

JAMES SKINOVSKY

**A INFLUÊNCIA DA NICOTINA NA CICATRIZAÇÃO DE ANASTOMOSES
DO INTESTINO DELGADO 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 à obtenção do grau acadêmico de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Osvaldo Malafaia

Coordenador: Prof. Dr. Antonio Carlos L. Campos

CURITIBA

2000

Skinovsky, James

A INFLUÊNCIA DA NICOTINA NA CICATRIZAÇÃO DE ANASTOMOSES
DO INTESTINO DELGADO EM RATOS – Curitiba, 2000.

77 p. : il

Orientador: Prof. Dr. Osvaldo Malafaia.

Dissertação/Mestrado/Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal
do Paraná.

1. Cicatrização. 2. Nicotina. 3. Colágeno

I. Título

O rio atinge os seus objetivos porque aprendeu a contornar os obstáculos.

André Luis

À Deus, por tudo

Em memória de meu pai Leiba, que deixou nesta vida exemplo inabalável de dedicação à família e ao próximo.

À minha mãe Matilde, por me ensinar e sempre demonstrar o real significado da palavra amar.

À minha esposa Giannini, constante fonte de luz a iluminar meu caminho.

AGRADECIMENTOS

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

Ao Prof. Dr. Osvaldo Malafaia, exemplo de vida e orientador deste trabalho, que pela sua paciência e sabedoria mostrou-me limitações e ajudou-me a superá-las.

Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Ligocki Campos, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná, pela confiança em mim depositada e pela constante porta aberta, amiga e conselheira.

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

Ao Prof. Dr. João Carlos Domingues Repka, pelo indispensável incentivo e participação constante neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Irineu Rubinstein, por servir de exemplo a nortear a minha vida profissional.

Ao Prof. Dr. Mario Rigatto, grande expoente na luta contra o tabagismo em nosso país, que continua a ensinar na outra e eterna vida.

Aos Drs. Maurício Chibatta e Fabiano Elias, pelas amizades sinceras e apoio durante todas as fases deste trabalho.

Aos Profs. Drs. Ary Elias Sabbag Júnior e Márcia Olandoski, pela análise estatística.

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

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação Edlaine Araújo dos Santos e Marlei Benedita Vieira Ribeiro, pela sempre presente vontade de ajudar.

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

SUMÁRIO

	LISTA DE FIGURAS	viii
	LISTA DE TABELAS	ix
	LISTA DE GRÁFICOS	x
	LISTA DE ABREVIATURAS	xi
	RESUMO	xii
	ABSTRACT	xiii
1	INTRODUÇÃO	2
1.1	OBJETIVO.....	4
2	REVISÃO DA LITERATURA	6
2.1	PROCESSO CICATRICIAL.....	6
2.2	TABAGISMO E NICOTINA.....	10
2.3	NICOTINA E CICATRIZAÇÃO.....	12
3	MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	19
3.2	AMBIENTE DE EXPERIMENTAÇÃO.....	19
3.3	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	19
3.4	ETAPAS EXPERIMENTAIS.....	20
3.4.1	Administração de nicotina ou solução fisiológica pré-operatórias.....	20
3.4.2	Preparo e procedimento operatório.....	21

3.4.3	Anestesia.....	21
3.4.4	Preparo da pele e posicionamento na mesa operatório.....	22
3.4.5	Procedimento operatório.....	22
3.4.6	Pós-operatório.....	24
3.4.7	Eutanásia e aferições.....	25
3.5	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	29
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	29
4	RESULTADOS	31
4.1	AVALIAÇÃO NO 7º DIA PÓS-OPERATÓRIO.....	31
4.1.1	Força de ruptura e percentagem de área ocupada pelos colágenos dos tipos I e III	31
4.1.2	Local de rompimento dos corpos de prova.....	33
4.1.3	Variáveis histopatológicas gerais.....	34
4.2	AVALIAÇÃO NO 14º DIA PÓS-OPERATÓRIO.....	36
4.2.1	Força de ruptura e percentagem de área ocupada pelos colágenos dos tipos I e III.....	36
4.2.2	Local de rompimento dos corpos de prova.....	39
4.2.3	Variáveis histopatológicas gerais.....	39
4.3	AVALIAÇÃO NO 28º DIA PÓS-OPERATÓRIO.....	42
4.3.1	Força de ruptura e percentagem de área ocupada pelos colágenos dos tipos I e III.....	42
4.3.2	Local de rompimento dos corpos de prova.....	44
4.3.3	Variáveis histopatológicas gerais.....	46
5	DISCUSSÃO	48
5.1	SOBRE O MÉTODO.....	48

5.1.1	Escolha do animal de experimentação.....	48
5.1.2	Escolha do segmento intestinal e anastomose.....	49
5.1.3	Uso da nicotina.....	50
5.1.4	Tempo de aferição.....	52
5.1.5	Força de ruptura.....	53
5.1.6	Avaliação microscópica.....	54
5.2	SOBRE OS RESULTADOS	55
5.2.1	Aferição: Aspectos microscópicos.....	55
5.2.1.1	Processo inflamatório agudo.....	55
5.2.1.2	Processo inflamatório crônico.....	55
5.2.1.3	Proliferação fibroblástica.....	56
5.2.1.4	Deposição de colágeno.....	56
5.2.1.5	Re-epitelização.....	57
5.2.1.6	Porcentagem da área anastomótica ocupada pelos colágenos tipos I e III.....	57
5.2.2	Aferição: Análise da força de ruptura.....	59
5.2.3	Identificação do local de ruptura.....	60
5.3	CONSIDERAÇÕES GERAIS	61
5.3.1	Nicotina e cicatrização.....	61
6	CONCLUSÕES	64
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
	ANEXO	76

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	ADMINISTRAÇÃO DA NICOTINA SUB-CUTÂNEA NO DORSO DO ANIMAL.....	21
FIGURA 2	ANASTOMOSE INTESTINAL (A, B e C).....	23
FIGURA 3	ASPECTO FINAL DAS 2 ANASTOMOSES (setas).....	24
FIGURA 4	MÁQUINA DE TRAÇÃO UTILIZADA NO EXPERIMENTO.....	28
FIGURA 5	7 ^o DIA DA ANASTOMOSE PROXIMAL.....	35
FIGURA 6	14 ^o DIA DE ANASTOMOSE PROXIMAL.....	39
FIGURA 7	14 ^o DIA DE ANASTOMOSE PROXIMAL.....	40
FIGURA 8	14 ^o DIA DA ANASTOMOSE PROXIMAL.....	40
FIGURA 9	14 ^o DIA DA ANASTOMOSE PROXIMAL.....	41
FIGURA 10	14 ^o DIA DA ANASTOMOSE PROXIMAL.....	41
FIGURA 11	LOCAL DE ROMPIMENTO DOS CORPOS DE PROVA NO 28 ^o DIA DO PÓS-OPERATÓRIO (A, B, C, D e E).....	45

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	FORÇA DE RUPTURA E PERCENTAGEM DE ÁREA OCUPADA PELOS COLÁGENOS TIPOS I E III NO 7º DIA PÓS-OPERATÓRIO.....	31
TABELA 2	LOCAL DE ROMPIMENTO DOS CORPOS DE PROVA NO 7º DIA PÓS-OPERATÓRIO.....	33
TABELA 3	VARIÁVEIS HISTOPATOLÓGICAS GERAIS NO 7º DIA PÓS-OPERATÓRIO.....	34
TABELA 4	FORÇA DE RUPTURA E PERCENTAGEM DE ÁREA OCUPADA PELOS COLÁGENOS TIPOS I E III NO 14º DIA PÓS-OPERATÓRIO.....	36
TABELA 5	LOCAL DE ROMPIMENTO DOS CORPOS DE PROVA NO 14º DIA PÓS-OPERATÓRIO.....	39
TABELA 6	VARIÁVEIS HISTOPATOLÓGICAS GERAIS NO 14º DIA PÓS-OPERATÓRIO.....	39
TABELA 7	FORÇA DE RUPTURA E PERCENTAGEM DE ÁREA OCUPADA PELOS COLÁGENO TIPOS I E III NO 28º DIA PÓS-OPERATÓRIO.....	42
TABELA 8	LOCAL DE ROMPIMENTO DOS CORPOS DE PROVA NO 28º DIA PÓS-OPERATÓRIO.....	44
TABELA 9	VARIÁVEIS HISTOPATOLÓGICAS GERAIS NO 28º DIA PÓS-OPERATÓRIO.....	46

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1	VALORES MÉDIOS DA FORÇA DE RUPTURA NO 7º DIA PÓS-OPERATÓRIO.....	32
GRÁFICO 2	VALORES MÉDIOS DA PERCENTAGEM DE ÁREA OCUPADA PELO COLÁGENO TIPO III NO 7º DIA PÓS-OPERATÓRIO.....	32
GRÁFICO 3	VALORES MÉDIOS DA PERCENTAGEM DE ÁREA OCUPADA PELO COLÁGENO TIPO I NO 7º DIA PÓS-OPERATÓRIO.....	33
GRÁFICO 4	VALORES MÉDIOS DA FORÇA DE RUPTURA NO 14º DIA PÓS-OPERATÓRIO.....	37
GRÁFICO 5	VALORES MÉDIOS DA PERCENTAGEM DE ÁREA OCUPADA PELO COLÁGENO TIPO III NO 14º DIA PÓS-OPERATÓRIO.....	37
GRÁFICO 6	VALORES MÉDIOS DA PERCENTAGEM DE ÁREA OCUPADA PELO COLÁGENO TIPO I NO 14º DIA PÓS-OPERATÓRIO.....	38
GRÁFICO 7	VALORES MÉDIOS DA FORÇA DE RUPTURA NO 28º DIA PÓS-OPERATÓRIO.....	43
GRÁFICO 8	VALORES MÉDIOS DA PERCENTAGEM DE ÁREA OCUPADA PELO COLÁGENO TIPO III NO 28º DIA PÓS-OPERATÓRIO.....	43
GRÁFICO 9	VALORES MÉDIOS DA PERCENTAGEM DE ÁREA OCUPADA PELO COLÁGENO TIPO I NO 28º DIA PÓS-OPERATÓRIO.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS

g	= grama
mg	= miligrama
kg	= quilograma
ml	= mililitro
cm	= centímetro
kgf	= quilograma-força
mm	= milímetro
PDGF	= fator de crescimento derivado das plaquetas
µg	= micrograma
ng	= nanograma

RESUMO

Com o objetivo de conhecer o efeito da nicotina, o principal componente vasoativo do tabaco, sobre a produção de colágeno maduro e imaturo e sua possível interferência na força de ruptura em anastomoses do intestino delgado de ratos, um estudo experimental foi realizado. Utilizaram-se 60 ratos *Wistar*, divididos de maneira aleatória em grupos N e C, conforme o tratamento proposto. Cada grupo foi subdividido em 3 subgrupos, de acordo com o intervalo de tempo utilizado para a avaliação. No grupo N, composto por 30 animais, foi administrada nicotina subcutânea, na dose de 2mg por kg de peso do rato, diluída em 0,3ml de solução fisiológica a 0,9%, em 2 aplicações diárias; a droga foi utilizada por 28 dias prévios à cirurgia, apresentando continuidade por mais 7, 14 ou 28 dias, conforme o subgrupo do animal e o intervalo pós-cirúrgico da aferição. No grupo C, igualmente composto por 30 animais e que serviu de controle para o estudo, foi administrada solução fisiológica a 0,9% somente, nas mesmas condições e intervalos de tempo do uso de nicotina. Após 28 dias de uso da droga ou da solução controle, foram efetivadas 2 anastomoses do tipo término-terminal, no intestino delgado dos animais, localizadas a 10 e a 20cm da flexura duodeno-jejunal. Realizaram-se as aferições nos 7º, 14º e 28º dias de pós-operatório, quando foram submetidos à eutanásia 10 ratos de cada grupo. As anastomoses distais eram retiradas inicialmente, sendo encaminhadas à análise do local e força de ruptura através de uma máquina de tração computadorizada; as anastomoses proximais eram então retiradas e encaminhadas para análise histopatológica, através das técnicas de coloração pela hematoxilina - eosina e picrossirius-red F3BA, sendo avaliadas as variáveis processo inflamatório agudo, processo inflamatório crônico, proliferação fibroblástica, deposição de colágeno e percentagem de área ocupada pelos colágenos dos tipos I e III. Os resultados permitiram concluir que os animais que receberam a nicotina apresentaram, no 7º dia de pós-operatório, menor proliferação de fibroblastos e, no 28º dia após a operação, menor área ocupada pelo colágeno imaturo, além de uma menor força de ruptura das anastomoses, quando as variáveis foram comparadas às do grupo controle.

ABSTRACT

An experimental study was accomplished with the aim of knowing the effect of nicotine, the main vasoactive component of tobacco, on the production of collagen and its possible interference in the breaking strength of small intestine anastomosis in rats. Sixty Wistar rats were used, randomly divided to groups N and C, according to the proposed treatment. Each group was subdivided in 3 subgroups, according to the time interval used to the evaluation. To group N, composed of 30 animals, subcutaneous nicotine was administered in the dose of 2mg per kg rat body weight, diluted in 0,3ml of saline solution and divided in 2 daily applications; the drug was used during 28 days before the surgery, presenting continuity for more 7, 14 or 28 days, according to the subgroup of the animal and the pos-surgical interval of the evaluation. To group C, equally composed of 30 animals and which served to control of the study, only saline solution was administered, in the same conditions and time intervals of the nicotine use. After the administration of the drug or the control solution for 28 days, 2 end-to-end anastomosis were done, in the small intestine of the rats, located 10 and 20cm from the duodenum-jejunum transition. The evaluations were done in the 7th, 14th and 28th days after the surgery, when 10 animals of each group were being submitted to euthanasia. The distal anastomosis were initially removed, being submitted to the analysis of their rupture local and breaking strength through a computerized traction machine. The proximal anastomosis were then removed and taken to a histopathological analysis, stained with hematoxilin-eosin and picrosirius-red F3BA, being evaluated the variables acute inflammatory process, chronic inflammatory process, fibroblastic proliferation, collagen deposition and percentage of the area occupied by collagens types I and III. The results allowed the conclusion that the animals which received the nicotine presented, in the seventh day after the operation, smaller fibroblastic proliferation and, in the twenty-eighth day of post-surgical, a smaller area occupied by the immature collagen, besides a smaller breaking strength of the anastomosis, when the variables were compared to the ones from the control group.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A injúria tecidual atua como um gatilho que desencadeia a complexa cascata de eventos bioquímicos e celulares que deve levar à ferida cicatrizada. ORGILL e DEMLING (1988) e WITTE e BARBUL (1997) dividiram, para propósitos didáticos, a resposta cicatricial dos tecidos em 3 fases distintas, mas interdependentes: 1) fase inflamatória; 2) fase proliferativa e 3) fase de maturação.

UDENFRIEND (1966) citou a proteína colágeno como o mais importante componente do tecido conjuntivo dos mamíferos, perfazendo cerca de um terço do tecido protéico corpóreo dos mesmos e tendo os fibroblastos como suas principais células produtoras (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1995).

Já HALSTED, no ano de 1887, citado por DIETZ (1993), em estudo sobre anastomoses intestinais, postulou que a resistência mecânica do tubo digestivo está na dependência da camada colágena contida na tela submucosa.

Posteriores estudos de MADDEN e PEACOCK (1968), CARRICO, MEHRHOF e COHEN (1984) e de WITTE e BARBUL (1997) relataram a existência de correlação direta entre a quantidade de colágeno e a força mecânica do tecido cicatricial.

As injúrias intestinais, segundo DUNPHY (1970), somente deixaram de ser tratadas de maneira conservadora durante a primeira guerra mundial, ocorrendo então, de maneira dramática, o decréscimo da morbidade e da mortalidade dos pacientes, levando a intervenção cirúrgica no segmento intestinal a tornar-se procedimento corriqueiro na prática operatória.

A fístula intestinal é importante complicação passível de ocorrer após ressecções e anastomoses intestinais, seja por operações eletivas de diversas causas, seja por procedimentos emergenciais. O fato que a ressecção e anastomose do cólon é associada com importante incidência de fístula é bem documentado. Por outro lado, muito poucos dados são disponíveis sobre a taxa de fístulas pós-operatórias em intestino delgado (FRIED et al., 1984). Esses autores afirmaram que o mais importante fator na cicatrização de anastomoses intestinais é a presença de adequado montante de colágeno na submucosa.

Segundo HENDRIKS et al. (1985) mudanças no metabolismo do colágeno podem afetar a estabilidade da parede intestinal.

Com a crescente preocupação e o debate nacional sobre os efeitos deletérios do tabagismo no organismo humano, muita atenção tem sido dispendida às conseqüências médicas adversas do ato de fumar. Os custos relacionados com as doenças ligadas ao tabaco, diretos e indiretos, consomem consideráveis recursos destinados à área de saúde em nosso país. As neoplasias, doenças cardiovasculares e respiratórias associadas com o fumo são bem documentadas; menor atenção, entretanto, tem sido dispendida com as complicações cirúrgicas associadas com o cigarro (COSTA e SILVA,1990; SACHAR, GOEL e WEISS, 1998).

Embora os produtos derivados do tabaco sejam consumidos há muitos séculos, somente no século XX observou-se acentuado aumento no seu consumo. O cigarro, pela extensão de seu uso, é a forma mais importante de sua utilização .

HIJJAR e COSTA E SILVA (1991), em estudo epidemiológico sobre tabagismo, afirmaram que cerca de 25% da população adulta brasileira fuma, estando especialmente concentrados na faixa etária entre 20 e 49 anos de idade. Os autores relataram que o maior percentual de fumantes no Brasil encontra-se na região Sul (42% dos habitantes da região), estimando-se que, em nosso país, morrem a cada ano de 80 a 100 mil pessoas devido às doenças chamadas tabaco-relacionadas, o que corresponde a um em cada sete óbitos no Brasil.

A fumaça do cigarro contém mais de 5 mil componentes, mas os principais efeitos tóxicos do tabaco são atribuídos à presença de monóxido de carbono, óxido nítrico, amoníaco e nicotina (REUS et al.,1984; FORREST, PANG e LINDSAY, 1991), sendo a última considerada o principal motivo da dependência do fumante, pois reforça e potencializa a vontade de fumar (COSTA E SILVA,1990).

Em artigo de revisão FRICK e SEALS (1994) relataram que a nicotina é o principal componente vasoativo da fumaça do tabaco, sendo uma substância alcalóide, inodora e incolor que, quando inalada ou injetada, pode liberar catecolaminas e resultar em vasoconstrição e diminuição da perfusão tecidual.

MOSELY e FINSETH (1977) foram os autores que inicialmente relataram os efeitos deletérios da nicotina na cicatrização tissular, observando retardo no processo cicatricial de ferida na mão de um fumante. Diversos estudos clínicos e

experimentais têm, desde então, sido realizados para tentar explicar esses efeitos, demonstrando deficiências em vários fatores envolvidos na cicatrização de lesões em tabagistas, em áreas tão diversas como a cirurgia plástica (REES, LIVERETT e GUY, 1984) e a ortopedia (SHERWIN e GASTWIRTH, 1990).

Diversas pesquisas, tais como as de CHAMSON et al. (1980) e TIPTON e DABBOUS (1995) relataram inibição da proliferação de fibroblastos por ação direta da nicotina, sendo que esse último estudo também relatou diminuição da produção de colágeno.

MEDEIROS et al. (1999) concluíram, em estudo experimental pioneiro, que a administração de nicotina contribuiu para retardar a cicatrização de anastomoses intestinais em animais de experimentação; porém, são necessários novos estudos que confirmem ou não essa assertiva e que esclareçam seus possíveis mecanismos.

1.1 OBJETIVO

O objetivo do presente estudo é avaliar, experimentalmente, a influência da nicotina no processo cicatricial de anastomoses do intestino delgado de ratos, em relação aos seguintes aspectos :

1. alterações histológicas gerais;
2. quantidade de colágeno maduro e imaturo;
3. força de ruptura.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 PROCESSO CICATRICIAL

O processo de cicatrização pode ser definido como a complexa sequência de eventos pelos quais uma injúria tecidual é reparada, resultando em regeneração celular e reorganização do tecido mesodérmico (ORGILL e DEMLING, 1988).

WITTE e BARBUL (1997) relataram em seu estudo de revisão sobre cicatrização de feridas que, para propósitos didáticos, o processo cicatricial pode ser dividido em 3 fases inter-relacionadas, sobrepostas entre si:

a) Fase Inflamatória : ocorre do momento da lesão até o 4^o 5^o dia, sendo caracterizada pelo aumento da permeabilidade vascular, quimiotaxia celular da circulação para o sítio da injúria e ainda liberação local de mediadores químicos e fatores de crescimento .

A hemostasia precede a inflamação; a ruptura de vasos pela lesão expõe o colágeno subendotelial às plaquetas, resultando na agregação delas e na ativação da porção intrínseca da cascata da coagulação. Esse contato e a presença da trombina resulta na liberação de mediadores químicos chamados citocinas (como tromboxano A2 e interleucina 1) e fatores de crescimento, tal como o fator de crescimento derivado das plaquetas ou *PDGF*. Esses mediadores químicos levam a um aumento da permeabilidade vascular, liberação de prostaglandinas e ao estímulo à migração de neutrófilos para o sítio da injúria, além de estimularem a multiplicação de fibroblastos.

Na revisão sobre o processo cicatricial, ORGILL e DEMLING (1988) descrevem a ação dos neutrófilos na fagocitose de possíveis micro-organismos presentes, bem como na lise de tecido desvitalizado. Essas células apresentam vida curta, sobrevivendo somente por poucas horas após a agressão. Ainda segundo o mesmo estudo, os linfócitos são as próximas células a serem atraídas para o sítio injuriado, sendo que seu papel na cicatrização ainda não foi completamente elucidado; porém, sabe-se que estas células liberam mediadores químicos chamados de linfocinas, os quais apresentam poder de quimiotaxia para os fibroblastos.

Os macrófagos são atraídos em seguida por mediadores tais como produtos de degradação da fibrina, fatores plaquetários e linfocinas, sendo oriundos do próprio tecido ou da diferenciação de monócitos circulantes e são considerados as células mais importantes da reação inflamatória que inicia a orquestração do processo cicatricial como um todo.

b) Fase Proliferativa: Inicia-se em torno do 4^o dia e persiste até aproximadamente o 14^o dia.

De acordo com a revisão de ORGILL e DEMLING (1988), essa fase envolve 3 processos-chaves: angiogênese, proliferação fibroblástica e reepitelização. A área da injúria é isquêmica e a cicatrização não será efetiva, até que suficiente fluxo sanguíneo seja restaurado.

Os macrófagos produzem o chamado fator de angiogênese, que é quimiotático para células mesoteliais e do endotélio vascular, assim como o *PDGF* liberado pelas plaquetas; assim inicia-se o processo de neo-vascularização. Se as margens da ferida estão aproximadas, os capilares podem atravessá-las, formando verdadeiras pontes.

Os fibroblastos constituem elementos cruciais na cicatrização e restauração tissular, sendo as células mais comuns no tecido conjuntivo e os principais produtores de colágeno (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1995).

Em 1978 WAHL, WAHL e Mc CARTHY, realizaram estudo introduzindo linfócitos T em culturas de fibroblastos provenientes da pele de porcos da Guiné, obtendo significativo aumento tanto no número das citadas células quanto na produção de colágeno.

NEILSON, PHILIPS e JIMENEZ (1982), em estudo *in vitro*, utilizando linfócitos T e fibroblastos de ratos, concluíram que as linfocinas podem modular a proliferação fibroblástica, estimulando-a ou inibindo-a, conforme a necessidade.

c) Fase de Maturação: Inicia-se classicamente em torno do início da 2^a semana pós-lesão, tendo como característica principal a deposição de colágeno no sítio da injúria. Do ponto de vista clínico é a fase mais importante da cicatrização, porque a quantidade e a qualidade dessa proteína determinará a força mecânica do tecido remodelado (WITTE e BARBUL, 1997).

Segundo UDEFRIEND (1966) e JUNQUEIRA e CARNEIRO (1995), a proteína colágena é a mais abundante do corpo dos mamíferos, representando 30% do total das proteínas do organismo humano, sendo portanto o principal componente do tecido conjuntivo. Apesar de ser uma molécula complexa, o colágeno apresenta composição bem característica, sendo formada por uma seqüência de 3 aminoácidos: a glicina aparece na proporção de 33,5%, enquanto a prolina e a hidroxiprolina estão presentes na proporção de 12% e 10%, respectivamente.

A molécula de colágeno é formada por 3 cadeias polipeptídicas configuradas em hélice e unidas por pontes de hidrogênio, denominadas cadeias alfa, sendo cada uma delas codificada por um gene, o que dá origem a diversos tipos dessa proteína; cada cadeia alfa é formada por cerca de 1000 aminoácidos (PROCKOP et al., 1979).

Das quase 2 dezenas de tipos de colágeno já descritos, o chamado colágeno tipo I (sintetizado pelos fibroblastos), é o mais freqüente, perfazendo 90% da proteína colágena do corpo dos mamíferos; o colágeno tipo III freqüentemente está associado ao tipo I e também é sintetizado pelos fibroblastos (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1995). Esse último é depositado cedo no tecido em cicatrização e caracteriza um colágeno imaturo; mais tarde, com a remodelação surge o tipo I, de características maduras (CRONIN, JACKSON e DUNPHY, 1968; WITTE e BARBUL, 1997).

Segundo estudo de revisão realizado por KIVIRIKKO e RISTELI (1976), a produção celular do colágeno passa por uma série de etapas, quais sejam: 1) síntese do RNA mensageiro para cada tipo de cadeia alfa; 2) hidroxilação de resíduos de prolil e lisil em hidroxiprolina e hidroxilisina; 3) glicosilação da hidroxilisina, com formação da molécula de procolágeno, que contém os chamados peptídeos de registro (determinam o alinhamento das cadeias protéicas em grupos de 3), o que ocorre no Retículo Endoplasmático Rugoso; 4) o procolágeno é transportado até o complexo de Golgi e daí ao meio extracelular, onde perde os peptídeos de registro, originando as chamadas moléculas de tropocolágeno, que se polimerizam para formar as fibras colágenas. Segundo o mesmo estudo a força mecânica do tecido cicatricial é dependente da interligação das moléculas do colágeno.

A degradação do colágeno é mediada pela enzima colagenase, por sua vez regulada por citocinas (WITTE e BARBUL, 1997).

Já no estudo de HALSTED, em 1887, sobre anastomoses intestinais, citado por DIETZ (1993), o autor postulou que a resistência mecânica do tubo digestivo está na dependência da camada colágena contida na submucosa.

HOWES, SOOY e HARVEY (1929) foram considerados por DUNPHY (1970) os precursores da moderna era de estudos biológicos da cicatrização do trato gastrointestinal, sendo os primeiros a utilizar a força mecânica da anastomose como medida da fibroplasia.

A maior parte das pesquisas sobre o comportamento do colágeno após injúria no aparelho digestório foram realizadas no cólon, pois a incidência de fístulas no intestino delgado é estatisticamente menor do que no intestino grosso (WISE et al., 1975).

IRVIN e GOLIGHER (1973) realizaram estudo retrospectivo de 203 casos de pacientes submetidos a ressecção e anastomose término-terminal em todos os segmentos do intestino. Desses, 16 casos referiam-se a cirurgias no intestino delgado, com achado de 2 fístulas pós-operatórias (13%). Os autores destacaram como principais fatores predisponentes para a ocorrência de fístulas intestinais a tensão na linha de sutura, anastomose em tecido sem adequado aporte sanguíneo, contaminação local e desnutrição .

WISE et al. (1975) realizaram estudo experimental comparativo entre anastomoses no íleo e cólon distais, levadas a cabo em 29 cães. Concluíram que ocorrem grandes diferenças entre a quantidade de colágeno existente nas várias camadas do intestino, possuindo a submucosa 10 vezes maior concentração dessa proteína do que a mucosa ou serosa; também concluíram que há melhor resposta do colágeno no intestino delgado em comparação com o cólon, apresentando ele menor taxa de destruição do colágeno nos primeiros 8 dias e reposição mais rápida após este tempo.

FRIED et al. (1984), em novo estudo comparativo entre anastomoses ileais e colônicas, desta vez em 72 coelhos, concluíram que a perda de colágeno após anastomoses no intestino delgado é menos extensa e mais rapidamente restaurada, ocorrendo somente na área da sutura, enquanto no cólon ocorre em áreas acima e abaixo dessa área. Em sua discussão afirmaram que o fator mais importante na

cicatrização de anastomoses intestinais é a presença de adequado montante de colágeno, simplificando o processo de cicatrização como um balanço entre a síntese e a lise dessa proteína.

Segundo DIETZ (1993), durante o reparo cicatricial de uma lesão do canal alimentar, grandes quantidades de colágeno pré-existente são destruídas e repostas por colágeno neo-sintetizado. Assim, forma-se ao nível da cicatriz um novo tecido conjuntivo na tela submucosa, o qual adquire resistência tênsil inicial à medida que é produzido o colágeno e, posteriormente, à medida que as fibras colágenas são reordenadas.

2.2 TABAGISMO E NICOTINA

A afirmação da Organização Mundial da Saúde de que o tabaco é a droga mais comumente utilizada e amplamente disseminada no mundo atual e que morrem 2,5 milhões de pessoas por ano, como conseqüência do hábito de fumar, aliada às estimativas de que no Brasil devam morrer anualmente de 80 a 100 mil pessoas em decorrência das doenças relacionadas ao tabaco nos dá a dimensão da importância da epidemia tabágica, no mundo e particularmente em nosso meio (HIJJAR e COSTA e SILVA, 1991).

Em seu estudo de revisão sobre o problema do tabagismo na saúde pública brasileira, COSTA E SILVA (1990) relatou que, quando Cabral chegou ao Brasil no século XV, encontrou nativos aspirando fumaça de rolos feitos de folhas, os quais faziam parte do ritual mágico-religioso dos ameríndios, sendo relatado seu uso para fins medicinais. Segundo estudos antropológicos, data de 1000 aC o uso do tabaco pelos astecas, no México.

No Brasil, nas escavações da Lagoa Santa, em Minas Gerais, foram encontrados cachimbos que se supõem datados de 10 mil anos atrás. A disseminação da planta do tabaco (*Nicotiana tabacum*) ocorreu pela troca das suas folhas por outros gêneros, passando então os portugueses a levá-la para a Europa, onde o produto se popularizou pelas mãos de JEAN NICOT, arquivista do rei da França em missão diplomática em Portugal, que levou o produto para curar as dores de cabeça da rainha francesa. Neste período, o fumo foi utilizado como

medicamento, havendo relato de 59 doenças que seriam curadas pelo seu uso. Ainda segundo a autora, seguiu-se a esta época de introdução do tabaco na Europa 4 fases de sua utilização:

1ª fase - Século XVII surge o cachimbo e se acentua o uso do tabaco pela alta sociedade;

2ª fase - Século XVIII o tabaco é utilizado também sob a forma de rapé. O uso de escarradeiras é disseminado, mesmo em hospitais;

3ª fase - Século XIX surge o charuto;

4ª fase - Século XX surgem os cigarros. O uso se dissemina ainda mais devido a industrialização e propaganda.

A fumaça do cigarro é um complexo aerossol composto por substâncias particuladas como o alcatrão e substâncias fenólicas; bases nitrogenadas como a nicotina e a piridina; ácidos voláteis e componentes gasosos, incluindo monóxido de carbono e óxido nítrico (REUS et al.,1984; COSTA e SILVA, 1990; FORREST, PANG e LINDSAY, 1991).

A nicotina tornou-se conhecida em estado impuro desde a introdução da planta na Europa, na metade do século XVI.

FLETCHER (1941), em revisão histórica sobre a nicotina, relatou que sua primeira referência na literatura ocorreu em 1572, em estudo de JACQUES GOHORY, francês discípulo de PARACELUSUS.

Após diversas tentativas frustradas de sintetizar em laboratório a nicotina, somente em 1843 MELSEUS chegou à fórmula correta da droga e no ano de 1904 o suíço AMÉ PICTET finalmente obteve sucesso.

BENOWITZ (1986) realizou estudo de revisão sobre a farmacologia da nicotina, relatando que, após sua absorção, a droga é difundida rapidamente, especialmente para o cérebro, sendo em seguida metabolizada primariamente no fígado mas também, em menor extensão, nos pulmões e rins; seus maiores metabólitos são a cotinina e o óxido-n-nicotínico e nenhum deles parece ser ativo. O autor continua sua revisão relatando os efeitos cardiovasculares da nicotina, tais como o aumento do fluxo cardíaco e a vasoconstrição periférica, em decorrência do aumento do nível de catecolaminas circulantes, por estimulação direta da nicotina nas supra-renais e gânglios simpáticos periféricos, efeito inicialmente descrito por WATTS (1960).

2.3 NICOTINA E CICATRIZAÇÃO

NEHER (1974) estudou culturas de linfócitos periféricos que foram estimulados a multiplicarem-se com fitohemaglutinina; nicotina foi então adicionada a essas culturas e a multiplicação celular foi comparada a linfócitos que não receberam a droga, 3 dias após. Nas culturas com adição de nicotina a multiplicação celular mostrou-se 6-7% menor do que as culturas livres da droga, o que foi estatisticamente significativo. Concluiu que a nicotina inibe a proliferação de linfócitos periféricos humanos *in vitro*.

RICHARDSON, MORTON e HOWARD (1977) realizaram estudo experimental em 20 ratos machos *Sprague-Dawley*, pesquisando os efeitos da administração da nicotina sobre a velocidade dos eritrócitos nos capilares mesentéricos. Os animais foram divididos em 2 grupos de 10. O primeiro grupo foi submetido à administração de nicotina na dosagem de 20µg por ml, diluída em água para beber, oferecida *ad libitum* e por um período de 15 semanas. O segundo grupo recebeu somente água. No final desse tempo foram aferidas a pressão arterial sistêmica e a velocidade dos eritrócitos nos capilares do mesentério. A diferença da pressão arterial sistêmica entre os 2 grupos não foi significativa, mas a velocidade dos glóbulos vermelhos foi significativamente menor nos capilares mesentéricos do grupo submetido à nicotina, em relação ao grupo controle. Os autores concluíram que a administração de nicotina provoca diminuição da velocidade do fluxo sanguíneo capilar mesentérico, em ratos.

Em 1977, MOSELY e FINSETH foram os primeiros a relacionar a dificuldade de cicatrização de uma lesão traumática na mão de paciente com 50 anos de idade e o fato dele ser tabagista. Relataram que a vasoconstrição associada à nicotina e a conseqüente diminuição da oxigenação local poderia ser causa de problemas no processo cicatricial. A lesão cicatrizou somente 12 semanas após o paciente ter cessado o seu hábito de fumar.

MOSELY, FINSETH e GOODY (1978) utilizaram experimentalmente 10 coelhos recebendo nicotina por via intraperitoneal, 2mg por kg de peso, duas vezes ao dia, por 5 dias no pré-operatório e por 21 dias após a operação. Foram realizadas lesões cutâneas na orelha dos animais, de maneira padronizada, e a análise da cicatrização foi efetivada medindo-se macroscopicamente o tecido cruento a cada 2

dias, desde o trauma até o 21º dia de evolução. Os resultados foram comparados com 10 animais controle, que receberam placebo pelo mesmo período. Os autores chegaram a conclusão de que a nicotina retardou a cicatrização no período do 6º ao 10º dia. As feridas cicatrizaram de maneira igual antes e após este período.

CHAMSON, FREY e HIVERT (1982) efetivaram pesquisa sobre os efeitos do extrato de tabaco na síntese de colágeno oriundo de culturas de fibroblastos. As células utilizadas eram originárias da pele humana, sendo as culturas experimentais mantidas em contato com extrato de tabaco apresentando concentração de nicotina de 35 n mol/ml. Foram realizadas dosagens de colágeno e determinados os seus tipos. As aferições foram realizadas nos dias 1, 3, 5, 6, 9, 12, 13, 16 e 18 após o início das culturas. Os resultados demonstraram aumento global na taxa de síntese do colágeno, mas diminuição de cerca de 50% nos níveis de colágeno tipo III, quando comparadas a culturas controle.

Em pesquisa realizada em 12 fumantes crônicos e 12 não tabagistas, NADLER, VELASCO e HORTON (1983) mediram a prostaciclina PGI₂, na urina. A dosagem foi realizada nos tabagistas após fumarem por 4 horas, uma unidade por hora, cigarros com alto teor de nicotina (mais do que 1mg por unidade). Nos fumantes crônicos houve significativa redução de PGI₂ na urina, sugerindo que a produção de prostaglandinas seja inibida pela nicotina.

RENAUD et al. (1984) mediram a taxa de agregação plaquetária em 10 tabagistas, 10 minutos antes e 10 minutos após fumarem cigarros com variadas concentrações de nicotina. Houve significativo aumento na agregação plaquetária quando foram utilizadas concentrações da droga entre 0,58 e 1,44mg.

REES, LIVERETT e GUY (1984) divulgaram estudo retrospectivo analisando 1186 pacientes submetidos de maneira consecutiva à cirurgia plástica facial (Ritidoplastia). Todos os pacientes foram operados pela mesma equipe médica, com somente algumas pequenas variantes na técnica cirúrgica. Chegaram à conclusão de que os fumantes tem 12,46 vezes mais chances de sofrer isquemia local e complicações no processo cicatricial do que os operados não fumantes. Recomendaram empiricamente que os pacientes cessem o tabagismo pelo menos por 10 dias antes e 3 semanas após o procedimento cirúrgico.

LAWRENCE et al. (1984) divulgaram estudo experimental no qual realizaram retalhos pediculados, tipo *Mc Farlane*, no dorso de 18 ratos. Dez animais foram submetidos à fumaça de 25 cigarros por dia, de maneira intermitente, durante 7 dias no pós-operatório, quando então a viabilidade do retalho foi avaliada. A taxa de viabilidade dos retalhos realizados nos animais do grupo controle (expostos somente ao ar ambiente) foi de 75,2% , enquanto a mesma foi de 40,1% nos ratos expostos à fumaça do cigarro, o que foi estatisticamente significativo. Concluíram que o uso do cigarro no período pós-operatório é prejudicial a viabilidade de retalhos pediculados, na amostra estudada.

Em uma série de 3 estudos publicados em 1985, os efeitos do tabagismo na viabilidade de retalhos cutâneos continuaram a ser estudados:

NOLAN et al. (1985) realizaram estudo semelhante ao último citado, utilizando uma amostra maior (344 ratos *Fischer*) e o mesmo modelo experimental. Concluíram que , nos animais que foram expostos à fumaça do cigarro, a taxa de necrose dos retalhos foi de 78%, enquanto a dos não expostos foi de 56%. A diferença foi estatisticamente significativa.

Ainda no mesmo ano, CRAIG e REES (1985) realizaram estudo experimental em 3 grupos de 10 hamsters. O primeiro grupo foi utilizado como controle; o segundo foi submetido à administração da fumaça do cigarro, em máquina produtora da mesma, por um período de 6 semanas anteriores à operação, mas não no pós-operatório. O terceiro, submetido ao contato com a fumaça do cigarro por 6 semanas antes e 2 semanas após a operação. Foi realizado no dorso de todos os animais um retalho cutâneo padronizado e a análise ocorreu após 2 semanas . Todos os retalhos do primeiro grupo tornaram-se viáveis e sem necrose; 2 dos 10 do segundo grupo apresentaram necrose terminal e 6 dos 10 retalhos realizados no terceiro grupo apresentaram essa alteração. Os autores concluíram que a inalação da fumaça do cigarro no período pré e pós-operatórios causa efeitos adversos na cicatrização de retalhos cutâneos em hamsters.

Finalmente FORREST, PANG e LINDSAY (1985) divulgaram estudo experimental, utilizando pela primeira vez a administração subcutânea de várias concentrações de nicotina (2, 4 ou 8mg por kg de peso ao dia, divididas em 2 aplicações), em 80 ratos *Sprague-Dawley*. A administração foi realizada por 4 semanas, quando então foram realizados retalhos cutâneos padronizados no dorso

dos animais. A análise foi realizada 6 horas após a operação e comparada com animais controle. Concluíram que o tamanho da área viável foi significativamente menor nos ratos tratados com nicotina.

Em novo estudo experimental, FORREST, PANG, e LINDSAY (1987) administraram nicotina por via subcutânea, nas mesmas concentrações e número de doses diárias do trabalho anterior, em ratos *Sprague-Dawley*. Em seu primeiro experimento, 80 animais foram divididos em 5 grupos de 16; 4 grupos receberam nicotina nas doses relatadas, por 4 semanas, quando foi realizado retalho cutâneo padrão no dorso e por mais 1 semana no pós-operatório, sendo a avaliação efetivada e comparada com o grupo controle. Os resultados demonstraram diminuição significativa da área de retalho viável a partir da dose de 2mg por kg, 2 vezes ao dia. No segundo experimento, o mesmo procedimento foi adotado, porém a administração de nicotina foi iniciada somente 2 semanas antes da operação. Não foi encontrada diferença significativa na área viável dos retalhos entre o grupo controle e os grupos experimentais. Concluíram que os efeitos deletérios da nicotina são tempo e dose dependentes, pois eles só foram identificados em doses iguais ou superiores a 2mg por kg, em 2 doses diárias e em período pré-operatório maior do que 2 semanas.

Os pesquisadores FORREST, PANG e LINDSAY (1991) publicaram novo trabalho experimental com o objetivo de estudar os efeitos da administração de nicotina, por um período prolongado, na viabilidade de retalhos cutâneos em ratos. Utilizaram baixa dose da droga (0,6mg por kg, via subcutânea, 2 vezes ao dia), administrada por 24 semanas pré-operatoriamente, em 2 grupos de 15 ratos cada (um terceiro grupo de 15 animais recebeu solução fisiológica a 0,9% e serviu como controle). Após esse período foram realizados retalhos cutâneos padronizados no dorso dos animais controle e no primeiro grupo. Nestes últimos, a administração de nicotina continuou por mais 7 dias, quando então ocorreu a eutanásia e a avaliação pós-operatória. No segundo grupo experimental, a administração da droga cessou após as 24 semanas e a operação foi realizada somente 2 semanas após. O primeiro grupo apresentou diminuição significativa da área viável do retalho, quando comparado com o grupo controle; já o segundo não apresentou diferença estatisticamente importante, em comparação com os controles. Concluíram os autores que a administração de nicotina por tempo prolongado influenciou

negativamente na viabilidade de retalhos cutâneos em ratos, que esses efeitos são reversíveis após 2 semanas de interrupção na administração da substância e que os efeitos deletérios da administração a longo prazo foram similares aos encontrados quando a nicotina foi utilizada em altas doses por um período curto (2mg por kg, 2 vezes ao dia, por 4 semanas).

FRICK e SEALS (1994) divulgaram estudo de revisão sobre a influência do tabagismo na cicatrização de lesões, relatando que, apesar das controvérsias quanto ao mecanismo de ação, existe consenso de que o cigarro dificulta o processo cicatricial normal das feridas.

TIPTON e DABBOUS (1995) utilizaram culturas de fibroblastos oriundos da gengiva sadia de um indivíduo na qual foi adicionada nicotina nas concentrações entre 0,001% e 0,05% (comparáveis aos níveis medidos na saliva de fumantes crônicos). Foram pesquisadas as possíveis alterações na proliferação celular e na produção de colágeno tipo I, sendo comparadas às culturas controle. Os resultados mostraram que, nas concentrações da droga entre 0,05% e 0,075% houve intensa vacuolização dos fibroblastos; todas as concentrações testadas da nicotina causaram significativa inibição da proliferação fibroblástica, cuja intensidade se mostrou dose-dependente; na concentração de nicotina de 0,05% somente a produção de colágeno tipo I foi significativamente inibida e finalmente concentrações testadas da droga iguais ou superiores a 0,075% causaram aumento significativo na atividade da colagenase. O estudo da proliferação dos fibroblastos deu-se após 24 horas de incubação a 37 graus Celsius; a pesquisa da produção de colágeno e da atividade da colagenase ocorreu após 6 dias de incubação. Os autores concluíram que, *in vitro*, a nicotina inibe a proliferação de fibroblastos gengivais humanos, bem como a produção originária dessas células de colágeno tipo I, enquanto aumenta a lise dessa proteína pelo aumento da atividade da colagenase.

GIANNOPOULOU, GEINOZ e CIMASONI (1999) realizaram estudo onde examinaram os efeitos *in vitro* da nicotina na proliferação e quimiotaxia de culturas de fibroblastos oriundos da cavidade bucal de 5 voluntários. As concentrações de nicotina variaram entre 5ng/ml a 250µg/ml, ocorrendo o estudo após 1, 3, 6, 24 e 48 horas de incubação, sendo os dados obtidos comparados com culturas controle, sem o uso da droga. As células foram examinadas morfológicamente, encontrando-se intensa vacuolização nas concentrações de 1µg e 2µg. O grau de inibição na

proliferação fibroblástica variou de 92% (concentração de 2µg/ml) a 0% (5ng/ml). Houve inibição dose-dependente da migração celular, que variou de 15% com a mais baixa concentração de nicotina (50ng/ml), até quase 90% com a mais alta (5µg/ml). Os autores concluíram que a nicotina inibe a proliferação e a quimiotaxia de fibroblastos periodontais *in vitro*.

MEDEIROS et al. (1999) realizaram estudo experimental utilizando 17 ratos *Wistar*, divididos em grupo I (n=9) e grupo II (n=8). O grupo I recebeu implante subcutâneo de disco contendo nicotina na dose de 5 mg por Kg de peso, em dias alternados e por 17 dias. No grupo II foi utilizado disco placebo, pelo mesmo período. Após o sétimo dia da aplicação dos discos, os animais foram submetidos à secção transversa de alça jejunal a 5 cm da transição duodeno-jejunal e, em seguida, à anastomose término-terminal com fio de polipropileno 6-0, em pontos simples separados, plano único. Completados 10 dias de observação pós-operatória com o uso da droga, provocou-se a eutanásia dos animais e foi realizada a retirada da alça intestinal anastomosada. Após 48 horas de fixação em formol elas foram processadas através de coloração pela hematoxilina e eosina para estudo em microscopia óptica. As lâminas foram examinadas com o objetivo de quantificar os achados de acordo com o método de MYERS, POSTLETHWAIT e SMITH (1961). Os resultados demonstraram que, no grupo I, os dados histopatológicos atingiram o escore 135 e o grupo II chegou ao escore 218, de acordo com o referido método. Com esse resultado concluiu-se que a nicotina, aplicada no subcutâneo de ratos, provocou alterações significativas na cicatrização das anastomoses intestinais; a reação inflamatória mostrou-se mais intensa e a quantidade de colágeno foi particularmente menor no grupo que fez uso da droga.

Devido a escassa literatura disponível sobre o efeito da nicotina no processo cicatricial do trato gastro-intestinal, bem como seu possível mecanismo de ação, este estudo foi levado a cabo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

Aplicaram-se nesse trabalho as Normas para Apresentação de Documentos Científicos da Universidade Federal do Paraná (2000). Utilizou-se a *Nomina Anatomica Veterinaria* (1975). Os procedimentos experimentais foram realizados no Centro de Pesquisas Cirúrgicas do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná e no Instituto Tecnológico do Laboratório Central de Pesquisa e Desenvolvimento do Paraná-LACTEC.

3.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Utilizaram-se para a realização do presente experimento 60 ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia*), *Wistar*, com idade variando de 160 a 200 dias (média de 180 dias) e procedentes do Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR). O peso deles esteve entre 270 e 290g.

3.2 AMBIENTE DE EXPERIMENTAÇÃO

Os animais foram alojados em grupos de 5, 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. Os ratos foram alimentados com ração própria para a espécie (Nuvilab CR1, Nuvital, Colombo, PR) e tiveram livre acesso à água durante todo o experimento.

3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os ratos foram divididos, de maneira aleatória, em 2 grupos: Grupo N, com 30 animais, para serem submetidos à aplicação de nicotina e Grupo C, com 30 animais, para submeterem-se à aplicação de solução fisiológica a 0,9%; cada grupo

foi, por sua vez, dividido em 3 subgrupos, contendo 10 ratos cada. Denominaram-se eles por N7, N14 , N28, C7, C14 e C28, segundo o tempo de avaliação pós-operatória.

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*), por via subcutânea (figura 1) e na dosagem de 2mg por Kg de peso, 2 vezes ao dia (12/12 horas), diluída em 0,3ml de solução fisiológica a 0,9% e ajustada para pH 7,4, por um período inicial de 28 dias prévios ao procedimento cirúrgico.

Nos animais do grupo C foi aplicada solução fisiológica a 0,9%, no volume de 0,3ml, 2 vezes ao dia (12/12 horas), por via subcutânea e sendo ajustada para pH 7,4. O período de administração foi o mesmo da nicotina. As citadas soluções foram administradas na região dorsal do animal, utilizando-se agulha 13 x 4,5. Os ratos foram pesados semanalmente e a dose de nicotina ajustada, quando necessário.

FIGURA 1 - ADMINISTRAÇÃO DA NICOTINA SUBCUTÂNEA NO DORSO DO ANIMAL



3.4.2 Preparo e procedimento operatório

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

3.4.3 Anestesia

Os ratos receberam indução anestésica inalatória com éter sulfúrico (Éter, Farmácia Magistral, Curitiba, PR), em campânula fechada, considerando-se os animais anestesiados quando eles se apresentavam sem reação ao manuseio. Após isto foram mantidos com o mesmo anestésico em sistema aberto. 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 do animal, assim como a data da operação.

3.4.4 Preparo da pele e posicionamento na mesa operatória

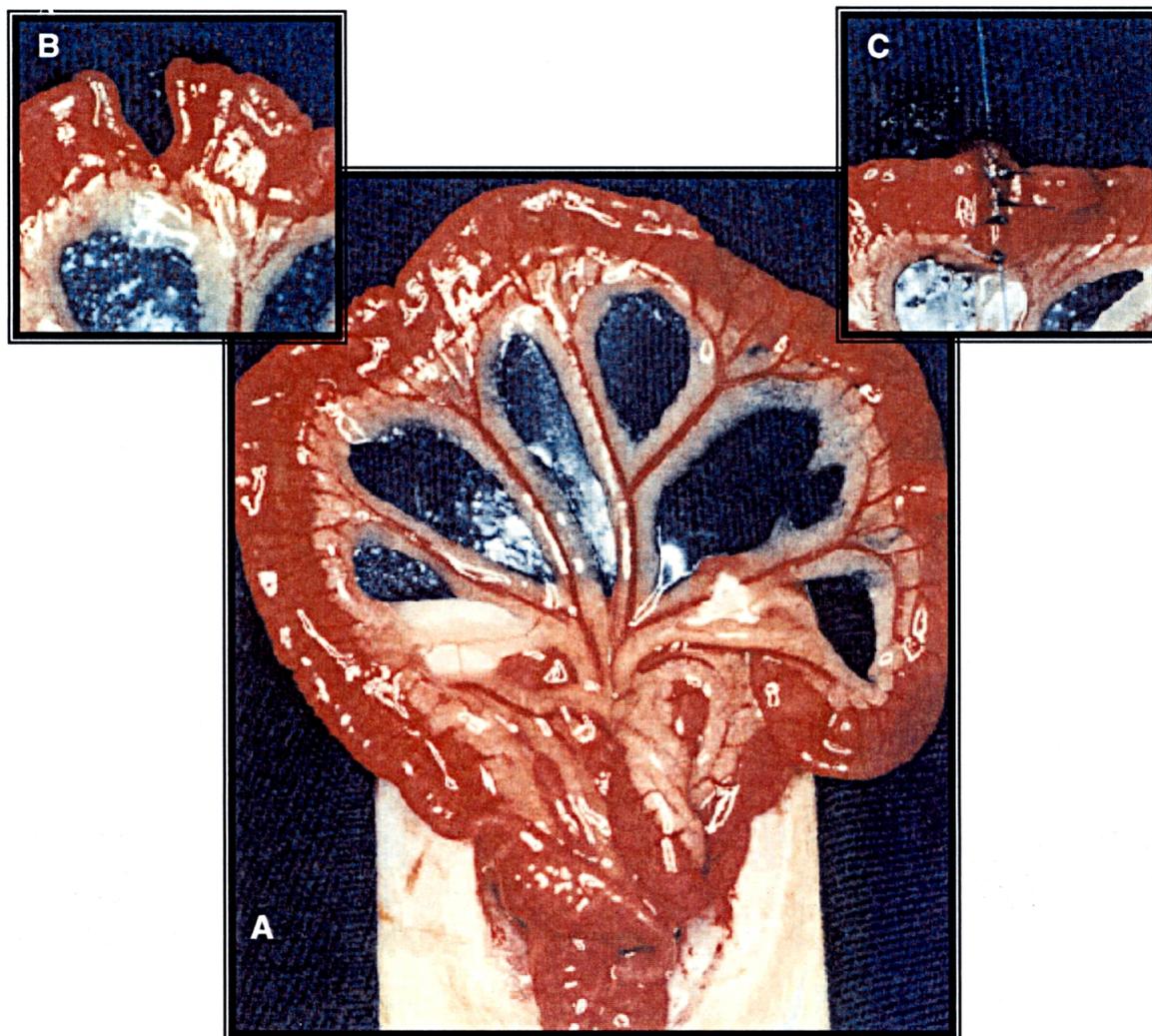
Procedeu-se à tricotomia da parede abdominal ventral. Em seguida, à fixação do animal, com fita adesiva, na prancheta cirúrgica, em posição de decúbito dorsal e mantendo-se seus membros em extensão. Realizou-se então a antissepsia tóraco-abdominal com solução de polivinilpirrolidona-iodo a 10% e a delimitação do abdômen com campos cirúrgicos esterilizados.

3.4.5 Procedimento operatório

Realizou-se uma incisão mediana de 4 cm de extensão, com bisturi de lâmina 15, iniciando-se ao término do processo xifóide e dirigindo-se em sentido caudal, interessando todos os planos da parede abdominal ventral. Obteve-se assim o acesso operatório à cavidade peritoneal. Em seguida pesquisaram-se os segmentos de intestino delgado a serem abordados, comuns a todos os animais, identificando-se inicialmente alça intestinal a 10 cm da flexura duodeno-jejunal. Realizou-se então uma secção transversal desta e, à seguir, a anastomose término-terminal, empregando-se fio monofilamentar de polipropileno 6-0 (agulha 3/8), em plano único de sutura, com pontos totais separados, fechados com 4 seminós, em um total de 8 pontos (figura 2). Em seguida isolou-se outro segmento de intestino delgado, 10cm distalmente à primeira anastomose e realizou-se idêntico procedimento utilizado na construção da anastomose proximal (figura 3). As anastomoses foram protegidas com gaze estéril úmida, para provocar menor trauma na alça intestinal. À seguir devolveu-se o intestino à sua posição normal na cavidade abdominal. A parede do abdômem foi suturada com 2 planos de sutura, em chuleio contínuo; o primeiro, peritônio-músculo-aponeurótico e o segundo, o da pele; utilizou-se para tanto fio

multifilar de poliglactina 3-0. Manteve-se técnica asséptica durante todo o procedimento relatado.

FIGURA 2 – ANASTOMOSE INTESTINAL (A, B e C)

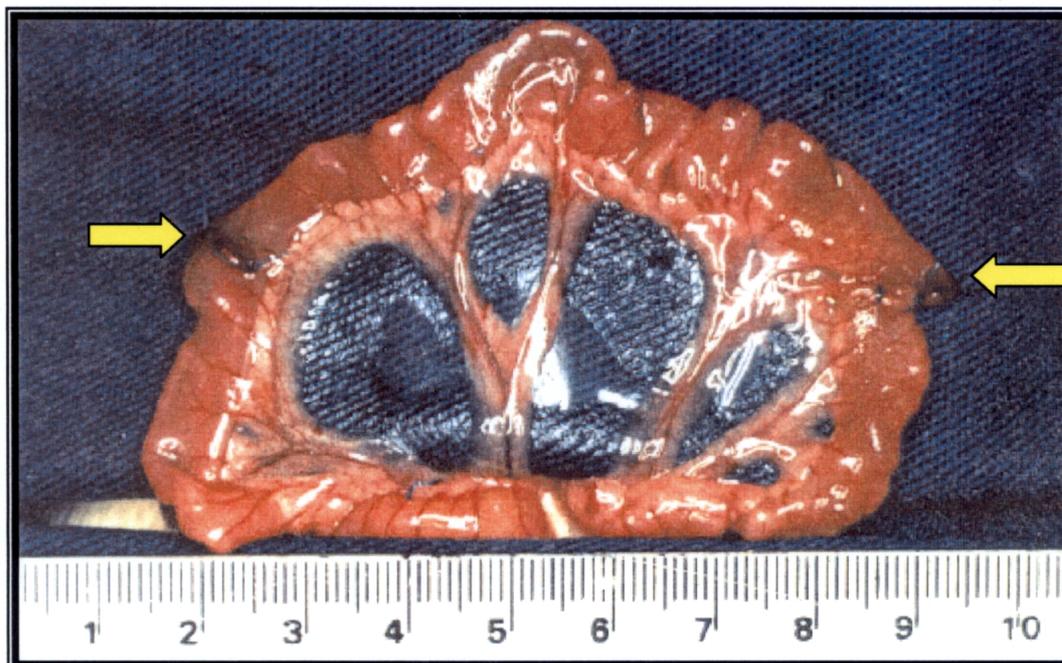


A – segmento intestinal isolado

B – enterostomia

C – resultado final da anastomose intestinal

FIGURA 3 – ASPECTO FINAL DAS 2 ANASTOMOSES (setas)



3.4.6 Pós-operatório

Os animais foram transferidos para gaiolas próprias, identificadas com grupo e subgrupo, para acompanhamento pós-operatório e observados até a recuperação de sua atividade motora normal, quando eram transferidos para as gaiolas originais, previamente identificadas e nas mesmas condições ambientais do período pré-operatório.

Os ratos receberam livre acesso à água imediatamente e à ração 12 horas após o procedimento operatório.

A administração de nicotina ou solução fisiológica manteve-se até mesmo no dia da operação e por mais 7, 14 ou 28 dias, conforme o subgrupo do animal e nas mesmas condições já relatadas .

No exame físico diário dos ratos observaram-se as condições gerais e o aspecto da ferida operatória, quanto a sangramento, infecção, deiscência da sutura da pele e/ou evisceração.

3.4.7 Eutanásia e aferições

Realizaram-se as eutanásias de 20 animais (10 de cada subgrupo) nos dias 7, 14 e 28 de pós-operatório, da seguinte maneira: foram realizadas a indução anestésica inalatória, a reposição dos animais na prancheta cirúrgica e a antisepsia abdominal, conforme descrição anterior.

O acesso à cavidade abdominal foi então obtido mediante incisão ventral paramediana à esquerda (2 cm da linha média). À seguir foram desfeitas as aderências porventura encontradas na área da anastomose distal, sendo ela isolada por pinças hemostáticas retas, em um segmento 1cm proximal e 1cm distal da linha de anastomose, realizando-se sua exérese. Os segmentos intestinais remanescentes, proximal e distal, foram ocluídos definitivamente através de ligadura transfixante única com fio de polipropileno 6-0. O segmento intestinal retirado foi mantido imerso em solução fisiológica a 0,9% para posterior estudo da força de ruptura.

A área da anastomose proximal não foi manipulada durante a manobra relatada. Em seguida procedeu-se ao acesso à cavidade torácica, mediante toracotomia em forma de V, tomando-se como vértice a extremidade do apêndice xifóide e seguindo-se em direção à raiz dos membros craniais, rebatendo-se a parede torácica anterior cranialmente; desta maneira obteve-se amplo acesso à cavidade torácica. Procedeu-se então a técnica de perfusão intracardíaca¹ com solução de formalina a 10%, utilizada em um volume de 100ml por animal. Após a eutanásia, os animais foram deixados em fixação com formalina a 10% por 48h, sendo realizada a exérese do segmento intestinal contendo a área da anastomose proximal, 1cm proximal e 1cm distal da linha de sutura e encaminhado para análise histopatológica.

As peças cirúrgicas foram então abertas em sentido longitudinal, na borda anti-mesentérica, sendo mantidas em fixação por formalina a 10%, para o preparo histológico.

Secções perpendiculares ao maior eixo da sutura foram efetuadas e encaminhadas para processamento histológico, incluindo desidratação, diafanização

AUSUBEL et al., 1992.

e embocamento em parafina histológica. Após microtomia a 4 micra de espessura, os cortes histológicos foram corados pela técnica da hematoxilina e eosina.

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

Os parâmetros histológicos analisados foram: intensidade de infiltrado inflamatório agudo, intensidade do infiltrado inflamatório crônico, intensidade da proliferação fibroblástica, deposição de colágeno e grau de re-epitelização da mucosa.

Estes parâmetros foram graduados em ausente ou discreto (receberam valor 0 ou 1), moderado (receberam valor 2) e intenso (receberam valor 3) e foram em seguida tabulados para análise.

Descrição dos parâmetros histológicos:

1. Intensidade do infiltrado inflamatório agudo.

Foi analisado o número de polimorfonucleares neutrófilos na área da sutura, sendo considerado discreto, quando raros neutrófilos foram observados em todos os campos histológicos; moderado, quando grupamentos isolados dessas células estavam presentes e intenso, quando eles foram encontrados difusamente na área anastomosada.

2. Intensidade do infiltrado inflamatório crônico.

Foi analisado o número de linfócitos e plasmócitos presentes na área da sutura, sendo considerado discreto, quando raros linfócitos e plasmócitos foram observados em todos os campos histológicos; moderado, quando grupamentos isolados dessas células estavam presentes e intenso, quando eles foram encontrados difusamente na área anastomosada.

3. Intensidade da proliferação fibroblástica.

Foi analisado o número de fibroblastos proliferados na linha de sutura. Não foram consideradas as células maduras similares aos fibrócitos, normalmente encontrados nas diversas camadas intestinais, considerando-se discreto, quando raros fibroblastos foram observados; moderado, quando se observou moderada

quantidade de feixes dessas células, separados por fibras colágenas e matriz edemaciada e intenso, quando fibroblastos proliferados formavam feixes celulares compactos, com deposição de colágeno basofílico e frouxo.

4. Deposição de colágeno.

Foi analisado o grau de deposição de fibras colágenas na área de sutura, considerando-se como colágeno maduro ou do tipo I as fibras eosinofílicas e densas, constituindo feixes longos e colágeno imaturo ou do tipo III as fibras curtas, ramificadas e basofílicas. Foi considerado discreto, quando a deposição foi predominantemente de fibras imaturas, sem constituir feixes de fibras eosinofílicas; moderado, quando havia deposição aproximadamente equitativa de fibras eosinofílicas e feixes de fibras basofílicas e intenso, quando a deposição foi predominantemente de fibras colágenas eosinofílicas e com raras fibras basofílicas.

5. Grau de re-epitelização.

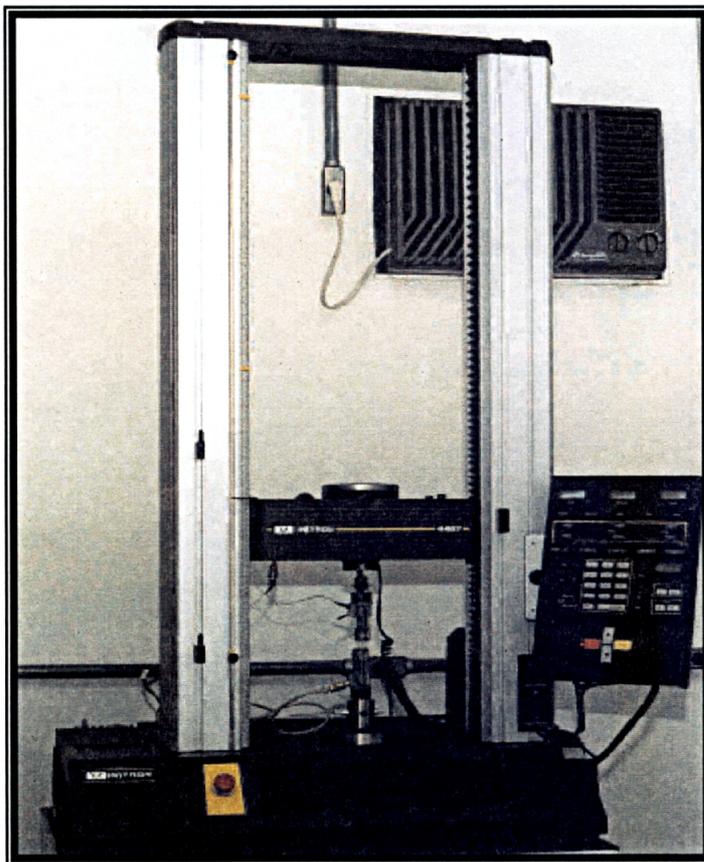
Avaliou-se a extensão em que a superfície da anastomose era recoberta por epitélio regenerativo da mucosa adjacente, sendo considerado grau discreto, quando se observou pouca proliferação epitelial nas bordas da sutura, permanecendo grande área central cruenta e com tecido de granulação desnudo; grau moderado, quando aproximadamente metade da superfície de sutura havia sido revestida pelo epitélio regenerativo de ambas as bordas da sutura e grau intenso, quando praticamente toda a superfície de sutura havia sido revestida por ele ou quando a re-epitelização foi completa.

Adicionalmente os cortes histológicos foram submetidos à coloração de picrosirius-red F3BA para identificação de colágenos maduro e imaturo por técnica de microscopia com luz polarizada e análise morfométrica computadorizada. Nesta técnica analisaram-se os cortes histológicos através de microscópio óptico da marca Zeiss, em aumento de 400 vezes, utilizando-se fonte de luz polarizada. As imagens foram captadas por uma câmera Sony CCD 101(*Sony, Tokyo, Japan*), transmitidas a um monitor colorido Trinitron 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 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 4 campos distintos, obtendo-se então as médias aritméticas. Calculou-se a percentagem da área ocupada pelas fibras que continham colágeno dos tipos I e III em relação à área total examinada.

O segmento distal abordado teve o seu eventual conteúdo fecal retirado com solução fisiológica a 0,9 %, mantido imerso em igual solução e logo após submetido à análise da força de ruptura, expressa em kgf, através de uma máquina de tração computadorizada, marca Instron, modelo 4467, com garras de pressão pneumáticas, protegidas com papel de filtro e capacidade para 3 toneladas (figura 4). Para este estudo foi utilizada uma célula de carga para 10kg, com sensibilidade de 50g, tracionada na velocidade de 100mm por minuto. Foi observado se o ponto de ruptura coincidia ou não com a linha anastomótica.

FIGURA 4 - MÁQUINA DE TRAÇÃO UTILIZADA NO EXPERIMENTO



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

Fez-se a análise descritiva dos dados através de tabelas e de gráficos.

Para cada uma das variáveis quantitativas testou-se a hipótese nula de resultados iguais nos 2 grupos, versus a hipótese alternativa de resultados diferentes. Para tanto, adotou-se o teste não-paramétrico de Mann-Whitney, no nível de significância de 5%.

Para a variável local de ruptura do corpo de prova (nominal dicotômica) testou-se a hipótese nula de que a proporção de rompimentos na linha anastomótica do grupo N é igual à do grupo C, versus a hipótese alternativa de proporções diferentes. Para tanto, adotou-se o teste Exato de Fisher, em nível de significância de 5 %.

Para as demais variáveis nominais dicotômicas, como processo inflamatório agudo, processo inflamatório crônico, proliferação fibroblástica, deposição de colágeno e re-epitelização, testou-se a hipótese nula de que a proporção de avaliações intensas no grupo N é igual à do grupo C. Para tanto, adotou-se o teste Exato de Fisher, considerando-se o nível de significância de 5%.

Em todas as análises utilizou-se o *software* Statistica.

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO NO 7º DIA PÓS-OPERATÓRIO

4.1.1 Força de ruptura e percentagem de área ocupada pelos colágenos dos tipos I e III

No 7º dia após a operação não observou-se, entre os 2 grupos do estudo, diferença significativa tanto na força de ruptura do corpo de prova quanto na percentagem de área ocupada pelos colágenos de tipos I e III (tabela 1), como visualizado nos gráficos 1, 2 e 3.

TABELA 1 – FORÇA DE RUPTURA E PERCENTAGEM DE ÁREA OCUPADA PELOS COLÁGENOS TIPOS I E III NO 7º DIA PÓS-OPERATÓRIO

VARIÁVEL	GRUPO	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	NÚMERO DE CASOS	VALOR DE p
Força de ruptura (kgf)	Grupo N	0,115	0,0343	9	0,9296
	Grupo C	0,114	0,0278	9	
Colágeno tipo III (%)	Grupo N	11,07	5,8327	8	0,7361
	Grupo C	15,84	8,3318	9	
Colágeno tipo I (%)	Grupo N	1,45	1,0843	8	0,7361
	Grupo C	2,77	3,0659	9	

FONTE: O autor

NOTA: Utilizou-se o teste não-paramétrico de Mann-Whitney, considerando-se o nível de significância de 5%.

GRÁFICO 1 - VALORES MÉDIOS DA FORÇA DE RUPTURA NO 7º DIA PÓS-OPERATÓRIO

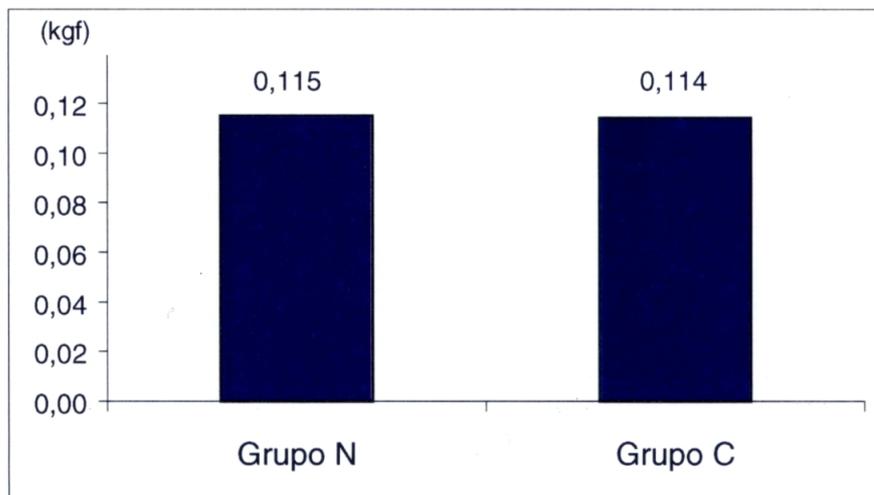


GRÁFICO 2 - VALORES MÉDIOS DA PERCENTAGEM DE ÁREA OCUPADA PELO COLÁGENO TIPO III NO 7º DIA PÓS-OPERATÓRIO

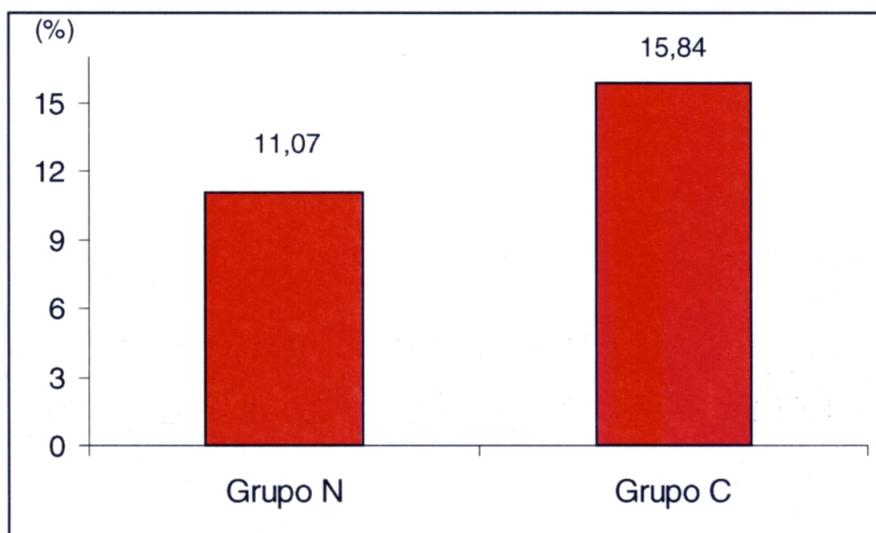
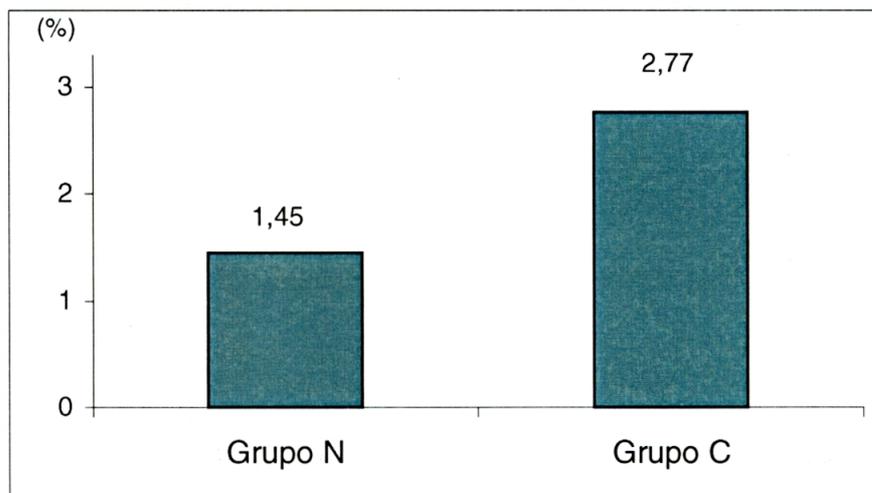


GRÁFICO 3 - VALORES ÉDIOS DA PERCENTAGEM DE ÁREA OCUPADA PELO COLÁGENO TIPO I NO 7º DIA PÓS-OPERATÓRIO



4.1.2 Local de rompimento dos corpos de prova

No 7º dia pós-operatório não se observou diferença significativa no local de rompimento dos corpos de prova entre os 2 grupos do estudo (tabela 2)

TABELA 2 - LOCAL DE ROMPIMENTO DOS CORPOS DE PROVA NO 7º DIA PÓS-OPERATÓRIO

ROMPIMENTO	GRUPO N	GRUPO C
Na anastomose	9 (90%)	7 (70%)
Fora da anastomose	1	3
Total	10	10

FONTE: O autor

NOTAS:O resultado do teste Exato de Fisher indicou a não rejeição da hipótese nula no nível de significância de 5% ($p=0,3344$).

4.1.3 Variáveis histopatológicas gerais

No 7º dia pós-operatório verificou-se diferença significativa na variável proliferação fibroblástica, ocorrendo esta em menor intensidade no grupo N. Nas demais variáveis não houve diferenças significativas entre os 2 grupos (tabela 3).

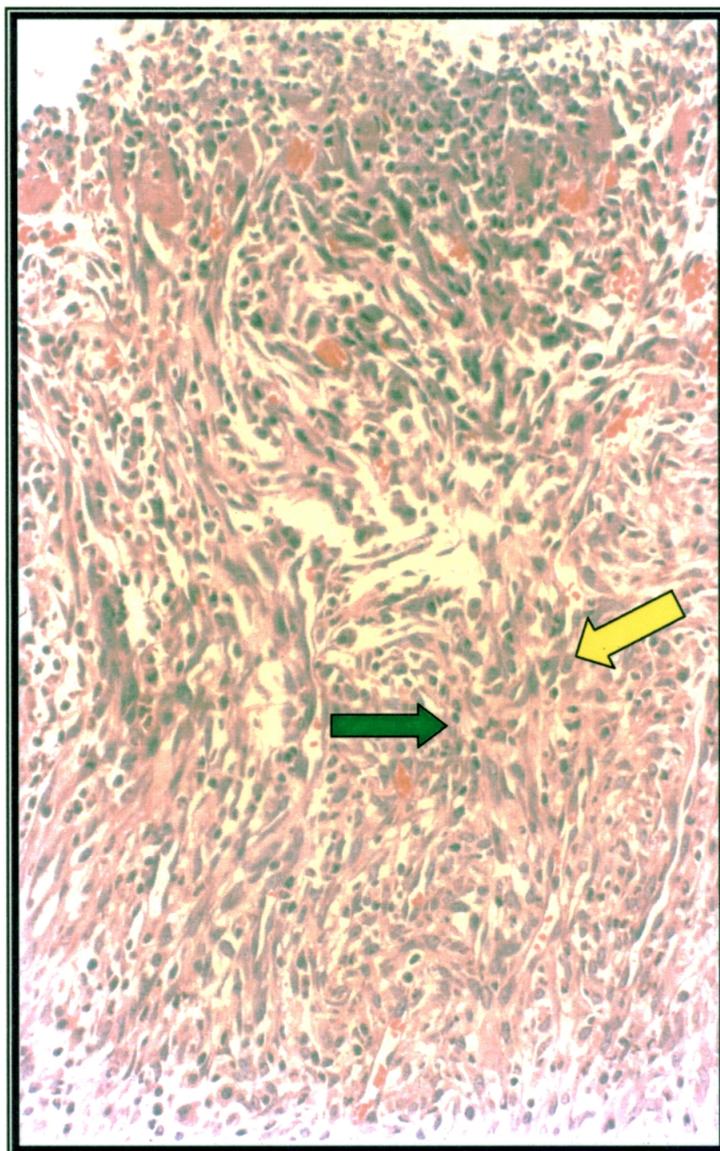
TABELA 3 - VARIÁVEIS HISTOPATOLÓGICAS GERAIS NO 7º DIA PÓS-OPERATÓRIO

VARIÁVEL	AVALIAÇÃO	GRUPO TESTE	GRUPO CONTROLE	VALOR DE p
Processo inflamatório agudo	0, 1 ou 2	6	8	0,5765
	3	2	1	
Processo inflamatório crônico	0, 1 ou 2	8	9	---
	3	0	0	
Proliferação fibroblástica	0, 1 ou 2	8	3	0,0090
	3	0	6	
Deposição de colágeno	0, 1 ou 2	8	9	---
	3	0	0	
Re-epitelização	0, 1 ou 2	7	8	1,0000
	3	1	1	

FONTE: O autor

NOTAS: O valor de p em negrito indica a rejeição da hipótese nula no nível de significância de 5%, para a variável proliferação fibroblástica.
Utilizou-se o teste Exato de Fisher.

FIGURA 5 – 7º DIA DA ANASTOMOSE PROXIMAL



Nota: Corte histológico representativo da área de reparo, contendo grande número de fibroblastos (seta amarela) e exsudato neutrofílico em grau moderado (seta verde). (Hematoxilina-Eosina,200x).

4.2 AVALIAÇÃO NO 14º DIA PÓS-OPERATÓRIO

4.2.1 Força de ruptura e percentagem de área ocupada pelos colágenos dos tipos I e III

No 14º dia de pós-operatório não se observou, entre os 2 grupos do estudo, diferença significativa tanto na força de ruptura dos corpos de prova, quanto na percentagem de área ocupada pelos colágenos de tipos I e III (tabela 4), como visualizado nos gráficos 4, 5 e 6.

TABELA 4 - FORÇA DE RUPTURA E PERCENTAGEM DE ÁREA OCUPADA PELOS COLÁGENOS TIPOS I E III NO 14º DIA PÓS-OPERATÓRIO

VARIÁVEL	GRUPO	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	NÚMERO DE CASOS	VALOR DE p
Força de ruptura (kgf)	Grupo N	0,156	0,0358	10	0,4495
	Grupo C	0,167	0,0348	10	
Colágeno tipo III (%)	Grupo N	20,07	9,2045	9	0,3538
	Grupo C	15,13	9,3610	9	
Colágeno tipo I (%)	Grupo N	3,46	2,8109	9	1,0000
	Grupo C	6,28	8,7160	9	

FONTE: O autor

NOTA: Utilizou-se o teste não-paramétrico de Mann-Whitney, considerando-se o nível de significância de 5%.

GRÁFICO 4 - VALORES MÉDIOS DA FORÇA DE RUPTURA NO 14º DIA PÓS-OPERATÓRIO

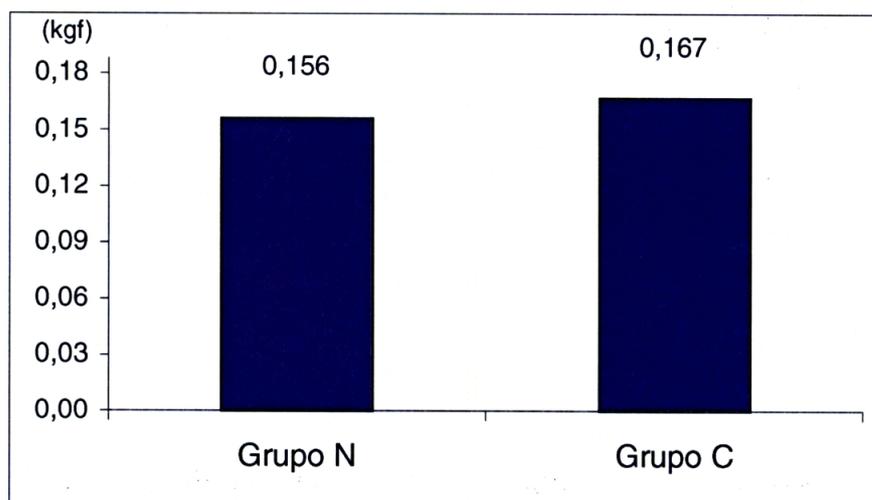


GRÁFICO 5 - VALORES MÉDIOS DA PERCENTAGEM DE ÁREA OCUPADA PELO COLÁGENO TIPO III NO 14º DIA PÓS-OPERATÓRIO

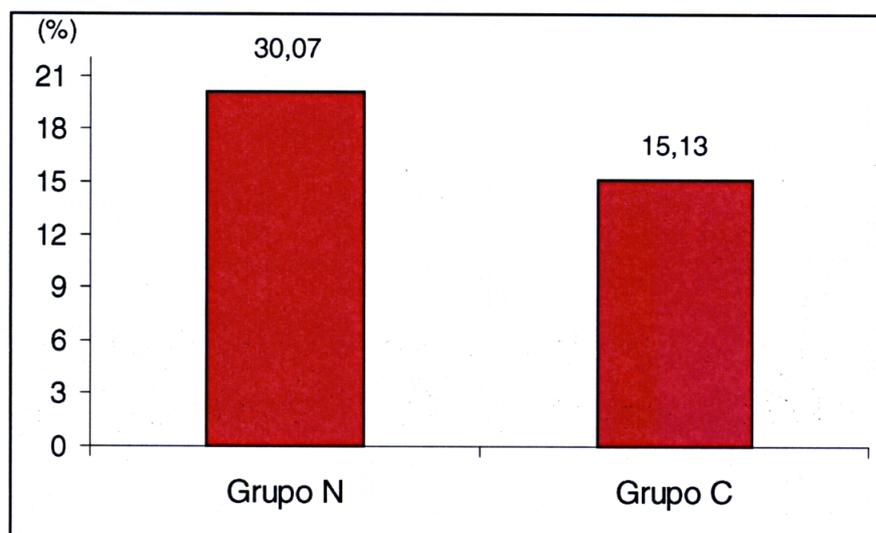


GRÁFICO 6 - VALORES MÉDIOS DA PERCENTAGEM DE ÁREA OCUPADA PELO COLÁGENO TIPO I NO 14º DIA PÓS-OPERATÓRIO

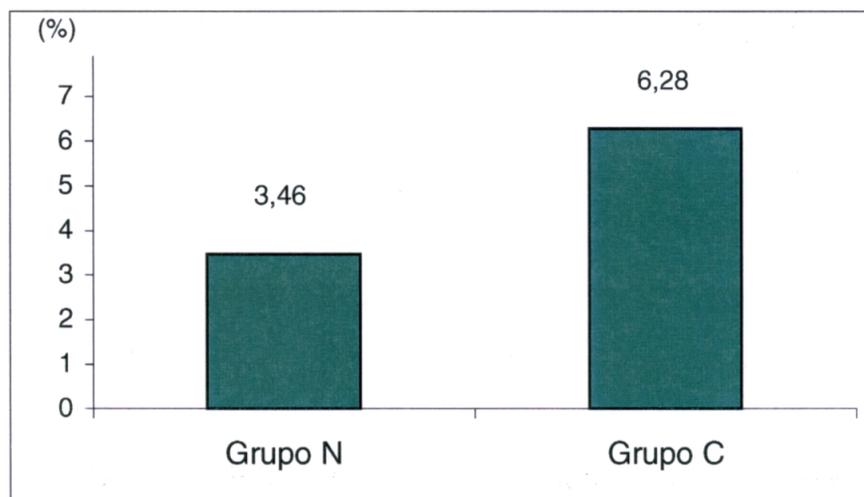
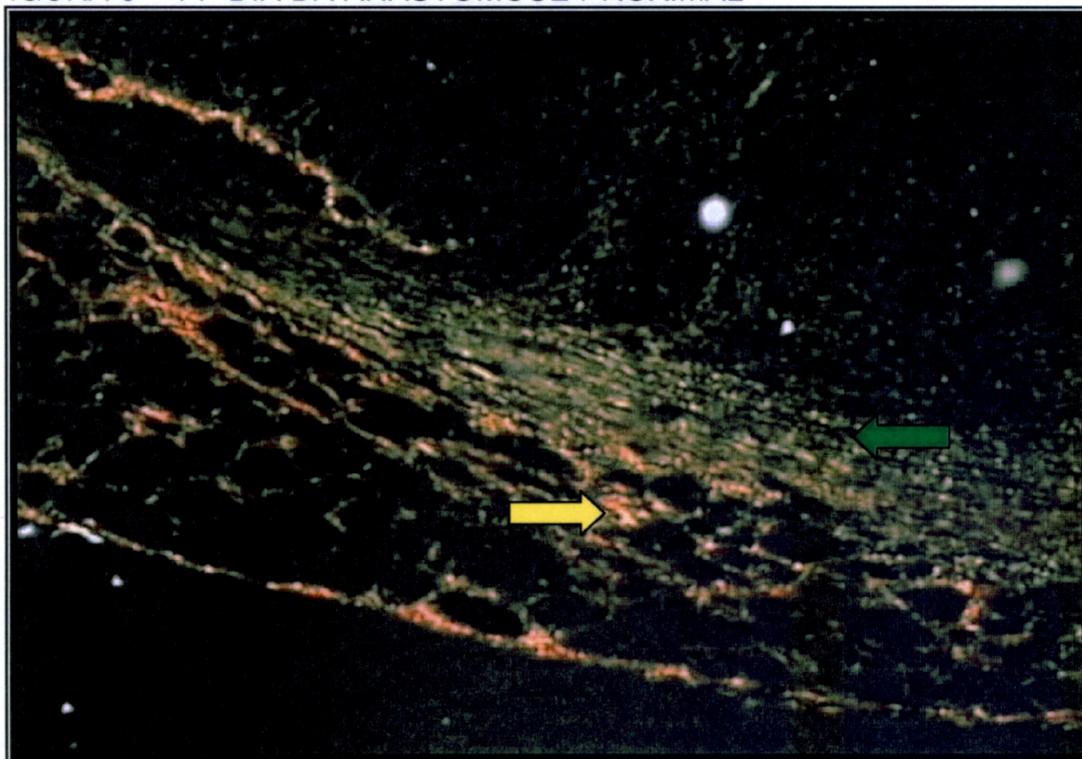


FIGURA 6 – 14º DIA DA ANASTOMOSE PROXIMAL



Nota: Fotomicrografia de corte histológico corado pela técnica do picosirius-red F3BA e analisada em microscópio de luz polarizada e sistema computadorizado de morfometria Optimas. As fibras de coloração verde são as fibras colágenas imaturas (seta verde). As fibras de coloração de tonalidade amarelo-avermelhada são as fibras colágenas maduras (seta amarela). (Picosirius-red F3BA, X 400).

4.2.2 Local de rompimento dos corpos de prova

No 14^o dia pós-operatório não se observou diferença significativa no local de rompimento dos corpos de prova entre os 2 grupos do estudo (tabela 5).

TABELA 5 - LOCAL DE ROMPIMENTO DOS CORPOS DE PROVA NO 14^o DIA PÓS-OPERATÓRIO

ROMPIMENTO	GRUPO N	GRUPO C
Na anastomose	7 (70%)	4 (40%)
Fora da anastomose	3	6
Total	10	10

FONTE: O autor

NOTA: O resultado do teste Exato de Fisher indicou a não rejeição da hipótese nula no nível de significância de 5% ($p=0,3698$).

4.2.3 Variáveis histopatológicas gerais

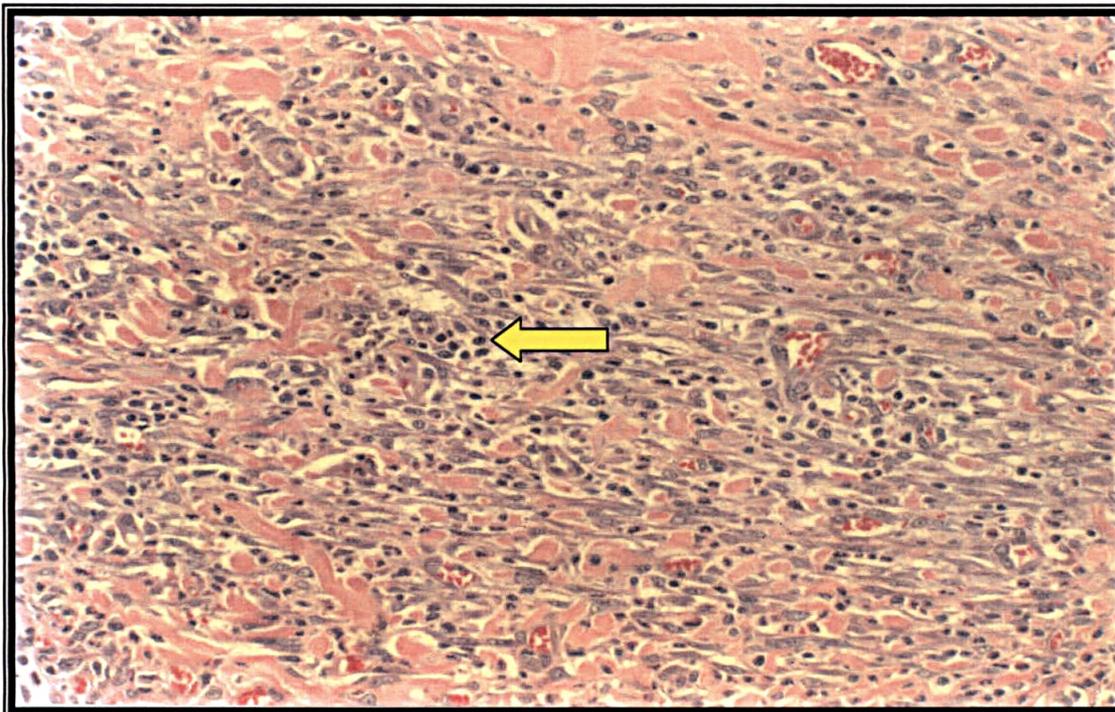
No 14^o dia pós-operatório não se observou diferença significativa entre as variáveis histopatológicas estudadas (tabela 6).

TABELA 6 - VARIÁVEIS HISTOPATOLÓGICAS GERAIS NO 14^o DIA PÓS-OPERATÓRIO

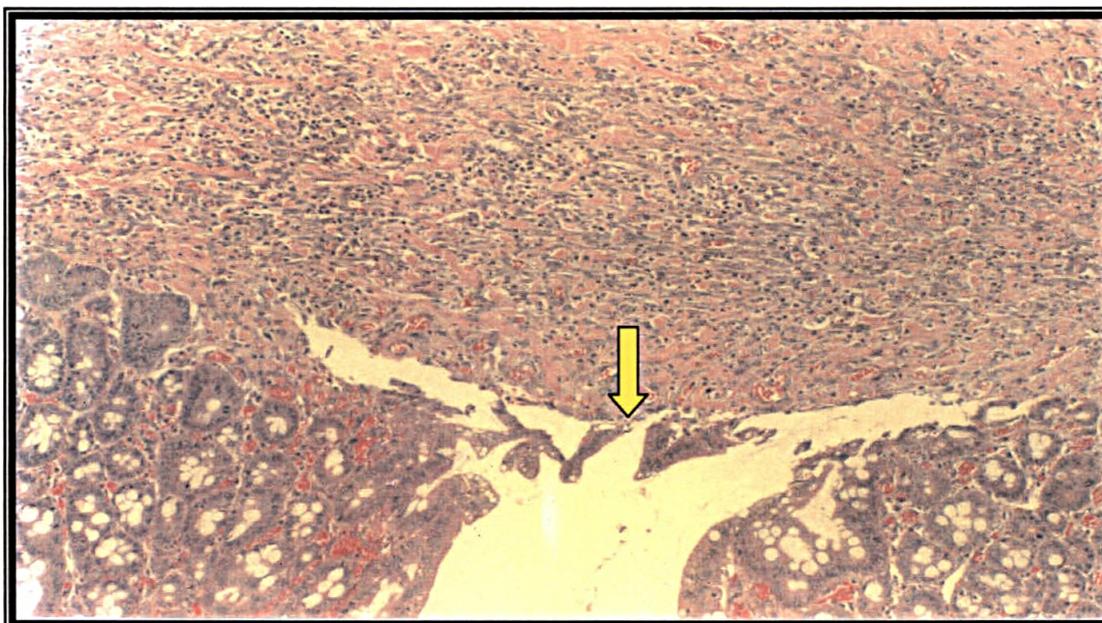
VARIÁVEL	AVALIAÇÃO	GRUPO TESTE	GRUPO CONTROLE	VALOR DE p
Processo inflamatório agudo	0, 1 ou 2 3	6 2	8 0	0,4667
Processo inflamatório crônico	0, 1 ou 2 3	8 0	8 0	---
Proliferação fibroblástica	0, 1 ou 2 3	7 1	8 0	1,0000
Deposição de colágeno	0, 1 ou 2 3	6 2	4 4	0,3636
Re-epitelização	0, 1 ou 2 3	7 1	5 3	0,5692

FONTE: O autor

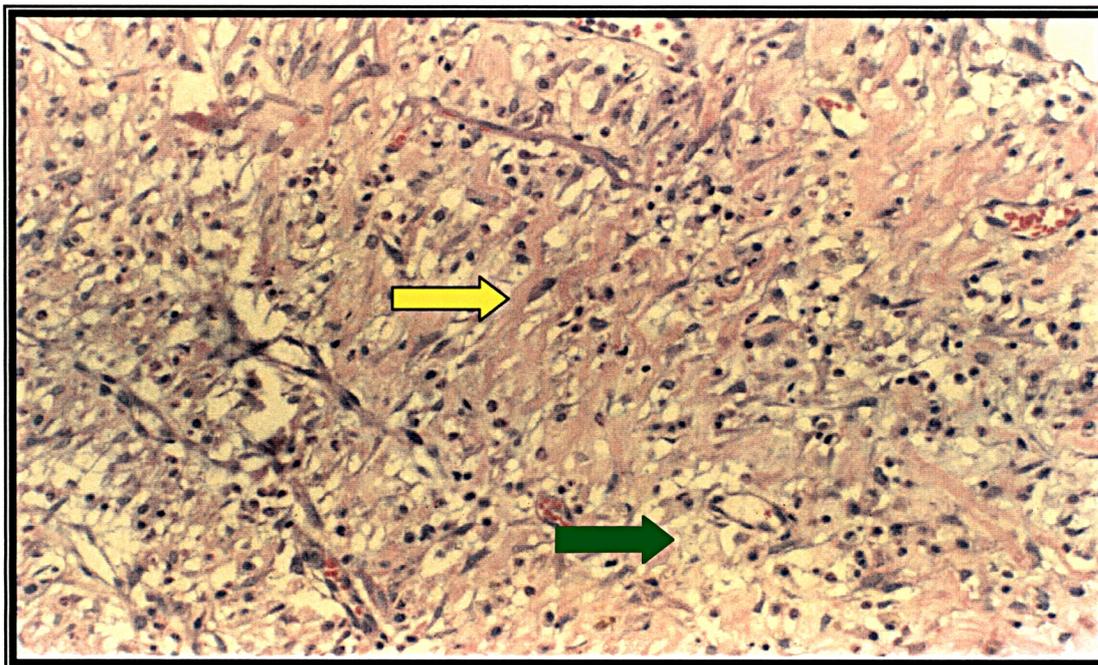
NOTA: Utilizou-se o teste Exato de Fisher, considerando-se o nível de significância de 5%.

FIGURA 7 – 14^o DIA DA ANASTOMOSE PROXIMAL

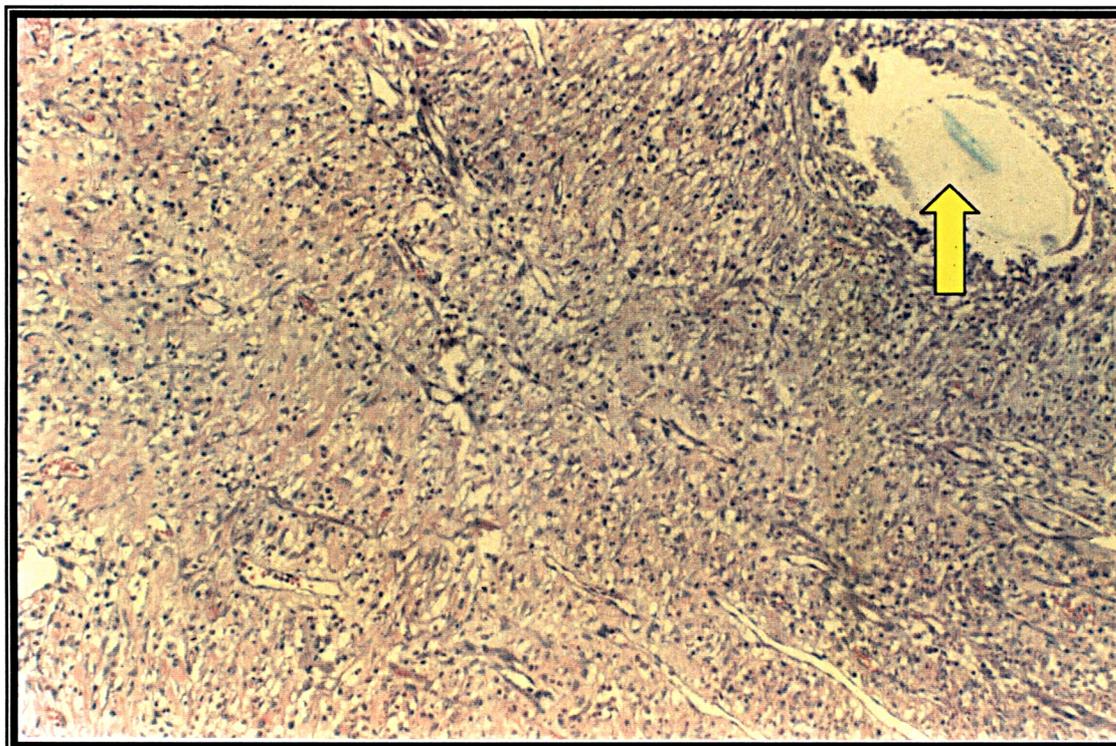
Nota: Corte histológico representativo de área com fibrogênese em fase mais avançada, contendo moderado infiltrado inflamatório linfo-plasmocitário (seta). (Hematoxilina-Eosina, 200 x)

FIGURA 8 – 14^o DIA DA ANASTOMOSE PROXIMAL

Nota: Corte histológico representativo da área em que a re-epitelização recobre parcialmente o tecido anastomosado (seta). (Hematoxilina-Eosina, 100 x)

FIGURA 9 – 14^o DIA DE ANASTOMOSE PROXIMAL

Nota: Corte histológico representativo da deposição colágena no centro da ferida operatória. Fibras maduras são mais densas e eosinofílicas (seta amarela). Fibras imaturas apresentam arranjo mais frouxo e são basofílicas (seta verde). (Hematoxilina-Eosina, 200 x)

FIGURA 10 – 14^o DIA DA ANASTOMOSE PROXIMAL

Nota: Corte histológico representativo da área de deposição colágena e o fio de sutura envolto por processo inflamatório (seta). (Hematoxilina-Eosina, 100 x)

4.3 AVALIAÇÃO NO 28º DIA PÓS-OPERATÓRIO

4.3.1 Força de ruptura e percentagem de área ocupada pelos colágenos dos tipos I e III

No 28º dia pós-operatório observou-se diferença significativa na variável força de ruptura, sendo ela menor no grupo que recebeu a administração de nicotina (grupo N);

Observou-se também uma tendência estatística de menor área ocupada pelo colágeno do tipo III no grupo N, não ocorrendo diferença significativa com relação a área ocupada pelo colágeno do tipo I (tabela 7), como visualizado nos gráficos 7, 8 e 9.

TABELA 7 - FORÇA DE RUPTURA E PERCENTAGEM DE ÁREA OCUPADA PELOS COLÁGENO TIPOS I E III NO 28º DIA PÓS-OPERATÓRIO

VARIÁVEL	GRUPO	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	NÚMERO DE CASOS	VALOR DE p
Força de ruptura (kgf)	Grupo N	0,117	0,0229	10	0,0112
	Grupo C	0,145	0,0280	10	
Colágeno tipo III (%)	Grupo N	6,19	3,7054	10	0,0548
	Grupo C	10,38	4,2578	9	
Colágeno tipo I (%)	Grupo N	1,84	1,2532	10	0,1025
	Grupo C	5,11	4,4147	9	

FONTE: O autor

NOTAS: O valor de p em negrito indica a rejeição da hipótese nula no nível de significância de 5%.

Para a variável Colágeno tipo III houve uma tendência à rejeição da hipótese nula no nível de significância de 5%.

Utilizou-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney.

GRÁFICO 7 - VALORES MÉDIOS DA FORÇA DE RUPTURA NO 28º DIA PÓS-OPERATÓRIO

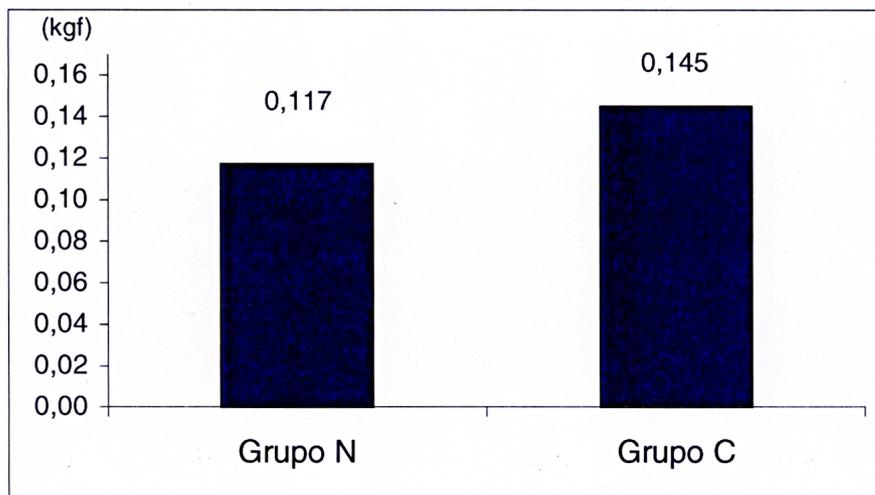


GRÁFICO 8 - VALORES MÉDIOS DA PERCENTAGEM DE ÁREA OCUPADA PELO COLÁGENO TIPO III NO 28º DIA PÓS-OPERATÓRIO

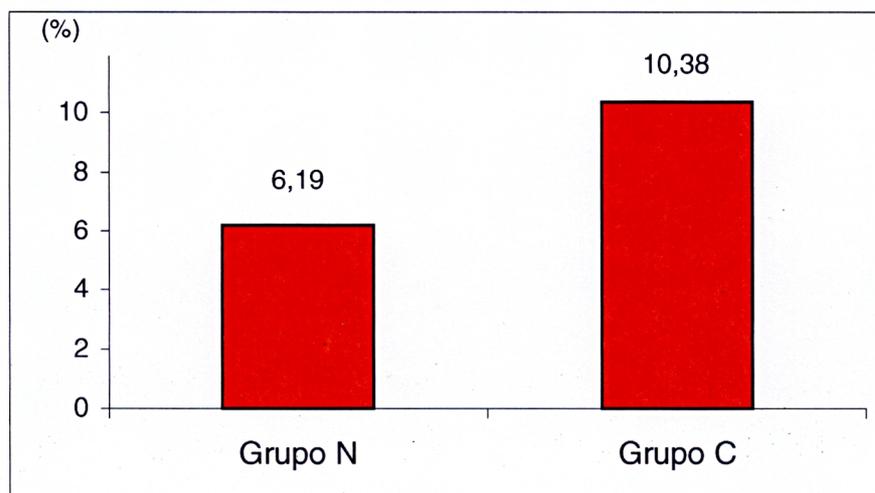
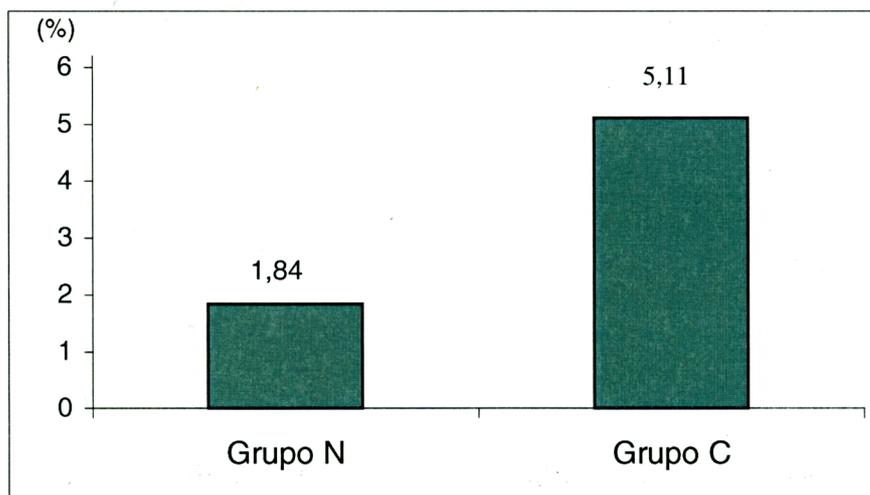


GRÁFICO 9 - VALORES MÉDIOS DA PERCENTAGEM DE ÁREA OCUPADA PELO COLÁGENO TIPO I NO 28º DIA PÓS-OPERATÓRIO



4.3.2 Local de rompimento dos corpos de prova

No 28º dia pós-operatório não se observou diferença significativa no local de rompimento dos corpos de prova entre os 2 grupos do estudo (tabela 8).

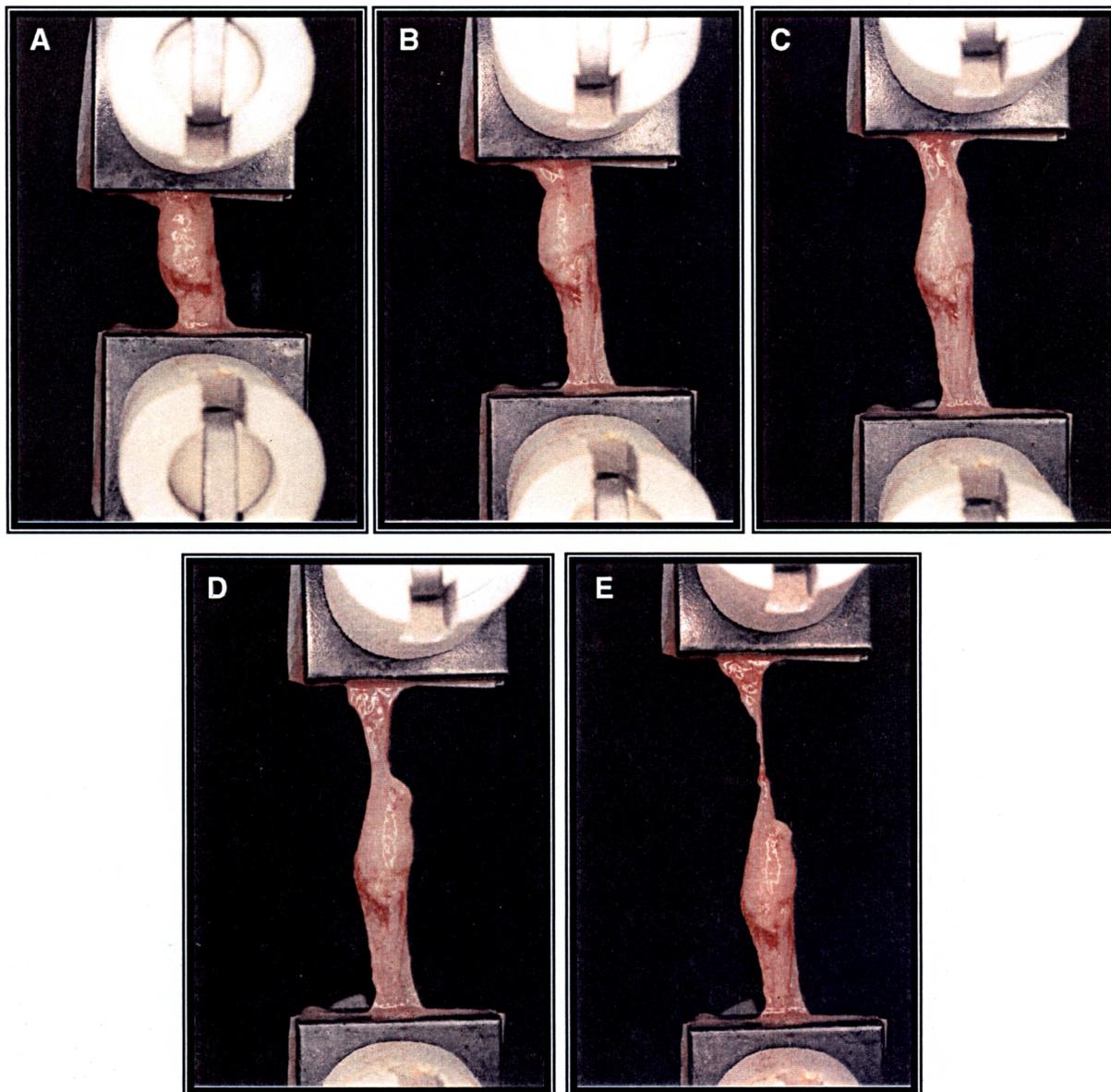
TABELA 8 - LOCAL DE ROMPIMENTO DOS CORPOS DE PROVA NO 28º DIA PÓS-OPERATÓRIO

ROMPIMENTO	GRUPO N	GRUPO C
Na anastomose	4 (40%)	2 (20%)
Fora da anastomose	6	8
Total	10	10

FONTE: O autor

NOTA: O resultado do teste Exato de Fisher indicou a não rejeição da hipótese nula no nível de significância de 5% ($p=0,3847$).

FIGURA 11 – ESTUDO DE FORÇA DE RUPTURA (A, B, C, D e E)



Nota: Corpo de prova contendo anastomose de 28 dias, cuja ruptura acontece fora da linha de sutura (A, B, C, D e E).

4.3.3 Variáveis histopatológicas gerais

No 28º dia pós-operatório não se observou diferença significativa entre as variáveis histopatológicas estudadas (tabela 9).

TABELA 9 - VARIÁVEIS HISTOPATOLÓGICAS GERAIS NO 28º DIA PÓS-OPERATÓRIO

VARIÁVEL	AVALIAÇÃO	GRUPO TESTE	GRUPO CONTROLE	VALOR DE p
Processo inflamatório agudo	0, 1 ou 2	9	9	---
	3	0	0	
Processo inflamatório crônico	0, 1 ou 2	9	8	0,5000
	3	0	1	
Proliferação fibroblástica	0, 1 ou 2	9	9	---
	3	0	0	
Deposição de colágeno	0, 1 ou 2	5	4	1,0000
	3	4	5	
Re-epitelização	0, 1 ou 2	2	2	1,0000
	3	7	7	

FONTE: O autor

NOTA: Utilizou-se o teste Exato de Fisher, considerando-se o nível de significância de 5 %.

OBSERVAÇÃO: Os dados obtidos das variáveis de todos os animais encontram-se discriminados no anexo deste estudo.

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

5.1 SOBRE O MÉTODO

5.1.1 Escolha do animal de experimentação

O rato foi o animal escolhido por ser de pequeno porte, de grande resistência ao meio ambiente, dócil em seu manuseio e produzido em laboratório com linhagens bem definidas, podendo-se obter amostras homogêneas em sua idade e peso de valores. É animal de custo relativamente baixo, que não requer tratamento diferenciado e tem transporte facilitado, podendo-se estudar grande número deles. Não requer alojamento individual e, desta forma, é possível obter-se número de dados que vai determinar acurácia ao experimento, em um período curto de tempo. Foram utilizados ratos adultos e machos para evitar variações hormonais e possíveis diferenças no processo cicatricial.

Os pesquisadores tem utilizado com freqüência o rato para estudo dos efeitos da nicotina na cicatrização de lesões. Revistos 14 trabalhos experimentais publicados sobre o assunto, pode-se verificar que esse animal foi utilizado em 11 deles, o coelho em dois, o hamster e o porco em um cada (esse último em pesquisa conjunta com o rato).

LAMBERT (1965), citado por SMANIOTTO (1999), relatou que o pequeno tamanho do intestino desses roedores pode representar significativo obstáculo, especificamente quando a técnica é analisada. No entanto o tamanho deixa de ser dificuldade, quando se utiliza material cirúrgico adequado. O uso do rato como animal de experimentação poderia ser criticado, não pelo seu tamanho, mas pelas suas características metabólicas e nutricionais, que são muito diferentes das do homem, muito mais do que as do cão.

No único estudo que trata especificamente sobre a influência da nicotina na cicatrização de anastomoses intestinais (MEDEIROS et al., 1999), o rato foi utilizado como animal de experimentação. Assim, apesar da pouca literatura disponível sobre a nicotina e sua influência na cicatrização do aparelho gastrointestinal e pelo já exposto, acredita-se que o rato seja o animal adequado para estudá-la.

5.1.2 Escolha do segmento intestinal e anastomose

A presente pesquisa teve como sítio de estudo o intestino delgado, pois este, segundo conclusões de WISE et al. (1975) e FRIED et al. (1984), apresenta melhor resposta do colágeno formado no período pós-lesional em comparação com o cólon, caracterizando-se por menor redução desta proteína no pós-trauma imediato e por recuperação mais rápida dos seus índices, apresentando portanto melhores condições de estudo da influência direta de uma droga na síntese do colágeno em víscera oca.

Utilizou-se para estudo alça intestinal a 10 e a 20cm da flexura duodeno-jejunal. MEDEIROS et al. (1999) o fizeram em alça jejunal a 5cm desta. No presente estudo a opção pelo procedimento a esses níveis foi feita no sentido de minimizar as possíveis aderências do sítio da anastomose proximal com o andar superior da cavidade abdominal do animal (especialmente com o fígado) e com o local da anastomose distal.

A área contendo a anastomose distal foi retirada antes da realização da perfusão intracardíaca, para que o tecido não sofresse a ação do fixador e pudesse ser adequadamente preparado para a aferição da força de ruptura.

A sutura intestinal, em todos os animais, foi realizada em pontos separados de fio monofilamentar de polipropileno 6-0, em plano único de sutura.

HALSTED (1887), citado por BRONWELL, RUTLEDGE e DALTON (1967) 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. Posteriormente outros autores recomendaram a utilização de sutura em plano único e pontos separados para anastomoses no trato gastrointestinal, tais como GUIMARÃES et al. (1974).

Vários estudos relacionaram as anastomoses intestinais construídas com sutura interrompida como produtoras de melhor cicatrização e com menor degradação de colágeno (HOWES, 1940; GUIMARÃES et al., 1974; JIBORN, AHONEN e ZEDERFELDT, 1980).

MEDEIROS et al. (1999) realizaram as anastomoses intestinais em ratos, utilizando pontos simples, separados, em plano único.

Um 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 o de polipropileno, provocam menor reação tecidual e, portanto, menor interferência no processo cicatricial (CHAIB, LING e VASCONCELOS, 1972; VAN WINCLE e HASTINGS, 1972 e HASTINGS et al., 1975).

A utilização do fio monofilamentar de polipropileno 6-0, no presente estudo, é justificada por se desejar mínima reação inflamatória tecidual pela própria presença do fio, pois esta poderia interferir no processo de cicatrização, ocasionando eventuais erros na análise dos resultados.

5.1.3 Uso da nicotina

Diversas vias já foram utilizadas para administrar nicotina em animais de experimentação: a via oral foi utilizada por estudos tais como os de BALFOUR (1980) e LAU, SPEAR e FALK (1994), a via intraperitoneal por pesquisas como a de RAO, MORRISON e O'BRIEN (1983), a via endovenosa, como por MARKS, STITZEL e COLLINS (1987) e VALENTINE et al. (1997); a utilização de mini-bolsas de implantação subcutânea tem como exemplo o estudo de MEDEIROS et al. (1999), a via inalatória foi utilizada por HAAG, LARSON e WEATHERBY (1960) e CRAIG e REES (1985) e ainda injeções subcutâneas foram utilizadas por FORREST, PANG e LINDSAY (1987) e ULRICH, HARGREAVES e FLORES (1997).

FORREST, PANG e LINDSAY (1991) discutiram as várias vias de administração da nicotina, relatando que o uso da via inalatória em animais de experimentação os expõe não só à nicotina, mas a todos os sub-produtos da fumaça do cigarro, sendo a frequência da exposição à fumaça e os níveis plasmáticos

destes subprodutos não similares àqueles encontrados em humanos tabagistas. Em adição, podem tornar-se intoxicados quando confinados aos aparatos produtores de fumaça, podendo levar até a sua morte. Quanto à via oral, os autores destacaram que os ratos podem diminuir drasticamente a ingestão de água contendo nicotina, possivelmente devido ao sabor desagradável ; além disso, foram citados casos de extensa ulceração hemorrágica na mucosa gástrica dos animais. O uso de mini-bolsas ou discos no subcutâneo apresenta a vantagem da acurácia na determinação do montante de nicotina administrada, porém funcionam por pouco tempo e necessitam ser trocadas periodicamente. Apresentam custo elevado, além de requererem operação e anestesia geral repetidas vezes, para seu reimplante. A utilização da via endovenosa por período prolongado de tempo requer o implante de catéter na veia jugular dos animais, aumentando de maneira importante a dificuldade de manejo e a morbi-mortalidade. A via intraperitoneal poderia levar a ação direta da nicotina sobre o sítio anastomótico, interferindo na análise adequada dos resultados.

As injeções diárias de nicotina por via subcutânea, como realizadas no presente estudo, foram utilizadas por diversas pesquisas anteriores (FORREST, PANG e LINDSAY, 1985; FORREST, PANG e LINDSAY, 1987; BOZARTH, PUDIAK e KUOLEE, 1998), até mesmo por longo tempo (24 semanas), como no estudo de FORREST, PANG e LINDSAY (1991), demonstrando boa tolerância por parte dos animais e rápida absorção pós-injeção da droga, levando a níveis de pico plasmático após 5 minutos da administração e oferecendo, segundo BALFOUR (1980), um meio conveniente de investigação dos efeitos da nicotina em ratos, o que foi confirmado por ULRICH, HARGREAVES e FLORES (1997) que, em estudo experimental comparativo entre a injeção subcutânea de nicotina e a liberação da droga por mini-bolsas na tela subcutânea concluíram que manter níveis constantes da nicotina circulante via infusão crônica é menos importante do que a dosagem diária total.

A dose utilizada neste trabalho experimental (2mg por kg de peso em 2 tomadas diárias) foi baseada nos resultados de níveis plasmáticos de nicotina observados em ratos, em experimentos prévios (FORREST, PANG e LINDSAY, 1987). Essa dose foi estimada como aproximadamente igual àquela identificada em amostras plasmáticas de humanos tabagistas crônicos (RUSSELL, JARVIS e IYER, 1980; FORREST, PANG e LINDSAY, 1991). Segundo RICHARDSON, MORTON e

HOWARD (1977), a dose utilizada no presente estudo equivale ao consumo de 3 pacotes de cigarro (60 unidades) ao dia. No citado estudo de MEDEIROS et al. (1999), utilizou-se a dose de 5mg por kg/dose, em dias alternados.

Em pesquisa já citada, FORREST, PANG e LINDSAY (1987) somente identificaram alterações deletérias na cicatrização com o uso de nicotina subcutânea em dose igual ou superior a 2mg por Kg, 2 vezes ao dia e somente no grupo em que a administração da droga iniciou 28 dias antes da operação. Concluíram que os efeitos da nicotina são tempo e dose-dependentes. Os mesmos autores, em 1991, concluíram que a extensão dos efeitos deletérios na cicatrização, com o uso da nicotina a longo prazo, foi similar àqueles encontrados quando a droga foi utilizada em dose maior e tempo de uso menor e que os mesmos só ocorreram quando a utilização da nicotina não cessou por pelo menos 2 semanas antes da cirurgia.

Pelo exposto, utilizou-se no presente estudo a administração da nicotina por 28 dias prévios ao procedimento cirúrgico, tendo a injeção da droga continuado no período pós-operatório, até a eutanásia dos animais.

5.1.4 Tempo de aferição

Os dados disponíveis na literatura relatam que a síntese de colágeno no processo cicatricial atinge seu nível máximo nos primeiros 7 a 14 dias pós-lesão, ocorrendo o pico de deposição dessa proteína no sítio de cicatrização do 21º ao 28º dias de evolução (PEACOCK, 1962; MADDEN e PEACOCK, 1968; ORGILL e DEMLING, 1988).

Nesta pesquisa, os intervalos de tempo utilizados para acompanhar a formação do colágeno e sua influência na força de ruptura de anastomoses intestinais foram de 7, 14 e 28 dias após o procedimento operatório.

No estudo de MEDEIROS et al. (1999), aferiu-se a cicatrização das anastomoses intestinais no 10º dia pós-operatório.

5.1.5 Força de ruptura

Um dos aspectos importantes da cicatrização diz respeito às propriedades mecânicas do tecido de reparação, o qual deve oferecer a resistência necessária para não se romper ao ser submetido às tensões normais do organismo.

HOWES, SOOY e HARVEY (1929) pela primeira vez declararam que a força mecânica de uma ferida em cicatrização é determinada pelos fibroblastos. No mesmo ano HARVEY (1929) relatou que a reação mestre na produção da força das cicatrizes é a multiplicação fibroblástica.

ADAMSONS, MUSCO e ENQUIST (1964) e MADDEN e PEACOCK (1968) citaram a existência de uma correlação direta entre o número de fibroblastos no sítio de cicatrização, quantidade de colágeno e força mecânica das cicatrizes.

Portanto, a aferição da força de ruptura torna-se adequado parâmetro a ser relacionado com satisfatória evolução cicatricial.

Existem 2 métodos básicos para se testar a força mecânica em órgãos musculares ocos: o primeiro consiste na tração das extremidades, chamada força de ruptura; o segundo, na resistência da ferida cirúrgica à insuflação gasosa ou de líquidos, denominada força de explosão (NELSEN e ANDERS, 1966; NARESSE, MENDES e CURI, 1987).

Segundo VAN WINCLE (1969) a força de ruptura é aquela requerida para romper um tecido, sem considerar suas dimensões. Do ponto de vista clínico, nessa variável reside o interesse do cirurgião.

A mensuração da força de ruptura é adequado método de avaliação das fases tardias da cicatrização intestinal, pois nos primeiros dias desse processo esta avaliação é tecnicamente difícil e até mesmo impossível devido à manipulação necessária para a obtenção do corpo de prova e ao fato de que, durante este período inicial, a força mecânica da cicatriz depende fundamentalmente da sutura e da deposição de fibrina (SCHEININ e VILJANTO, 1966).

VAN WINCLE e HASTINGS (1972) afirmaram que a força de ruptura é a variável ideal a ser estudada quando o tecido não é homogêneo, ou seja, quando a sua espessura não pode ser mensurada com total acurácia,

Na literatura são diversos os estudos que utilizaram essa variável na avaliação da cicatrização intestinal (NELSEN e ANDERS, 1966; GOTTRUP, 1980).

No presente estudo, devido aos citados fatores, foi medida a força de ruptura das anastomoses intestinais distais, comparando-as com as do grupo controle.

Na calibragem da máquina de tração, seguiram-se os mesmos valores utilizados pelo único experimento encontrado, na literatura revisada, que ocupou este mesmo equipamento (COELHO, 1999).

5.1.6 Avaliação microscópica

Os cortes histológicos corados pela hematoxilina e eosina permitiram conhecer o tipo e a intensidade da reação inflamatória, utilizando-se as variáveis relatadas previamente.

Os cortes histológicos corados pelo picrossirius-red F3BA permitiram conhecer o tipo de colágeno, bem como a sua quantificação nas amostras estudadas.

CONSTANTINE e MOWRY (1968), comparando diversos métodos de coloração para análise do colágeno, concluíram ser o corante picrossirius-red mais seletivo, simples de executar e de fácil interpretação, sendo ele 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 dela (SWEAT, PUTCHTLER e ROSENTHAL, 1964; JUNQUEIRA, BIGNOLAS e BRENTANI, 1979).

Nas preparações coradas pelo picrossirius-red, ao microscópio de luz polarizada, as fibras colágenas mais espessas, fortemente birefringentes e que apresentam coloração em tons de amarelo a vermelho, representam o colágeno tipo I; as fibras mais finas e dispersas, fracamente birefringentes e que apresentam coloração esverdeada representam o colágeno tipo III. Essas propriedades conferem ao uso do picrossirius-red características de excelência para a diferenciação histológica do colágeno (JUNQUEIRA, MONTES e SANCHEZ, 1982).

A análise computadorizada de imagem torna-se progressivamente uma realidade e aperfeiçoa-se rapidamente com a elaboração de “softwares” específicos.

PICKERING e BOUGHNER (1990) demonstraram excelente correlação desta técnica com a análise bioquímica da hidroxiprolina e SMANIOTTO (1999) a utilizou na análise do colágeno em anastomoses do cólon de ratos.

5.2 SOBRE OS RESULTADOS

5.2.1 Aferição: Aspectos microscópicos

5.2.1.1 Processo inflamatório agudo

A análise da variável processo inflamatório agudo, caracterizada pela presença de infiltrado leucocitário, formado principalmente por neutrófilos, não se mostrou intensa na maioria das amostras dos grupos N e C, nos 3 intervalos de tempo pós-cirúrgico em que o estudo foi realizado, não se obtendo, portanto, diferença significativa entre os grupos com relação ao teste realizado. Esse resultado mostrou-se como o esperado em evolução normal pós-injúria, já que, segundo ORGILL e DEMLING (1988), os neutrófilos têm ação fugaz e somente na fase mais inicial do processo cicatricial.

A nicotina não modificou essa fase da cicatrização, na amostra estudada.

MEDEIROS et al. (1999), utilizando a mesma técnica de coloração e aferindo seus resultados no 10º dia pós-operatório, encontraram reação inflamatória mais intensa na área anastomosada dos animais que receberam nicotina (quantificada pelo método de MYERS, POSTLETHWAITE e SMITH, 1961). Os autores não diferenciaram o tipo de reação inflamatória.

5.2.1.2 Processo inflamatório crônico

A análise da variável processo inflamatório crônico, caracterizado pelo infiltrado rico em linfócitos e plasmócitos, revelou-se de maneira não intensa na ampla maioria das amostras estudadas, em ambos os grupos e considerando-se

todos os momentos de aferição, não se obtendo, portanto, diferença estatisticamente significativa neste parâmetro.

Na amostra estudada, a nicotina não mostrou possuir efeito inibidor sobre os linfócitos, células importantes na fisiologia do estímulo à quimiotaxia dos fibroblastos para o sítio da lesão, de maneira contrária ao estudo de NEHER (1974).

5.2.1.3 Proliferação fibroblástica

Estudando-se os resultados obtidos com a variável proliferação fibroblástica, observou-se que, no 7º dia pós-operatório, a multiplicação dessas que são as principais células produtoras de colágeno, mostrou-se estatisticamente menor nas anastomoses do grupo de ratos que receberam a nicotina, em comparação com os animais que não sofreram a ação dela mesma ($p= 0,0090$). Esse fenômeno não se repetiu, de maneira significativa, quando a avaliação ocorreu no 14º e 28º dias após a operação. Sabe-se que o 7º dia pós-injúria corresponde a um período onde a proliferação fibroblástica já se mostra de maneira intensa na cicatrização normal (HARVEY, 1929; ORGILL e DEMLING, 1988). A ação inibidora da nicotina nesse período, demonstrada pela significância estatística encontrada neste trabalho, poderia levar à deficiência na deposição de colágeno e/ou à diminuição da resistência mecânica das anastomoses intestinais, em fase mais tardia da cicatrização, mesmo não se tendo obtido diferenças significativas na variável em questão, com o avançar do processo cicatricial.

Não foram encontrados, na literatura pesquisada, trabalhos em que este dado foi estudado, nas condições da presente pesquisa.

5.2.1.4 Deposição de colágeno

A análise da variável deposição de colágeno, utilizando-se a coloração pela hematoxilina e eosina, não demonstrou diferença estatística significativa com relação à presença de deposição intensa dele, comparando-se os resultados obtidos nos grupos N e C, em cada um dos intervalos de tempo testados.

MEDEIROS et al. (1999) concluíram em sua pesquisa que, no 10^o dia após a confecção da anastomose intestinal, a quantidade de colágeno avaliada pela citada coloração foi estatisticamente menor no grupo que fez uso da nicotina.

Cabe ressaltar que este método apresenta menor sensibilidade e menor especificidade com relação à coloração das fibras colágenas, quando comparado com o picrosirius-red, método também utilizado no presente estudo (CONSTANTINE e MOWRY, 1968).

5.2.1.5 Re-epitelização

Finalmente, com relação ao estudo da variável re-epitelização, igualmente não foi detectada, na amostra pesquisada, diferença estatisticamente significativa com relação à presença intensa de epitélio regenerativo na área anastomótica, comparando-se os grupos nicotina e controle, nos 3 períodos pós-operatórios analisados. Não foram encontrados, em pesquisa da literatura disponível, eventuais dados comparativos com a variável estudada, nas condições deste estudo.

5.2.1.6 Percentagem da área anastomótica ocupada pelos colágenos tipos I e III

Na análise das variáveis percentagem de colágenos tipos I e III na área da anastomose, com a coloração pelo picrosirius-red F3BA, observou-se que, no 7^o dia após a cirurgia, não ocorreu diferença com significância estatística tanto na quantificação da área ocupada pelo colágeno tipo I, quanto pelo tipo III, em ambos os grupos do experimento.

FRIED et al. (1984) estudaram a taxa de colágeno (pelo método indireto, através da medida da hidroxiprolina tecidual) em anastomoses do íleo de coelhos, concluindo que ela atingiu níveis de 40% do normal, quando comparados com tecido intestinal íntegro, no 7^o dia após a operação.

Na avaliação realizada no 14^o dia pós-operatório houve aumento, em números absolutos, da área ocupada pelo colágeno tipo III (imaturo), no grupo que

recebeu nicotina, em relação ao grupo controle, fato este sem significância estatística, o que não se repetiu em relação ao colágeno maduro.

MADDEN e PEACOCK (1969) concluíram que a taxa de deposição de colágeno no tecido cicatricial atinge seu máximo em torno do 14º dia pós-lesão, diminuindo progressivamente após esse tempo.

Já na avaliação realizada no 28º dia de evolução pós-operatória, notou-se, no grupo que recebeu nicotina, tendência a menor percentagem de área ocupada pelo colágeno tipo III ($p= 0,0548$), quando comparado aos dados do grupo controle. Apesar disto, pelo teste estatístico e na amostra utilizada, a hipótese nula não foi completamente rejeitada, havendo somente tendência estatística para que isto ocorra.

ORGILL e DEMLING (1988) relataram que o pico de deposição do colágeno se dá entre 21 e 28 dias após o trauma.

CHAMSON, FREY e HOVERT (1982), em estudo *in vitro* já relatado, encontraram nas culturas de fibroblastos que receberam adição de extrato de tabaco uma diminuição de 50% na taxa de colágeno do tipo III, em todo o período estudado, dados estes contrários ao presente estudo.

Notou-se, nos dados do atual trabalho, um aumento global na área ocupada por ambos os tipos de colágeno no 14º dia (valor máximo observado na pesquisa), quando comparados com o 7º dia de evolução, ocorrendo então no 28º dia da anastomose uma diminuição dos valores encontrados (em ambos os grupos e nos 2 tipos de colágeno). Devido a ausência de dados na literatura sobre a percentagem de área ocupada por ambos os tipos de colágeno estudados, seja no intestino delgado normal, seja após anastomoses deste segmento em ratos e como houve um decréscimo tanto no grupo N como no grupo C, não é possível a comparação com outros estudos, bem como o uso da nicotina não pode ser responsabilizado como causa deste efeito.

5.2.2 Aferição: Análise da força de ruptura

Observando-se os resultados obtidos com esta variável no 7º dia pós-operatório, concluiu-se que não houve diferença estatística significativa nos valores médios obtidos, entre os grupos N e C.

GOTTRUP (1980), estudando lesões provocadas em estômago e duodeno de ratos, concluiu que esses tecidos apresentaram rápido ganho em sua força mecânica entre o 5º e o 10º dias de pós-operatório, quando então atingiram valores semelhantes aos tecidos controle e nenhum ganho significativo foi observado até o 40º dia após a operação.

No 14º dia de evolução notou-se uma diminuição não significativa estatisticamente ($p= 0,4495$) no valor médio do grupo N, quando comparado ao grupo C.

PEACOCK (1962) relatou que, durante a fase inicial do processo cicatricial, existe uma estreita correspondência entre o aumento da força mecânica do tecido em cicatrização e a biogênese do colágeno. Sugeriu o autor que o ganho da força mecânica em cicatrizes, nas fases mais tardias do processo cicatricial, pode ocorrer em grande parte devido à reorganização e interligação das moléculas de colágeno, em detrimento do aumento específico da síntese dessa proteína.

Finalmente, no 28º dia após a operação, foi observada diminuição estatisticamente significativa ($p= 0,0112$) no valor médio dessa variável, no grupo de animais que receberam nicotina. Portanto, na amostra estudada, os ratos que sofreram a ação da nicotina apresentaram menor resistência tecidual na área anastomótica, quando submetidos à tração de suas extremidades.

Segundo ADAMSONS, MUSCO e ENQUIST (1964), a força mecânica dos tecidos cicatriciais aumenta exponencialmente durante os primeiros 9 dias de evolução da lesão, após os quais esta se torna mais gradual e linear até alcançar valores iguais a de tecidos controle normais ao redor do 28º dia. Os autores relataram que a concentração absoluta de colágeno no tecido cicatricial mostra pobre correlação com a força mecânica do tecido em cicatrização, devido ao fator relatado por PEACOCK (1962) .

No presente estudo, notou-se diminuição dos valores médios da força de ruptura no 28º dia após a operação, em ambos os grupos e mais pronunciada no grupo N, quando comparados com os valores obtidos no 14º dia, sem concordância com os trabalhos relatados. Assim como em variáveis anteriores, a ausência de dados na literatura pesquisada, sobre a força de ruptura de anastomoses de intestino delgado em ratos, utilizando o método deste estudo, não permite análise comparativa adequada.

São numerosos os trabalhos na literatura que estudaram a resistência das anastomoses do trato gastrointestinal. No entanto a interpretação destas informações é problemática devido aos diferentes métodos utilizados na sua avaliação, além do emprego de diferentes animais e técnicas de sutura (NARESSE, MENDES e CURI, 1987).

5.2.3 Identificação do local de ruptura

Nos corpos de prova testados no 7º dia pós-operatório 90% dos animais que receberam nicotina apresentaram rompimento na linha de anastomose. No grupo controle este resultado ocorreu em 70% das amostras. Já nos testes levados a cabo no 14º dia após a operação, 70% das anastomoses do grupo N ainda romperam na linha anastomótica e somente 40% das pertencentes ao grupo C obtiveram o mesmo resultado. Finalmente, no 28º dia pós-operatório, 40% das anastomoses do grupo nicotina romperam no local da anastomose e somente 20% do grupo controle chegaram a este fim.

Constatou-se, em ambos os grupos, diminuição gradativa da ruptura localizada na linha anastomótica, proporcionalmente ao avanço do tempo pós-operatório, identificando-se primariamente uma tendência das anastomoses distais dos animais que receberam nicotina a apresentarem, nos 3 momentos progressivos da avaliação, proporção de ruptura na linha de sutura maior do que as do grupo C. Apesar disso, não houve diferença estatisticamente significativa detectada na amostra estudada, com relação a esta variável.

Segundo NARESSE, MENDES e CURI (1987), a cicatrização intestinal apresenta alta taxa de resistência após o 10º dia e a ruptura pode então ocorrer no tecido adjacente à linha de cicatrização.

5.3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Observou-se neste experimento que a utilização de nicotina, na metodologia determinada, levou à diminuição estatisticamente significativa da proliferação fibroblástica no 7º dia pós-operatório, bem como à tendência estatística a diminuição da área ocupada pelo colágeno imaturo no 28º dia após a operação e menor força de ruptura medida na anastomose distal neste último período de avaliação.

A própria presença de menor número de fibroblastos no 7º dia após o trauma pode ser especulada como sendo a causa da diminuição da produção de colágeno no 28º dia, já que estas são as principais células produtoras desta proteína (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1995). Esta mesma causa pode ser a responsável pela menor força de ruptura encontrada no subgrupo N 28, quando comparada ao seu subgrupo controle, já que, segundo HARVEY (1929), a força mecânica de um tecido em cicatrização é função da multiplicação e maturação dos fibroblastos. De maneira semelhante, a presença de diminuição do colágeno tipo III no subgrupo N28, observada neste estudo com tendência estatística importante pode ter-se refletido na diminuição da força de ruptura nos animais submetidos ao uso da nicotina, pois sabe-se que esta proteína é a principal responsável pela força mecânica do tecido cicatricial (MADDEN e PEACOCK, 1968; CARRICO, MEHRHOF e COHEN, 1984; WITTE e BARBUL, 1997).

5.3.1 Nicotina e cicatrização

Diversas podem ser as ações deletérias da nicotina com relação à síntese fisiológica do colágeno no processo cicatricial: esta droga pode comprometer a circulação sangüínea e o conseqüente aporte de oxigênio no sítio da injúria, seja pelo estímulo à liberação de catecolaminas circulantes (WATTS, 1960), levando à vasoconstrição, seja pela diminuição da velocidade dos eritrócitos, carreadores de

oxigênio, nos capilares mesentéricos dos animais (RICHARDSON, MORTON e HOWARD, 1977) ou ainda pelo aumento da agregação plaquetária causada pela droga, possivelmente devido à inibição da liberação de prostaglandinas (apresentam ação anti-agregante plaquetária), com a conseqüente formação de micro-trombos (NADLER, VELASCO e HORTON, 1983; FRICK e SEALS, 1994). Sabe-se ainda que a própria ativação e proliferação dos fibroblastos, bem como diversas etapas da síntese intracelular do colágeno são dependentes de adequado aporte de oxigênio para ocorrerem de maneira satisfatória, podendo ser afetados pela nicotina, tais como a hidroxilação da prolina e da lisina e a remoção dos peptídeos de registro, necessária para a polimerização das moléculas de colágeno (ORGILL e DEMLING, 1988).

A nicotina poderia igualmente influenciar de maneira indireta e em caráter negativo na proliferação fibroblástica e na produção de colágeno através da inibição da proliferação de linfócitos (NEHER, 1974), células moduladoras da atividade fibroblástica (WAHL, WAHL e Mc CARTHY, 1978). Este efeito não foi observado na presente pesquisa.

Os resultados observados neste estudo podem ainda terem sido frutos da ação intracelular direta da nicotina sobre os fibroblastos, inibindo sua proliferação e/ou produção do colágeno (TIPTON e DALBOUS, 1995; GIANNOPOULOU, GEINOZ e CIMASONI, 1999).

Pelo exposto, diversos podem ser os mecanismos utilizados pela nicotina em prejuízo de um processo cicatricial normal, os quais merecem ser esclarecidos por futuros estudos. As ferramentas para que as hipóteses sejam testadas estão disponíveis, faltando apenas a presença do último e mais importante ingrediente: a curiosidade humana.

6 CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

A análise dos resultados permite concluir que a nicotina, na dose de 2mg/kg de peso do animal, em 2 administrações diárias, teve ação prejudicial na cicatrização de anastomoses do intestino delgado em ratos, levando a :

1. diminuição da proliferação fibroblástica no 7º dia pós-operatório;
2. menor quantidade de colágeno imaturo, no 28º dia após a operação;
3. menor força de ruptura do tecido cicatricial, no 28º dia após a realização das anastomoses.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMSONS, R. J.; MUSCO, F.; ENQUIST, I. F. The relationship of collagen content to wound strength in normal and scorbutic animals. **Surg. Gynecol. Obstet.**, New York, v. 119, n. 1, p. 323-329, 1964.

AUSUBEL, F. M. et al. In situ hybridization and immunohistochemistry. In: **SHORT protocols in molecular biology**. 2 ed. New York: Greene Publishing Association, 1992. p.144-145.

BALFOUR, D. J. F. Studies on the biochemical and behavioral effects of oral nicotine. **Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.**, Paris, v. 245, n. 1, p. 95-103, 1980.

BENOWITZ, N. Clinical pharmacology of nicotine. **Ann. Rev. Med.**, Palo Alto, v. 37, p. 21-33, 1986.

BOZARTH, M. A.; PUDIAK, C. M.; KUOLEE, R. Effect of chronic nicotine on brain stimulation reward. Effect of daily injections. **Behav. Brain. Res.**, Amsterdam, v. 96, n. 1-2, p. 185-188, 1998.

BRONWELL, A. W.; RUTLEDGE, R.; DALTON, M. L. Single-layer open gastrointestinal anastomoses. **Ann. Surg.**, Philadelphia, v. 165, n. 6, p. 925-932, 1967.

CARRICO, T.; MEHRHOF, A.; COHEN, I. Biology of wound healing. **Surg. Clin. North. Am.**, Philadelphia, v. 64, n. 4, p. 721-733, 1984.

CHAIB, S. A.; LING, W. S.; VASCONCELOS, E. Avaliação experimental dos fios de sutura em um só plano. **Rev. Paul. Med.**, São Paulo, v. 80, n. 5-6, p. 217-226, 1972.

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

CHAMSON, A. et al. Effects of tobacco smoke extracts on the ultrastructure of fibroblasts in culture. **J. Submicrosc. Cytol.**, Bologna, v. 12, n. 3, p. 401-406, 1980.

COELHO, I. C. M. M. **Estudo comparativo da tensão entre as cicatrizes das laparotomias paramedianas e das laparotomias transversas em ratos jovens.** Curitiba, 1999. Dissertação (Mestrado em Clínica Cirúrgica) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

CONSTANTINE, V. S.; MOWRY, R. W. The selective staining of human dermal collagen. The use of Picrosirius Red F3BA with polarization microscopy. **J. Invest. Derm.**, New York, v. 50, n. 5, p. 419-423, 1968.

COSTA e SILVA, V. L. Tabagismo, um problema de saúde pública no Brasil. **J. B. M.**, Rio de Janeiro, v. 59, n. 1, p. 14-24, 1990.

CRAIG, S.; REES, T. D. The effects of smoking on experimental skin flaps in hamsters. **Plast. Reconstr. Surg.**, Baltimore, v. 75, n. 6, p. 842-846, 1985.

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

DIETZ, U. A. **Estudo da taxa de hidroxiprolina tecidual nos diversos segmentos do canal alimentar normal do cão pelo método fotocolorimétrico utilizando o reativo de Ehrlich.** Curitiba, 1993. Dissertação (Mestrado em Clínica Cirúrgica) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

DUNPHY, J. E. The cut gut. **Am. J. Surg.**, Belle Mead, v. 119, p.1-8, 1970.

FLETCHER, H. G. The history of nicotine. **J. Chem. Educ.**, Beijing, v. 18, p. 303-308, 1941.

FORREST, C. R.; PANG, C. Y.; LINDSAY, W. K. Detrimental effect of nicotine on skin flap viability and blood flow in random skin flap operation on rats and pigs. **Surg. Forum**, Chicago, v. 36, p. 611-613, 1985.

_____. 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.

_____. Pathogenesis of ischemic necrosis in random-pattern skin flaps induced by long-term low-dose nicotine treatment in the rat. **Plast. Reconstr. Surg.**, Baltimore, v. 87, n. 3, p. 518-528, 1991.

FRICK, W. G.; SEALS, R. R. Smoking and wound healing: a review. **Tex. Dent. J.**, Austin, v. 111, n. 6, p. 21-23, 1994.

FRIED, L. E. et al. Wound healing in the intestinal wall: a comparison between ileal and colonic anastomoses. **Dis. Colon Rectum**, Baltimore, v. 27, n. 2, p. 99-104, 1984.

GIANNOPOULOU, C.; GEINOZ, A.; CIMASONI, G. Effects of nicotine on periodontal ligament fibroblasts in vitro. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 26, n. 1, p. 49-55, 1999.

GOTTRUP, F. Healing of incisional wounds in stomach and duodenum: a biomechanical study. **Amer. J. Surg.**, Belle Mead, v. 140, n. 2, p. 296-301, 1980.

GUIMARÃES, A. S. et al. Comparação entre anastomoses intestinais em 1 e 2 planos de sutura mediante estudo da rede vascular sanguínea e da cicatrização. Trabalho experimental em intestino delgado de cão. **Rev. Ass. Med. Bras.**, São Paulo, v. 20, n. 3, p. 97-101, 1974.

HAAG, H. B.; LARSON, P. S.; WEATHERBY, J. H. The effect on rats of chronic exposure to cigarette smoke. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, New York, v. 90, p. 227-238, 1960.

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.

HASTINGS, J. C. et al. Effect of suture materials on healing wounds of the stomach and colon. **Surg. Gynecol. Obstet.**, New York, v. 140, n. 5, p. 701-707, 1975.

HENDRIKS, T. et al. Solubility of tissue hydroxyproline in experimental intestinal anastomoses. **Exp. Mol. Pathol.**, Orlando, v. 43, n. 2, p. 253-259, 1985.

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.

HOWES, E. L. The immediate strength of the sutured wound. **Surgery**, St. Louis, v. 7, p. 24-31, 1940.

HOWES, E. L.; SOOY, J. W.; HARVEY, S. C. The healing of wounds as determined by their tensile strength. **J. A. M. A.**, Chicago, v. 92, n. 1, p. 42-45, 1929.

IRVIN, T. T.; GOLIGHER, J. C. Aetiology of disruption of intestinal anastomoses. **Br. J. Surg.**, Guildford, v. 60, n. 5, p. 461-464, 1973.

JIBORN, H.; AHONEN, J.; ZEDERFELDT, B. Healing of experimental colonic anastomoses. **Am. J. Surg.**, Belle Mead, v. 139, n. 3, p. 406-413, 1980.

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

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

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

KIVIRIKKO, K. I.; RISTELI, L. Biosynthesis of collagen and its alterations in pathological states. **Med. Biol.**, Springfield, v. 54, n. 3, p. 159-189, 1976.

LAU, C. E.; SPEAR, D. J.; FALK, J. L. Acute and chronic nicotine effects on multiple-schedule behavior: oral and sc routes. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, Tarrytown, v. 48, n. 1, p. 209-215, 1994.

LAWRENCE, W. T. et al. The detrimental effect of cigarette smoking on experimental flap survival. **Br. J. Plast. Surg.**, Edinburgh, v. 37, n. 2, p. 216-219, 1984.

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.

MARKS, M. I.; STITZEL, J. A.; COLLINS, A. C. Influence of kinetics of nicotine administration on tolerance development and receptor levels. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, Tarrytown, v. 27, n. 3, p. 505-512, 1987.

MEDEIROS, A. C. et al. Efeitos da nicotina na cicatrização intestinal em ratos. **Rev. Col. Bras. Cir.**, Rio de Janeiro, v. 26, n. 6, p. 375-377, 1999.

MOSELY, L. H.; FINSETH, F. Cigarette smoking: impairment of digital blood flow and wound healing in the hand. **Hand.**, v. 9, n. 2, p. 97-101, 1977.

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

MYERS, A. H.; POSTLETHWAIT, R. W.; SMITH, A. G. Histologic grading of the experimental healing wound. **Arch. Surg.**, Chicago, v. 83, n. 1, p. 147-150, 1961.

NADLER, J. L.; VELASCO, J. S.; HORTON, R. Cigarette smoking inhibits prostacyclin formation. **Lancet**, London, v. 1, p.1248-1250, 1983.

NARESSE, L. E.; MENDES, E. F.; CURI, P. R. Aparelho para medida da força de ruptura das anastomoses intestinais. **Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo.**, São Paulo. v. 42, n. 5, p. 204-208, 1987.

NEHER, G. H. Nicotine induced depression of lymphocyte growth. **Toxic. Appl. Pharmacol.**, New York, v. 27, n. 2, p. 253-258, 1974.

NEILSON, E. G.; PHILIPS, S. M.; JIMENEZ, S. Lymphokine modulation of fibroblast proliferation. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 128, n. 3, p. 1484-1486, 1982.

NELSEN, T. S.; ANDERS, C. J. Dynamic aspects of small intestine rupture with special consideration of anastomotic strength. **Arch. Surg.**, Chicago, v. 93, n. 2, p. 309-313, 1966.

NOLAN, J. et al. The acute effects of cigarette smoke exposure on experimental skin flaps. **Plast. Reconstr. Surg.**, Baltimore, v. 75, n. 4, p. 544-549, 1985.

NOMINA Anatomica veterinaria. Barcelona: Aedos, 1975. 218 p.

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

PICKERING, J. G.; BOUGHNER, D. R. Fibrosis in the transplanted heart and its relation to donor ischemic time. Assessment with polarized light microscopy and digital image analysis. **Circulation**, Dallas, v. 81, n. 3, p. 949-957, 1990.

PROCKOP, D. J. et al. The biosynthesis of collagen and its disorders. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 301, n. 1, p. 313-323, 1979.

RAO, V. K.; MORRISON, W. A.; O'BRIEN, B. Effect of nicotine on blood flow and patency of experimental microvascular anastomoses. **Ann. Plast. Surg.**, Boston, v. 11, n. 3, p. 206-209, 1983.

REES, T. D.; LIVERETT, D. M.; GUY, C. L. The effect of cigarette smoking on skin flap survival in the face lift patient. **Plast. Reconstr. Surg.**, Baltimore, v. 73, n. 6, p. 911-915, 1984.

RENAUD, S. et al. Platelet function after cigarette smoking in relation to nicotine and carbon monoxide. **Clin. Pharmacol. Ther.**, St. Louis, v. 36, n. 3, p. 389-395, 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, n. 2, p. 213-215, 1984.

RICHARDSON, D. R.; MORTON, R.; HOWARD, J. Effects of chronic nicotine administration on RBC velocity in mesenteric capillaries of the rat. **Blood Vessels**, Basel, v. 14, n. 5, p. 318-324, 1977.

RUSSELL, M. A.; JARVIS, M.; IYER, R. Relation of nicotine yield of cigarettes to blood nicotine concentrations in smokers. **Br. Med. J.**, London, v. 280, p. 972-976, 1980.

SACHAR, K.; GOEL, R.; WEISS, A. P. Acute and chronic effects of nicotine on anastomotic patency following ischemia/reperfusion. **J. Reconstr. Microsurg.**, New York, v. 14, n. 3, p. 179-184, 1998.

SCHEININ, T. M.; VILJANTO, J. Bursting pressure of healing gastrointestinal wounds in the rat. **Ann. Med. Exp. Biol. Fenn.**, Helsinki, v. 44, n. 1, p. 49-51, 1966.

SHERWIN, M. A.; GASTWIRTH, C. M. Detrimental effects of cigarette smoking on lower extremity wound healing. **J. Foot Surg.**, Baltimore, v. 29, n. 1, p. 84-87, 1990.

SMANIOTTO, B. **O efeito da estreptoquinase na cicatrização de anastomoses do cólon, no rato.** Curitiba, 1999. Tese (Doutorado em Clínica Cirúrgica) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

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

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

UDENFRIEND, S. Formation of hydroxyproline in collagen. **Science.**, Washington, v. 152, n. 3727, p. 1335-1340, 1966.

ULRICH, Y. M.; HARGREAVES, K. M.; FLORES, C. M. A comparison of multiple injections versus continuous infusion of nicotine for producing up-regulation of neuronal [3H]-Epibatidine binding sites. **Neuropharmacology.**, Oxford, v. 36, n. 8, p. 1119-1125, 1997.

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

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

VAN WINCLE, W.; HASTINGS, J. C. Considerations in the choice of suture material for various tissues. **Surg. Gynecol. Obstet.**, New York, v. 135, n. 2, p. 113-126, 1972.

WAHL, S. M.; WAHL, L. M.; MC CARTHY, J. B. Lymphocyte-mediated activation of fibroblast proliferation and collagen production. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 121, n. 3, p. 247-254, 1978.

WATTS, D. T. The effect of nicotine and tobacco smoke on the secretion of epinephrine. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, New York, v. 90, n. , p. 74-80, 1960.

WISE, I. et al. Studies on the healing of anastomoses of small and large intestines. **Surg. Gynecol. Obstet.**, New York, v. 141, n. 2, p. 190-194, 1975.

WITTE, M. B.; BARBUL, A. General principles of wound healing. **Surg. Clin. North Am.**, Philadelphia, v. 77, n. 3, p. 509-527, 1997.

ANEXO

GRUPO	DIA	RATO	FR	PIA	PIC	PF	DC	RE	COLAG_3	COLAG_1
1 N	7	1	0,142	3	1	2	2	1	18,45	0,25
2 N	7	2	0,125	2	1	2	1	1	29,7	1,8
3 N	7	3	0,077						20,2	1,25
4 N	7	4	0,161	1	1	2	1	2	11,85	0,3
5 N	7	5	0,048	2	1	2	2	1	12,8	1,1
6 N	7	6	0,122	2	1	2	2	3	16,9	0,95
7 N	7	7	0,136	1	1	2	2	2	13,5	3,35
8 N	7	8	0,114	3	1	2	2	1	21,15	2,6
9 N	7	9	0,107	2	1	2	1	2		
10 C	7	1	0,123	1	2	3	2	2	5,55	0,95
11 C	7	2	0,122	1	1	3	2	2	4,6	0,85
12 C	7	3	0,139	1	1	2	2	3	18,45	0,4
13 C	7	4	0,137	2	1	3	2	1	9,2	0,15
14 C	7	5	0,059	2	1	3	2	1	24,85	7,15
15 C	7	6	0,121	1	1	3	2	1	25,7	7,9
16 C	7	7	0,131	3	1	2	1	1	10,85	1,3
17 C	7	8	0,075	2	2	2	2	2	22,05	1,15
18 C	7	9	0,115	1	1	3	2	2	21,35	5,1
19 N	14	1	0,153	2	1	2	2	2	36,05	9,65
20 N	14	2	0,167	1	1	3	2	3	14	4,15
21 N	14	3	0,138	2	1	2	2	2	11,3	1,1
22 N	14	4	0,15	3	1	2	2	1	17,15	4,4
23 N	14	5	0,144	2	1	2	2	2	25,15	4,85
24 N	14	6	0,103	3	1	2	3	1	6,65	0,25
25 N	14	7	0,23	1	2	2	3	2	28,9	2,15
26 N	14	8	0,167	1	1	2	2	2	23,5	3,05
27 N	14	9	0,118						17,95	1,5
28 N	14	10	0,188							
29 C	14	1	0,19	0	1	2	2	2	15,2	27
30 C	14	2	0,136	1	1	2	2	2	4,5	0,8
31 C	14	3	0,137	2	1	2	2	1	23,6	11,8
32 C	14	4	0,192	2	2	2	1	1	24,65	8,45
33 C	14	5	0,224	1	1	2	3	3	18,65	1,75
34 C	14	6	0,154	1	1	2	3	2	7,95	0,4
35 C	14	7	0,165						8,75	0,35
36 C	14	8	0,185	1	1	2	3	3	3,85	2,15
37 C	14	9	0,104	0	1	1	3	3	29,05	3,85
38 C	14	10	0,18							
39 N	28	1	0,108	0	1	2	2	3	5,9	1,2
40 N	28	2	0,148	0	2	2	3	2	1,8	0,7
41 N	28	3	0,139	0	1	2	3	3	2,7	1,25
42 N	28	4	0,124	0	1	2	3	3	3,2	0,4
43 N	28	5	0,118	0	0	2	3	3	8,15	1,9
44 N	28	6	0,119	1	1	2	2	3	10,1	2,35
45 N	28	7	0,117	0	1	1	2	3	10,35	4,1
46 N	28	8	0,108	1	1	1	2	3	5,05	1,15
47 N	28	9	0,123	1	2	1	2	2	2,7	1,5

48 N	28	10	0,062						11,95	3,85
49 C	28	1	0,123	0	1	2	3	3	6,15	0,9
50 C	28	2	0,135	0	1	2	3	3	8,05	5,85
51 C	28	3	0,127	1	1	2	2	3	7,45	2,8
52 C	28	4	0,122	1	1	1	3	2	14,3	2,4
53 C	28	5	0,154	1	3	2	2	3	15,65	1,35
54 C	28	6	0,147	2	2	2	2	1	16,1	12,45
55 C	28	7	0,143	1	1	2	2	3	9,2	8,7
56 C	28	8	0,219	1	1	2	3	3	11,95	10,4
57 C	28	9	0,143	0	1	2	3	3	4,6	1,1
58 C	28	10	0,138							

FR – Força de ruptura

PIA – Processo inflamatório agudo

PIC – Processo inflamatório crônico

PF – Proliferação fibroblástica

DC – Deposição de colágeno

RE – Re-epitelização

COLAG_3 – Colágeno tipo III

COLAG_1 – Colágeno tipo I