia, and perfusion in relation to the wound healing in surgical patients. **Ann. Surg.**, Philadelphia, v.214, p. 605-613, 1991.

KNUUTINEN, A. et al. Smoking affects collagen synthesis and extracellular matrix turnover in human skin. **Br. J. Dermatol.**, Oxford, v.146, p.588-594, 2002.

KOSKIMAKI, J. et al. Association of smoking with lower urinary tract symptoms. **J. Urol.**, Baltimore v.159, p.1580-1582, 1998.

KUMAR, R.; LADER, M. Nicotine and smoking, In: Essmac, W.B., Valzelli, L. (Ed.). **Current developments in psycopharmacology**. New York: Spectrum Publication, 1981. v.6, p.127-164.

LICHTENSTEIN, I.L. et al. The dynamics of wound healing. **Surg. Gynecol. Obstet.**, Chicago, v.136, p.685-690, 1970.

LIPSKI, B.A. et al. A unique new model to study the effects of urinary diversion in the developing rabbit bladder. **J. Urol.**, Baltimore v.160, p.1454-1458, 1998.

MARTINEZ, A.E.T.; SILVÉRIO, K.G.; ROSSA JÚNIOR, C. Effect of nicotine on the viability and morphology of fibroblasts – in vitro study. **Pesq. Odontol. Bras.**, São Paulo, v.16, p.234-238, 2002.

MAST, B.A. Healing in other tissues. **Surg. Clin. North Am.**, Philadelphia, v. p.529-547, 1997.

MEDEIROS, A.C. et al. A nicotina atua como efeito deletério na reparação da parede abdominal. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v.18, n.1, p.19-23, 2003a.

MEDEIROS, A.C. et al. Lesões pulmonares provocadas pela nicotina por via subcutânea em ratos. **Acta Cir. Bras**, São Paulo, v.18, n.1, p. 24-27, 2003b.

MISERY, L. Nicotine effects on skin: Are they positive or negative? **Exp. Dermatol.**, Copenhagen, v.13, p.665-670, 2004.

MORRIS, M.C. et al. Urolithiasis on absorbable and non-absorbable suture materials in the rabbit bladder. **J. Urol.**, Baltimore, v.135, p.602-603, 1986.

MOSELY, L.H.; FINSETH, F. Cigarette smoking: impairment of digital blood flow and wound healing in the hand. **Hand**, Essex, v.9, n.2, p.7-101, 1977.

MOSELY, L.H.; FINSETH, F.; GOODY, M. Nicotine and its effect on wound healing. **Plastic Reconstr. Surg.**, Baltimore, v.61, n.4, p.570-575, 1978.

NOMINA ANATOMICA VETERINARIA. Barcelona: Aedos, 1975. 218p.

PAL, K.M.I. Urinary bladder wall repair: what suture to use? **Br. J. Urol.**, Oxford, v.82, p.196-198, 1998.

READ, R.C. Systemic effects of smoking. **Am. J. Surg.**, Belle Mead, v.148, p.706-711, 1984.

REUS, W. F. et al. Acute effects of tobacco smoking on blood flow in the cutaneous micro-circulation. **Br. J. Plast. Surg.**, Edinburgh, v.37, p.213-215, 1984.

ROCHA, L.C. **Avaliação da eficácia e das alterações histológicas causadas pelo adesivo butil-2-cianocrilato em comparação com o fio de catgut para sutura vesical: estudo experimental.** Tese (Professor Titular) – Disciplina de Urologia, Pontifícia Universidade Católica.

SILVERSTEIN, P. Smoking and wound healing. **Am. J. Med.**, Belle Mead, v.93 n.1A, p. 22-24, 1992.

SINGER, A.J.; CLARK, R.A.F. Mechanism of disease: cutaneous wound healing. **N. Engl.J. Med.**, Boston, v.340, n.10, p.738-746, 1999.

SIPE III, R.V.; BUCK, D.C.; HOLLINGER, J.O. Nicotine administration in rabbits using habitrol nicotine patches and nicotine nasal spray. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, Carlton, v. 27, p.480-482, 2000.

SKINOVSKY, J. **A influência da nicotina na cicatrização de anastomoses do intestino delgado em ratos**. Curitiba, 2000. Tese (Mestrado em Clínica Cirúrgica) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

STADELMANN, W. K. et al. Impediments to wound healing. **Am. J. Surg.**, Belle Mead, v.176, supl.2A, p.39S-47S, 1998.

SUTHERLAND, R. S. et al. Regeneration of bladder urothelium, smooth muscle, blood vessels and nerves into an acellular tissue matrix. **J. Urol.**, Baltimore, v.156, n.2S, p.571-577, 1996.

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

UENG, S. et al. Effect of intermittent cigarette smoking inhalation on tibial lengthening: experimental study on rabbits. **J. Trauma**, Baltimore, v.42, p.231-238, 1997.

VALENTINE, J. D. et al. Self-administration in rats allowed access to nicotine. **Psychopharmacology**, Berlin, v.133, n.3, p.300-304, 1997.

WHELAN, C.; STEWART, J.; SCHWARTZ, B.F. Mechanics of wound healing and importance of vacuum assisted closure in urology. **J. Urol.**, Baltimore v.173, p.1463-1470, 2005.

WITTE, M.B.; BARBUL, A. General principles of wound healing. **Surg. Clin. North Am.**, Philadelphia, v.77, p.509-528, 1997.

WONG, L.S. et al. Effects of second hand smoke on structure and function of fibroblasts, cells that are critical for tissue repair and remodeling. **BMC Biol.**, v.5, p.13, 2004.

WU, H, et al. Understanding bladder regeneration: Smooth muscle ontogeny. **J. Urol.**, Baltimore, v.162, p.1101-1105, 1999.

## APÊNDICE

### GRUPO CONTROLE (C) = SOLUÇÃO FISIOLÓGICA

ANIMAL	GRU- PO	CÉLULAS INFLAMATÓRIAS								TESTE DE TRAÇÃO		COLÁGENO			
		4º PO				7º PO				4ºPO	7ºPO	4ºPO		7ºPO	
		Linfó- citos	Plasmó- citos	Neutró- filos	Fibro- blastos	Linfó- citos	Plasmó- citos	Neutró- filos	Fibro- blastos			I	III	I	III
1	C	1,4	3,0	1,8	6,0	2,0	4,2	1,2	8,0	0,355	0,446	1,68	98,31	11,07	88,92
2	C	0,6	4,0	3,2	7,8	1,2	2,8	0,2	9,0	0,198	0,463	0,37	99,62	22,56	77,43
3	C	0,8	3,2	3,0	13,4	1,4	3,4	2,4	8,8	0,305	0,431	5,60	94,39	3,77	96,22
4	C	0,8	2,2	2,2	7,0	0,8	4,2	1,4	9,8	0,106	0,503	6,40	93,59	1,72	98,27
5	C	2,0	4,6	2,4	9,4	1,2	3,6	0,8	8,4	0,223	0,332	1,15	98,84	16,02	83,97
Nº		5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Média		1,1	3,4	2,5	8,7	1,3	3,6	1,2	8,8	0,237	0,435	3,04	96,95	11,03	88,96
Desvio		0,6	0,9	0,6	2,9	0,4	0,6	0,8	0,7	0,097	0,064	2,76	2,76	8,62	8,62
Mínimo		0,6	2,2	1,8	6,0	0,8	2,8	0,2	8,0	0,106	0,332	0,37	93,59	1,72	77,43
Máximo		2,0	4,6	3,2	13,4	2,0	4,2	2,4	9,8	0,355	0,503	6,40	99,62	22,56	98,27
Mediana		0,8	3,2	2,4	7,8	1,2	3,6	1,2	8,8	0,223	0,446	1,68	98,31	11,07	88,92
%desvio		51,4	27,3	22,9	33,2	33,2	16,2	67,7	7,7	40,7	14,6	90,7	2,8	78,2	9,7

### GRUPO NICOTINA (N) = ESTUDO

ANIMAL	GRU- PO	CÉLULAS INFLAMATÓRIAS								TESTE DE TRAÇÃO		COLÁGENO			
		4º PO				7º PO				4ºPO	7ºPO	4ºPO		7ºPO	
		Linfó- citos	Plasmó- citos	Neutró- filos	Fibro- blastos	Linfó- citos	Plasmó- citos	Neutró- filos	Fibro- blastos			I	III	I	III
1	N	1,0	5,4	0,4	9,8	2,2	6,2	7,0	11,6	0,187	0,288	12,92	87,07	9,08	90,91
2	N	1,6	5,8	2,0	6,8	1,0	4,2	1,0	4,8	0,216	0,283	4,59	95,40	15,10	84,89
3	N	0,6	3,2	2,2	10,8	3,0	4,6	3,4	5,2	0,298	0,558	3,82	96,18	1,46	98,53
4	N	0,4	3,0	1,2	5,0	1,0	4,4	1,2	6,2	0,256	0,637	1,97	98,02	1,48	98,51
5	N	1,0	3,0	2,2	4,4	1,0	4,0	3,4	7,2	0,476	0,388	3,29	96,70	4,95	95,04
Nº		5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Média		0,9	4,1	1,6	7,4	1,6	4,7	3,2	7,0	0,287	0,431	5,32	94,67	6,41	93,58
Desvio		0,5	1,4	0,8	2,8	0,9	0,9	2,4	2,7	0,114	0,160	4,36	4,36	5,78	5,78
Mínimo		0,4	3,0	0,4	4,4	1,0	4,0	1,0	4,8	0,187	0,283	1,97	87,07	1,46	84,89
Máximo		1,6	5,8	2,2	10,8	3,0	6,2	7,0	11,6	0,476	0,637	12,92	98,02	15,10	98,53
Mediana		1,0	3,2	2,0	6,8	1,0	4,4	3,4	6,2	0,256	0,388	3,82	96,18	4,95	95,04
%desvio		50,0	34,2	49,2	38,7	56,2	18,8	75,5	39,1	39,7	37,2	81,9	4,6	90,1	6,2

**TOTAL GERAL**

	ANIMAL	GRU- PO	CÉLULAS INFLAMATÓRIAS								TESTE DE TRAÇÃO		COLÁGENO			
			4° PO				7° PO				4°PO	7°PO	4°PO		7°PO	
			Linfó- citos	Plasmó- citos	Neutró- filos	Fibro- blastos	Linfó- citos	Plasmó- citos	Neutró- filos	Fibro- blastos			I	III	I	III
1	C		1,4	3,0	1,8	6,0	2,0	4,2	1,2	8,0	0,355	0,446	1,68	98,31	11,07	88,92
2	C		0,6	4,0	3,2	7,8	1,2	2,8	0,2	9,0	0,198	0,463	0,37	99,62	22,56	77,43
3	C		0,8	3,2	3,0	13,4	1,4	3,4	2,4	8,8	0,305	0,431	5,60	94,39	3,77	96,22
4	C		0,8	2,2	2,2	7,0	0,8	4,2	1,4	9,8	0,106	0,503	6,40	93,59	1,72	98,27
5	C		2,0	4,6	2,4	9,4	1,2	3,6	0,8	8,4	0,223	0,332	1,15	98,84	16,02	83,97
1	N		1,0	5,4	0,4	9,8	2,2	6,2	7,0	11,6	0,187	0,288	12,92	87,07	9,08	90,91
2	N		1,6	5,8	2,0	6,8	1,0	4,2	1,0	4,8	0,216	0,283	4,59	95,40	15,10	84,89
3	N		0,6	3,2	2,2	10,8	3,0	4,6	3,4	5,2	0,298	0,558	3,82	96,18	1,46	98,53
4	N		0,4	3,0	1,2	5,0	1,0	4,4	1,2	6,2	0,256	0,637	1,97	98,02	1,48	98,51
5	N		1,0	3,0	2,2	4,4	1,0	4,0	3,4	7,2	0,476	0,388	3,29	96,70	4,95	95,04
N°			10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Média			1,0	3,7	2,1	8,0	1,5	4,2	2,2	7,9	0,262	0,433	4,18	95,81	8,72	91,27
Desvio			0,5	1,2	0,8	2,8	0,7	0,9	2,0	2,1	0,103	0,115	3,64	3,64	7,33	7,33
Mínimo			0,4	2,2	0,4	4,4	0,8	2,8	0,2	4,8	0,106	0,283	0,37	87,07	1,46	77,43
Máximo			2,0	5,8	3,2	13,4	3,0	6,2	7,0	11,6	0,476	0,637	12,92	99,62	22,56	98,53
Mediana			0,9	3,2	2,2	7,4	1,2	4,2	1,3	8,2	0,240	0,439	3,56	96,44	7,02	92,98
%desvio			49,3	31,4	39,4	34,8	47,3	21,5	90,9	26,6	39,3	26,6	87,1	3,8	84,1	8,0