



TIAGO JACOMETO COELHO DE CASTILHO

**EFEITO DO ÁCIDO GRAXO ÔMEGA-3 NA CICATRIZAÇÃO DE
ANASTOMOSE COLÔNICA EM RATOS: ESTUDO TENSÍOMÉTRICO,
DENSITOMETRIA E HISTOLOGIA DO COLÁGENO**

**CURITIBA
2015**

TIAGO JACOMETO COELHO DE CASTILHO

**EFEITO DO ÁCIDO GRAXO ÔMEGA-3 NA CICATRIZAÇÃO DE
ANASTOMOSE COLÔNICA EM RATOS: ESTUDO TENSIO MÉTRICO,
DENSITOMETRIA E HISTOLOGIA DO COLÁGENO**

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

Orientador: Prof.Dr. Antonio Carlos L. Campos

Co-orientadora: Profa. Dra. Eneri Vieira de S. L. Mello

**CURITIBA
2015**



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

Ata do julgamento da 414ª dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná, referente ao aluno TIAGO JACOMETO COELHO DE CASTILHO com o título EFEITO DO ÁCIDO GRAXO ÔMEGA-3 NA CICATRIZAÇÃO DE ANASTOMOSE COLÔNICA EM RATOS: ESTUDO TENSIMÉTRICO, DENSITOMETRIA E HISTOLOGIA DO COLÁGENO Linha de Pesquisa Cicatrização e Medidas de Resistência dos Tecidos Área de Concentração Nutrição e Cicatrização em Cirurgia tendo como orientador Professor Doutor Antonio Carlos L. Campos

Às sete horas e trinta minutos do dia cinco de maio de dois mil e quinze, no auditório da CAD - sala 701 - 7º andar do prédio central do Hospital de Clínicas, reuniu-se, em sessão pública, a Banca Examinadora de Avaliação composta pelos seguintes professores doutores Eneir Vieira de Souza Leite, Marco Aurélio Raeder da Costa e Antonio Sergio Brenner sendo este último Presidente da Banca. Aberta a sessão, foi apresentada pelo Professor Doutor Jorge Eduardo Fouto Matias Coordenador do Programa, a documentação probatória do cumprimento pelo candidato das exigências legais que lhe facultam submeter-se à avaliação da dissertação como última etapa à sua titulação no Programa. A seguir o Presidente da Banca Examinadora de Avaliação convidou o candidato a apresentar oralmente resumo de sua dissertação no prazo máximo de trinta minutos para demonstração de sua capacidade didática e para melhor conhecimento do tema por parte da audiência composta de professores, médicos, alunos, familiares e demais interessados. Seguiu-se a arguição e imediata resposta pelo candidato, sucessivamente pelos componentes da Banca Examinadora. Obedecido o tempo máximo de vinte minutos para a arguição e igual tempo para cada resposta. Terminada a etapa de arguição, reuniu-se a Banca Examinadora em sala reservada para atribuição das notas, dos conceitos e lavratura do Parecer Conjunto. O candidato foi considerado **APROVADO** considerando-se os parâmetros vigentes estabelecidos pelo programa e regidos pela legislação pertinente da instituição. Voltando à sala de sessão, o Senhor Presidente da Banca Examinadora leu os conceitos do Parecer Conjunto e deu por encerrada a sessão. E para que tudo conste, foi lavrada a presente Ata por mim Regina Aparecida Sass Marques secretária desta Pós-Graduação, que será assinada pelos seguintes membros da Banca Examinadora de Avaliação.


Eneir Vieira de Souza Leite


Marco Aurélio Raeder da Costa


Antonio Sergio Brenner



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

**PARECER CONJUNTO DA BANCA EXAMINADORA
DA AVALIAÇÃO DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

Aluno **TIAGO JACOMETO COELHO DE CASTILHO**

Titulo da dissertação **EFEITO DO ÁCIDO GRAXO ÔMEGA-3 NA
CICATRIZAÇÃO DE ANASTOMOSE COLÔNICA EM RATOS:ESTUDO
TENSIO MÉTRICO, DENSITOMETRIA E HISTOLOGIA DO COLÁGENO**

CONCEITOS EMITIDOS

MEMBROS	CONCEITO	EQUIVALÊNCIA
Eneri Vieira de Souza Leite	A	9,5
Marco Aurélio Raeder da Costa	A	9,5
Antonio Sergio Brenner	A	9,5

CONCEITO FINAL DE AVALIAÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

Conceito Final: A Equivalência: 9,5

Curitiba, 05 de maio de 2015.

MEMBROS	ASSINATURA
Eneri Vieira de Souza Leite	
Marco Aurélio Raeder da Costa	
Antonio Sergio Brenner	

À minha esposa, **PAOLA**, e a minha pequena filha **HELENA**, razões pelas quais minha vida se torna doce, feliz e completa.

Aos meus pais, pelo amor e incentivo; por tudo o que alçaram em suas vidas e por formarem três filhos médicos apaixonados pelo que fazem.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Antônio Carlos L. Campos, professor titular do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal do Paraná, orientador desta dissertação, pela confiança, incentivo, dedicação e grande auxílio na realização deste trabalho;

À Profa Dra Eneri Vieira de Souza Leite Mello, professora associada do Departamento de Ciências Morfofisiológicas da Universidade Estadual de Maringá, co-orientadora desta dissertação, pelo carinho, disponibilidade e incentivo desde meus tempos de acadêmico do curso de Medicina até o presente momento, para a realização deste trabalho;

Aos técnicos do Laboratório de Ciências Morfofisiológicas da UEM, Maria dos Anjos e Maria Eurides, pela fundamental e grande ajuda durante a fase experimental deste trabalho;

À biotecnóloga, Beatriz Petroncine Martins, exemplo de determinação pela ajuda na confecção deste trabalho;

À funcionária do Programa de Pós-Graduação Regina Aparecida Sass Marques, pela prestatividade e ajuda;

À Universidade Federal do Paraná, pelo Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica conceituado e sólido;

À Universidade Estadual de Maringá, pela oportunidade de realizar graduação em Medicina, e também por ter oferecido toda a infraestrutura para a realização da parte experimental do trabalho;

À Capes, pelo incentivo à pesquisa;

A todos aqueles que, de muitas formas, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Introdução: A utilização de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa, tem sido estudado no contexto da cicatrização e regeneração tecidual principalmente em função de suas propriedades antiinflamatórias, antioncogênicas e imunorregulatórias. Estudos prévios demonstraram efeitos benéficos com o uso da imunonutrição enteral contendo diversos elementos (L-arginina, ômega-3 e oligoelementos), porém a ação individual de cada componente na cicatrização de anastomoses colônica ainda permanece desconhecida. O objetivo do presente trabalho é avaliar a influência da suplementação pré-operatória com ômega-3 na cicatrização de anastomoses colônicas de ratos eutróficos. **Material e método:** Foram utilizados 40 ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*, *Roentia Mammalia*), machos adultos, com peso de $234,4 \pm 22,3$ gramas, provenientes do Biotério da Universidade Estadual de Maringá. Os animais foram alojados individualmente e divididos em 2 grupos principais recebendo ração *ad libitum* nas quatro semanas anteriores ao procedimento. Nos sete dias que antecederam ao cirúrgico, o grupo 1 um recebeu suplementação de azeite de oliva e o grupo 2, ômega-3 na forma de emulsões isocalóricas e isovolumétricas na dose de 100 mg/kg/dia. Nos dois grupos a suplementação foi realizada através de gavagem orogástrica sem anestesia, sendo submetidos a duas colotomias seguidas de colorrafia. No 5º PO os ratos foram sacrificados. Foram analisados: evolução do peso; morbidade e mortalidade; avaliação tensiométrica da anastomose colônica; histologia e densitometria do colágeno. A análise estatística foi realizada por meio dos testes t de Student, Mann-Whitney, teste Exato de Fisher e teste Z para comparação de proporções, com $p < 0,05$. **Resultados:** houve deiscência de anastomose em 4 animais no grupo GAO e 4 no grupo GOM. A taxa de mortalidade no grupo GAO foi de 35,0% (n=7) e 10,0% (n=2) no grupo GOM, com $p = 0,1973$. Não houve diferença na média de peso no início do experimento, no 7º, 14º, 21º dia, no dia da cirurgia e no dia do sacrifício, respectivamente. O valor da força máxima de tração do grupo GAO foi de $1,9 \pm 0,3$ N e para o grupo GOM $1,7 \pm 0,2$ com $p = 0,357$. Observou-se, contudo, uma maior quantidade de colágeno tipo I significativa ($p = 0,0126$) no grupo GOM em relação ao grupo GAO. O Índice de Maturação do Colágeno (IMaC) foi estabelecido para os grupos (GAO – $1,74 \pm 0,71$; GOM - $1,67 \pm 0,5$ não sendo observado diferença estatística em relação às médias entre os grupos ($p = 0,719$). **Conclusões:** A suplementação pré-operatória com ômega-3 está associado a aumento no depósito de colágeno do tipo I nas anastomoses colônicas em ratos no 5º PO. Não foram identificadas diferenças na força de ruptura ou no Índice de Maturação do colágeno. Nas condições do presente estudo foi verificado a presença de maior quantidade de colágeno tipo I nas anastomoses de ratos suplementados com ácido graxo ômega-3.

Palavras-chave: Ômega-3. Cicatrização de feridas. Anastomose colônica. Tensiometria. Densitometria do colágeno. Ratos.

ABSTRACT

Background: The use of long-chain polyunsaturated fatty acids, has been studied in the context of healing and tissue regeneration mainly due to its anti-inflammatory, immunoregulatory antioncogenic properties. Previous studies have demonstrated beneficial effects with the use of enteral immunonutrition containing various elements (L-arginine, omega-3, trace elements), but the individual action of each component in the healing of colonic anastomosis remains unclear. The aim of this study is to evaluate the influence of preoperative supplementation with omega-3 fatty acids in the healing of colonic anastomoses of normal weight mice. **Methods:** 40 Wistar rats (*Rattus norvegicus albinos*, Roentia Mammalia), adult male, weighing 234.4 ± 22.3 grams from the vivarium of the Universidade Estadual de Maringá. The animals were acclimated individually and divided into two main groups receiving ad libitum in the four weeks prior to the procedure. Seven days prior to surgery, group 1 one received olive oil supplementation and group 2, omega-3 as an isocaloric and isovolumetric emulsions at a dose of 100 mg / kg / day. Both groups received the fatty acids supplementation through orogastric gavage without anesthesia and submitted to two consecutive enteral anastomosis, right and left colon, respectively. In the fifth PO, rats were sacrificed. We evaluated the evolution of weight; morbidity and mortality; strain, histology and densitometry of collagen, of colonic anastomosis. Statistical analysis was performed using the Student t test, Mann-Whitney test, Fisher's exact test and Z-test to compare proportions, with $p < 0.05$. **Results:** there was anastomotic leakage in 4 animals in each group. The mortality rate in the GAO group was 35.0% ($n = 7$) and 10.0% ($n = 2$) in the GOM group, with $p = 0.1973$. There was no difference in the average weight at the beginning of the experiment, on the 7th, 14th, 21st day, the day of surgery and the day of sacrifice, respectively. The value of the maximum tensile strength of the GAO group was 1.9 ± 0.3 N and the GOM group 1.7 ± 0.2 , $p = 0.357$. There was, however, a larger amount of type I collagen ($p = 0.0126$) in the GOM group. The maturation index Collagen (CMI) was established for groups (GAO - 1.74 ± 0.71 ; GOM - 1.67 ± 0.5 ; $p=0,719$) and it was not observed difference between them. **Conclusions:** Preoperative supplementation with omega-3 is associated with increased collagen deposition of type I fibers in colonic anastomoses in rats on the 5th PO. No differences were observed in the breaking strength or collagen maturation index.

Key-words: Omega-3. Wound healing. Colonic anastomosis. Tensiometers. Collagen densitometry. Rats.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 –	Fases da cicatrização da ferida.....	23
FIGURA 2 –	Evolução da força tênsil no processo de cicatrização de acordo com a síntese e degradação do colágeno.....	27
FIGURA 3 –	Síntese do óxido nítrico a partir da l-arginina.....	30
FIGURA 4 –	Estrutura química dos ácidos graxos.....	33
FIGURA 5 –	Mecanismos de ação do ômega-3.....	35
FIGURA 6 –	Delineamento experimental e cronologia do experimento.....	42
FIGURA 7 –	Realização da gavagem para administração da emulsão lipídica.....	43
FIGURA 8 –	Anastomoses colônicas: a – anastomose proximal. b – anastomose distal.....	44
FIGURA 9 –	Tensiômetro Emic® DL 1000.....	46
FIGURA 10 –	Amostra dos corpos de prova para estudo tensiométrico (a) e histopatológico (b).....	47
FIGURA 11 –	Teste de tração da anastomose colônica do rato.....	47
FIGURA 12 –	Sistema de captação picrosírius red grupo ômega-3 (predominância colágeno tipo I).....	50
FIGURA 13 –	Sistema de captação picrosírius red grupo azeite de oliva (predominância colágeno tipo III).....	50

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 –	Evolução do peso em D0, D7, D14, D21, DCX e DSX.....	55
GRÁFICO 2 –	Comparação da força máxima de tração e força de ruptura total entre os grupos GAO e GOM.....	56
GRÁFICO 3 –	Distribuição dos colágenos tipos I e III nos grupos GOM e GAO.....	58
GRÁFICO 4 –	Índice de maturação do colágeno nos grupos GAO e GOM.....	59

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 –	Composição do azeite de oliva.....	43
QUADRO 2 –	Índice de maturação do colágeno (IMaC).....	51

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 –	Intensidade dos achados histológicos pela técnica de hematoxilina-eosina.....	48
TABELA 2 –	Média \pm erro padrão do peso da amostra por grupos (g).....	54
TABELA 3 –	Média \pm erro padrão das variáveis força máxima de tração e força de ruptura total entre os grupos GAO e GOM.....	55
TABELA 4 –	Grupos GAO e GOM segundo as variáveis infiltrado, edema, congestão, tecido de granulação e fibrose.....	57
TABELA 5 –	Média \pm erro padrão médio de área ocupada pelo colágeno maduro (tipo I) e imaturo (tipo III) os grupos GAO e GOM.....	58
TABELA 6 –	Média \pm erro padrão de IMaC para os grupos GAO e GOM.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS

CD8	–	Receptor de membrana do grupo 8+ (<i>cluster determinant</i>)
cm	–	Centímetro
cm ²	–	Centímetro quadrado
cm ³	–	Centímetro cúbico
CP	–	Corpo de prova
CX	–	Dia da cirurgia
D0	–	Dia do início do estudo
DNA	–	Ácido Desoxirribonucléico
EP	–	Erro padrão
EPM	–	Erro padrão da média
<i>et al.</i>	–	e colaboradores
FMT	–	Força Máxima de Tração
FRT	–	Força Ruptura Total
g	–	Gramas
GAO	–	Grupo submetido à suplementação pré-operatória com dieta enteral controle azeite oliva
GOM	–	Grupo submetido à suplementação pré-operatória com dieta enteral com ômega-3
HE	–	Hematoxilina-Eosina
IGF	–	1 Fator de crescimento insulina símilie
IL-1	–	Interleucina 1
IL-10	–	Interleucina 10
IL-6	–	Interleucina 6
IL-8	–	Interleucina 8
IM	–	Intramuscular
IMaC	–	Índice de maturação do colágeno
INMETRO	–	Instituto Nacional de Pesos e Medidas
Kcal	–	Kilocaloria
Kg	–	Kilograma
Kgf	–	Kilograma-força
<i>lag</i>	–	Estacionária
M	–	Média
mg	–	Miligrama
min	–	Minuto
MIP	–	Proteína quimioatraente de macrófagos
ml	–	Mililitro
mm	–	Milímetro
N	–	Newtons

n	–	Tamanho da amostra
NADPH	–	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NO	–	Óxido Nítrico
NOi	–	Óxido Nítrico Sintetase
O ₂	–	Oxigênio
p	–	<i>Nível de significância estatística</i>
PCS	–	<i>Picrosírius Red</i>
PDGF	–	Fator quimioatraente derivado de plaquetas
PNM	–	Polimorfonucleares
RGB	–	<i>Red, green, blue</i>
SX	–	Dia da morte dos animais
TGF- α	–	Fator de crescimento de transformação alfa
TGF- β	–	Fator de crescimento de transformação beta
TM	-	Tensão Máxima
TNF- α	–	Fator de necrose tumoral alfa
UEM	–	Universidade Estadual de Maringá
UFPR	–	Universidade Federal do Paraná
UTI	–	Unidade de Terapia Intensiva

LISTA DE SÍMBOLOS

%	–	Porcentagem
Δ	–	Delta
=	–	Igual a
\pm	–	Mais ou menos
vs.	–	Versus
α	–	Alfa
β	–	Beta
μm	–	Micrômetro
μm^2	–	Micrômetro quadrado
Υ	–	Gama
ω	–	Ômega
κ	–	Kappa

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	OBJETIVOS.....	18
2	REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1	CICATRIZAÇÃO DAS ANASTOMOSES COLÔNICAS.....	20
2.1.1	Cicatrização anastomoses colônicas	20
2.1.2	Fase inflamatória	21
2.1.3	Fase proliferativa	22
2.1.4	Fase de maturação	23
2.2	AVALIAÇÃO DA CICATRIZAÇÃO DE ANASTOMOSES COLÔNICAS....	24
2.2.1	Avaliação mecânica	24
2.2.2	Avaliação histológica e densitometria do colágeno	26
2.3	IMUNONUTRIÇÃO E CICATRIZAÇÃO.....	28
2.4	ÁCIDOS GRAXOS E CICATRIZAÇÃO.....	32
2.4.1	Ácidos graxos	32
2.4.2	Ácidos graxos ômega-3 e cicatrização	34
3	MATERIAL E MÉTODO	40
3.1	ANIMAIS.....	41
3.2	CONSIDERAÇÕES AMBIENTAIS.....	41
3.3	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	42
3.4	SUPLEMENTAÇÃO ÔMEGA-3.....	42
3.5	PROCEDIMENTO CIRÚRGICO.....	43
3.6	SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS.....	45
3.7	MORBIDADE E MORTALIDADE.....	45
3.8	CONTROLE DO PESO.....	45
3.9	AVALIAÇÃO TENSÍOMÉTRICA.....	46
3.10	AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E DENSITOMETRIA DO COLÁGENO.....	48
3.10.1	Hematoxilina-Eosina	48
3.10.2	Densitometria do Colágeno	49
3.11	AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA.....	52

4	RESULTADOS	53
4.1	MORBIDADE E MORTALIDADE.....	54
4.2	PESO.....	54
4.3	AVALIAÇÃO TENSIOMÉTRICA.....	55
4.4	HEMATOXILINA – EOSINA.....	56
4.5	DENSITOMETRIA DO COLÁGENO.....	57
5	DISCUSSÃO	60
5.1	DO MATERIAL E MÉTODO.....	61
5.2	DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÔMEGA-3.....	62
5.3	DOS RESULTADOS.....	64
5.3.1	Morbidade e mortalidade	64
5.3.2	Peso	65
5.3.3	Avaliação tensiométrica	65
5.3.4	Avaliação histológica	66
5.3.5	Densitometria do colágeno	67
5.4	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	68
6	CONCLUSÕES	69
	REFERÊNCIAS	71
	APÊNDICES	81

1 INTRODUÇÃO

A imunonutrição é definida como utilização de nutrientes específicos em fórmulas que promovem, através de diferentes mecanismos de ação, efeitos sobre o sistema inflamatório e imune (SUCHNER; KUHN; FÜRST, 2000 e CHOW; BARBUL, 2014).

Inicialmente testada em modelos animais, passou a ser utilizada em pacientes previamente desnutridos que seriam submetidos a intervenções cirúrgicas, demonstrando claro benefício em termos de recuperação pós-cirúrgica, taxa de morbidade, tempo de hospitalização e tempo de ventilação mecânica. Contudo, a utilização dessas fórmulas difundiu-se e estudos passaram a demonstrar efeito positivo também para indivíduos eutróficos (WEIMANN *et al.*, 2006; WAITZBERG; MARIMUTHU *et al.*, 2012; TURNOCK, *et al.*, 2013).

Entretanto, devido aos complexos mecanismos de interação entre os processos de absorção, acomplamento às membranas, sinalização intracelular, sabe-se hoje que as fórmulas compostas de aminoácidos, ácidos graxos essenciais, oligoelementos, vitaminas, nucleotídeos e nucleosídeos quando utilizam esses elementos em conjunto, trazem nitidamente benefícios, ao passo que, ao se utilizarem nutrientes específicos, os mecanismos de atuação tornam-se menos claros e seus efeitos são discutíveis (CORRÊA-NETO *et al.*, 2009).

A utilização de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa tem sido objeto de estudo no contexto da cicatrização e regeneração tecidual, principalmente em função de suas propriedades antiinflamatórias, imunorregulatórias e antioncogênicas.

Contudo, estudos com resultados divergentes foram realizados em modelos murinos com colite induzida, nos quais a utilização do ácido graxo ômega-3 foi prejudicial, resultando em agravamento da colite (MATSUNAGA *et al.*, 2008; WOODWORTH *et al.*, 2010)

Suas propriedades antiinflamatórias advêm de processos como o da substituição parcial do ácido aracdônico nas membranas celulares, e com isso, há

redução na produção de seus derivados considerados pró-inflamatórios, como prostaglandinas E2. Há também redução na quimiotaxia de monócitos e neutrófilos, modulando, dessa forma, a resposta inflamatória em suas fases mais iniciais. São notáveis também seus efeitos imunorregulatórios através da redução na proliferação de linfócitos T citotóxicos em resposta a citocinas pró-inflamatórias, na produção de mediadores como óxido nítrico e fator de necrose tumoral (CALDER, 1998; KURATKO, 2000; CALDER, 2001; WHITING; BLAND; TARLTON, 2005).

Chow e Barbul (2014), em seu artigo sobre imunonutrição e o papel do ômega-3, cita que apesar de exercer um papel claro na resposta inflamatória, a suplementação com ômega-3 e seu papel no contexto geral da cicatrização ainda são desconhecidos.

1.1 OBJETIVOS

Avaliar o efeito da suplementação pré-operatória com ácido graxo ômega-3 sobre a cicatrização de anastomoses colônicas em ratos, por meio de:

- a) Morbidade e mortalidade pós-operatórias;
- b) Peso;
- c) Avaliação histológica e densiometria do colágeno;
- d) Avaliação tensiométrica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CICATRIZAÇÃO DAS ANASTOMOSES COLÔNICAS

2.1.1 Cicatrização anastomoses colônicas

O processo de cicatrização envolve o pico de aparecimento determinados tipos celulares com diferentes graus de atividade durante o processo de regeneração. Assim, plaquetas, neutrófilos, macrófagos fibroblastos e linfócitos farão parte de um complexo meio de sinalização que depende de um sistema imune efetivo. Fatores que levem, por exemplo, a depleção de linfócitos T na ferida operatória, cujo pico encontra-se dentro de uma semana do momento no início do processo de cicatrização, reduzem a força de ruptura e conteúdo de colágeno da ferida (PETERSON *et al.*, 1987; EFRON *et al.*, 1990).

O epitélio intestinal pode sofrer agressão pelos mais diversos agentes e substâncias, como toxinas endoluminais, estresse oxidativo, interação com a própria microbiota existente ou mesmo através do processo de digestão normal.

Assim, didaticamente, a cicatrização na área de anastomose intestinal segue as etapas de inflamação, proliferação e de maturação, porém, de maneira quase independente, cada camada da parede colônica exibe características específicas com intensidades diferentes (HERRMANN; WOODWARD; PULASKI, 1964; THORNTON; BARBUL, 1997).

O intestino normal possui forte metabolismo glicolítico aeróbio e anaeróbio. A confecção de uma anastomose é capaz de reduzir profundamente e por tempo indeterminado o metabolismo e energia nesse local. As camadas mucosa e muscular da mucosa são as mais atingidas por essa redução do metabolismo, ao passo que a camada submucosa permanece intacta no que tange à produção de energia (BRASKÉN, 1991).

A camada submucosa, pela grande quantidade de colágeno produzida durante o processo de regeneração, é considerada o local de maior resistência tênsil da anastomose (HESP; HENDRIKS; SCHILLING, 1985). A qualidade (maior concentração de colágeno tipo I) e não somente a quantidade de colágeno são determinantes para a resistência da anastomose (DOILLON *et al.*, 1985b).

A resistência à tração de anastomoses jejunais em ratos foi avaliada por Jonsson, Jiborn e Zederfeldt (1983) imediatamente após a confecção da sutura e nos dias 1º, 2º, 3º, 4º, 14º e 28º de pós-operatório. A resistência tênsil caiu nos três dias iniciais de pós-operatório, seguida de aumento progressivo a partir de então, atingindo resistência máxima a partir do 14º dia. O mesmo comportamento de queda, seguido de aumento progressivo na força tênsil, foi observado por HÖGSTRÖN *et al.* (1985) no estudo do efeito da sepsis induzida por E.coli nas anastomoses intestinais.

Entre o 4º e o 7º dia pós-anastomose, o risco de ruptura da anastomose é máximo devido à ação das colagenases teciduais que degradaram o colágeno previamente depositado, sem, contudo, haver quantidade suficiente de colágeno novo na região da anastomose (JONSSON; JIBORN, ZEDERFERLDT, 1983).

2.1.2 Fase inflamatória

A cicatrização constitui um processo sistêmico e dinâmico independente do agente que a produziu. Sequências bem definidas desse processo foram estabelecidas inicialmente em 1910 por Carrel e, hoje, após modificações, está dividida em fases inflamatória, proliferação e maturação (CLARK, 2005).

Após o surgimento de uma solução de continuidade, o processo cicatricial inicia-se dentro de minutos ou horas do momento da descontinuidade epitelial, com o chamado processo de restituição, através do qual as células colunares ao redor perdem sua polaridade e se tornam achatadas, forrando a área desnuda, mecanismo que independe da proliferação celular (STURM; DIGGAOS, 2008). A fase inflamatória ocorre em até 3 dias do evento inicial e se caracteriza pela

vasoconstrição inicial promovida pelo tromboxane A₂ e por prostaglandinas derivados da lise celular seguida pela vasodilatação com edema intersticial e pelo aparecimento de leucócitos polimorfonucleares. Os neutrófilos são as primeiras células a chegar à ferida, atraídos, principalmente, pelos fatores quimiotáticos derivados de plaquetas (PDGF) por meio de seu processo de desgranulação. O mesmo fator também é responsável pela presença dos macrófagos e fibroblastos na área em reparação (HATANAKA; CURI, 2007).

O fator de crescimento de transformação (TGF- β e TNF- α), a proteína quimioatraente de macrófagos (MIPs) e a interleucinas 1,6 e 8 (IL-1,IL-6,IL-8), entre outros, promovem, em conjunto, a adesão dos neutrófilos ao endotélio por meio das selectinas, sendo substituídos ao longo do processo pelos macrófagos (WERNER; GROSE, 2003; IIZUKA; KONNO, 2011). Os macrófagos, por sua vez, têm ações no desbridamento, promotores de angiogênese, fibroplasia e confecção de uma matriz extracelular necessária à próxima fase, a proliferativa (BRASKÉN, 1991; THORNTON; BARBUL, 1997; BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006).

2.1.3 Fase proliferativa

A fase de proliferação celular inicia-se por volta do 4º dia, tendo duração de 12 a 14 dias. Caracteriza-se pelo aparecimento dos fibroblastos atraídos pelos fatores liberados pelos macrófagos. É composta por processos simultâneos de proliferação fibroblástica, angiogênese, epitelização e deposição do colágeno (CAMPOS; GROTH; BRANCO, 2008).

Por volta da segunda semana, passa a ser caracterizada pela formação do tecido de granulação. A multiplicação dos fibroblastos marca essa fase, por meio de estímulos dos fatores de crescimento como o PGDF e do TGF- β através de suas vias dependentes de TGF- α e independentes (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006; HATANAKA; CURI, 2007).

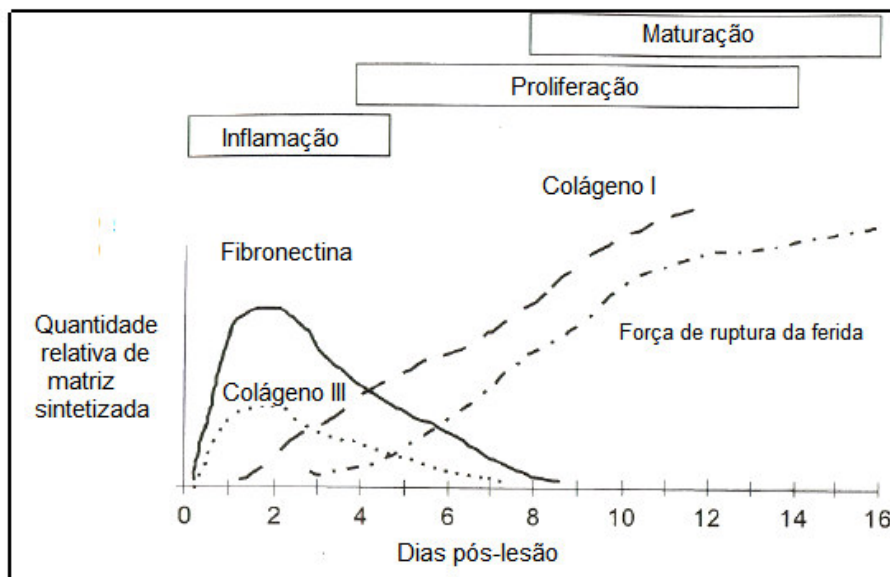
Com o processo de angiogênese mediado principalmente pelo VEGF-A (Fator de crescimento vascular-endotelial-A) e o TNF- α associado à fibroplasia, dá-se início à formação do tecido de granulação composto por uma matriz frouxa de fibronectina, ácido hialurônico, colágeno imaturo e vasos neoformados (HATANAKA; CURI, 2007).

A produção do colágeno pelos fibroblastos, inicialmente do tipo III e do tipo V pericelular, é registrada por volta do 2º dia e dá lugar ao colágeno do tipo I mais espesso e resistente, através do processo de reabsorção e novo depósito (DOILLON *et al.*, 1985a; BRASKÉN; LETHO; RENVALL, 1990).

2.1.4 Fase de maturação

A fase de maturação da ferida inicia-se por volta do 8º dia, podendo durar meses a anos. A reorganização do colágeno, assim como a modificação em seu conteúdo na ferida, com o colágeno tipo III sendo substituído gradualmente pelo tipo I por ação principalmente da colagenase, formará um arranjo de acordo com a organização das fibras do tecido conjuntivo adjacente e lateralmente conectadas por ligações covalentes. As proporções entre os tipos de colágeno dependerão da origem do tecido a ser recomposto (p. ex. derme, fáscias, ossos). O fenômeno da contração determinada por miofibroblastos determina a redução da área cicatricial nessa fase (ROBSON; STEED; FRANZ, 2001).

O resultado final será de um colágeno com uma força tênsil reduzida, alcançando aproximadamente 80% do seu total três meses após o início do processo (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006).



ADAPTADO DE WITTE; BARBUL, 1997

FIGURA 1 – Fases da cicatrização da ferida
 FONTE – CAMPOS; GROTH; BRANCO (2008).

2.2 AVALIAÇÃO DA CICATRIZAÇÃO DE ANASTOMOSES COLÔNICAS

Toda investigação de processo de cicatrização, para que seja reprodutível e possa melhorar seu resultado, necessita de processos de quantificação. Essa quantificação servirá para demonstrar variações em técnicas cirúrgicas utilizadas, administração de drogas ou qualquer intervenção cuja intenção deva ser mensurável (EKMEKTZOGLU *et al.*, 2006).

As anastomoses colônicas são tradicionalmente avaliadas em modelos animais através de tensiometria, morfologia do colágeno, imunistoquímica e dosagem de fatores de crescimento (CAMPOS; GROTH; BRANCO, 2008). Os estudos comparativos entre os métodos têm-se mostrado complementares ao invés de mutuamente excludentes.

A cicatrização das anastomoses colônicas, a pós-ressecção e a anastomose ocorrem de forma mais lenta e são acompanhadas de maiores taxas de complicações, como fístula e ruptura, se comparadas a outros sítios do trato

gastrointestinal (JIBORN; AHONEN; ZEDERFELDT, 1978; BRASKÉN, 1991). Desta forma, modelos experimentais foram desenvolvidos para determinar quais fatores poderiam influenciar sua qualidade e resistência, já que, em humanos, fístulas intestinais, em especial as colônicas, podem apresentar uma taxa de mortalidade de até 30% (FILDING *et al.*, 1980; GRAHAM; FINNIS, 2005).

2.2.1 Avaliação mecânica

O desenvolvimento da resistência mecânica é considerado um marco no processo de cicatrização das anastomoses colônicas. Para tanto, dois principais métodos têm sido utilizados no meio experimental para avaliar a resistência: a pressão de ruptura ou *busting pressure* e a força de ruptura total. No método da pressão de ruptura, a resistência da parede colônica é determinada de acordo com o aumento progressivo da pressão intraluminal e a força de ruptura total é avaliada aplicando-se forças longitudinais em sentidos opostos (KORUDA; ROLANDELLI, 1990; HENDRICKS; MASTBOOM, 1990, IKEUCHI *et al.*, 1999).

Em 1978, Jiborn, Ahonen e Zederfeldt delinearum um estudo para avaliar a influência da técnica utilizada na anastomose (pontos contínuos ou separados) e determinar se existia correlação entre a resistência da anastomose e a concentração de colágeno na parede colônica. Neste estudo, os parâmetros utilizados para avaliação mecânica foram a pressão de ruptura e a força de ruptura. Apesar de não ter sido realizado para determinar qual método de avaliação mecânica de escolha para experimentos, o grande valor desse estudo foi o de determinar que a sutura contínua provocou uma redução maior e mais duradoura na concentração de colágeno na área da anastomose do que pontos interrompidos e também o de registrar a diferença significativa do ponto de vista estatístico entre as forças necessárias para romper a anastomose no pós-operatório. No 4º dia, as forças menores provoracam vazamento e ruptura na linha da anastomose, ao passo que a partir do 7º dia as forças equiparavam-se a de segmentos colônicos não operados. Os resultados em relação aos valores de força de ruptura ao longo do período do

estudo também foram observados por Naresse *et al.* (1987), que identificaram que as forças igualavam-se em torno do 21º dia.

Segundo Ballantyne (1983) e Högström, Haglund, Zederfeldt (1985), a técnica de sutura intestinal deverá, do ponto de vista técnico, alinhar as suturas e ancorar à submucosa, distando entre 3mm e 1,5mm, já que essa sutura determinará a resistência da anastomose durante a fase estacionária ou *lag*. A maior proximidade da anastomose determinou uma menor resistência à tração durante as primeiras 48 horas. Månsson *et al.* (2002) verificaram que a confecção de 8 pontos separados, ao invés de 4, reduzia o risco de vazamento do pós-operatório imediato. No entanto, esse achado ou efeito se perdia depois de 12 horas, quando um aumento na integridade do tecido era verificado.

Em estudo realizado por Ikeuchi *et al.* (1999), entretanto, não foi encontrada uma correlação entre pressão de ruptura e força de ruptura no período pós-operatório durante a fase *lag*, recomendando fortemente o uso da força de ruptura como medida de avaliação mecânica das anastomoses intestinais.

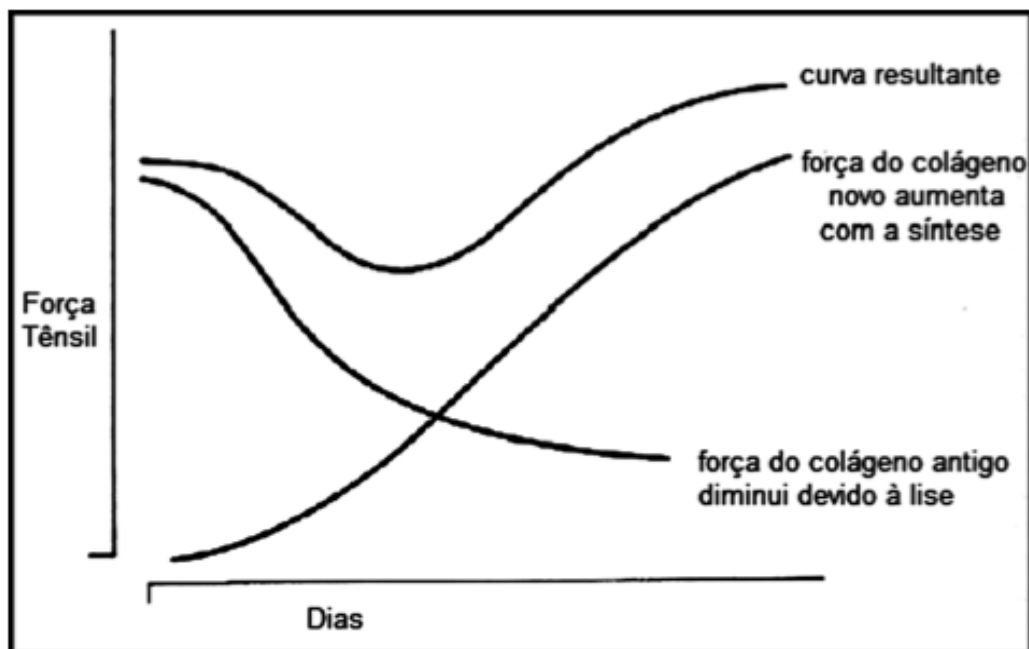
2.2.2 Avaliação histológica e densitometria do colágeno

A avaliação histológica através da microscopia ótica e por métodos de polarização por meio da coloração hematoxilina-eosina (HE) e do Picrosirius red constituem ferramentas importantes para a avaliação da evolução de processo de cicatrização das anastomoses intestinais.

O processo de reparação pode ser avaliado através da técnica de (HE), podendo ser efetuado quantificando-se, ainda que de forma subjetiva, achados ou parâmetros como o exudato neutrofílico, edema intersticial, congestão vascular, infiltrado monomorfonuclear, atividade regenerativa da mucosa, proliferação fibroblástica, neoformação vascular, processo granulomatoso e fibrose intersticial (VIZZOTTO JR. *et al.*, 2003).

Dentro da reparação tecidual, o colágeno, seus subtipos e sua concentração nas áreas de reparação foram, ao longo do tempo, ganhando destaque e importância ao observarem que fatores que alterassem sua dinâmica de depósito e maturação podem alterar a qualidade da anastomose.

A classificação do colágeno é feita de acordo com a estrutura da hélice dominante e seu tamanho molecular. Assim, foram encontrados dentro das categorias o colágeno fibrilar (tipos I, II, III, V e IX), o colágeno não-fibrilar grande (tipos IV, VI, VII e XII) e o colágeno de cadeia curta (tipos IX, X e XIII) (BRASKÉN, 1991). Os subtipos I, III e V foram identificados durante o processo cicatricial do cólon. Contudo, são os colágenos I e III que apresentam importância maior no estudo da cicatrização anastomótica devido à sua predominância ao longo do processo cicatricial da anastomose, demonstrando uma boa correlação com a força de tração a partir do 3º dia (COSSERMELLI; BRENTANI, 1978; JÖNSSON; JIBORN, ZEDERFERLDT, 1985; JUNQUEIRA; TÖRNQVIST *et al.*, 1990; BRASKÉN, 1991). Como se pode observar na FIGURA 2, após a fase de quiescência inicial, existe um crescimento acentuado da força tênsil, resultado da síntese aumentada de colágeno novo.



ADAPTADO DE THORTON; BARBUL, 1997

FIGURA 2 – Evolução da força tênsil no processo de cicatrização de acordo com a síntese e degradação do colágeno

O Picrosirius Red é um método utilizado para determinação da qualidade e quantidade de colágeno presente em determinada área (RABAU *et al.*, 1995). O estudo histoquímico conduzido por Sweat, Puchler e Rosenthal (1964) possibilitou determinar que o corante do subtipo F3BA permitia um tingimento mais duradouro e estável, sendo vantagem para estudos sob polarização. Assim, o colágeno maduro tipo I apresenta-se amarelo, laranja ou vermelho, ao passo que o colágeno imaturo do tipo III apresenta-se verde (JUNQUEIRA; COSSERMELLI; BRENTANI, 1978). Além do período transcorrido entre a intervenção e a análise do corpo de prova obtido, Junqueira, Montes e Sanches (1982) verificaram que quanto mais espessa a secção do tecido a ser avaliado, maior sua birrefringência, sendo notada uma mudança gradual da coloração verde para a amarela e vermelha.

A aplicação do método do Picrosirius Red F3BA mostrou-se útil e vantajosa não apenas para avaliação do colágeno da anastomose intestinal ou pele, mas também na avaliação de fibrose pulmonar e hepática em processos degenerativos como doença pulmonar obstrutiva crônica e cirrose hepática (MALKUSH; REHN; BRUCH, 1995; HUANG *et al.*, 2013).

2.3 IMUNONUTRIÇÃO E CICATRIZAÇÃO

Imunonutrição foi definida por Chow e Barbul (2014) como a utilização de nutrientes específicos com o intuito de modular o sistema imune de forma a trazer benefícios em situações de injúria ou doença.

O papel da imunonutrição na cicatrização de feridas tem sido objeto de estudo por muitos pesquisadores e área de intensa discussão sobre suas vantagens e desvantagens nas mais diversas situações clínico-cirúrgicas. Nesse cenário, meta-análises realizadas puderam identificar efeito positivo e melhora, reduzindo risco e infecção, período em ventilação mecânica e também tempo de estadia em Unidades de Terapia Intensiva (UTI). Contudo, em pacientes com sepse grave, choque e falência de funções orgânicas, não houve demonstração de benefício e, em algumas

situações, houve desvantagem na utilização da imunonutrição (SUCHNER; KUHN; FÜRST, 2000; TRUBIAN, 2008; CHOW; BARBUL, 2014). Suas fórmulas atuais incluem normalmente a suplementação da arginina, glutamina, vitaminas, oligoelementos (selênio, zinco) e ômega-3.

Na meta-análise conduzida por Heys *et al.* (1999), em que foi pesquisado o impacto da imunonutrição em pacientes submetidos a cirurgias do trato gastrointestinal previamente desnutridos, verificou-se que a suplementação nutricional com elementos-chave reduziu significativamente o risco de desenvolver complicações infecciosas e também no tempo de internamento em UTI. Todavia, não houve modificação da taxa de mortalidade desses pacientes. Os estudos analisados incluíam suplementação principalmente da L-arginina, L-glutamina, aminoácidos de cadeia ramificada e ômega-3.

A glutamina é considerada o aminoácido livre mais abundante da corrente sanguínea, sendo a fonte primária de fornecimento de energia para os enterócitos. Suas funções incluem o equilíbrio ácido-base, transporte de nitrogênio, gliconeogênese e síntese de proteínas e ácidos nucleicos. Em estudo conduzido por SHAWN *et al.* (2007) ficou demonstrado que a adição de (1mmol/l) de glutamina à dieta enteral induziu o crescimento de células epiteliais de ratos (RIE-1).

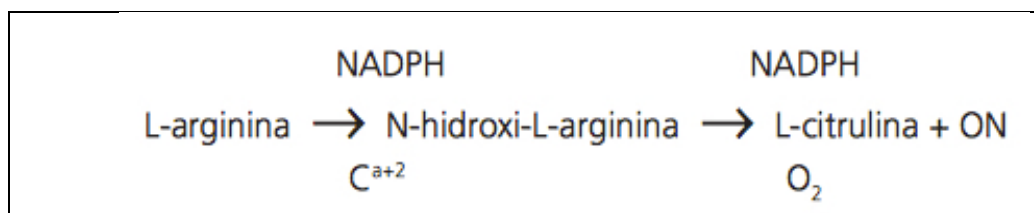
O efeito benéfico de sua utilização ficou evidente também nos casos de sepse, ao induzir o aumento da expressão de proteínas de choque térmico (“heat shock protein” ou HSP) e com isso produzir tolerância ao estresse severo, reduzindo os defechos desfavoráveis com múltiplas disfunções orgânicas secundárias ao processo infeccioso (WISCHMEYER *et al.*, 1985; WISCHMEYER, 2001).

A suplementação da glutamina por via enteral foi objeto de estudo de Costa *et al.* (2003). Nele, 48 ratos Wistar machos, submetidos a duas anastomoses colônicas, foram divididos em dois grupos: o grupo que recebeu 10% de L-glutamina e o que recebeu 10% de glicina em soluções isonitrogenada e isovolumétrica por um período de sete dias no pré-operatório na dose de (1.5g/Kg por dia). Os ratos foram sacrificados no 3º e 8º dias de pós-operatório. Os resultados demonstraram uma força de ruptura e uma área de colágeno maduro superiores do ponto de vista

estatístico ($p=.04$ e $p=.0000$) no grupo suplementado com glutamina, independente do dia do sacrifício.

Sukhotnik *et al.* (2007) avaliaram os efeitos da administração oral preventiva de glutamina em experimento delineado para avaliar o impacto da isquemia e reperfusão intestinal de ratos, descobrindo que a glutamina melhorou a recuperação do epitélio intestinal através da estimulação do crescimento ao invés da inibição da apoptose celular. Contudo, o efeito de inibição da apoptose celular também está presente na recuperação de tecidos de experimentos com suplementação de glutamina. Esse mecanismo envolve a ativação extracelular relacionada à quinase (ERK), proteíno-quinase D (PKD) e fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K)/Akt (LARSON *et al.*, 2007).

A arginina, aminoácido semiessencial, desempenha inúmeros efeitos sobre o sistema imune e cicatrização de feridas. É precursor da prolina, elemento essencial à produção do colágeno, da ornitina que atua na síntese de poliaminas. Além dessas funções, a arginina funciona como substrato para a produção do óxido nítrico, como observado na FIGURA 3 (NOVAES; PANTALEÃO, 2005; CORRÊA-NETO *et al.*, 2009; SINGH *et al.*, 2012; CHOW; BARBUL, 2014). A prolina e seu metabólito, a hidroxiprolina, são aminoácidos derivados da arginina e glutamina/glutamato, constituindo um terço dos aminoácidos presentes nas proteínas do colágeno e representando cerca de 30% de todas as proteínas do corpo (WU *et al.*, 2011).



ADAPTADO DE NOVAES; PANTALEÃO, 2005
FIGURA 3 – Síntese do óxido nítrico a partir da l-arginina

Barbul *et al.* (1990), em estudo para avaliar o papel da arginina na recuperação de feridas e resposta imune mediada por linfócitos em humanos, realizaram a suplementação oral por um período de duas semanas com arginina livre, asparto de arginina e placebo. Os resultados obtidos demonstraram um aumento da mitogênese linfocitária e na quantidade de colágeno depositado em

implante subcutâneo de politetrafluoretileno expandido, sugerindo benefício da arginina na melhora dessas funções.

Leigh *et al.* (2012) avaliaram a regeneração de úlceras de pressão na vigência de duas doses diferentes de suplementos de arginina: 4,5g e 9 g, verificando não haver diferença no tempo de regeneração da úlcera em função da dose de arginina utilizada. Entretanto, houve uma importante melhora da úlcera ($p < 0.001$) em função do tempo. A utilização da arginina reduziu em quase duas vezes o tempo para regeneração da úlcera quando comparada ao grupo controle histórico.

Corrêa-Neto *et al.* (2009) utilizaram 47 ratos Wistar para estudo de suplementação com solução salina isotônica, solução de aminoácidos e solução a 10% de L-arginina com objetivo de observar as anastomoses colônicas (força de tração, os efeitos histológicos de angiogênese e a proliferação de miofibroblastos) em um contexto de utilização da arginina isolada e não um conjunto de aminoácidos que normalmente estão presentes em fórmulas de suplementação. A análise estatística das diferenças das médias da força de ruptura total mostrou significância entre os grupos aminoácido e arginina ($p = 0.05$). Não houve diferença entre os três grupos em relação à densitometria do colágeno calculada pelo IMaC e na contagem de vasos e miofibroblastos avaliados por imunistoquímica.

O efeito da inibição da síntese do óxido nítrico em feridas foi estudado em modelo animal (ratos) por Schäffer *et al.* (1999); com a arginina sendo um dos substratos para sua síntese, o estudo mostra particular importância ao demonstrar a sobreposição e interação entre os mais diversos processos metabólicos na cicatrização de feridas. Os resultados encontrados apontam que a inibição da síntese de óxido nítrico reduziu o acúmulo de colágeno em ferida de forma estatisticamente significativa ($p < 0.01$). Mais tarde, em publicação de Debats *et al.* (2009), esse efeito da inibição do metabolismo da arginina e seus metabólitos na produção do óxido nítrico foi demonstrado em estudo em humanos, ao se avaliar por meio de imunistoquímica, a expressão de marcadores como Arginase-1 em neutrófilos e Arginase-2 em células endoteliais, queratinócitos, fibroblastos, macrófagos e neutrófilos em células colhidas da ferida em regeneração.

As vitaminas constituem cofatores fundamentais para diversas funções orgânicas. O ácido ascórbico (ou vitamina C), por exemplo, é cofator no processo de hidroxilação dos resíduos prolina e lisina em pró-colágeno, essencial para resistência e estabilidade das fibras de colágeno. Em estudo em animais conduzido por Jagetia *et al.* (2007), foi avaliada a suplementação pré-operatória de ratos submetidos à radiação- γ nas doses de 2,4,6 e 8 Gy em toda a superfície corpórea; em seguida, os ratos passaram por cirurgia com a criação de ferida em dorso. Os achados revelam que a recuperação da ferida foi significativamente mais rápida no ratos suplementados com ácido ascórbico (tempo de contração e cicatrização), dependente da dose de radiação utilizada: quanto maior a dose, mais prolongado o processo. O mecanismo pelo qual houve essa melhora ocorreu pela maior deposição do colágeno, aumento de fibroblastos e densidade vascular aumentada no local da ferida.

A vitamina A estimula a formação da fibra do colágeno e aumento na força de ruptura de feridas. Um de seus mecanismos de atuação envolve o aumento da permeabilidade da membrana lipossomal, migração de macrófagos e estímulo à síntese de colágeno (CHOW; BARBUL, 2014).

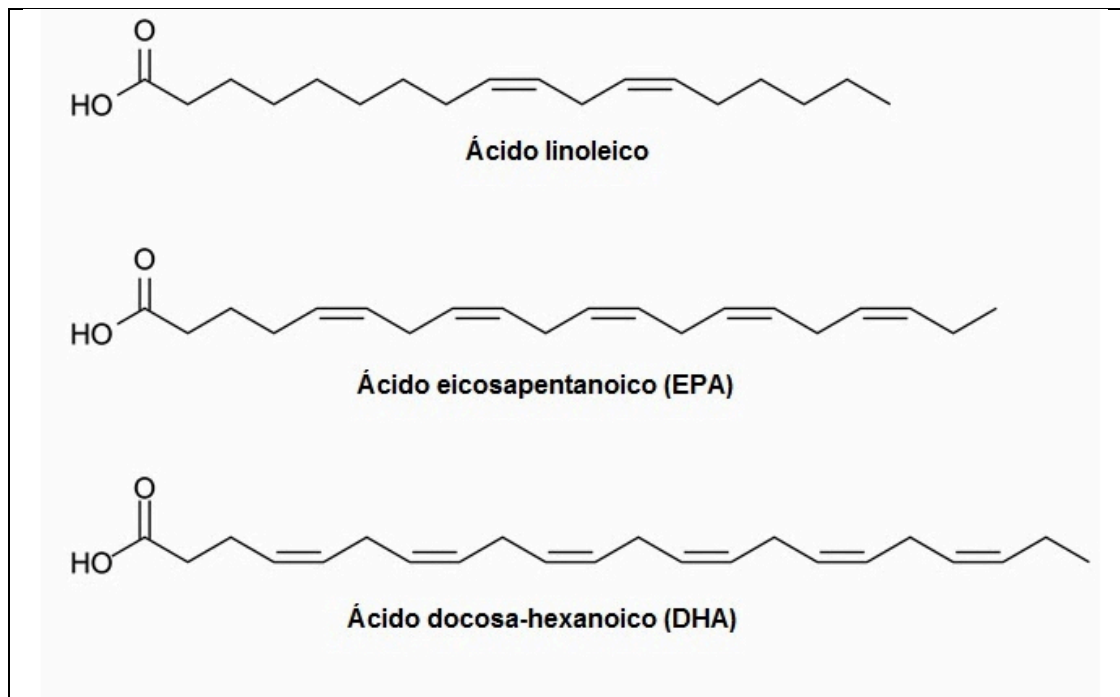
2.4 ÁCIDOS GRAXOS E CICATRIZAÇÃO

2.4.1 Ácidos graxos

O conceito de “lipídios bioativos” ganhou força nos últimos 20 anos ao se identificar que praticamente não existem eventos biológicos nos quais essa classe de moléculas não desempenhe um papel fundamental na sinalização e regulação desses eventos. Os mediadores lipídicos estão estruturalmente divididos em três categorias: classe 1 – eicosanoides derivados do ácido aracdônico, incluindo as prostaglandinas (PGs) e leucotrienos (LTs); classe 2 – os lisofosfolipídios e seus derivados, como o fator de ativação plaquetária (PAF), ácido lisofosfatídico (LPA), esfingosina-1-fostato (S1P) e os endocanabinóides; e classe 3 – os mediadores

lipídicos derivados dos ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 (PUFAs), como as resolvinas [derivado do ácido eicopentaenóico (EPA)] e protectinas [derivado do ácido docosahexanóico (DHA)].

Ácidos graxos (AG) são a base da formação dos lipídeos, caracterizados por sua constituição em ácidos carboxílicos de cadeias não-ramificadas, formadas por número pares de átomos de carbonos unidos por ligações simples ou duplas. São classificados estruturalmente de acordo com o número de átomos na cadeia carbônica: cadeia longa, com 14 mais átomos de carbono; média, com 6-12 átomos de carbono, e curta, quando não excedem 4 átomos de carbono; duplas ligações (saturados, moniinsaturados e poliinsaturados) e posição da primeira dupla ligação. A primeira dupla-ligação contada a partir do radical metil (ômega – ω) ou de seu grupo carboxila (delta – Δ) classifica os ácidos graxos insaturados em ômega-9 (poliinsaturado, cadeia longa), ômega-6 (poliinsaturado, cadeia longa) e ômega-3 (poliinsaturado de cadeia longa) (FIGURA 4).



ADAPTADO DE MONTE E ISLÁN, 2010
FIGURA 4 – Estrutura química dos ácidos graxos

Em relação à sua função, os ácidos graxos podem ser considerados essenciais, quando não sintetizados por mamíferos, devido à indisponibilidade de enzimas biossintéticas capazes de inserir duplas-ligações em nenhuma posição

mais próxima que n-9 e cuja deficiência pode ser corrigida por sua adição à dieta. Desta forma, entre todos os AG, apenas as classes n-3 e n-6 são essenciais à dieta. Quando classificados como não-essenciais, sua síntese é realizada pelo próprio organismo, independente de sua ingestão.

A importância nutricional de lipídeos específicos foi demonstrada inicialmente através do experimento publicado por Evans & Burr em 1929, no qual a reintrodução do ácido linoléico (C18:2n-6) na dieta de ratos revertia prontamente os efeitos de sua privação, tais como restrição de crescimento, dermatite escamosa, necrose de cauda e aumento de mortalidade em ratos recém-desmamados (SHILS *et al.*, 2009).

Sabe-se, atualmente, que lipídeos formados por ácidos graxos têm como funções gerais o armazenamento e o fornecimento de energia (até 9,3 kcal/g); funções biológicas na formação da membrana fosfolipídica, mediadores intra e extracelulares da resposta imunológica, assim como o processo inflamatório e o estresse oxidativo das reações orgânicas (HOLUM, 1994; RUTHIG; MECKLING-GILL, 1999; CALDER, 2001).

Um dos principais mecanismos de absorção dos lipídeos é o da difusão passiva através de micelas que contêm o produto da digestão das gorduras (Figura 5.3 - SHILLS *et al.*, 2009). Considerando que o trato gastrointestinal comporta-se como um órgão com funções de absorção, metabolismo, defesa e endócrina, é de grande importância a manutenção de sua homeostase através dos mais variados processos, entre os quais o da cicatrização, que depende essencialmente do balanço entre migração, proliferação e diferenciação das células epiteliais que circundam a área afetada (IIZUKA; KONNO, 2011).

Para que esse balanço ocorra de forma adequada, fatores de crescimento, citocinas, peptídeos e, mais recentemente, os receptores do tipo *Toll-like* desempenham importante efeito modulador na regeneração do epitélio (KURATKO, 2000; LU *et al.*, 2008; KIM *et al.*, 2013).

2.4.2 Ácidos graxos ômega-3 e cicatrização

O ω -3 (ácido alfa-linolênico eicosapentaenoico [EPA] e docosaexaenoico [DHA]) e ω -6 (ácido linolênico e araquidônico) são ácidos graxos essenciais, cujas fontes exógenas de fornecimento para a manutenção das funções biológicas são primordiais. Isso se deve ao fato de animais não possuírem as enzimas delta-12 e delta-15 dessaturase, responsáveis pela adição de duplas ligações antes do nono carbono do grupo funcional carboxila (CALDER, 2003).

No caso do EPA e do DHA, suas funções moduladoras na resposta inflamatória e imunológica têm sido alvo de muitos estudos baseados na observação de que dietas ricas nesses ácidos ω -3 têm efeito protetor em estudos com humanos e em modelos experimentais contra uma série de doenças, como, por exemplo, as cardiovasculares, renais, autoimunes, neurológicas (ALEXANDER, 1998).

A resposta imunológica depende da incorporação dos ácidos graxos poliinsaturados à membrana celular modificando sua fluidez, estrutura de receptores, mecanismos de sinalização intracelular, enzimas e canais iônicos, modulando a função leucocitária. Por sua vez, é através da competição pelas mesmas vias enzimáticas que o ácido araquidônico (AA), a fração EPA acaba por gerar eicosanoides de menor potencial inflamatório (prostaglandina E₃, leucotrieno B₅ e tromboxano 3), ainda assim causando um efeito anti-inflamatório. Os ω -3 também exercem sua função anti-inflamatória através da inibição de citocinas como TNF- α e interleucinas 1 (IL-1) e 6 (IL-6), sabidamente de potencial pró-inflamatório (CALDER, 1998; KURATKO, 2000; WERNER; GROSE, 2003; CALDER, 2008; McDANIEL, *et al.*, 2008).

Os ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 têm-se mostrado importantes em uma série de eventos que culminam com um efeito anti-inflamatório. Os ácidos EPA e DHA competem com LTB₄ na ocupação de receptores, impedindo a transdução de sinais para a síntese de proteínas G fundamentais na sinalização celular. Do mesmo modo, o DHA também inibe a ativação da fosfolipase C induzida pelo TNF- α , prejudicando ou retardando a sinalização celular (YAGALOFF *et al.*, 1995; WEBER *et al.*, 1995; CALDER, 1998).

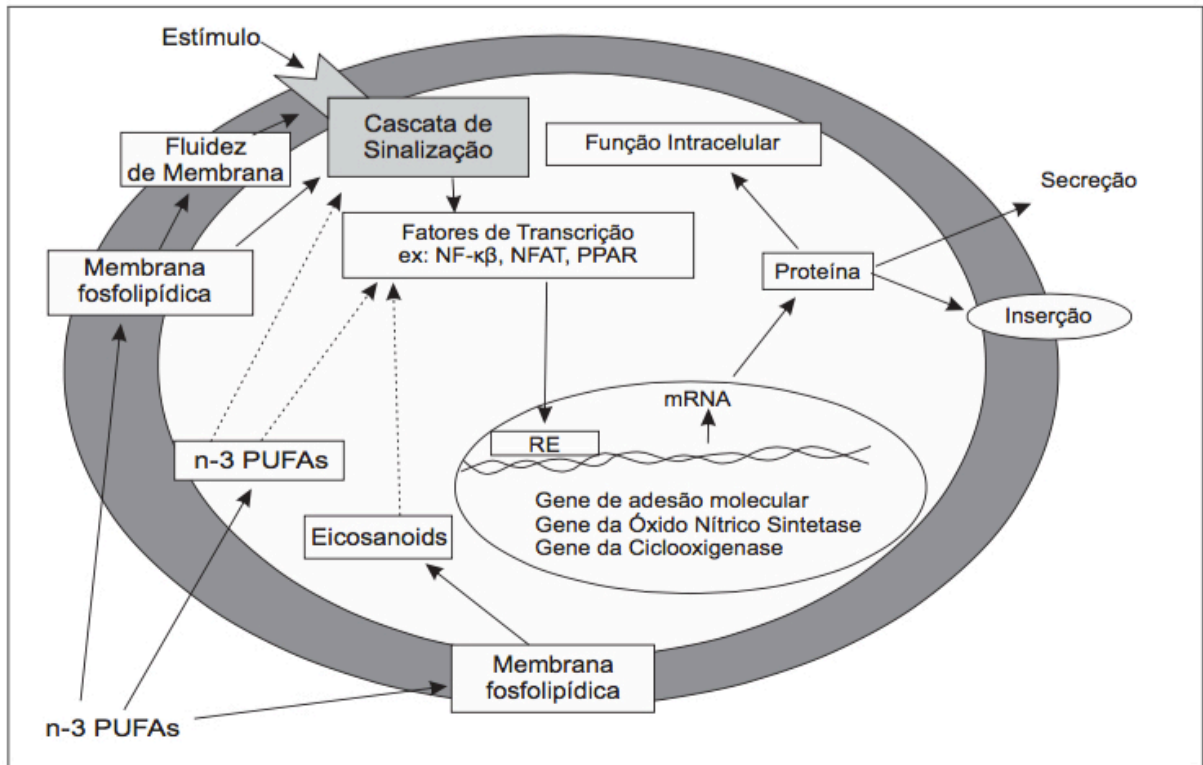


FIGURA 5 – Mecanismos de ação do ômega-3
 FONTE – ADAPTADO DE CALDER (1998).

O efeito anti-inflamatório do ômega-3 também está vinculado à inativação do processo de sinalização mediada pelo fator nuclear kappa B, que regula a produção de TNF- α pelos macrófagos, assim como a produção de citocinas pró-inflamatórias e óxido nítrico, retardando o processo de cicatrização (ENDRES *et al.*, 1989; CALDER, 1998; GRIMM, *et al.*, 2002; NOVAK *et al.*, 2003) (FIGURA 5).

Camuesco *et al.* (2005) avaliaram o efeito do óleo de peixe, rico em EPA e DHA, na resposta inflamatória de colite induzida em ratos através da dosagem de marcadores como o leucotrieno B4 (LTB(4)), fator de necrose tumoral alfa e óxido nítrico. Os ratos receberam duas dietas diferentes, por duas semanas, antes da indução da colite com dextrano sulfato de sódio (DSS). Ratos com colite que receberam azeite de oliva associado ao ômega-3 apresentaram redução significativa de TNF- α e LTB(4) colônico se comparados ao grupo controle que recebeu óleo de soja.

Eisner *et al.* (2011) conduziram um estudo para investigar se a dieta enteral com lipídios de cadeia longa inibia a ativação dos leucócitos da parede intestinal de ratos. Os linfonodos mesentéricos foram retirados dos ratos, que receberam infusão

de glicose ou glicose associada aos lipídios. Os leucócitos retirados foram estimulados *in vitro* com lipopolissacarídeo (LPS) antes e depois da suplementação lipídica. A dosagem do TNF- α foi feita a partir do sobrenadante. Como resultado, verificou-se que a liberação de macrófagos pela parede intestinal durante a sepse induzida pelo LPS foi igual para os dois grupos. Porém, a liberação de TNF- α a partir de leucócitos de linfonodos mesentéricos após a estimulação com LPS foi três vezes maior no grupo glicose quando comparado ao grupo glicose associada a lipídios, demonstrando uma supressão na liberação da citocina inflamatória.

Em outro estudo *in vitro*, Paschoal *et al.* (2013) avaliaram os efeitos do EPA e DHA na função dos neutrófilos murinos. Os resultados revelaram que o EPA e DHA aumentam a produção de superóxido quando as células são estimuladas por LPS, sendo o efeito maior com EPA. Somente o DHA aumentou a capacidade de fagocitose e a atividade fungicida dos neutrófilos. Notadamente, ambos os ácidos graxos aumentaram a síntese de TNF- α em células não estimuladas, mas apenas o EPA foi capaz de induzir a produção de neutrófilos quimioatraente-2 (CINC-2) na presença ou ausência da LPS. O aumento da interleucina-1 (IL-1) só ocorreu com DHA estimulado. Nesse sentido, conclui-se que o EPA e DHA podem, cada um de uma forma diferente, modular a resposta neutrofilica.

Chang *et al.* (2013) testaram os efeitos do DHA na resposta celular inflamatória de ratos com isquemia cerebral permanente. A administração do DHA foi realizada durante um período de três dias antes da indução da isquemia cerebral. Clinicamente, foi verificado que o DHA apresentou efeito neuroprotetor (redução de distúrbios de comportamento, área de infarto, edema e disfunção da barreira hematoencefálica). Bioquimicamente, através do teste de Western-Blot, transcriptase reversa seguida por reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) e citometria de fluxo, foi revelado que o DHA reduziu a ativação de macrófagos no sistema nervoso central (SNC), infiltração linfocitária, expressão de citocinas pró-inflamatórias e ativação de leucócitos periféricos.

Kim *et al.* (2013) empreenderam um estudo com três grupos de ratos que receberam dieta associada à água, ômega-3 ou ômega-6, respectivamente, por um período de sete dias. Na seqüência, os ratos foram submetidos a 60 minutos de isquemia hepática parcial normotérmica seguida por 6 horas de reperfusão. A

ativação dos receptores *Toll-like-4* foi medida através do isolamento dos domínios funcionais da membrana ("*lipid raft*" composta glicolipídios, esfingomielina, colesterol e proteínas). Os resultados mostraram que o uso do ômega-3 inibiu o TRL-4 no recrutamento dos domínios funcionais das células hepáticas, considerado o passo inicial da sinalização para a produção de NF-kappa B, reduzindo o dano celular induzido pela isquemia/reperfusão.

Maksymchuk (2014) analisou as mudanças na expressão em fígados de ratos do citocromo P450 2E1 (CYP2E1), que possui um forte efeito pró-oxidativo, e da enzima heme-oxigenase 1 (HO-1), caracterizada por suas propriedades antiinflamatórias e antiapoptóticas, através da avaliação da atividade de enzimas antioxidantes. Os ratos foram tratados com ômega-3 via enteral diariamente por quatro semanas. Ficou constatado que não houve mudanças na atividade de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase e catalase. O estudo levantou a possibilidade de que a ativação da HO-1 dependente do citocromo P450 2E1, com suas propriedades, possa ser um dos mecanismos de atuação do ômega-3.

No estudo experimental conduzido por Whiting, Bland e Tarlton (2005), foi testada a hipótese de que os ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 reduziram a severidade da doença inflamatória intestinal através da diminuição da ativação da resposta imune pela barreira epitelial. Assim, por um período de três semanas foi realizada a suplementação com ômega-3 antes da indução da colite. O que foi verificado no grupo ômega-3 foi um escore patológico reduzido (menores níveis de TNF- α , IL-12 e IL-1 beta em colonócitos) quando comparados ao grupo controle. As citocinas pró-inflamatórias estavam em valores reduzidos apesar do infiltrado celular de linfócitos T, células CD 11c e CD11b serem bastante semelhantes.

O complexo de imunocompatibilidade do tipo II (MHC II) também mostrou alteração em seu funcionamento dentro do contexto imunológico com a adição do ômega 3 ao reduzir a porcentagem de macrófagos que expressassem ou carregassem em sua superfície o MHC no exudato peritoneal de ratos. Assim, de forma objetiva, há uma redução na apresentação de antígenos e supressão imunológica (SHERRINGTON; SANDERSON; CALDER, 1995).

O estudo do ômega-3 no processo da carcinogênese, em especial do câncer colorretal, também constitui alvo de grande interesse dos pesquisadores. Pell, Brown, Johnson (1994) estudaram a influência do ômega-3 na produção de células das criptas intestinais em ratos. Para tanto, utilizaram três grupos de 10 ratos (n=30) alimentados com dietas livres de fibras contendo, respectivamente, bacon, óleo de milho e óleo de peixe na quantidade de 80g/kg. Após 14 dias, dois segmentos do intestino delgado, dois segmentos do cólon e 1 segmento do ceco foram analisados. A técnica utilizada foi a da avaliação durante a metáfase. Os achados demonstraram uma proliferação reduzida das criptas de ratos que receberam óleo de peixe, sugerindo que em algumas regiões do trato gastrointestinal pode haver uma supressão do processo de proliferação e, por consequência, redução da carcinogênese.

No estudo de Hendrickse, Keighley, Neoptolemos (1995), 60 ratos foram alimentados com dieta isocalórica e isovolumétrica, por seis semanas, à base de 20% de ômega-3 ou dieta com lipídios saturados. Os animais foram divididos em dois grupos após indução à carcinogênese com azoximetano ou não (utilização de solução salina). A anastomose colônica foi analisada com 15 e 23 semanas, após o início do experimento. Como resultado, os animais alimentados com ômega-3 demonstraram significativa redução no índice de proliferação celular das criptas das mucosas intestinais.

A redução de criptas intestinais aberrantes induzidas em modelos experimentais com o uso do ômega-3 também ficou demonstrada por Latham, Lund, Johnson (1999) e por Rao, Hirose e Indranie (2001).

Desta forma, temos efeitos benéficos com a utilização do ácido graxo poliinsaturado ômega-3 ficaram demonstrados nos processos cicatrização, imunomodulação, neuroproteção e redução nas taxas do processo de carcinogênese. Estes efeitos, contudo, não foram obtidos por todos os pesquisadores, havendo divergências em relação a estes resultados.

3 MATERIAL E MÉTODO

3 MATERIAL E MÉTODO

Este estudo faz parte da linha de pesquisa em Cicatrização de Tecidos e Medidas de Resistência do Programa de Pós-graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná, em parceria com o Departamento de Ciências Morfológicas da Universidade Estadual de Maringá (UEM) e do Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (COMCAP), laboratórios em que foram realizadas as etapas experimentais. Para tanto, foram obedecidas às normas de pesquisa animal estabelecidas na legislação nacional, de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal postulados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) da Universidade Estadual de Maringá (APÊNDICE A).

3.1 ANIMAIS

Para a realização deste estudo experimental, foram utilizados 40 ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*, *Roentia Mammalia*), machos adultos, com peso corporal variando entre 220 e 320 gramas, provenientes do Biotério da UEM. Os animais foram alojados individualmente em caixas recebendo água e ração *ad libitum* (Nuvilab CR1®).

3.2 CONSIDERAÇÕES AMBIENTAIS

As condições ambientais laboratoriais foram de temperatura de 22°C, umidade relativa do ar de 55% e ciclo claro-escuro de 12 horas. Todos os animais tiveram o peso corporal aferido diariamente desde o dia anterior ao início do experimento.

3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Após aclimação inicial (FIGURA 6), os ratos foram divididos em 2 grupos:

O *grupo controle* – GAO – grupo azeite de oliva – (n=20) foi submetido à alimentação com ração *ad libitum* por quatro semanas. Na semana que precedeu ao procedimento cirúrgico, o rato recebeu, via gavagem orogástrica (FIGURA 7), uma suplementação de solução isocalórica e isovolumétrica de azeite de oliva na dose de 100mg/kg/dia (QUADRO 1).

O *grupo estudo* – GOM – grupo ômega 3 – (n=20) foi submetido à alimentação com ração *ad libitum* por quatro semanas. Na semana que precedeu ao procedimento cirúrgico, o rato recebeu, via gavagem orogástrica, suplementação de solução isocalórica de ômega 3 na dose de 100 mg/kg/dia



FIGURA 6 – Delineamento experimental e cronologia do experimento

3.4 SUPLEMENTAÇÃO ÔMEGA-3

As emulsões lipídicas utilizadas foram azeite de oliva (QUADRO 1) e solução de ácidos graxos ômega 3 composta por EPA e DHA na proporção de 80:20 (ANEXO G) em uma solução de 20 mg/ml. A administração foi feita na dosagem de 100 mg/kg (FIGURA 7).

COMPOSIÇÃO DO	AZEITE UTILIZADO
Cada ml contém:	
Kcal	8,3
Gorduras totais (g)	0,92
Gorduras saturadas (g)	0,14
Gorduras monoinsaturadas (g)	0,71
Gorduras poliinsaturadas (g)	0,06

QUADRO 1 – Composição do azeite de oliva
 FONTE – Azeite GALO®



FIGURA 7 – Realização da gavagem para administração da emulsão lipídica

3.5 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Pré-operatório: todos os animais foram submetidos a jejum de 12 horas previamente ao procedimento cirúrgico com o objetivo de diminuir o conteúdo fecal do intestino grosso do rato, local em que foram feitas as anastomoses.

Per-operatório: Para procedimento cirúrgico, a anestesia foi feita com a associação de xilazina (Rompum® 20mg/ml – Bayer®), na dose de 10 mg/kg, associada à quetamina (Ketalar® 50mg/ml – Packer-Davis®) 50 mg/kg, ambas

administradas de forma intramuscular no músculo bíceps femoral dos animais. Após a anestesia, foi realizada tricotomia abdominal, seguida da antissepsia local. Por meio de uma incisão abdominal mediana, de cerca de 5 cm de extensão, obteve-se acesso à cavidade peritoneal. Foram realizadas duas secções totais do cólon (FIGURA 8). A primeira, a 5 cm distalmente à válvula ileocecal (PONTO A), e a segunda secção realizada a 3 cm proximalmente à reflexão peritoneal do reto (PONTO B). As reconstruções foram realizadas por meio de anastomoses término-terminais em plano único total com sutura interrompida, utilizando 8 pontos de fio monofilamentar de nylon 6.0 (mononylon® 6.0, Ethicon®, São José dos Campos, SP). A síntese da parede abdominal foi realizada através de sutura contínua com monofilamentar de nylon 4.0 (mononylon® 4.0, Ethicon®, São José dos Campos, SP) em dois planos: músculo-aponeurótico e pele.

Pós-operatório: Após a recuperação anestésica, cada animal foi reconduzido à caixa, onde, após uma hora de pós-operatório, recebeu água e ração *ad libitum*, e sob as condições ambientais citadas, permanecendo até o momento do sacrifício. Os ratos foram inspecionados diariamente no período da manhã procedendo-se à avaliação da ferida operatória quanto à presença de complicações (infecção, deiscência) e óbito, de acordo com o grupo.

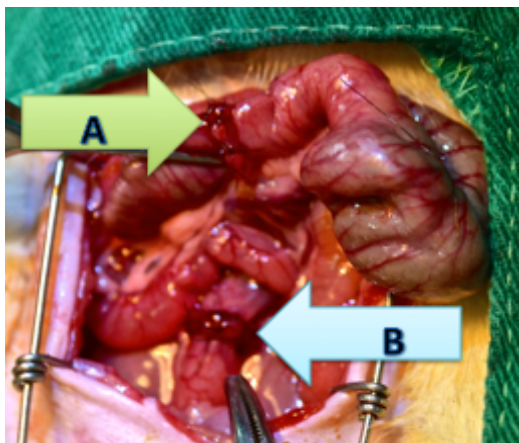


FIGURA 8 – Anastomoses colônicas: a – anastomose proximal. b – anastomose distal

3.6 SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS

Os animais foram mortos com dose letal da associação de xilazina com quetamina no quinto dia de pós-operatório. Na sequência, a laparotomia mediana, com acesso à cavidade abdominal, foi realizada para a retirada dos segmentos direito e esquerdo do cólon de forma separada, cada um medindo 4 cm de comprimento.

O corpo de prova continha a anastomose em sua porção média. O segmento contendo a anastomose do cólon esquerdo foi colocado em recipiente com soro fisiológico 0,9% para, na sequência, ser submetido ao teste de tração. A anastomose do cólon direito foi seccionada longitudinalmente a partir da borda antimesentérica e estendida em um papel filtro. O armazenamento do segmento de cólon direito foi feito em frasco com formol a 10% para estudo anátomo-patológico.

3.7 MORBIDADE E MORTALIDADE

Os animais foram acompanhados diariamente e os que evoluíram a óbito foram submetidos à necrópsia para avaliação abdominal e definição se a *causa mortis* tinha relação com complicações pós-operatórias como a presença de fistula ou peritonite.

3.8 CONTROLE DO PESO

Os animais foram pesados diariamente durante todo o processo experimental.

3.9 AVALIAÇÃO TENSIOMÉTRICA

O corpo de prova a ser utilizado para avaliação de força tênsil foi o fragmento contendo a anastomose em cólon esquerdo. Para avaliação da força tênsil da anastomose foi utilizada uma máquina de ensaio mecânico computadorizada, da marca EMIC[®], modelo DL 1000 (EMIC, São José dos Pinhais-PR) localizada no Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa – UEM.



FIGURA 9 – Tensiômetro Emic[®] DL 1000

A fixação do corpo de prova foi feita individual e manualmente ao equipamento com presilha de pressão ajustável, de forma a conter a anastomose em sua porção média, equidistante das extremidades. A tração ocorreu com velocidade de 50 mm/minuto. Foi utilizada uma célula de carga de 1 kg com sensibilidade de 50 gramas, para um limite de força de 4500 kgf, até o colapso de 100%, com ruptura do diâmetro total da anastomose (corpo de prova). A margem de erro estimada foi de 0,5%.

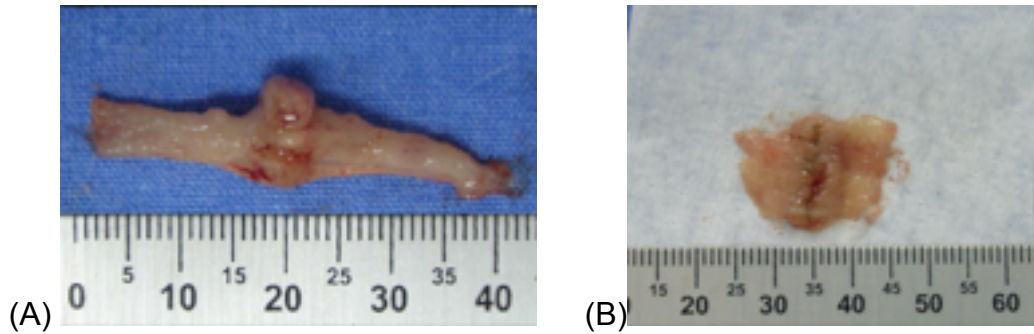


FIGURA 10 – Amostra dos corpos de prova para estudo tensiométrico (a) e histopatológico (b)

Todos os corpos de prova foram submetidos ao teste em intervalo de tempo inferior a duas horas após sua ressecção. A aquisição dos resultados foi feita por meio da utilização do software TestScript®, versão 3.04, acoplado à máquina de ensaio mecânico, permitindo a obtenção dos dados a serem avaliados. As variáveis avaliadas foram: Força Máxima de Tração (N) e Força de Ruptura Total (N). A FMT foi definida como a força máxima suportada pela anastomose imediatamente antes do início da ruptura, a FRT foi considerada a força necessária para romper completamente a anastomose.

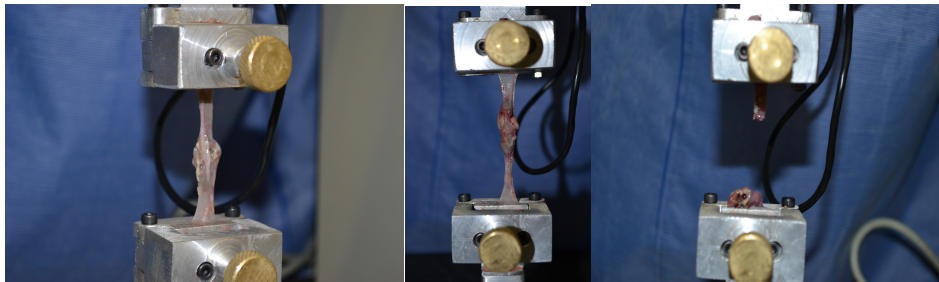


FIGURA 11 – Teste de tração da anastomose colônica do rato

3.10 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E DENSITOMETRIA DO COLÁGENO

O fragmento de proximal do cólon de cada animal foi aberto em sentido longitudinal na borda antimesentérica e fixado em formalina tamponada a 10%. O corpo de prova foi encaminhado para o laboratório de histotécnica para o processamento histológico (desidratação, diafanização e emblocamento em parafina). Após microtomia com 6 μ m de espessura, os cortes histológicos semi-seriados foram submetidos à coloração pelas técnicas de hematoxilina-eosina (HE) e Picrosirius Red 3FBA (PSR 3FBA), utilizando-se quatro cortes para cada coloração de cada anastomose.

3.10.1 Hematoxilina-Eosina

A técnica de hematoxilina-eosina (HE) foi utilizada para avaliar o grau de intensidade da reação inflamatória (infiltrado polimorfonuclear e monomorfonuclear), do edema intersticial, da congestão vascular, do tecido de granulação e da fibrose.

Os dados foram classificados em acentuado, moderado, discreto e ausente, de acordo com a intensidade em que foram encontrados, e transformados em variáveis quantitativas através da atribuição de índice aos achados histológicos da seguinte maneira: ausente, índice 0; discreto, índice 1, moderado, índice 2 e acentuado, índice 3 (TABELA 1).

TABELA 1 – Intensidade dos achados histológicos pela técnica de hematoxilina-eosina

ACHADOS HISTOLÓGICOS	INTENSIDADE			
	AUSENTE	DISCRETO	MODERADO	ACENTUADO
Infiltrado Inflamatório	0	1	2	3
Edema	0	1	2	3
Congestão	0	1	2	3
Tecidode Granulação	0	1	2	3
Fibrose	0	1	2	3

FONTE – VIZZOTTO (2003).

A área do processo inflamatório foi avaliada da mesma forma. Os cortes histológicos foram avaliados por meio de microscópio óptico da marca *Nikon® Eclipse 80i* (Nikon, Tóquio, Japão), em aumento de 200 vezes.

3.10.2 Densitometria do Colágeno

A coloração de Picrosirius Red F3BA (PSR) foi utilizada para avaliar a presença de colágeno, sua maturidade e o seu grau de ordenação, utilizando a microscopia de polarização através do método computadorizado com leitura da densidade dos tipos de colágeno pelo sistema Optimus 4.0.

Os cortes histológicos referentes foram avaliados por meio de microscópio óptico da marca *Nikon® Eclipse 80i* (Nikon, Tóquio, Japão), em aumento de 20 vezes, utilizando-se fonte de luz polarizada *C-SP simple polarizer*. As imagens foram capturadas por câmera *Nikon DS-F11C cooled digital®* (Nikon, Tóquio, Japão), transmitidas através do sistema *D-DA simple analyzer* ao monitor colorido LCD *G205HV®*, congeladas e digitalizadas por meio de computador *Intel Pentium Processor® E 5700 LGA775*. As imagens foram processadas através do aplicativo *Image Pro-plus®*. A calibração do sistema foi realizada através da densidade óptica dos pontos de resolução (“pixels”) que formam as imagens, selecionando-se o valor limite de melhor resolução.

No sistema RGB (“Red, Green, Blue”), foram considerados valores para tons de vermelho, amarelo e laranja (colágeno tipo I) e para tons de verde (colágeno tipo III) (FIGURAS 12 e 13). Todas as lâminas foram avaliadas sob as mesmas condições de regulação, dentro dos parâmetros exigidos pelo aplicativo.

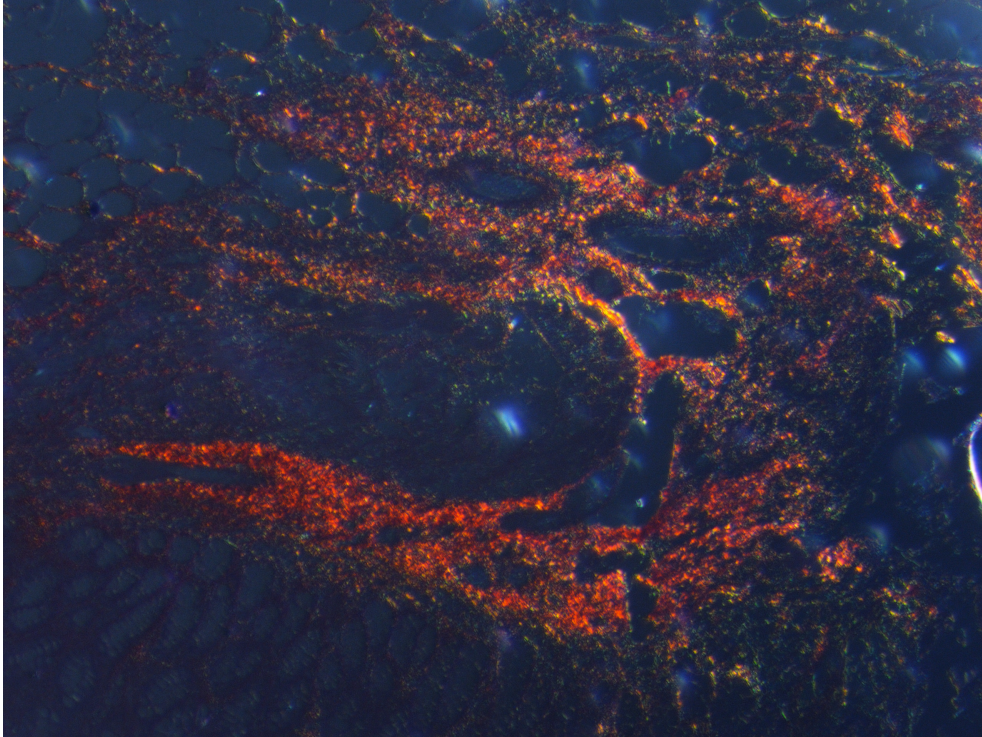


FIGURA 12 – Corte histológico de anastomose colônica mostrado pelo sistema de captação picrossírius red grupo ômega-3 (predominância colágeno tipo I). Aumento 20x objetiva de captura.

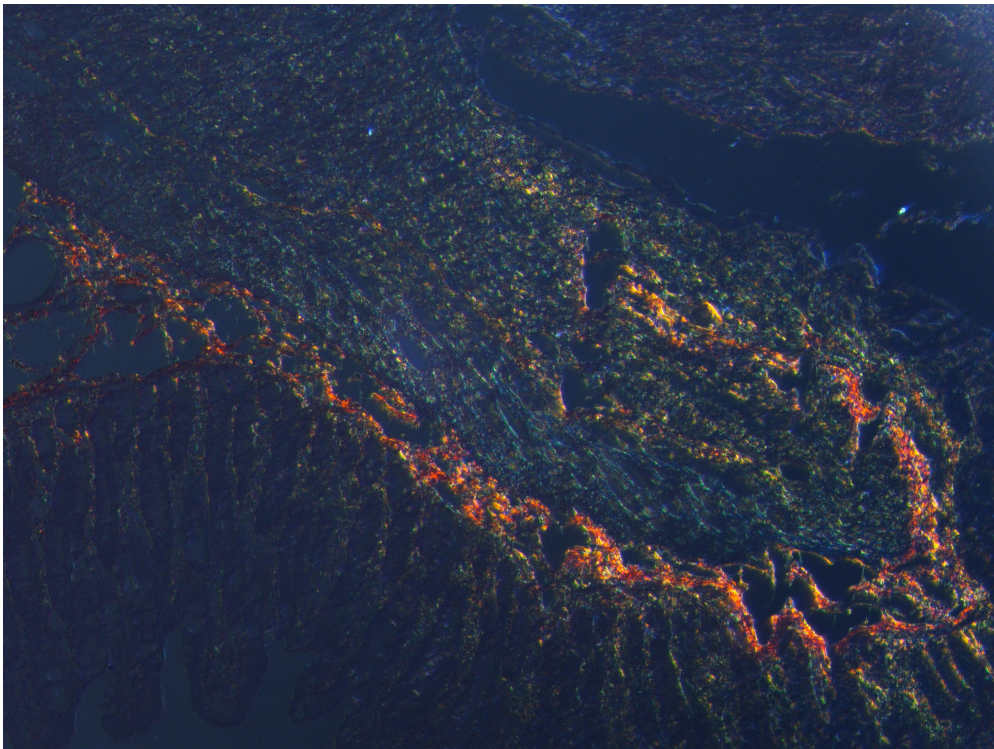


FIGURA 13 – Corte histológico de anastomose colônica mostrado pelo sistema de captação picrossírius red grupo azeite de oliva (predominância colágeno tipo III). Aumento 20x objetiva de captura.

Nos cortes analisados, determinou-se o campo microscópico sobre a linha de sutura e foram obtidas medidas de três áreas distintas (superior, média e inferior). Em cada uma delas, calculou-se o percentual da área ocupada pelas fibras que continham colágeno dos tipos I e III em relação à área total examinada, para um aumento de 20 vezes. A partir da medida da porcentagem de fibras colágenas foi calculado o índice de maturação de colágeno (IMaC), definido como a razão entre essas porcentagens (COELHO-LEMOS *et al.*, 2004).

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

LEGENDA: IMaC = Índice de Maturação do colágeno; % = porcentagem
QUADRO 2 – Índice de maturação do colágeno (IMaC)

Valores de IMaC maiores do que 1 (um) indicam que a porcentagem de colágeno tipo I é maior do que a porcentagem de colágeno do tipo III.

3.11 AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram digitados em planilha do programa Microsoft Excel 2010 e analisados estatisticamente com o auxílio do *Software R 3.1.2*.

O tratamento estatístico foi realizado conforme os dados obtidos nos grupos GAO e GOM utilizando-se a medida da média e do erro padrão da média (EPM), adotando-se um nível de significância de $p < 0,05$.

Para aplicação dos testes, foi observada a distribuição normal das variáveis (Gaussiana). Para as análises estatísticas paramétricas, foi utilizado o teste t de Student, e nas análises não-paramétricas o teste de Mann-Whitney. Já para as variáveis qualitativas foram utilizadas tabelas de frequências com percentual seguidas do teste Exato de Fisher.

Foram avaliadas as diferenças das médias das variáveis peso, parâmetros de avaliação tensiométrica (força máxima de tração e força de ruptura total), densitometria do colágeno (área de colágeno total dos tipos I e III) e o Índice de Maturação do Colágeno (IMaC) entre os grupos GAO e GOM.

4 RESULTADOS

4.1 MORBIDADE E MORTALIDADE

A deiscência de anastomose teve a seguinte distribuição nos grupos: 4 no grupo GAO, 4 no grupo GOM.

A taxa de mortalidade no grupo GAO foi de 35,0% (n=7) e 10,0% (n=2) no grupo GOM com $p=0,1973$ (teste Z para comparação de proporções). O índice de mortalidade geral nos dois grupos foi de 22,5% (9/40).

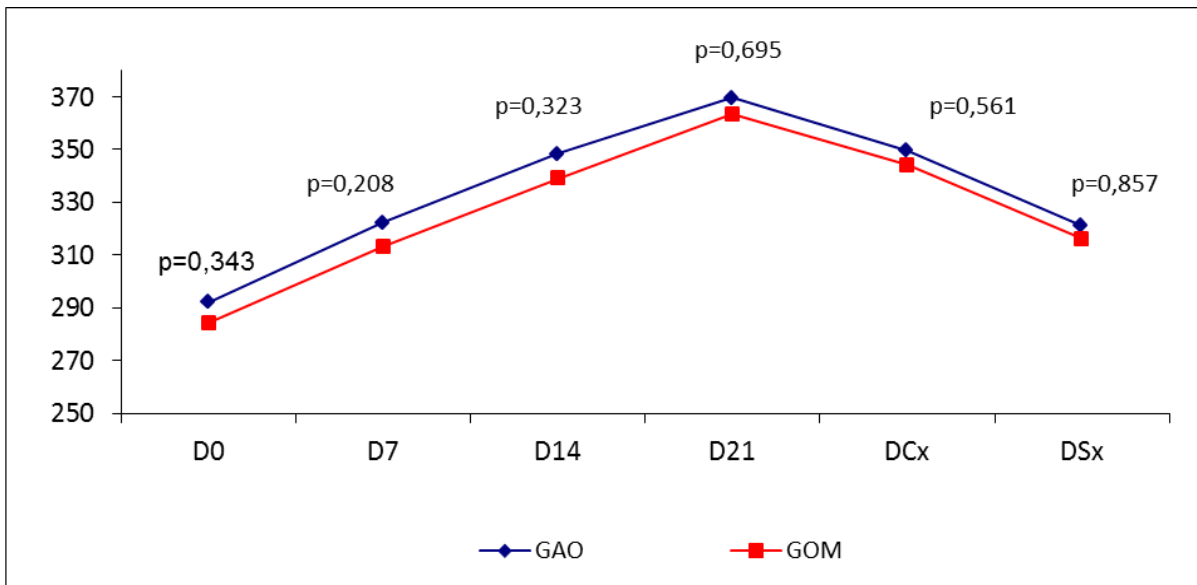
4.2 PESO

A média de peso no início do experimento, no 7º, 14º, 21º dia, no dia da cirurgia e no dia do sacrifício está apresentada na TABELA 2 e GRÁFICO 1.

TABELA 2 – Média \pm erro padrão do peso da amostra por grupos (g)

Dias	GAO (n=20)			GOM (n=20)			P
	Média	\pm	EP	Média	\pm	EP	
D0	292,3	\pm	4,4	284,3	\pm	5,3	0,343
D7	322,3	\pm	5,0	313,1	\pm	5,6	0,208
D14	348,4	\pm	5,5	339,0	\pm	6,5	0,323
D21	369,7	\pm	6,2	363,4	\pm	6,9	0,695
DCx	349,7	\pm	6,4	344,0	\pm	7,2	0,561
DSx	321,0	\pm	8,8	316,1	\pm	3,8	0,857

NOTA: D0: Primeiro dia do estudo. DCx: Dia da cirurgia. DSx: Dia do sacrifício. GOM: Grupo ômega-3. GAO: Grupo azeite de oliva. p = nível de significância estatística (Teste Mann-Whitney).



NOTA: D0: Primeiro dia do estudo. DCx: Dia da cirurgia. DSx: Dia do sacrifício. GOM: Grupo ômega-3. GAO: Grupo azeite de oliva. p - nível de significância estatística (Teste Mann-Whitney).

GRÁFICO 1 – Evolução do peso em D0, D7, D14, D21, DCX e DSX

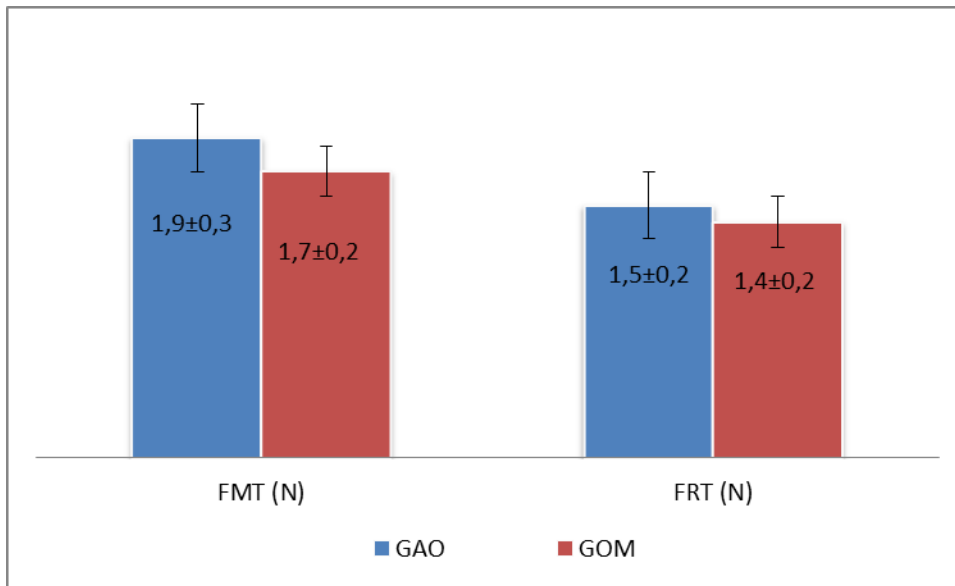
4.3 AVALIAÇÃO TENSÍOMÉTRICA

A Força Máxima de Tração (FMT) e a Força de Ruptura Total (FRT) foram analisadas e tiveram suas médias e erros-padrão calculados e comparados dentro dos grupos GAO e GOM. Os dados obtidos são apresentados na TABELA 3, GRÁFICO 2.

TABELA 3 – Média \pm erro padrão das variáveis força máxima de tração e força de ruptura total entre os grupos GAO e GOM

Variáveis	GAO (n=20)		GOM (n=20)		p
	Média	\pm EPM	Média	\pm EPM	
FMT (N)	1,9	\pm 0,3	1,7	\pm 0,2	0,357
FRT (N)	1,5	\pm 0,2	1,4	\pm 0,2	0,603

NOTA: n – tamanho da amostra. EPM – erro padrão da média. p - nível de significância estatística. FMT – força máxima de tração. FRT – força de ruptura total. N – newtons. GAO: Grupo azeite de oliva. GOM: Grupo ômega-3 (Teste Mann-Whitney).



NOTA: p - nível de significância estatística. FMT – força máxima de tração ($p=0,6028$). FRT – força de ruptura total ($p=0,3572$). N – newtons. GAO: Grupo azeite de oliva. GOM: Grupo ômega-3 (Teste Mann-Whitney).

GRÁFICO 2 – Comparação da força máxima de tração e força de ruptura total entre os grupos GAO e GOM

4.4 HEMATOXILINA – EOSINA

Ao avaliar as variáveis de maneira qualitativa não ficou evidenciado nenhuma associação significativa entre as variáveis (TABELA 4).

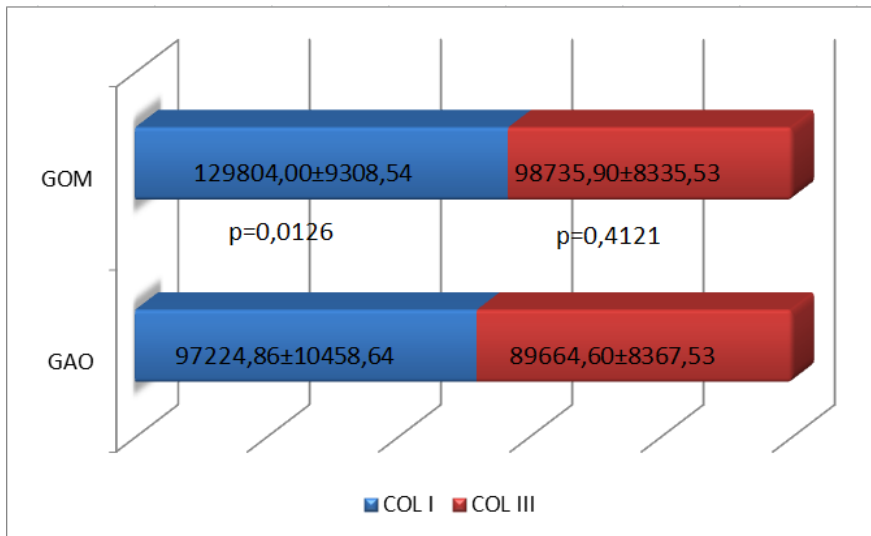
TABELA 4 – Grupos gao e gom segundo as variáveis infiltrado, edema, congestão, tecido de granulação e fibrose

Variáveis	GRUPOS				p*
	GAO		GOM		
	n	%	n	%	
Infiltrado					
0	0	00,0	0	0,00	0,388
1	5	25,0	3	15,0	
2	4	20,0	8	40,0	
3	4	20,0	7	35,0	
Edema					
0	0	0,0	1	5,0	0,819
1	3	15,0	5	25,0	
2	7	35,0	8	40,0	
3	3	15,0	4	20,0	
Congestão					
0	2	10,0	2	10,0	0,834
1	7	35,0	9	45,0	
2	4	20,0	6	30,0	
3	0	0,0	1	5,0	
Tecido de granulação					
0	1	5,0	5	25,0	0,522
1	9	45,0	9	45,0	
2	2	10,0	2	10,0	
3	1	5,0	2	10,0	
Fibrose					
0	10	50,0	13	65,0	0,941
1	2	10,0	3	15,0	
2	1	5,0	2	10,0	
3	0	00,0	0	00,0	

NOTA: GOM - Grupo ômega-3. GAO - Grupo azeite de oliva. p - nível de significância estatística (Teste Exato de Fisher). Observação: para as variáveis Infiltrado e Fibrose não houve, respectivamente, quantificação zero e três, para os grupos.

4.5 DENSITOMETRIA DO COLÁGENO

A quantidade de colágeno dos tipos I e III foi determinada nos grupo estudados conforme o GRÁFICO 3 e TABELA 5. Observou-se maior quantidade de colágeno tipo I ($p=0,0126$) no grupo GOM em relação ao grupo GAO.



NOTA: COL I – Colágeno tipo UM. COL III – Colágeno tipo TRÊS. GOM - Grupo ômega-3. GAO - Grupo azeite de oliva. EPM - Erro-padrão médio. p - nível de significância estatística

GRÁFICO 3 – Distribuição dos colágenos tipos I e III nos grupos GOM e GAO

TABELA 5 – Média ± erro padrão médio de área ocupada pelo colágeno maduro (tipo I) e imaturo (tipo III) os grupos GAO e GOM

GRUPOS	GAO		GOM		p
	Média	± EPM	Média	± EPM	
COL I	97224,86 μm^2	± 10458,64 μm^2	129804,00 μm^2	± 9308,54 μm^2	0,0126
COL III	89664,60 μm^2	± 8367,53 μm^2	98735,90 μm^2	± 8335,53 μm^2	0,4121

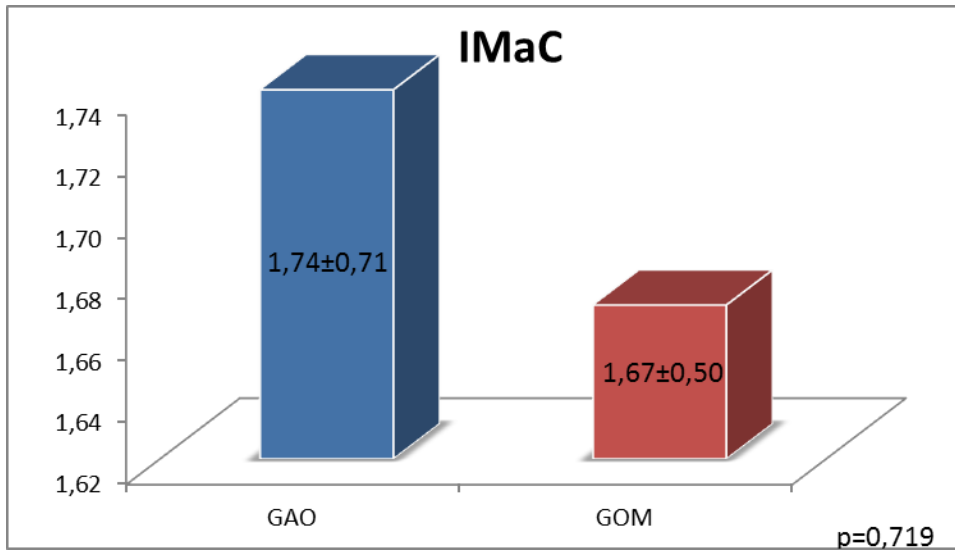
NOTA: COL I – Colágeno tipo UM. COL III – Colágeno tipo TRÊS. GOM - Grupo ômega-3. GAO - Grupo azeite de oliva. EPM - Erro-padrão médio. p - nível de significância estatística (Teste t de Student). μm^2 – micrômetro quadrado. *Grupo GAO difere de GOM.

O Índice de Maturação do Colágeno (IMaC) foi estabelecido para os grupos GAO e GOM (TABELA 6 e GRÁFICO 4). Não foi observada diferença estatística em relação às médias entre os grupos ($p=0,719$).

TABELA 6 – Média ± erro padrão de IMaC para os grupos GAO e GOM

Grupos	n	IMaC		P
		Média	± EP	
GAO	13	1,74	± 0,71	0,719
GOM	18	1,67	± 0,5	

NOTA: IMaC: Índice da maturação do colágeno. GAO: Grupo azeite de oliva. GOM: Grupo ômega-3. EP: Erro padrão. n - Tamanho da amostra. p - nível de significância estatística (Teste Mann-Whitney).



NOTA: IMaC: Índice da Maturação do Colágeno. GAO - Grupo azeite de oliva. GOM – Grupo ômega-3. (Teste Mann-Whitney).

GRÁFICO 4 – Índice de maturação do colágeno nos grupos GAO e GOM

5 DISCUSSÃO

Neste estudo, foi avaliada a influência da suplementação pré-operatória com dieta enteral enriquecida com ômega-3 sobre a cicatrização de anastomoses colônicas em ratos.

5.1 DO MATERIAL E MÉTODO

O estudo experimental tem, por característica, a possibilidade de reprodução, encontrando-se ou não os mesmos resultados. O modelo animal baseado no rato possui vantagens, como homozigidade da ninhada, peso aproximado semelhante e idade. O manuseio e o manejo do rato também são bastantes simples, e neste experimento foram utilizadas gaiolas individuais, reduzindo disputa alimentar, coprofagia e eventual estresse que pudesse ocorrer durante o período de aclimação. O modelo experimental em ratos, com seu metabolismo acelerado e grande *turnover* celular, permite mimetizar situações de estudos clínicos mais prolongados (JIBORN; AHONEN; ZEDERFELDT, 1978; BRASKÉN, 1991; VIANNA, 2009).

A suplementação enteral foi realizada através de gavagem, garantindo, dessa forma, o aporte da dose dos óleos calculados pelo peso diário do animal. A suplementação por um período de sete dias antes da cirurgia baseia-se no guideline ESPEN (WEIMANN *et al.*, 2006), que determina que a nutrição enteral com suplementos está indicada até mesmo para pacientes sem evidências de subnutrição (MARIMUTHU *et al.*, 2012; TURNOCK, *et al.*, 2013).

As anastomoses colônicas, apresenta diversas possibilidades técnicas descritas na literatura. O estudo de Jiborn, Ahonen e Zederfeldt (1978), encontrou que sutura contínua mostrou-se inferior tecnicamente ao provocar uma redução maior na concentração de colágeno se comparada a pontos interrompidos. Neste estudo, as anastomoses foram avaliadas através de tensiometria, histologia, morfologia e densitometria do colágeno.

Em relação ao desenvolvimento da resistência mecânica, depois do período *lag* no processo cicatricial o colágeno passa a ser depositado na ferida, e um dos fatores que determina sua resistência é a quantidade e a qualidade do colágeno presente na submucosa, considerando que nos três primeiros dias a resistência da anastomose é determinada pela sutura (SOUSA; SOARES; APPRILLI, 1991). Estudos posteriores determinaram que a partir do 3º e 4º dia os colágenos I e III de maior importância nos estudos passam a apresentar boa correlação com a força de tração (JUNQUEIRA; COSSERMELLI; BRENTANI, 1978; JÖNSSON; JIBORN, ZEDERFERLDT, 1985; TÖRNQVIST *et al.*, 1990; BRASKÉN, 1991).

Dentre os testes tensiométricos, o teste da força de ruptura foi recomendado por Ikeuchi *et al.* (1999), primeiro por não ter encontrado correlação direta entre a pressão de ruptura e a força de ruptura, além de mais fácil aplicação e reprodutibilidade.

A avaliação histológica, realizada através da microscopia ótica com uso da hematoxilina-eosina (HE) e do *Picrosirius red*, permite uma análise ainda que subjetiva no caso do uso do HE (leitura de lâmina pesquisador-dependente) (VIZZOTTO JR. *et al.*, 2003) de achados ou parâmetros como o exudato neutrofílico, infiltrado monomorfonuclear, proliferação fibroblástica, neovascularização, além dos processos de granulomatose e fibrose intersticiais. O *Picrosirius Red F3BA*, sob luz polarizada e através de placa de aquisição de imagem e programa de processamento dessas imagens, não só é capaz de demonstrar o principal tipo de colágeno presente na anastomose nos diferentes períodos da cicatrização (maduro tipo I - amarelo, laranja ou vermelho; imaturo tipo III – verde), como também quantificá-lo no processo cicatricial do cólon (JUNQUEIRA; COSSERMELLI; BRENTANI, 1978; JUNQUEIRA; MONTES; SANCHES, 1982).

5.2 DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÔMEGA-3

O papel da imunonutrição na cicatrização depende do desempenho fisiológico e das interações moleculares específicas dos nutrientes envolvidos.

Substratos com atividades imuno-moduladoras têm sido identificados entre os macro e micronutrientes e o racional para a utilização de tais fórmulas em pacientes criticamente enfermos é a necessidade de uma redução ou atenuação da resposta inflamatória em períodos específicos da recuperação pós-intervenções (SCHUNER; KUHN; FÜRST, 2000).

Diversos foram os trabalhos mostrando que a utilização de fórmulas enterais trazem claro benefício para o status imunológico e recuperação pós-cirúrgicas em seus mais variados aspectos (HEYS *et al.*, 1999).

Contudo, quando individualizada a utilização dos componentes presentes nessas fórmulas, o benefício passa a não ser tão claro com resultados divergentes na literatura (CORRÊA-NETO, 2009; CHOW; BARBUL, 2014).

Os ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 têm-se mostrado importantes em uma série de mecanismos e caminhos de sinalização celular que culminam com um efeito anti-inflamatório como, por exemplo, na redução da produção de TNF- α pelos macrófagos, assim como na produção de citocinas pró-inflamatórias e óxido nítrico (ENDRES *et al.*, 1989; CALDER, 1998; GRIMM *et al.*, 2002; NOVAK *et al.*, 2003).

A resposta imunológica, por sua vez, consequência da habilidade em se gerar uma resposta inflamatória, acaba sendo modificada pela adição dos ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 na dieta. A membrana celular modifica suas características apresentando maior fluidez, áreas de domínio lipídico como maior ou menos afinidade por determinados sinalizadores o que acaba por modular, principalmente, a função leucocitária. Como resultado, tem-se, da competição pelas mesmas vias enzimáticas que o ácido aracdônico (AA) e geração de eicosanoides de menor potencial inflamatório, além de reduzir a capacidade de macrófagos apresentar antígenos (CALDER, 1998; SHERRINGTON; SANDERSON; CALDER, 1995; KURATKO, 2000; WERNER; GROSE, 2003; CALDER, 2008; McDANIEL *et al.*, 2008).

Os ácidos EPA e DHA podem agir competindo com LTB4 pela ocupação de receptores impedindo a transdução de sinais para síntese de proteínas G fundamentais na sinalização celular ou mesmo através da inibição da ativação da

fosfolipase C induzida pelo TNF- α , prejudicando ou retardando a sinalização celular (YAGALOFF *et al.*, 1995; WEBER *et al.*, 1995; CALDER, 1998).

Quando induzida sepse através da LPS, o ômega-3 demonstrou reduzir a produção de citocina pró-inflamatórias, modulando a atividade de macrófagos e neutrófilos (EISNER *et al.*, 2011; PASCHOAL *et al.*, 2013).

O estudo do ômega-3 também ocorre dentro do processo da carcinogênese, em especial do câncer colorretal. Estudos demonstraram uma redução significativa na proliferação de criptas intestinais, consideradas elemento para progressão da sequência metaplasia-displasia-câncer (PELL; BROWN; JOHNSON, 1994; HENDRICKSE; KEIGHLEY; NEOPTOLEMOS, 1995; LATHAM; LUND; JOHNSON, 1999; RAO; HIROSE; INDRANIE, 2001).

5.3 DOS RESULTADOS

5.3.1 Morbidade e mortalidade

Em animais, clinicamente o processo de cicatrização pode ser inferido mesmo antes do sacrifício, através de sua evolução no período pós-operatório mediante o período necessário para reiniciar a realimentação, a atividade motora e o comportamento dentro da gaiola. Normalmente, a inatividade do animal e a demora para realimentação podem refletir complicações do período per e pós-operatório.

No presente estudo, houve 4 deiscências de anastomose em cada grupo e uma taxa de mortalidade no grupo GAO de 35,0% (n=7) e 10,0% (n=2) no grupo GOM com . Dentre as possíveis explicações, sempre se deve pensar na própria técnica cirúrgica, que apesar de extensamente praticada durante o projeto-piloto não está isenta de complicações.

Taxas semelhantes de mortalidade foram encontradas entre os grupos, apesar de BOYLU, *et al.*, 2005, em seu trabalho sobre a segurança de anastomoses

sincrônicas intestinais ter encontrado risco aumentado para o procedimento. Fatores como resposta inflamatória atenuada pelos efeitos descritos pelo ômega-3, principalmente em fases iniciais da resposta inflamatória sobre ativação de leucócitos e macrófagos, podem ter contribuído para o resultado no presente estudo (EISNER *et al.*, 2011; PASCHOAL *et al.*, 2013).

5.3.2 **Peso**

A aferição do peso é considerada um parâmetro nutricional importante nos estudos experimentais. Apesar da “qualidade do peso” (relação entre massa magra e índice de gordura) não ser normalmente caracterizada nos estudos, essa variável mostra-se fiel em relação ao estado nutricional do animal, e estudos mostram que uma perda de até 10% no período que antecede uma intervenção cirúrgica tem efeito adverso nos resultados (WEIMANN *et al.*, 2006).

No presente estudo, foram incluídos animais eutróficos, não desnutridos, que receberam suplementação com dieta enteral com azeite de oliva (grupo controle) e com ômega-3 (grupo experimental). A utilização dos ratos nutridos reduz o viés do benefício já comprovado da terapia nutricional pré-operatória (GONÇALVES *et al.*, 2009), podendo-se avaliar o efeito da intervenção de maneira isolada.

Não houve, ao longo do experimento, diferenças estatísticas em relação ao peso entre os dois grupos ($p > 0,05$). Esse resultado era teoricamente esperado, já que para os grupos GAO e GOM foram utilizadas fórmulas isocalóricas e isovolumétricas (100mg/kg).

5.3.3 **Avaliação tensiométrica**

A cicatrização na área de anastomose intestinal segue as mesmas etapas de inflamação, proliferação e de maturação, com cada camada da parede colônica

apresentando diferentes *turn-overs* celulares e fases de maturação (HERRMANN; WOODWARD; PULASKI, 1964; THORNTON; BARBUL, 1997).

As agressões ao intestino, quer sejam por meios mecânico (cirurgia) ou metabólicos (indução de inflamação por agentes químicos ou bacterianos), determinam também diferentes impactos sobre o cólon, e as camadas mucosa e muscular da mucosa são normalmente mais susceptíveis à redução do aporte de glicose. Desta forma, a submucosa constitui o grande ponto de ancoragem das anastomoses colônicas, oferecendo-lhes continuidade e resistência (BRASKÉN, 1991).

A deposição e a maturação do colágeno são determinantes nesse processo, e até o 3º dia essa força tênsil é determinada pelos pontos; a partir do 4º dia, pela neovascularização, reepitelização e maturação do colágeno presente, ao ponto de se ter, em torno do 10 dia de pós-operatório, registro da mesma força de ruptura no corpo de prova e em um segmento de colon intacto (JONSSON; JIBORN; ZEDERFELDT, 1983; HESP; HENDRIKS; SCHILLING, 1985; DOILLON *et al.*, 1985b; NARESSE *et al.*, 1987).

No presente estudo, a avaliação das anastomoses colônicas não demonstrou diferença entre grupo suplementado e grupo controle ($p=0,603$), apesar de ter sido identificada uma presença maior do colágeno do tipo I no grupo GOM ($p= 0,012$). O fato de se ter trabalhado com ratos nutridos e dietas isocalóricas pode ter contribuído para esse resultado, aliado ainda ao fato de tal método possuir menor sensibilidade para tecidos heterogêneos como em tecido sintético (COSTA *et al.*, 2003).

5.3.4 Avaliação histológica

O método histológico, apesar de subjetivo, é utilizado como forma de avaliação da evolução da cicatrização das anastomoses como proposto por Sousa

et al. (1994) e Oliveira (1995). Neste estudo, foi utilizado o parâmetro histológico com atribuição de índices de intensidade aos achados histológicos.

O infiltrado neutrofílico, o principal achado histológico na fase aguda do processo cicatricial, é o que caracteriza o processo como agudo. A quantidade de neutrófilos nas margens da ferida operatória apresenta relação direta com o processo de proliferação, ativação e deslocamento celular. O edema intersticial e congestão vascular possuem uma relação mais subjetiva e indireta com o processo de proliferação celular.

Ikeuchi *et al.*(1999) propuseram que a fase inicial do processo cicatricial terminaria em torno do 4º dia de pós-operatório, estando presente a partir do 5º dia de pós-operatório um infiltrado neutrofílico menos intenso, dando lugar aos monomorfonucleares e aos fibroblastos.

No presente estudo, utilizando-se o Teste de Fisher para distribuição de frequência de achados de acordo com sua intensidade, não foi verificada diferença entre os grupos em relação a infiltrado, edema, congestão, tecido de granulação e fibrose com *p* respectivamente de: 0,388; 0,819; 0,834; 0,522 e 0,941.

5.3.5 Densitometria do colágeno

A análise do corpo de prova por meio da microscopia ótica e através de métodos de polarização com hematoxilina-eosina (HE) e Picrosirius red permitiu a quantificação e a análise das diferentes proporções de colágeno na anastomose colônica. Assim, dentre os cinco tipos de colágenos (I, II, III, V e XI), os subtipos I e III de maior interesse nos diversos estudos podem ser avaliados por meio de captura e análise através de *softwares*, eliminando a subjetividade de uma leitura humana destreinada (JUNQUEIRA; COSSERMELLI; BRENTANI, 1978; JÖNSSON; JIBORN, ZEDERFERLDT, 1985; TÖRNQVIST *et al.*, 1990; BRASKÉN, 1991)

No presente trabalho, a quantidade total de colágeno na anastomose colônica foi igual para os grupos controle e estudo ($p > 0,05$). O Índice de Maturação do

Colágeno (IMaC) não diferiu ($p=0,719$) entre os grupos GAO ($1,74 \pm 0,71$) e GOM ($1,67 \pm 0,5$). A qualidade do colágeno nas anastomoses apresentou diferença. Foi encontrada maior quantidade de colágeno ($p=0,0126$) do tipo I (maturo) no grupo GOM ($129804\mu\text{m}^2 \pm 9308,54\mu\text{m}^2$) do que no grupo GAO ($97224,86 \mu\text{m}^2 \pm 10458,64\mu\text{m}^2$), o que, segundo Jonsson, Jiborn e Zederfeldt (1983), Doillon *et al.* (1985b) e Hendriks e Mastboom (1990) deveria conferir uma maior força tênsil da anastomose.

5.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

A utilização do ácido graxo ômega-3 demonstrou efeitos positivos ao não reduzir a qualidade da anastomose e ao aumentar o depósito do colágeno maduro do tipo I em ratos nutridos. Esses benefícios ampliam-se ao serem utilizados em animais ou seres humanos previamente desnutridos, através de redução de complicações infecciosas pós-operatórias, tempo de ventilação mecânica e custos hospitalares.

Poucos trabalhos experimentais, contudo, isolaram um elemento dessas fórmulas e o testaram. Resultados semelhantes ao deste trabalho foram obtidos ao isolar-se a utilização da arginina e glutamina e o próprio ômega-3.

Desta forma, o efeitos da suplementação com ácido graxo ômega-3 isoladamente sobre a cicatrização da anastomose colônica, ainda podem ser avaliados por meio de outros métodos como:

- suplementação peri-operatória;
- modelos de desnutrição e renutrição;
- imunistoquímica na investigação de neoangiogênese em local da anastomose;
- correlação entre níveis sérios de marcadores inflamatórios e qualidade da anastomose.

6 CONCLUSÕES

A suplementação pré-operatória com ácido graxo com ômega-3 em ratos submetidos a colotomia melhora a quantidade de colágeno tipo I (maduro) na anastomose colônica. Quando se compara o grupo controle (GAO) ao grupo de estudo (GOM), tem-se:

- a) Morbidade e mortalidade pós-operatórias igual nos dois grupos no 5º PO;
- b) Evolução ponderal igual nos dois grupos durante o experimento;
- c) Avaliação histológica e densiometria do colágeno iguais nos dois grupos no 5º PO;
- d) Força de ruptura total e Força Máxima de Ruptura igual nos dois grupos no 5º PO.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ALEXANDER, J.W. Immunonutrition: the role of omega-3 fatty acids. **Nutrition.**, ano 14, n. 7-8, p. 627-633, 1998.

BALLANTYNE, G.H. Intestinal Suturing. Review of the experimental foundations for traditional doctrines. **Dis Colon Rectum**, ano 26, n. 12, p. 836-843, 1983.

_____. Therapeutic Applicability of Anti-Inflammatory and Proresolving Polyunsaturated Fatty Acid-Derived Lipid Mediators. **TheScientificWorldJOURNAL**, ano 10, p. 676-712, 2010.

BARBUL, A.; LAZAROU, S.A.; EFRON, D.T.; WASSERKRUG, H.L.; EFRON, G. Arginine enhances wound healing and lymphocyte immune responses in humans. **Surgery.**, ano 108, n. 2, p. 331-336, 1990.

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

BRASKÉN, P.; LETHO, M.; RENVALL, S. Fibronectin, laminin, and collagen types I, III, IV and V in the healing rat colon anastomosis. **Ann Chir Gynaecol.**, ano 79, n. 2, p. 65-71, 1990.

BROUGHTON, G. 2ND; JANIS, J.E.; ATTINGER, C. E. Wound healing: an overview. **Plast Reconstr Surg**, ano 117, Suppl 7, p. 1e-S-32eS, 2006.

BOYLU, S.; OZGUN, H.; TUNCYUREK, P.; YENISEY, C.; CULHACI, N.; ERPEK, H.; DEMIRKIRAN, A.E. Is synchronous bowel anastomosis safe?. **Acta Chir Belg.**, ano 6, n.105, p.649-652, Nov-Dec. 2005.

CALDER, P. C. Immunoregulatory and anti-inflammatory effects of n-3 polyunsaturated fatty acids. **Braz J Med Biol Res.**, ano 31, n. 4, p. 467-490, Apr. 1998.

_____. Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and immunity. **Lipids**, ano 36, n. 9. p. 1007-1024, Sep. 2001.

_____. Long-chain n-3 fatty acids and inflammation: potential application in surgical and trauma patients. **Braz J Med Biol Res.**, ano 36, n. 4, p. 433-446, 2003.

_____. Polyunsaturated fatty acids, inflammatory process and inflammatory bowel diseases. **Mol Nutr Food Res.**, ano 52, n. 8, p. 885-897, 2008.

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

CAMPOS, A.C.; GROTH, A.K.; BRANCO, A.B. Assesment and nutritional aspects of wound healing. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, ano 11, n. 3, p. 281-288, 2008.

CAMUESCO, D.; GÁLVEZ, J.; NIETO, A.; COMALADA, M. *et al.* Dietary olive oil supplemented with fish oil, rich in EPA and DHA (n-3) polyunsaturated fatty acids, attenuates colonic inflammation in rats with DSS-induced colitis. **J Nutr.**, ano 135, n. 4, p. 687-694, 2005.

CARREL A. The treatment of wounds. **JAMA**, ano 55, p. 2148-2150, 1910.

CHANG, C.Y.; KUAN, Y.H.; LI, J.R.; CHEN, W.Y. *et al.* Docosahexaenoic acid reduces cellular inflammatory response following permanent focal cerebral ischemia in rats. **J Nutr Biochem.**, ano 24, n. 12, p. 2127-2137, 2013.

CHOW, O.; BARBUL, A. Immunonutrition: Role in Wound Healing and Tissue Regeneration. **Advances in Wound Care**, ano 3, n. 1, p. 46-48, 2014.

CLARK, R.A.F. Wound repair. In: KUMAR, ROBBINS, COTRAN, **Pathologic Basis of Disease**. 7. ed. Ed. Sauders, 2005. p. 112.

COELHO-LEMO, I. C.; CAMPOS, A. C.; ALMEIDA, M. de; SCHULER, S.L.; GURMINI, J.; MALAFAI, O.; ANDRADE, D. F. In utero malnutrition influences wound healing of newborn rats as measured by tensile strength and collagen deposition. **JPEN J Parenter Enteral Nutr.**, ano 28, n. 4, p. 241-244, Jul.-Aug. 2004.

CORRÊA-NETO, M.P.; CAMPOS, A.C.L.; BRANCO, A.B.; MATIAS, J.E.F. Efeito da suplementação dietética de arginina na cicatrização das anastomoses colônicas em ratos. **ABCD Arq Bras Cir Dig.**, v. 22, n. 1, p. 7-14, novembro, 2009.

COSTA, M.A.; CAMPOS, A.C.; COELHO, J.C.; BARROS, A.M. de; MATSUMOTO, H.M. Oral glutamine and the healing of colonic anastomoses in rats. **J Parenter Enteral Nutr**, ano 27, n. 3, p. 182-185, 2003.

DEBATS, I.B.; WOLFS, T.G.; GOTOH, T.; CLEUTJENS, J.P.; PEUTZ-KOOTSTRA, C.J.; VAN DER HULST, R.R. Role of arginine in superficial wound healing in man., **Nitric Oxide.**, ano 21, n. 3-4, p. 175-183, 2009.

DOILLON, C.J.; DUNN, M.G.; BERG, R.A.; SILVER, F.H. Collagen deposition during wound repair. **Scanning electron microscopy**, ano 5, Pt. 2, p. 897-903. 1985a.

_____. Collagen fiber formation in repair tissue: development of strength and toughness. **Coll Relat Res**, ano 5, n. 6, p. 481-492, 1985b.

EFRON, J.E.; FRANKEL, H.L.; LAZAROU, S.A.; WASSERKRUG, H.L.; BARBUL, A. Wound healing and T-lymphocytes. **J Surg Res.**, ano 48, n. 5, p. 460-463, 1990.

EISNER, F.; JACOB, P.; FRICK J.S.; FEILITZSCH, M. *et al.* Immunonutrition with long-chain fatty acids prevents activation of macrophages in the gut wall. **J Gastrointest Surg.**, ano 15, n. 5, p. 853-859, 2011.

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

ENDRES, S.; REZA GHORBANI, B.S.; KELLEY, V.E.; GEORGILIS, K.; LONNEMANN, G.; VAN DER MEER, J.W.M. *et al.* The Effect of Dietary Supplementation with n-3 Polyunsaturated Fatty Acids on the Synthesis of Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor by Mononuclear Cells. **N Engl J Med**, ano 320, number 5, p. 265-271, 1989.

FILDING, L.P.; STEWART-BROWN, S.; BLESOVSKY, L.; KEARNEY, G. Anastomotic integrity after operations for large-bowel cancer: a multicentric study. **BMJ.**, ano 281, 6237, p. 411-414, 1980.

GONÇALVES, C.G.; GROTH, A.K.; FERREIRA, M.; MATIAS, J.E.; COELHO, J.C.; CAMPOS, A.C. Influence of preoperative feeding on the healing of colonic anastomoses in malnourished rats. **J Parenter Enteral Nutr**, 33(1): 83-89, 2009

GRAHAM, B.; FINNIS, D. Prognosis After Anastomotic Leakage in Colorectal Surgery., **Diseases of th Colon & Rectum.**, ano 48, n. 5, p. 1021-1026, 2005.

GRIMM, H.; MAYER, K.; MAYSER, P.; EIGENBRODT, E. Regulatory potential of n-3 fatty acids in immunological and inflammatory processes. **British Journal of Nutrition.**, ano 87, Suppl. 1, p. S59-S67, 2002.

HATANAKA, E.; CURI, R. Ácidos graxos e cicatrização: uma revisão. **Rev. Bras. Farm**, São Paulo, v. 88, n. 2, p. 53-58, out. 2007.

HENDRICKS, T; MASTBOOM W.J. Healing of experimental intestinal anastomoses. Parameters for repair. **Dis Colon Rectum.**, ano 33, n. 10, p. 891-901, 1990.

HENDRICKSE, C.W.; KEIGHLEY, M.R.; NEOPTOLEMOS, J.P. Dietary omega-3 fats reduces proliferation and tumor yields at colorectal anastomosis rats. **Gastroenterology.**, ano 109, n. 2, p. 431-439, Aug. 1995.

HERRMANN, J.B.; WOODWARD, S.C.; PULASKI, E.J. Healing of colonic anastomoses in the rat. **Surg Gynecol Obstet.**, ano 119, p. 269-275, 1964.

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

HEYS, S.D.; WALKER, L.G.; SMITH, I.; ERMIN, O. Enteral nutritional supplementation with jey nutrients in patients with critical illness and cancer: a meta-analysis of randomized controlled clinical trials. **Ann Surg.**, ano 229, n. 4, p. 467-477, 1999.

HÖGSTRÖM, H.; HAGLUND, U.; ZEDERFELDT, B. Suture technique and early breaking strength of intestinal anastomoses and laparotomy wounds. **Acta Chir Scand**, 151 (5): 441-443, 1985

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

HOLUM, R.J. **Lipids in fundamentals of general, organic and biological chemistry**. New York: Wiley, J. and Sons Inc., 1994.

HUANG, Y.; BOER, W.B. de; ADAMS, L.A.; MACQUILLAN, G. *et al.* Image analysis of liver collagen using sirius red is more accurate and correlates better with serum fibrosis markers than trichome. **Liver Int.**, ano 33, n. 8, p. 1249-1256, 2013.

IIZUKA, M.; KONNO, S. Wound healing of intestinal epithelial cells. **World J Gastroenterol**, ano 17, n. 7, p. 2161-2171, 2011.

IKEUCHI, D.; ONODERA, H.; AUNG, T.; KAN, S. *et al.* Correlation of tensile strength with bursting pressure in the evaluation of intestinal anastomosis. **Dig Surg.**, ano 16, n. 6, p. 478-485, 1999.

JAGETIA, G.C.; RAJANIKANT, G.K.; MALLIKARJUN, T.I.; RAO, K.V. Ascorbic acid increases healing of excision wounds of mice whole body exposed to different doses of gamma-radiation. **Burns.**, ano 33, n. 4, p. 484-494, 2007.

JIBORN, H.; AHONEN, J.; ZEDERFELDT, B. Healing of Experimental Colonic Anastomoses: I. Bursting Strength of the Colon After Left Colon Resection and Anastomosis. **The American Journal of Surgery.**, ano 136, n. 5, p. 587-594, 1978.

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

JONSSON, K.; JIBORN, H.; ZEDERFERLDT, B. Changes in collagen content of the small intestinal wall after anastomoses. **Am J Surg.**, ano 150, n. 3, p. 315-317, 1985.

JUNQUEIRA, L.C.; COSSERMELLI, W.; BRENTANI, R. Differential staining of collagens type I, II and III by Sirius Red and Polarization microscopy. **Arch Histol Jpn.**, ano 41, n. 3, p. 267-274, 1978.

JUNQUEIRA, L.C.; MONTES, G.S.; SANCHES, E.M. The influence of tissue section thickness on the study of collagen by the picosirius-polarization method. **Histochemistry.**, ano 74, n. 1, p. 153-156, 1982.

KIM, K.; JUNG, N.; LEE, K.; CHOI, J.; JUN, J.; KIM, E.; KIM, D. Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids attenuate hepatic ischemia/reperfusion injury in rats by modulating toll-like receptor recruitment into lipid rafts. **Clin Nutr.**, ano 32, n. 5, p. 855-862, 2013.

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

KURATKO, C.N. Proliferation of colonic lymphocytes in response to inflammatory cytokines is lower in mice fed with fish oil than in mice fed with corn oil. **Cancer Lett.**, ano 148, n. 1, p. 27-32, 2000.

LARSON, S.D.; LI, J.; CHUNG, D.H.; EVERS, B.M. Molecular mechanisms contributing to glutamine-mediated intestinal cell survival. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.**, ano 293, n. 6, p. G1262-1271, 2007.

LATHAM, P.; LUND, E.K.; JOHNSON, I.T. Dietary n-3 PUFA increases the apoptotic response to 1,2-dimethylhydrazine, reduces mitosis and suppresses the induction of carcinogenesis in rat colon. **Carcinogenesis**, ano 20, n. 4, p. 645-650, Apr. 1999.

LEIGH, B.; DESNEVES, K.; RAFFERTY, J.; PEARCE, L.; KING, S.; WOODWARD, M.C.; BROWN, D.; MARTIN, R.; CROWE, T.C. The effect of different doses of an arginine-containing supplement on the healing of pressure ulcers. **J Wound Care.**, ano 21, n. 3, p. 150-156, 2012.

LU, J.; CAPLAN, M.S.; LI, D., *et al.* Polyunsaturated fatty acids block platelet-activating factor-induced phosphatidylinositol 3 kinase/Akt-mediated apoptosis in intestinal epithelial cells. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.**, ano 294, n. 5, p. G1 181-90, May 2008.

MAKSYMCHUK, O.V. The influence of omega-3 polyunsaturated fatty acids on the expression of enzymes of the prooxidant and antioxidant systems in the rat liver. **Fiziol Zh.**, ano 60, n. 3, p. 32-37, 2014.

MALKUSH, W.; REHN, B.; BRUCH, J. Advantages os Sirius Red staining for quantitative morphometric collagen measurements in lungs. **Exp Lung Res.**, ano 21, n. 1, p. 67-77, 1995.

MÅNSSON, P.; ZHANG, X.W.; JEPPSON, B.; THORLACIUS, H. Anastomotic healing in rat colon: comparison between a radiological method, breaking strength and bursting pressure. **Int J Colorectal Dis.**, ano 17, n. 6, p. 420-425, 2002.

MARIMUTHU, K.; VARADHAN, K.; LJUNGQVIST, O.; LOBO, D. A Meta-Analysis of the Effect of Combinations Of Immune Modulating Nutrients on Outcome in Patients Undergoing Major Open Gastrointestinal Surgery. **Annals Of Surgery**, ano 6, n. 255, p. 1060-1068, 2012.

MATSUNAGA, H.; HOKARI, R.; KURIHARA, C.; OKADA, Y.; TAKEBAYASHI, K.; OKUDAIRA, K.; WATANABE, C.; KOMOTO, S.; NAKAMURA, M.; TSUZUKI, Y.; KAWAGUCHI, A.; NAGAO, S.; ITOH, K., MIURA, S. Omega-3 fatty acids exacerbates DSS-induced colitis through decreased adiponectin in colonic subepithelial myofibroblasts. **Inflamm Bowel Dis**, ano 10, n. 14, p. 1348-1357, 2008.

McDANIEL, J.C.; BELURY, M.; AHIJEVYCH, K.; BLAKELY, W. ω -3 fatty acids effect on wound healing. **Wound Repair Regen**, ano 16, n. 3, p. 337-345, 2008.

MONTE, M.E.M.; ISLÁN, A.P. M. Ácidos grasos esenciales omega-3 y omega 6. **Offarm.**, ano 29, n. 1, p. 66-72, 2010.

MURAKAMI, M. Lipid Mediators in Life Science. **Exp. Anim.**, ano 60, n. 1, p. 7-20, 2011.

NARESSE, L.E.; LEITE, C.V.S.; RODRIGUES, M.A.M.; ANGELELI, A.Y.O.; MIGOMSI, J.G.; KOBAYASI, S. Efeito da peritonite fecal na cicatrização do colon distal no rato: avaliação anátomopatológica, estudo da força de ruptura e da hidroxiprolina tecidual. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v.8, n. 2, p. 48-53, abr./jun. 1993.

NARESSE, L.E.; MENDES, E.F.; CURTI, P. R.; LUCCHIARI, P. H.; KOBAYASI, S. Aparelho para medida da força de ruptura das anastomoses intestinais. **Rev. Hops. Clin. Fac. Med. Univ.**, São Paulo, v. 42, n. 5, 204-208, p. 204-208, set./out. 1987.

NOVAES, M.R.C.G.; PANTALEÃO, C.M. Arginina: bioquímica, fisiologia e implicações terapêuticas em pacientes com câncer gastrointestinal. **Rev. Ciênc. Méd.**, Campinas, SP, v. 14, n. 1, p. 65-75, jan./fev. 2005.

NOVAK, T.E.; BABCOCK, T.A.; JHO, D.H.; HELTON, W.S.; ESPAT, N.J. NF-kappa B inhibition by omega-3 fatty acids modulates LPS-stimulated macrophage TNF-alpha transcription. **Am J Physiol Lung Cell Physiol.**, ano 284, número 1, p. L84, 2003.

OKAWA, L. **Influência da suplementação enteral pré-operatória com dieta enriquecida com arginina, ácidos graxos ômega-3, nucleotídeos e oligoelementos na cicatrização de anastomoses colônicas em ratos**: estudo tensiométrico e da densitometria do colágeno. 2009. 137 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Cirúrgica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

OLIVEIRA, P. G. **Efeito da peritonite por *Cândida albicans* na cicatrização de anastomoses colônicas**: estudo experimental em ratos. 1995, 119 f. Tese (Doutorado em Clínica Cirúrgica) – Faculdade Médica de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1995.

PASCHOAL, V.A.; VINOLO, M.A. CRISMA, A.R., MAGDALON, J.; CURI, R. Eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic (DHA) acid differentially modulate rat neutrophil function in vitro. **Lipids.**, ano 48, n. 2, p. 93-103, 2013.

PELL, J.D.; BROWN, J.C.; JOHNSON, I.T. Polyunsaturated fatty acids of the n-3 series influence intestinal crypt cell production in rats. **Carcinogenesis.**, ano 15, n. 4, p. 1115-1119, 1994.

PETERSON, J.M.; BARBUL, A.; BRESLIN, R.J.; WASSERKRUG, H.L.; EFRON, G. Significance of T-lymphocytes in wound healing. **Surgery.**, ano 102, n. 2, p. 300, 1987.

RABAU, M.Y.; HIRSHBERG, A.; HISS, Y., DAYAN, D. Intestinal anastomosis healing in rat: collagen concentration and histochemical characterization by Picrosirius red staining and polarizing microscopy. **Exp Mol Pathol.**, ano 62, n. 3, p. 160-165, 1995.

RAO, C.V.; HIROSE, Y.; INDRANIE, C. *et al.* Modulation of experimental colon tumorigenesis by types and amounts of dietary fatty acids. **Cancer Res.**, ano 1, n. 61, v. 5, p. 1927-1933, Mar. 2001.

ROBSON, M.C.M.; STEED, D.L.; FRANZ, M.G. Wound Healing: Biologic Features and Approaches to Maximize Healing Trajectories. **Current Problems in Surgery.**, ano 38, n. 2, p. 72-132, 2001.

RUTHIG, D. J.; MECKLING-GILL, K.A. Both (n-3) and (n-6) fatty acids stimulate wound healing in the rat intestinal epithelial cell line, IEC-6. **J Nutr.**, ano 129, n. 10, p. 1791-1798, Oct. 1999.

SCHÄFFER, M.R.; TANTRY, U.; THORTON, F.J.; BARBUL, A. Inhibition of nitric oxide synthesis in wounds: pharmacology and effect on accumulation of collagen in wounds in mice. **Eur J Surg.**, ano 165, n. 3, p. 262-267, 1999.

SHAWN D.L.; LI, J.; CHUNG, D.H.; EVERS, B.M. Molecular mechanisms contributing to glutamine-mediated intestinal cell survival., **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.**, ano 293, n. 6, p. G1262-G1271, 2007.

SHERRINGTON, E.J.; SANDERSON, P.; CALDER, P. C. The effect of dietary lipid manipulation on macrophage cell surface molecule expression. **Biochemical Society Transactions.**, ano 23, n. 2, p. 272S, 1995.

SHILS, M.E.; OLSON, J.A.; SHIKE, M.; ROSS, A. C.; CABALLERO, B.; COUS, R. J. **Nutrição Moderna na Saúde e na Doença.** 10. ed. São Paulo: Manole, 2009.

SINGH, K.; COBURN, L.A.; BARRY, D.P.; BOUCHER, J.L.; CHATURVEDI, R.; WILSON, K.T. L-arginine uptake by cationic amino acid transporter 2 is essential for colonic epithelial cell restitution. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.**, ano 302, n. 9, p. G1061-G1073, 2012.

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

SOUSA, J. B. **Evolução da cicatrização de anastomoses colônicas sob a ação do diclofenaco sódico administrado no período perioperatório**: estudo experimental em coelhos. 1994. 95 f. Tese (Doutorado em Clínica Cirúrgica) – Faculdade Médica de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1994.

STURM, A.; DIGGAOS, A.U. Epithelial restitution and wound healing in inflammatory bowel disease. **World J Gastroenterol.**, ano 14, n. 3, p. 348-353, 2008.

SUCHNER, U.; KUHN, K.S.; FÜRST, P. The scientific basis of immunonutrition. **Proc Nutr Soc.**, ano 59, n. 4, p. 553-563, 2000.

SUKHOTNIK, I.; KHATEEB, K. MOLGINER, J.G., HELOU, H.; LURIE, M.; CORAN, A.G.; SHILONI, E. Dietary glutamine supplementation prevents mucosal injury and modulates intestinal epithelial restitution following ischemi-reperfusion injury in the rat., **Dig Dis Sci.**, ano 52, n. 6, p. 1497-1504, 2007.

SWEAT, F.; PUCHLER, H.; ROSENTHAL, S.I. Sirius red F3BA as a stain for connective tissue. **Archives of pathology.**, ano 78, p. 69-72, Jul., 1964.

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

TÖRNQVIST, A.; BLOMQUIST, P.; JIBORN, H.; ZEDERFELDT, B. Anastomotic healing after resection of left-colon stenosis: effect on collagen metabolism and anastomotic strength. An experimental study in the rat. **Dis Colon Rectum**, ano 33, n. 3, p. 217-221, 1990.

TRUBIAN, P. S. **Nutrição perioperatória e cicatrização de anastomoses em ratos desnutridos e toxêmicos**: tensiometria, densitometria do colágeno e quantificação de angiogênese e miofibroblasto. 2008. 147 f. Tese (Doutorado em Clínica Cirúrgica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

TURNOCK, A.; CALDER, P.C.; WEST, A.L.; IZZARD, M.; MORTON, R.P.; PLANK, L.D. Perioperative Immunonutrition in Well-Nourished Patients Undergoing Surgery for Head and Neck Cancer: Evaluation of Inflammatory and Immunologic Outcomes. **Nutrients.**, ano 5, n. 4, p.1186-1199, 2013.

VIANNA, L.M.A.; **Manual de fisiologia experimental**. São Paulo, Ed Yendis, 2009. Cap. 2, p. 20-27.

VIZZOTTO JR., A.O.; NORONHA, L.; SCHEFFEL, D.L.H.; CAMPOS, A.C.L. Effect of the cisplatin applied before and after the surgical procedure on the healing of colonic anastomoses in rats. **J Bras Pathol Med Lab.**, ano 39, n. 2, p. 143-149, 2003.

WAITZBERG, D.L.; TORRINHAS, R.S. Fish oil lipid emulsions and immune response: what clinicians need to know. **Nutr Clin Pract.**, ano 24, n. 4, p. 487-499, 2009.

WEBER, C.; ERL, W.; PIETSCH, A.; DANESH, U.; WEBER, P. C. Docosahexanoic acid selectively attenuates induction of vascular cell adhesion molecule-1 and subsequent monocytic cell adhesion to human endothelial cells stimulated by tumor necrosis factor- α . **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology.**, ano 15, n. 5, p. 622-628, 1995.

WEIMANN, A.; BRAGA, M.; HARSANYI, L.; LAVIANO, A.; LJUNGVIST, O.; SOETERS, P.; KEMEN, J.M.; HIESMAYR, J.M.; HORBACH, T.; KUSE, E.R.; VESTWEBER, K.H. ESPEN Guidelines on Enteral Nutrition: Surgery including Organ Transplantation. **Clinical Nutrition.**, ano 25, n. 2, p. 224-244, 2006.

WERNER, S.; GROSE, R. Regulation of Wound Healing by Growth Factors and Cytokines. **Physiol Rev.**, ano 83, n. 3, p. 835-870, 2003.

WHITING, C.V.; BLAND, P. W.; TARLTON, J.F.; Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids reduce disease and colonic proinflammatory cytokines in a mouse model for colitis. **Inflamm Bowel Dis.**, ano 11, n. 4, p. 340-349, Apr. 2005.

WISCHMEYER, P.E. Glutamine and heat shock protein expression. **Nutrition.**, ano 18, n. 3, p. 225-228, 2001.

WISCHMEYER, P.E.; KAHANA, M.; WOLFSON, R.; REN, H.; MUSH, M.M.; CHANG, E.B. Glutamine induces heat shock protein and protects against endotoxin shock. **J Appl Physiol.**, ano 90, n. 6, p. 2403-2410, 1985.

WOODWORTH, H.L.; McCASKEY, S.J.; DURIANCIK, D.M.; CLINTHORNE, J.F.; LANGOHR, I.M.; GARDNER, E.M.; FENTON, J.I. Dietary fish oil alters T lymphocyte cell populations and exacerbates disease in a mouse model inflammatory colitis. **Cancer Res.**, ano 20, n. 70, p. 7960-7969, Oct. 2010.

WU, G.; BAZER, F.W.; BURGHARDT, R.C.; JOHNSON, G.A.; KIM, S.W.; KNABE, D.A.; LI, P.; LI, X.; McNIGHT, J.R.; STTATERFIELD, M.C.; SPENCER, T.E. Proline and hydroxyproline metabolism: implications for animal and human nutrition. **Amino Acids.**, ano 40, n. 4, p. 1053-1063, 2011.

YAGALOFF, K.A.; FRANCO, L.; SIMKO, B.; BURGHARDT, B. Essential fatty acids are antagonists of the leukotriene B₄ receptor. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids.**, ano 52, n. 5, p. 293-297, 1995.

APÊNDICE A PROTOCOLO DE TRÂMITE NO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ



Universidade Estadual de Maringá
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação



Parecer emitido após reunião realizada em: 4/4/2013 Parecer nº 032/2013

Pesquisador: Eneri Vieira de Souza Leite Mello	Setor: DCM
Título:	Protocolo nº 015/2013
Influência da suplementação pré-operatória com ácido graxo ômega-3 na cicatrização das anastomoses colônicas em ratos nutridos e desnutridos recebendo paclitaxel	
Entrada: 26/3/2013	Início: 1/5/2013
	Término: 30/4/2014
Situação do Projeto: Aprovado com Recomendação	
Relatório Final: ATENÇÃO: este parecer, quando a situação do projeto constar "aprovado", autoriza os proponentes a executarem o protocolo em questão. O certificado será emitido após apreciação do relatório final.	
Considerações e Parecer:	
<p>Quanto ao mérito da pesquisa em relação às normas previstas na Lei no 11.794/08, Decreto 6.899/09, Resoluções do CONCEA, Lei Estadual no 14.037/03 e Resolução UEM no 032/2006-CEP, verifica-se que o projeto atende aos critérios éticos para o uso dos animais nos experimentos propostos.</p> <p>Contudo, em função de problemas no preenchimento do formulário solicitamos que sejam corrigidos:</p> <p>a) <input type="checkbox"/> O item 3.2.4. do formulário, referente a alimentação. Foi informado que não haveria suplementação alimentar, entretanto a administração de azeite de oliva e ômega-2 são os suplementos testados, de acordo o o título do trabalho;</p> <p>b) <input type="checkbox"/> A página 9 do processo, não foi impressa completamente e deverá ser substituída;</p> <p>c) <input type="checkbox"/> O item 4.1.8. do formulário indica que não há recuperação cirúrgica, entretanto, os animais terão recuperação, de acordo com os procedimentos descritos no formulário, item 4.1. – pós-operatório.</p> <p>Além das correções do formulário, indicamos que, conforme descrito no formulário o volume declarado para administração de salina IP é de 3 mL, entretanto, conforme guidelines internacionais (Canadian Council on Animal Care (CCAC) guidelines (www.ccac.ca) (http://www.animalcare.ubc.ca/sop/ACS-2012-TECH10.pdf)), o volume máximo para ratos deve ser 2 mL. Sendo assim, haverá a necessidade de alteração do protocolo para ajuste do volume administrado de salina.</p> <p>Os outros guidelines utilizados para avaliação deste protocolo estão disponíveis em: http://www.procedureswithcare.org.uk/alt/2010/oral-gavage-in-the-rat/; http://www.research.psu.edu/arp/experimental-guidelines/administration-by-oral-gavage.</p> <p>Sendo assim, opina-se pela APROVAÇÃO do protocolo, na forma do artigo 10, inciso I, da Resolução UEM no 032/2006-CEP, vez que não se constatam óbices legais para o desenvolvimento dos procedimentos experimentais nos moldes propostos pela pesquisadora em relação à legislação vigente, condicionado o início dos experimentos aos ajustes solicitados.</p> <p>É o parecer.</p>	
 Prof. Dr. GENTIL CANINI DE MORAES, Presidente em exercício do CEAE.	

Artigo 10 da Resolução nº 032/2006-CEP: Os projetos analisados serão enquadrados em uma das seguintes categorias:

I - aprovado;

II - pendente, quando o CEAE considerar o protocolo e o projeto como aceitáveis, porém com problemas no protocolo, no projeto ou em ambos, e houver recomendação de uma revisão específica, ou solicitação de modificação ou informação relevante, que deverá ser atendida em até 60 dias, após o recebimento da comunicação, pelo coordenador do projeto;

III - arquivado, quando o protocolo permanecer pendente, transcorridos 30 dias, após o prazo previsto no Inciso II do recebimento da comunicação;

IV - não aprovado

APÊNDICE B PESO

Variáveis	Grupos	n	Média	Mínimo	Máximo	Erro Padrão	p*
D0	GAO	20	292,3	241	321	4,4	0,3546
	GOM	20	284,3	221	323	5,3	
D1	GAO	20	298,7	242	324	4,5	0,2648
	GOM	20	292	233	333	4,9	
D2	GAO	20	300,3	244	328	4,8	0,3834
	GOM	20	295,3	250	334	4,6	
D3	GAO	20	308,5	248	352	5,0	0,1826
	GOM	20	298,6	240	343	5,6	
D4	GAO	20	308,9	253	380	6,1	0,2648
	GOM	20	300,9	238	353	5,8	
D5	GAO	20	314,7	260	345	4,5	0,0595
	GOM	20	300,8	240	350	6,0	
D6	GAO	20	318,4	260	350	4,8	0,22422
	GOM	20	309,1	242	351	5,5	
D7	GAO	20	322,3	259	353	5,0	0,2109
	GOM	20	313,1	248	355	5,6	
D8	GAO	20	325,8	265	363	4,8	0,2012
	GOM	20	317,2	251	360	5,3	
D9	GAO	20	325,9	272	366	4,9	0,3983
	GOM	20	319,8	254	367	6,0	
D10	GAO	20	331,7	274	370	4,8	0,1572
	GOM	20	321,1	256	370	6,2	
D11	GAO	20	336	279	374	4,9	0,2315
	GOM	20	326,3	263	378	6,0	
D12	GAO	20	342	279	381	5,1	0,1344
	GOM	20	330	266	385	6,3	
D13	GAO	20	344	282	386	5,2	0,1493
	GOM	20	333,5	270	374	5,5	
D14	GAO	20	348,4	286	388	5,5	0,3272
	GOM	20	339	260	388	6,5	
D15	GAO	20	350,9	288	395	5,7	0,2888
	GOM	20	340,1	276	390	6,8	
D16	GAO	20	352,3	279	401	6,1	0,3834
	GOM	20	345,1	281	396	6,3	
D17	GAO	20	358,6	293	410	6,0	0,3834
	GOM	20	349,9	283	402	6,5	
D18	GAO	20	361,6	296	416	6,2	0,3141
	GOM	20	349,7	284	400	6,9	
D19	GAO	20	365,4	302	417	6,2	0,445
	GOM	20	356,4	285	406	6,4	
D20	GAO	20	367,4	301	426	6,4	0,5648
	GOM	20	356,9	242	414	8,7	
D21	GAO	20	369,7	309	427	6,2	0,698
	GOM	20	363,4	292	419	6,9	
D22	GAO	20	373,6	311	430	6,4	0,4945
	GOM	20	365,9	295	420	7,3	
D23	GAO	20	369,8	310	430	6,4	0,7788
	GOM	20	365,6	296	422	6,6	
D24	GAO	20	371,9	304	434	6,6	0,718
	GOM	20	367,1	277	426	7,3	
D25	GAO	20	372,4	308	434	6,6	0,7229
	GOM	20	366,8	283	420	6,9	
D26	GAO	20	371,8	312	430	6,5	0,698
	GOM	20	366,3	268	426	7,6	
D27	GAO	20	373,4	310	432	6,6	0,698
	GOM	20	369	284	420	7,1	
D28	GAO	20	372,6	308	436	6,8	0,7381
	GOM	20	369,6	283	429	7,4	
DCIR	GAO	20	349,7	286	409	6,4	0,5608
	GOM	20	344	258	402	7,2	
DSAC	GAO	13	321	272	393	8,8	0,857
	GOM	18	316,056	286	343	3,8	

* Teste *Mann-Whitney* não significativo considerando nível de significância de 5%.

APÊNDICE C FMT, FRT, TM (Kgf), TM (N)

Variável	Grupo	n	Média	Mínimo	Máximo	Erro Padrão	P
FMT (N)	GAO	13	1,954	0,309	3,35	0,3	0,3572
	GOM	18	1,691	0,532	3,121	0,2	
FRT (N)	GAO	13	1,501	0,158	2,822	0,2	0,6028
	GOM	18	1,398	0,333	2,462	0,1	
TM (Kgf)	GAO	13	0,003	0	0,004	0,0	0,4118
	GOM	18	0,002	0,001	0,004	0,0	
TM (N)	GAO	13	0,026	0,004	0,042	0,0	0,4118
	GOM	18	0,023	0,007	0,04	0,0	

* Teste *Mann-Whitney* não significativo considerando nível de significância de 5%.

APÊNDICE D DENSITOMETRIA DO COLÁGENO: ÁREA TOTAL E COLÁGENOS TIPO I E III

Variável	Grupo	n	Média	Mínimo	Máximo	Erro Padrão	p
ÁREA TOTAL	GAO	13	2274608	2274608	2274608	0,0	0,9999
	GOM	18	2274608	2274608	2274608	0,0	
COL I	GAO	52	97224,86	1203,2	312758,6	10458,6	0,0126*
	GOM	72	129804	20448,4	348018,9	7910,7	
COL III	GAO	52	89664,69	6672,7	240804,3	8367,5	0,4121
	GOM	72	101742,2	5476,6	301761,7	7532,5	

* Teste *Mann-Whitney* significativo considerando nível de significância de 5%.

APÊNDICE E COMPOSIÇÃO DE RAÇÃO POR KG PARA RATOS NUVILAB CR1®

Composição Básica do Produto: Carbonato de cálcio, farelo de milho, farelo de soja, farelo de trigo, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, premix mineral vitamínico, aminoácido. VITAMIGAO: A; E; K; B2; B6, B12, niacina; ácido pantotênico; ácido fólico; biotina, colina.

NÍVEIS DE GARANTIA

Umidade (máx.)	12,50%
Proteína Bruta (min.)	22,00%
Extrato Etéreo (min.)	4,00%
Matéria Fibrosa (máx.)	8,00%
Matéria Mineral (máx.)	10,00%
Cálcio (máx.)	1,40%
Fósforo (min.)	0,80%

MICROELEMENTOS MINERAIS: Ferro; zinco; cobre; iodo; manganês; selênio; cobalto.

AMINOÁCIDOS: DL-metionina 300,00 mg; lisina 100,00 mg.

ADITIVOS: Antioxidante.

APÊNDICE F COMPOSIÇÃO MÉDIA DOS ÁCIDOS GRAXOS NO AZEITE DE OLIVA EXTRA-VIRGEM

ÁCIDO GRAXO	NÚMERO DE CARBOGOM (C)	FAIXA DE DISPONIBILIDADE %
Mirístico	C 14:0	0,002-0,8
Palmítico	C 16:0	8,5-15,2
Palmitoléico	C 16:1	0,9-2,2
Esteárico	C 18:0	1,3-2,7
Oléico	C 18:1	63,8-82,6
Linoléico	C 18:2	5,1-13,6
Linolênico	C 18:3	0,7-1,0
Araquídico	C 20:0	0,1-0,8

Fonte: Manual do Azeite de Oliva, Câmara de Comércio Goiás/Itália; ABOISSA - 2004

APÊNDICE G

COMPOSIÇÃO DA EMULSÃO LÍPIDA DE ÔMEGA-3



VITAL ESPECIALIDADES DERMOCOSMETICAS LTDA
 CNPJ: 74.411.257/0001-72 I.E.: 113.993.671.113
 RUA AMERICO BRASILIENSE - 04715-001 - SAO PAULO - SP
 FONE: 11 3526-8200 - FAX: 11 3526-8296
 EMAIL: vendas@vital.especialidades.com.br - WEBSITE: WWW.VITALEPECIALIDADES.COM.BR

Página: 1

CERTIFICADO DE QUALIDADE

CLIENTE: FARMACIA FLORACELL LTDA
 ITEM : 10.0042-1- OMEGA 3 (1L)
 QUANTIDADE: 1 UN CAS: 8001-26-1
 NF: 18367 DE 05/12/2012

ITEM: 10.0042-1 - OMEGA 3 (1L)
 LOTE: 10.0042-1123
 LOTE FORNEC.: LIN 081/156
 OP: 20797/2012

STATUS: APROVADO
 DATA FABRICAÇÃO: 19/06/2012
 PAÍS DE PROCEDÊNCIA: BRASIL
 PAÍS DE ORIGEM: BRASIL

QUANTIDADE: 1 UN
 VALIDADE: 19/12/2013
 FABRICANTE: NACIONAL

Características Críticas

Ordem	PONTO DE INSPEÇÃO
1	* APARENCIA
2	* COR
3	* ODOR
4	* INDICE DE ACIDEZ
5	* INDICE DE PEROXIDO
6	* INDICE DE SAPONIFICACAO
7	* INDICE DE IODO
8	* DENSIDADE
9	INDICE DE REFRACAO

INSTRUMENTO DE MEDIÇÃO

VISUAL
VISUAL
OLFATIVO
TITULACAO
TITULACAO
TITULACAO
TITULACAO
PICNOMETRO
REFRATOMETRO

VALOR ESPECIFICADO

MIN / MÁX
LIQUIDO OLEOSO
AMARELO
CARACTERISTICO
<2
< 10
158 A 198
100 A 150
0,910 A 0,920
1,4650 A 1,4850

VALOR ENCONTRADO

ÚNICO - MIN / MAX
LIQUIDO OLEOSO
AMARELO
CARACTERISTICO
1,65
0,59
191,25
148,22
0,920
1,4711

Monografia

METODOLOGIA INTERNA

Observações

ANALISES REALIZADAS PELO L.C.Q DA VITAL ESPECIALIDADES.
 *NAO EXPOR AO CALOR, NEM A RAIOS SOLARES.

Estocagem

{\rtf1\ansi\def0\fonttbl{\f0\fnil\charset0 MS Sans Serif;}{\f1\fnil MS Sans Serif;}}
 \viewkind4\uc1\pard\lang1046\fs16 MANTER EM LOCAL SECO E AREJADO E EM TEMPERATURA AMBIENTE\fs1\par

Garantimos e certificamos que os materiais e/ou produtos acima mencionados foram produzidos, testados e inspecionados sob condições controladas e estabelecidas pelo nosso Sistema de Qualidade.

Dra. Mayara de Lima Evangelista.
 Farmacêutica Responsável CRF/SP: 67.583