

**LUCAS DUDA SCHMITZ**

**NUTRIÇÃO PERIOPERATÓRIA SUPLEMENTADA COM GLUTAMINA NA  
CICATRIZAÇÃO DE ANASTOMOSE COLÔNICA DE RATOS  
DESNUTRIDOS**

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

**Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Ligoeki  
Campos**

**Coordenador: Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto  
Matias**

**CURITIBA**

**2006**

Schmitz, Lucas Duda

Nutrição perioperatória suplementada com glutamina na cicatrização de anastomose colônica de ratos desnutridos /. – Lucas Duda Schmitz.- Curitiba, 2006.

xvii, 89 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos L. Campos.  
Dissertação (Mestrado) – Setor de Ciências da Saúde,  
Universidade Federal do Paraná

1.Glutamina. 2.Desnutrição. 3.Cólon. 4.Anastomose cirúrgica.  
4.Cicatrização de feridas. 5.Ratos Wistar. I.Título.

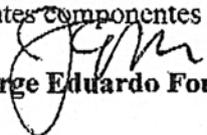
NLM WI 520

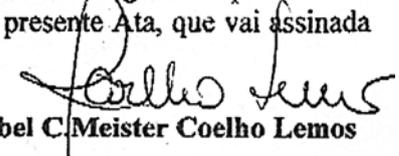


MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA CIRÚRGICA  
NÍVEL MESTRADO - DOUTORADO

Ata do julgamento da 296ª Dissertação de Mestrado do 405º do Programa para conclusão da Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica, nível Mestrado da Universidade Federal do Paraná, referente o aluno LUCAS DUDA SCHMITZ, com o título: "NUTRIÇÃO PERIOPERATÓRIA SUPLEMENTADA COM GLUTAMINA EM RATOS DESNUTRIDOS SUBMETIDOS À ANASTOMOSE COLÔNICA: AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA E TENSIOMÉTRICA", tendo como orientador Prof. Dr. Antonio Carlos L. Campos realizada em 17 de abril de dois mil e seis.

Às sete horas e trinta minutos do dia dezesseis de abril de dois mil e seis no Auditório do 7º andar central sala 701 do Hospital de Clínicas, teve início a prova em epígrafe, constituída a Comissão Examinadora pelos Professores Doutores Jorge Eduardo Fouto Matias, Izabel C. Meister Coelho Lemos e Júlio Cezar Uilli Coelho sendo este Presidente da Comissão. Aberta a sessão foi apresentada pelo Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias, Coordenador do Programa, a documentação probatória do cumprimento pelo candidato das exigências legais que lhe facultam submeter-se à avaliação da dissertação, como última etapa à sua titulação no Programa. A seguir o Presidente da Comissão 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 Comissão 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 Comissão Examinadora em sala reservada para atribuição das notas, dos conceitos e lavratura do Parecer Conjunto necessário. Os conceitos e notas atribuídos foram: Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias - conceito " A " e equivalência " 10 "; Dra. Izabel C. Meister Coelho Lemos - conceito " A " e equivalência " 10 "; Dr. Júlio Cezar Uilli Coelho - conceito " A " e equivalência " 10 ". Voltando à sala de sessão, o Senhor Presidente da Comissão leu os conceitos do Parecer Conjunto, dando como final o conceito " A " e equivalência " 10 ", e a recomendação de que a dissertação com o título já referido, possa ser publicada na forma final nos meios de divulgação científica adequados, depois de incorporadas as sugestões apresentadas no decurso das arguições. E para que tudo conste, foi lavrada a presente Ata, que vai assinada pelos seguintes componentes da Comissão Examinadora.

  
Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias

  
Profa. Dra. Izabel C. Meister Coelho Lemos

  
Prof. Dr. Júlio Cezar Uilli Coelho



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

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

Aluno: LUCAS DUDA SCHMITZ

Título da Dissertação "NUTRIÇÃO PERIOPERATÓRIA SUPLEMENTADA COM GLUTAMINA EM RATOS DESNUTRIDOS SUBMETIDOS À ANASTOMOSE COLÔNICA: AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA E TENSIOMÉTRICA".

**CONCEITOS EMITIDOS:**

Prof. Dr. Júlio Cezar Uilli Coelho	Conceito emitido <u>A</u>	Equivalência <u>10</u>
Profa. Dra. Izabel C. Meister Coelho Lemos	Conceito emitido <u>A</u>	Equivalência <u>10</u>
Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias	Conceito emitido <u>A</u>	Equivalência <u>10</u>

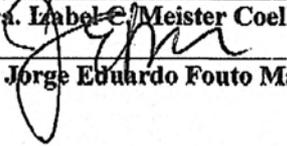
Conceito Final de Avaliação:

Conceito: A Equivalência 10

Curitiba, 17 de abril de 2006

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Júlio Cezar Uilli Coelho

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Izabel C. Meister Coelho Lemos

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias

## **DEDICATÓRIA**

**Ao meu pai, pelos ensinamentos deixados e que nunca serão esquecidos.**

**À minha mãe, pelo apoio, e incentivo, sem os quais seria impossível o meu progresso.**

**À Roberta, minha esposa, pela paciência, compreensão, fé e companheirismo, o que me faz mais forte para vencer os desafios.**

**Aos meus avós, exemplos vivos de amor, trabalho e família.**

**Ao grande mestre Juarez Antônio Dal Vesco, amigo e exemplo.**

## AGRADECIMENTOS

À **Deus**, pela vida e pelos êxitos.

Ao Dr. **Antonio Carlos L. Campos**, Professor Titular do Departamento de Cirurgia e Vice-coordenador do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná, pela ilustre orientação e ampla sabedoria, as quais foram fundamentais no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. **Julio Cezar U. Coelho**, Professor Titular e Chefe do Serviço de Cirurgia do Aparelho Digestivo e de Transplante Hepático da Universidade Federal do Paraná, ilustre cirurgião com o qual tive a oportunidade muito honrosa de aprender e estabelecer laços permanentes de amizade influenciando meu ingresso nesse programa de pós-graduação.

Aos professores do departamento de cirurgia da UFPR, Dr. **Jorge Eduardo Fouto Matias** e Dr. **Oswaldo Malafaia**, pelos ensinamentos e dedicação a esse programa de pós-graduação.

Ao Dr. **José Luiz de Godoy**, pelas orientações e pelo empenho na construção da minha formação científica, cirúrgica e humana.

Ao acadêmico de Medicina da Universidade Federal do Paraná **Danilo Aedo Gardim Camilo**, pela amizade e auxílio científico na condução do experimento.

Ao Drs. **Sérgio Ossamu Ioshii** e **Luis Kotze**, médicos do departamento de patologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, pela contribuição na avaliação histológica deste trabalho.

À professora **Saete do Carmo Pelanda**, pelos ensinamentos e pelo profissionalismo com que se dedica à estatística e às causas sociais.

Aos **colegas** residentes de Cirurgia do aparelho digestivo do Hospital de Clínicas que me ajudaram e souberam compreender minhas ausências durante a realização deste estudo.

Aos funcionários do programa de pós-graduação em clínica cirúrgica e departamento de Cirurgia da UFPR: **Marili Drews**, **Regina Sass Marques**,

**Guilherme Blanc Mottin e Élon Dias de França**, que colaboraram das mais diversas formas na realização deste trabalho.

À **Ajinomoto Interamericana do Brasil**, pela doação dos aminoácidos utilizados.

À **Universidade Federal do Paraná**, pela oportunidade de realizar meus cursos de pós-graduação.

Ao **CNPQ**, pela concessão da bolsa e pelo incentivo à pesquisa em nosso país.

Aos meus irmãos **Marcos Duda Schmitz e Miguel Duda Schmitz** pelo estímulo, força e cumplicidade.

Aos meus sogros **Jorge Bandarra Westphalen e Maria Adélia Bilibio Westphalen** que possibilitaram minha presença em Curitiba e sempre estiveram próximos.

Aos amigos: **Anne Guimarães e Ricardo Guimarães, André Zanchet e Kátia Zanchet, Edenilson Maia e Denise Bayer, Jéferson Ferreira e Liliane Ferreira, Analuce Coelho e Marco Medeiros** pelos agradáveis momentos em Curitiba que me faziam relaxar e renovavam minhas forças nos intervalos deste estudo.

## **EPÍGRAFE**

**A nutrição da ferida é, na verdade,  
nutrição do corpo todo**  
**Goodson e Hill**

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	viii
<b>LISTA DE GRÁFICOS .....</b>	ix
<b>LISTA DE QUADROS.....</b>	x
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	xi
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....</b>	xii
<b>RESUMO.....</b>	xiv
<b>ABSTRACT .....</b>	xv
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	1
1.1 OBJETIVO .....	3
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	4
2.1 CICATRIZAÇÃO .....	5
2.1.1 Considerações gerais .....	5
2.1.2 Cicatrização das anastomoses colônicas .....	7
2.1.3 Colágeno na anastomose colônica de ratos .....	9
2.1.4 Avaliação histológica da cicatrização de anastomoses colônicas .....	12
2.1.5 Avaliação mecânica da cicatrização de anastomoses colônicas.....	14
2.1.6 Fatores que influenciam a cicatrização.....	17
2.2 DESNUTRIÇÃO E CICATRIZAÇÃO.....	18
2.2.1 Considerações gerais .....	18
2.2.2 Desnutrição na cicatrização de anastomoses colônicas.....	20
2.2.3 Terapia nutricional na desnutrição associada à anastomose colônica.....	20
2.3 GLUTAMINA.....	23
2.3.1 Considerações gerais .....	23
2.3.2 Utilização da Gln como suplemento nutricional .....	26
<b>3 MATERIAL E MÉTODO .....</b>	30
3.1 MATERIAL.....	31
3.1.1 Animais.....	31
3.1.2 Ração .....	31
3.1.3 Aminoácidos.....	31
3.2 MÉTODO .....	32
3.2.1 Considerações ambientais .....	32
3.2.2 Grupos .....	34
3.2.3 Desenho do estudo.....	34
3.2.4 Diluição dos aminoácidos.....	35
3.2.5 Gavagem.....	35
3.2.6 Controle de peso e ingesta.....	36
3.2.7 Morbimortalidade .....	36
3.2.8 Anestesia.....	37
3.2.9 Ato cirúrgico.....	37
3.2.10 Pós-operatório.....	38
3.2.11 Sacrifício.....	39
3.2.12 Teste de tração .....	40
3.2.13 Avaliação histológica .....	42

3.2.14 Análise estatística .....	46
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>48</b>
4.1 MORTALIDADE .....	49
4.2 MORBIDADE .....	49
4.3 PESO .....	50
4.3.1 Grupo CTL .....	50
4.3.2 Grupo GLY .....	50
4.3.3 Grupo GLN .....	52
4.3.4 Grupo CTL versus grupos GLN e GLY .....	52
4.3.5 Grupo GLN versus grupo GLY .....	53
4.4 INGESTA .....	54
4.5 ADERÊNCIAS .....	55
4.6 VARIÁVEIS DE FORÇA .....	57
4.7 VARIÁVEIS HISTOLÓGICAS .....	58
4.7.1 Contagem de polimorfonucleares .....	58
4.7.2 Densitometria do colágeno .....	58
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>62</b>
5.1 DO MÉTODO .....	63
5.1.1 Escolha dos animais .....	63
5.1.2 Desnutrição .....	63
5.1.3 Nutrição perioperatória .....	65
5.1.4 Data do sacrifício .....	65
5.1.5 Anestesia .....	66
5.1.6 Anastomose colônica .....	67
5.1.7 Glutamina .....	67
5.2 DOS RESULTADOS .....	68
5.2.1 Morbimortalidade .....	68
5.2.2 Peso .....	70
5.2.3 Ingesta .....	71
5.2.4 Força tênsil da anastomose .....	72
5.2.5 Aderências .....	73
5.2.6 Contagem de polimorfonucleares .....	73
5.2.7 Densitometria do colágeno .....	74
5.3 PERSPECTIVAS FUTURAS .....	75
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>77</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>79</b>

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ELEMENTOS DA CICATRIZAÇÃO.....	5
FIGURA 2 – FASES DA CICATRIZAÇÃO.....	6
FIGURA 3 – MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS E MECÂNICAS DA FERIDA.....	11
FIGURA 4 – SÍNTESE E DEGRADAÇÃO DO COLÉGENO NA CICATRIZAÇÃO.....	12
FIGURA 5 – SÍNTESE E DEGRADAÇÃO DA GLUTAMINA (Gln).....	24
FIGURA 6 – SÍNTESE E CONSUMO DA GLUTAMINA.....	25
FIGURA 7 – ESTANTES HORIZONTAIS COM GAIOLAS.....	33
FIGURA 8 – GAIOLA METABÓLICA.....	33
FIGURA 9 – DESENHO DO ESTUDO.....	35
FIGURA 10 – PROCEDIMENTO DE GAVAGEM.....	36
FIGURA 11 – PROCEDIMENTO CIRÚRGICO.....	38
FIGURA 12 – ANASTOMOSES COLÔNICAS NO DIA DA CIRURGIA.....	39
FIGURA 13 – ANASTOMOSES COLÔNICAS NO DIA DO SACRIFÍCIO.....	41
FIGURA 14 – PEÇA HISTOLÓGICA E CORPO DE PROVA.....	41
FIGURA 15 – TENSÍMETRO (EMIC DL500MF).....	42
FIGURA 16 – FOTOMICROGRAFIA DA ANASTOMOSE COLÔNICA CORADA COM H/E.....	43
FIGURA 17 – FOTOMICROGRAFIA DA ANASTOMOSE COLÔNICA CORADA COM PSR.....	44
FIGURA 18 – FOTOMICROGRAFIA DE REGIÃO ANASTOMÓTICA CORADA COM PSR.....	45
FIGURA 19 – CAPTAÇÃO DE IMAGEM HISTOLÓGICA NO SISTEMA RGB.....	45

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – MÉDIAS DE PESOS DOS GRUPOS CTL, GLN E GLY .....	51
GRÁFICO 2 – DIFERENÇAS DAS MÉDIAS DE PESO INTRA-GRUPO CTL NA FASE DE DESNUTRIÇÃO .....	51
GRÁFICO 3 – MÉDIA DE INGESTA DOS GRUPOS CTL, GLN E GLY .....	56
GRÁFICO 4 – ÍNDICES DE KNIGHTLY ENTRE OS GRUPOS GLN E GLY .....	57
GRÁFICO 5 – DIFERENÇAS DAS MÉDIAS DE PMN ENTRE OS GRUPOS GLN E GLY .....	58
GRÁFICO 6 – DIFERENÇA DAS MÉDIAS DE COLÁGENO MADURO E IMATURO DAS ÁREAS 1, 2, 3 E 4 INTER-GRUPOS GLN E GLY .....	59
GRÁFICO 7 – DIFERENÇA DAS MÉDIAS DO IMaC ENTRE OS GRUPOS GLN e GLY .....	59
GRÁFICO 8 – DIFERENÇA DAS MÉDIAS DOS COLÁGENOS MADURO E IMATURO INTER-GRUPOS GLN E GLY NAS ÁREAS 1, 3 E 4.....	60
GRÁFICO 9 – DIFERENÇA DAS MÉDIAS DO IMaC DAS ÁREAS 1, 3 E 4 ENTRE OS GRUPOS GLN E GLY .....	60
GRÁFICO 10 – DIFERENÇA DAS MÉDIAS DA ÁREA 1 DE COLÁGENOS MADURO E IMATURO INTER-GRUPOS GLN E GLY .....	61
GRÁFICO 11 – DIFERENÇA DAS MÉDIAS DO IMaC DA ÁREA 1 ENTRE OS GRUPOS GLN E GLY .....	61

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – ÍNDICE DE MATURAÇÃO DO COLÁGENO (IMaC) .....	15
QUADRO 2 – FATORES QUE INFLUENCIAM A CICATRIZAÇÃO ANASTOMÓTICA .....	18
QUADRO 3 – COMPOSIÇÃO DA RAÇÃO UTILIZADA PARA ALIMENTAR OS ANIMAIS .....	32
QUADRO 4 – CLASSIFICAÇÃO DE ADERÊNCIAS .....	39

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DA COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DE ÓBITOS INTER-GRUPOS GLN E GLY APÓS A FASE DE DESNUTRIÇÃO .....	49
TABELA 2 – COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DE COMPLICAÇÕES INTER-GRUPOS GLN E GLY APÓS A FASE DE DESNUTRIÇÃO .....	50
TABELA 3 – DIFERENÇAS DAS MÉDIAS DE PESOS NO GRUPO GLY ENTRE OS DIAS INICIAL, 21D, 6S, CX E FINAL.....	52
TABELA 4 – DIFERENÇAS DAS MÉDIAS DE PESOS INTRA-GRUPO GLN NOS DIVERSOS PERÍODOS DO ESTUDO .....	53
TABELA 5 – DIFERENÇAS DAS MÉDIAS DE PESOS ENTRE OS GRUPOS GLN E CTL E GLY E CTL NA FASE DE DESNUTRIÇÃO.....	54
TABELA 6 – DIFERENÇAS DAS MÉDIAS DE PESOS ENTRE OS GRUPOS GLN E GLY NOS DIAS INICIAL, 21D, 6S, CX E FINAL .....	54
TABELA 7 – DIFERENÇAS DAS MÉDIAS DE INGESTA NAS FASES D, PRÉ-OP E PÓS-OP INTER-GRUPOS GLN, GLY E CTL .....	55
TABELA 8 – DIFERENÇAS DAS MÉDIAS DE INGESTA NAS FASES PRÉ-OP E PÓS-OP INTRA-GRUPOS GLN E GLY.....	56
TABELA 9 – DIFERENÇAS DAS MÉDIAS DAS VARIÁVEIS FORÇA MÁXIMA DE TRAÇÃO (FMT) E FORÇA DE RUPTURA TOTAL (FRT) ENTRE OS GRUPOS GLN E GLY .....	57

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

μm	- Micrômetro
±	- Mais ou menos
=	- Igual a
<	- Menor que
>	- Maior que
%	- Porcentagem
+	- Mais
®	- Marca registrada
°C	- Graus Celsius
x	- Vezes
cGy	- Centigray (rad)
cm	- Centímetro
CP	- Corpo de Prova
CTL	- Grupo controle
D	- Fase de desnutrição
EP	- Erro Padrão
et al	- E colaboradores
FMT	- Força Máxima de Tração
FRT	- Força de Ruptura Total
g	- Grama
GLN	- Grupo Glutamina
GLY	- Grupo Glicina.
h	- Horas
H/E	- Hematoxilina-Eosina
Hg	- Mercúrio
IMaC	- Índice de Maturação do Colágeno
INMETRO	- Instituto Nacional de Metrologia
Kcal	- Quilocaloria
Kg	- Quilograma
Kgf	- Quilograma-força
m	- Metro
mm	- Milímetro.
MTS	- Maximal Tensil Strength
n	- Tamanho da amostra.
NP	- Nutrição Parenteral
p	- Nível de significância estatística
PMN	- Polimorfonucleares
PO	- Pós-operatório
PRÉ-OP	- Pré-operatório
PSR	- Picrosirius-red
RNA <sub>m</sub>	- Ácido ribonucléico mensageiro
S	- Dia do sacrifício
SRF	- Picrosirius-red

TGI - Trato gastrointestinal  
TRS - Total rupture strength  
VO - Via oral

## RESUMO

### NUTRIÇÃO PERIOPERATÓRIA SUPLEMENTADA COM GLUTAMINA NA CICATRIZAÇÃO DE ANASTOMOSE COLÔNICA DE RATOS DESNUTRIDOS

Desnutrição leva a diminuição da força tênsil da ferida. Em anastomoses colônicas o comprometimento da cicatrização pode levar a deiscência e pobres resultados. Por outro lado, a Glutamina é considerada condicionalmente essencial em episódios de estresse cirúrgico e desnutrição. A sua suplementação exógena preserva a estrutura e função da mucosa intestinal. O objetivo desse estudo foi investigar os efeitos da nutrição perioperatória suplementada com glutamina na cicatrização de anastomoses colônicas de ratos desnutridos. Um total de 46 ratos Wistar, machos, pesando  $242,80g \pm 21,95g$  foram alocados em gaiolas individuais e após período de aclimação de três dias os animais foram randomizadamente divididos em três grupos: grupo controle (CTL, n=14), que tinha livre acesso à água e ração por 21 dias antes de ser descartado e grupos Glutamina (GLN, n=16) e Glicina (GLY, n=16), alimentados com 50% da média de ingesta do grupo CTL por 21 dias (Pair Feeding) e, então, foram renutridos, respectivamente, com ração e água *ad libitum* mais L-Glutamina (1,5g/Kg/dia) ou solução isonitrogenada e isovolumétrica de Glicina através de gavagem durante seis dias antes e quatro dias após a operação. No sexto dia de suplementação os ratos foram anestesiados e submetidos a duas secções colônicas: uma 6 cm do *ostium ileale* (válvula ileocecal) e outra 3 cm acima da reflexão peritoneal. A reconstrução da continuidade intestinal foi realizada por duas anastomoses término-terminais em plano único com oito pontos separados de nylon 6/0. Os ratos foram sacrificados no quinto dia pós-operatório e as duas anastomoses colônicas de cada animal foram ressecadas e conservadas em solução salina 0,9% e formalina a 10% para estudos de força tênsil (força máxima de tração - FMT e força de ruptura total - FRT) e histológico (densitometria do colágeno com índice de maturação do colágeno - IMaC), respectivamente. Também foi avaliado a variação de peso, ingesta, índices de aderências intra-abdominais e morbimortalidade. A análise estatística incluiu os testes t de Student e Kruskal Wallis e valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos. Os resultados mostraram que não houve diferença estatística significativa entre os dois grupos na força tênsil (FMT: GLN =  $0.17 \pm 0.01$  vs. GLY =  $0.17 \pm 0.01$ ,  $p = 0.63$  e FRT: GLN =  $0.12 \pm 0.00$  vs. GLY =  $0.10 \pm 0.01$ ,  $p = 0.17$ ). Na densitometria do colágeno o IMaC não demonstrou diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,14$ ) embora tenha sido maior no grupo GLY ( $0.53 \pm 0.04$ ) que no grupo GLN ( $0.45 \pm 0.03$ ). Em conclusão, a suplementação perioperatória oral de Glutamina não tem efeito na cicatrização de anastomoses colônicas de ratos desnutridos.

Palavras-chave: Glutamina; desnutrição; anastomose colônica; cicatrização.

## ABSTRACT

### PERIOPERATIVE NUTRITION SUPPLEMENTED WITH GLUTAMINE IN HEALING OF COLONIC ANASTOMOSES OF MALNOURISHED RATS

Malnutrition leads to decreased wound tensile strength. In colonic anastomoses compromised healing may lead to dehiscence and poor results. On the other hand, glutamine is considered conditionally essential during episodes of surgical stress and malnutrition. Its exogenous supplementation preserves intestinal mucosal structure and function. The aim of this study was to investigate the effects of perioperative glutamine enriched diet on the healing of colonic anastomoses of malnourished rats. A total of 46 male Wistar rats, weighing  $242.80\text{g} \pm 21.95\text{g}$ , were housed in individual cages and after three days of acclimatization were randomly divided in three groups: Control Pair Feeding Group (CTL, n=14), had free access to water and standard rat chow for 21 days before the discard and Glutamine (GLN, n=16) and Glycine (GLY, n=16) groups fed 50% of the average of the ingested food by the CTL for 21 days and then re-fed, respectively, with standard rat chow and water *ad libitum* plus either L-glutamine (1.5g/Kg/day) or a control solution in isonitrogenous and isovolumetric solutions through gavage during 6 days before and 4 days after the operation. On the 5<sup>th</sup> PO day rats were anesthetized and undergone to 2 colonic transections; one 6 cm distal from the *ostium ileale* (ileocecal valve) and another 3 cm above the peritoneal reflection. Bowel continuity was restored by two end-to-end, single layer, anastomoses with 8 interrupted sutures (6/0 nylon). The rats were killed on 5<sup>th</sup> PO, and the 2 colonic anastomoses of each animal were resected and stored in 0.9% saline and 10% formalin for tensile test (Maximal Tensile Strength - MTS and Total Rupture Strength - TRS) and histologic (collagen densitometry with collagen maturation index - IMAC) studies, respectively. Student's t-test and Kruskal Wallis tests were used for statistical analysis and P values < 0,05 were considered significant. The results showed that there were no statistically significant differences between the two groups in the MTS (GLN =  $0.17 \pm 0.01$  vs. GLY =  $0.17 \pm 0.01$ , p = 0.63) and TRS (GLN =  $0.12 \pm 0.00$  vs. GLY =  $0.10 \pm 0.01$ , p = 0.17). The IMAC was higher in the GLY group ( $0.53 \pm 0.04$ ) than GLN group ( $0.45 \pm 0.03$ ), although there was no statistically significant differences detected (p = 0.14). As conclusion, perioperative oral glutamine supplementation had no effect on the healing of colonic anastomoses in malnourished rats.

Key Words: Glutamine; malnutrition; colonic anastomoses; wound healing.



## 1. INTRODUÇÃO

A operação do cólon apresenta número significativo de complicações quando comparada a procedimentos cirúrgicos sobre outros órgãos. Parte desse insucesso relaciona-se às falhas na cicatrização das anastomoses colônicas influenciadas por fatores de risco como a desnutrição. Intervenções nutricionais perioperatórias demonstraram benefícios nessas situações e a manipulação de dietas utilizando substratos como a Glutamina poderia trazer vantagens adicionais à cicatrização do cólon.

A deiscência é a tradução clínica da falha dos mecanismos de cicatrização na anastomose colônica. A diminuição da sua incidência nos últimos anos está associada à melhora terapêutica e aos avanços tecnológicos. No estudo de GOLIGHER, GRAHAM e DOMBAL (1970) houve 20% de fistulização anastomótica do cólon, enquanto na metanálise de GUENAGA, ATALLAH, CASTRO, MATOS e WILLE-JORGENSEN (2005) esse índice não ultrapassou 2,9%. No entanto, essa complicação associa-se à elevação significativa dos custos e da duração do tratamento (KORUDA; ROLANDELLI, 1990; CAMPOS; MEGUID; COELHO, 1996) e está relacionada, direta ou indiretamente, com 20% a 80% da mortalidade pós-operatória (ABETE; RONCHETTI; CASANO; PESCIO, 2003; CHAMBERS; MORTENSEN, 2004).

Nas últimas décadas foi demonstrado que a perfeição técnica não é suficiente para garantir o sucesso da cicatrização de uma anastomose colônica. Assim, vários fatores de risco para fístulas foram identificados, entre eles os déficits nutricionais (HOIER-MADSEN; HANSEN; LINDENBERG, 1975). Alimentação inadequada, perda de peso e desnutrição prejudicam o reparo cicatricial e associam-se às deiscências anastomóticas do cólon (GREENHALGH; GAMELLI, 1987; MÄKELÄ; KIVINIEME; LAITINEN, 2003).

Entre as evidências, DALY, VARS e DUDRICK (1972) demonstraram que a desnutrição pré-operatória prejudica a cicatrização de anastomoses colônicas em ratos. Recentemente, GONÇALVES (2005) confirmou os achados de DALY et al. (1972) e evidenciou que a nutrição perioperatória de ratos desnutridos melhora a cicatrização

das anastomoses do cólon, porém em nível inferior ao alcançado por animais eutróficos.

O maior conhecimento metabólico identificou ações farmacológicas importantes em vários nutrientes. Entre eles, a Glutamina (Gln) deixou de ser considerada apenas um aminoácido não essencial e passou a ser o foco de muitos estudos (LACEY; WILMORE, 1990). Esse substrato serve de combustível para colonócitos (ARDAWI; NEWSHOLME, 1985; SOUBA; SMITH; WILMORE, 1985) e assume importância na manutenção da estrutura intestinal em períodos de elevado catabolismo (BOELEN; NIJVELDT; HOUDIJK; MEIJER; VAN LEEUWEN, 2001; SOUBA; KLIMBERG; PLUMLEY; SALLOUM; FLYNN; BLAND; COPELAND, 1990; WILMORE, 2001). Outras evidências associam a Gln ao processo de cicatrização (WILLIAMS; BARBUL, 2003).

Baseados nesses estudos, COSTA, CAMPOS, COELHO, BARROS e MATSUMOTO (2003) utilizaram Gln via oral perioperatória em ratos eutróficos e verificaram melhora dos parâmetros cicatriciais nas anastomoses colônicas desses animais. No entanto, não foi avaliado se esse efeito benéfico da suplementação oral de Gln supera os prejuízos causados pela desnutrição pré-operatória.

## 1.1 OBJETIVO

Avaliar o efeito da suplementação da nutrição oral perioperatória com Glutamina na cicatrização de anastomoses colônicas em ratos desnutridos, mediante análise de parâmetros morfológicos e tensiométricos.



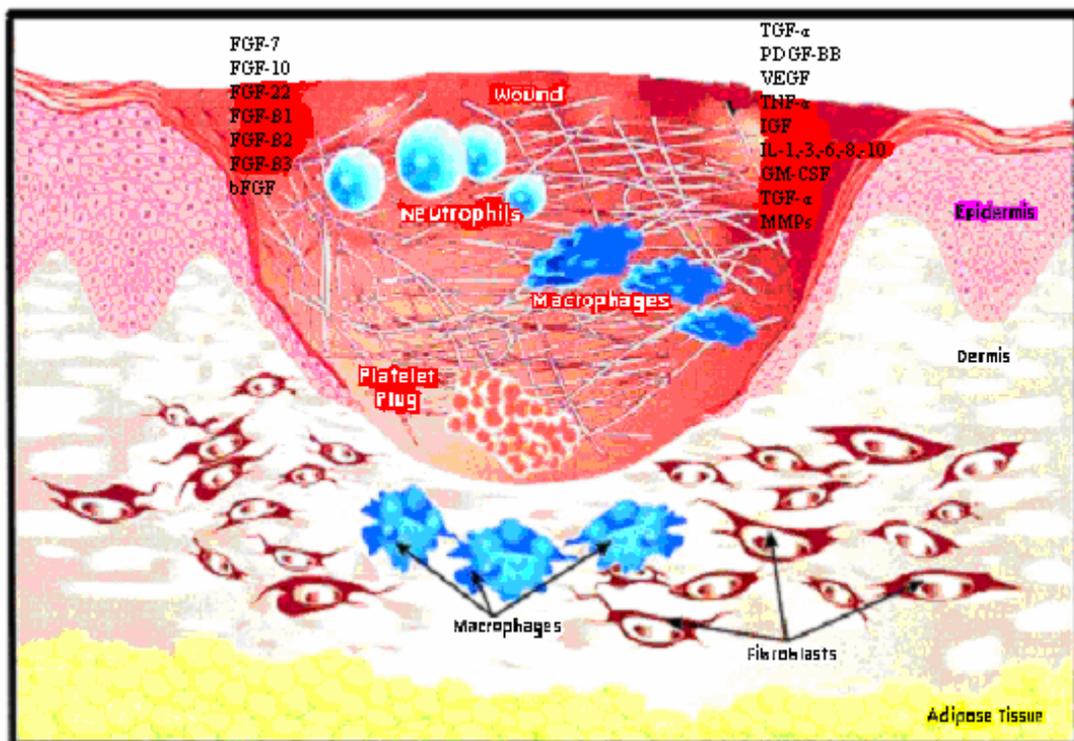
## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 CICATRIZAÇÃO

#### 2.1.1 Considerações gerais

A cicatrização é uma resposta fibroproliferativa com interação de diferentes tipos de células e mediadores na tentativa de reparo do defeito lesional (FIGURA 1).

FIGURA 1 - ELEMENTOS DA CICATRIZAÇÃO



LEGENDA: wound = ferida; neutrophils = neutrófilos; macrophages = macrófagos; platelet plug = plaquetas; fibroblasts = fibroblastos; epidermis = epiderme; dermis = derme; adipose tissue = tecido adiposo; FGF 7, FGF 10, FGF 22, TGF-β1, TGF-β2, TGF β3, bFGF, TGFα, PDGF-BB, VEGF, IGF, IL-1, IL-3, IL-6, IL-8, IL-10, GM-CSF, TGFα e MMPs = mediadores vasoativos e quimiotáticos.

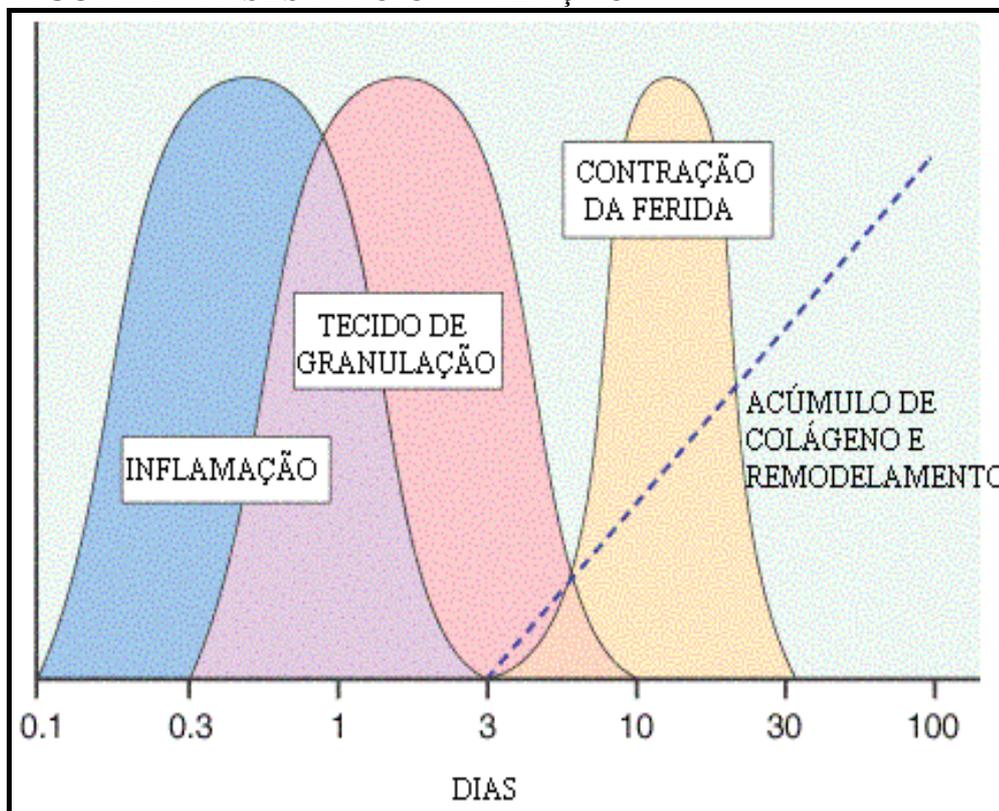
FONTE: modificado de JIMENEZ; JIMENEZ, 2004.

Em 1910, CARREL descreveu os mecanismos cicatriciais em seqüência ordenada de eventos, que foram divididos por ORGILL e DEMLING (1988) em cinco elementos principais: inflamação, proliferação celular, formação do tecido de

granulação, contração e remodelamento da ferida. Recentemente, CLARK (2005) representou esse processo em três fases (FIGURA 2).

A lesão tecidual coloca elementos sanguíneos em contato com o colágeno e outras substâncias da matriz extracelular, provocando degranulação de plaquetas e ativação das cascatas de coagulação e do complemento. Com isso, há liberação de vários mediadores vasoativos e quimiotáticos que conduzem o processo cicatricial mediante aumento de células inflamatórias na região da ferida (BENNETT; SCHULTZ, 1993).

FIGURA 2 - FASES DA CICATRIZAÇÃO



FONTE: modificado de Clark, 2005.

Os neutrófilos ocupam precocemente a região lesada fagocitando debris e são, progressivamente, substituídos por macrófagos durante a evolução favorável da cicatrização. Dessa forma, o padrão celular representa marcador evolutivo do reparo tecidual (SOUSA; SOARES; APRILLI, 1991; GRECA; NORONHA; BENDHACK; FERES; SOCCOL; DUDA, 2004; COSTA et al, 2003).

Os processos de angiogênese, multiplicação fibroblástica e epitelização são os principais eventos de proliferação celular envolvidos no desenvolvimento do tecido de granulação. A neovascularização permite a sustentação nutricional da área de reparo. Os fibroblastos multiplicam-se e produzem o colágeno, importante componente estrutural do tecido cicatricial. A epitelização reveste a ferida evitando contaminação e a perda de umidade e proteínas da região cicatricial (MANDELBAUM; SANTIS; MANDELBAUM, 2003).

A contração gera forças que aproximam as bordas da ferida através da ação do miofibroblasto, que invade a área cicatricial no final da primeira semana após a lesão tecidual (VAN WINKLE, 1967). Na fase seguinte, algumas modificações ocorrem no tecido de granulação durante o remodelamento da ferida: regressão da rede capilar, remoção do excesso de colágeno com organização espacial de suas fibras e diminuições da demanda metabólica, do edema e da quantidade de proteoglicanos da área de cicatrização (MADDEN; PEACOCK, 1971; ORGILL; DEMLING, 1988).

Em condições normais, esses eventos constituem os mecanismos habituais do processo de cicatrização desencadeados pela ferida, que conduzirão à restituição da integridade tecidual. Eles são normalmente representados de forma didática sobre a superfície cutânea, porém, apesar de serem constantes em qualquer ferida, apresentam particularidades quando envolvem o trato gastrointestinal (THORNTON; BARBUL, 1997). A cicatrização do cólon e de outros órgãos intra-abdominais apresenta, ainda, maior complexidade que o reparo da superfície cutânea, em função do maior número de camadas estruturais e pela presença do peritônio, que reage ativamente com peritonite e formação de aderências ao ser estimulado.

### 2.1.2 Cicatrização das anastomoses colônicas

As fases de inflamação e formação do tecido de granulação correspondem aos momentos mais críticos para o sucesso cicatricial das anastomoses colônicas. Durante esses processos ocorrem grande parte dos déficits cicatriciais que levam à deiscência anastomótica.

A resposta inflamatória nas anastomoses é rápida. Os mediadores quimiotáticos atraem neutrófilos, que se acumulam na área anastomótica três horas após a sua realização, e aumentam a proporção de monócitos a partir de 12 horas pós-operatórias (HESP; HENDRIKS; SCHILLING; LUBBERS; DeBOER, 1985). Os agentes vasoativos contribuem no edema anastomótico que persiste os primeiros sete dias pós-operatórios (GETZEN; HOLLOWAY, 1966).

Vários tipos celulares aumentam sua concentração na área anastomótica durante a proliferação celular. Evidencia-se neovascularização entre o segundo e terceiro dia pós-operatório (WISE; McALISER; STEIN; SCHUCK, 1975). Os fibroblastos atingem a região da ferida nas primeiras 12 horas após a anastomose multiplicando-se no local (HESP et al., 1985).

Os eventos cicatriciais sobre a anastomose afetam toda a estrutura laminar do cólon. Cada camada da parede colônica exibe características próprias e sofre alterações em diferentes intensidades. A aproximação das bordas da anastomose afeta a velocidade do reparo epitelial. Essa camada pode se reconstituir em três dias quando há ótima coaptação (THORNTON; BARBUL, 1997).

A submucosa mantém a taxa metabólica mais elevada da parede colônica na área da cicatrização anastomótica. HALSTED, em 1887, provou a importância dessa camada ao incluí-la sob os pontos da anastomose. É na submucosa que se distribui a maior parte do colágeno produzido no cólon, fundamental na manutenção da integridade intestinal durante a cicatrização anastomótica (HESP et al., 1984).

MORI, DOI, HARA, YOSHIZUKA, OHSATO e FUJIMOTO (1992) demonstraram que a reconstituição da camada muscular depende da diferenciação de células musculares lisas a partir de células mesenquimais indiferenciadas, as quais invadem a região entre o terceiro e quinto dia após o ferimento. As primeiras, aliadas aos fibroblastos locais, são as responsáveis pela produção da totalidade do colágeno cicatricial intestinal (GRAHAM; DRUCKER; DIEGELMANN; ELSON, 1987).

A importância do peritônio visceral no processo de cicatrização foi evidenciada no estudo de GOLIGHER et al. (1970). Os autores provaram que estruturas extra-peritoneais (desprovidas de serosa) estavam mais sujeitas a fistulas.

A observação direta dos eventos cicatriciais que envolvem o reparo de anastomoses colônicas exige que os dados sejam obtidos através de estudos experimentais. Dessa forma, a maior parte das evidências relacionadas à cicatrização desse segmento, avalia a integridade anastomótica a partir das alterações mecânicas e histológicas no cólon de animais.

### 2.1.3 Colágeno na anastomose colônica de ratos

O colágeno é o principal componente da matriz extracelular dos tecidos. Estrutura-se numa rede densa e dinâmica resultante da sua constante deposição e reabsorção. A quantidade de colágeno modifica-se no cólon durante o pós-operatório de anastomoses colônicas, principalmente na região peri-anastomótica (JIBORN; AHONEN; ZEDERFELDT, 1980).

A enzima colagenase quebra o colágeno, atuando mais intensamente no início da cicatrização da anastomose. Após o terceiro dia do processo cicatricial, a atividade colagenolítica diminui, aumentando a quantidade absoluta de colágeno na região cicatricial (CHOWCAT; SAVAGE; HEMBRY, 1988; HAWLEY, 1970).

CRONIN, JACKSON e DUMPHY (1968) através do método de detecção da hidroxiprolina demonstraram que os níveis absolutos de colágeno em anastomoses colônicas de ratos permanecem baixos até o 5º PO, ocorrendo aumento progressivo da sua quantidade até atingir valores quase normais em torno do 10º PO. IRVIN e HUNT (1974a) utilizando radioisótopos confirmaram os achados de CRONIN et al. (1968), mas observaram que as alterações na concentração do colágeno ocorriam em proporções menos intensas devido à formação de edema na região anastomótica. Segundo IRVIN e HUNT (1974a), o conteúdo de colágeno peri-anastomótico permanece constante durante os três primeiros dias pós-operatórios, com aumento significativo após esse período e alcançando valores máximos no 7º PO.

JIBORN et al. (1980) avaliaram o metabolismo de colágeno em anastomoses de cólon esquerdo de ratos. Demonstraram que em estágios precoces após a anastomose (4º PO) a lise predominava, embora a atividade sintética também estivesse

aumentada. Entre o 4º e 7º PO, a síntese começava a superar a degradação, até que no 7º PO esse balanço tornava-se favorável à deposição de colágeno no tecido cicatricial.

Três subtipos de colágeno (I, III e V) são identificados durante o processo cicatricial do cólon. Os colágenos I e III atingem proporções mais significativas e a relação entre eles têm importância maior no estudo da cicatrização anastomótica.

BRÁSKEN (1991) determinou a expressão de RNAm de colágenos I e III, através de técnicas de hibridização, em anastomoses colônicas de ratos. Verificou que em segmentos intestinais correspondentes de animais não operados (controles), houve baixa atividade de RNAm, enquanto que em ratos com anastomoses ocorreu ativação significativa de genes localizados principalmente em fibroblastos da submucosa, serosa e interface anastomótica. As mais altas expressões genéticas de RNAm na submucosa foram vistas no 2º PO (colágeno tipo III) e 3º PO (colágeno tipo I), sendo que houve atividade mais intensa e prolongada do subtipo I e mais precoce do subtipo III.

BRÁSKEN, RENVALL e SANDBERG (1991) utilizaram marcadores monoclonais observando queda na concentração de colágeno III e I anastomóticos, com níveis mínimos no 1º e 2º PO respectivamente. Ambos subtipos de colágeno acumularam-se a partir do 3º PO, atingindo níveis máximos no 7º PO e permanecendo elevados até o 14º PO.

Essas alterações histológicas da anastomose acompanham as modificações das propriedades mecânicas do tecido cicatricial (FIGURA 3). HERRMANN, WOODWARD e PULANSKI (1964) sugeriram que as alterações histológicas da cicatrização eram as responsáveis pela força da anastomose e identificaram três diferentes fases:

- 1) Fase Lag (quiescência): predominância de edema e inflamação, ocorrendo entre o dia da cirurgia e o 4º PO, momento em que a força da ferida é dependente do reforço artificial das suturas;

- 2) Fase Logarítmica (fibroplasia): proliferação de fibroblastos com rápido ganho de força da anastomose, ocorrendo entre 3 e 14 dias;

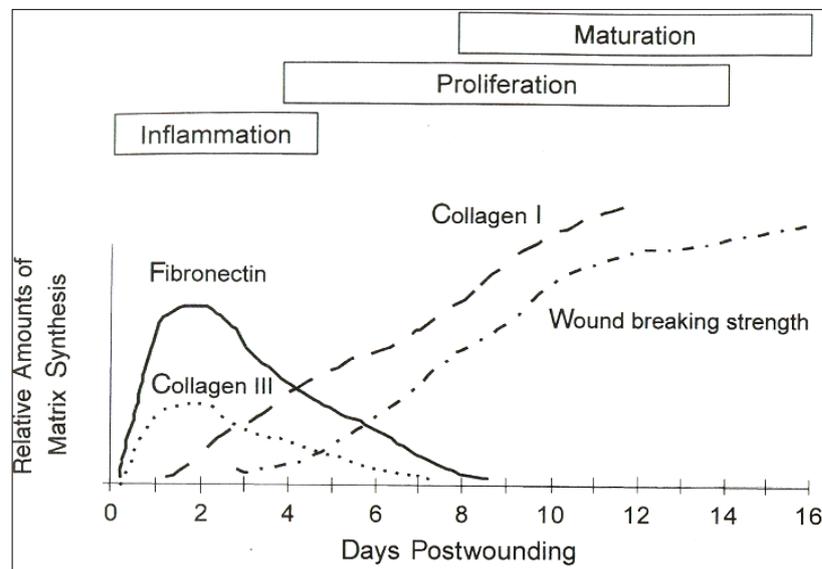
3) Fase Estacionária (maturação): remodelamento das fibras de colágeno, com menor ganho de força que se inicia em torno do 10º PO.

Evidência recente associou as alterações da rede de colágeno como as principais responsáveis pelas modificações mecânicas das anastomoses intestinais (KHOURY; WAXMAN, 1983).

As anastomoses colônicas perdem 72% a 95% da sua força tecidual original, durante os três primeiros dias do processo cicatricial, quando há atividade mais intensa da colagenase (HÖGSTRÖN; HAGLUND; ZEDERFELDT, 1985 e JIBORN et al., 1980). Após esse período inicial a anastomose ganha força acompanhando progressivo depósito de colágeno na área cicatricial (FIGURA 4).

Entretanto, as características qualitativas do colágeno depositado são mais importantes para o suporte estrutural da anastomose do que sua concentração tecidual (HENDRIKS; MASTBOOM, 1990).

FIGURA 3 - MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS E MECÂNICAS DA FERIDA



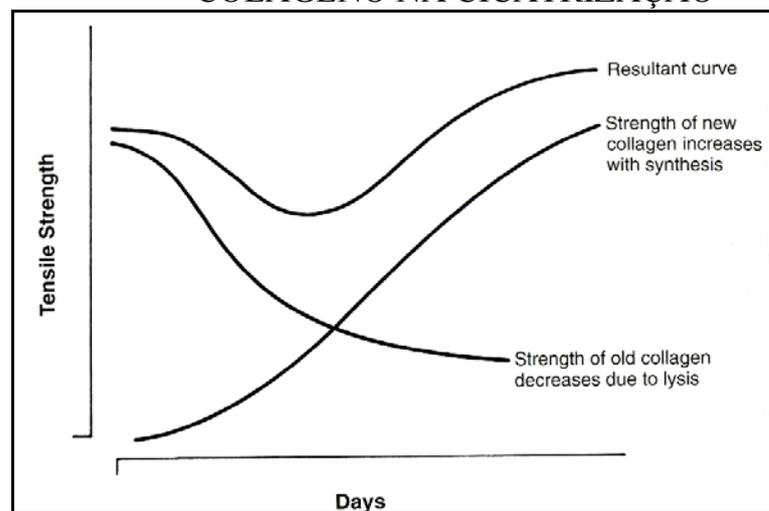
LEGENDA: Maturation = maturação; Proliferation = proliferação; Inflammation = inflamação; Collagen = colágeno; Fibronectin = fibronectina; Wound breaking strength = força de ruptura da ferida; Relative Amounts of Matrix Synthesis = quantidade relativa de matriz sintetizada; Days Postwounding = dias pós-lesão.

FONTE: WITTE; BARBUL, 1997

O aumento de força tênsil é mais relacionado com o colágeno I do que com o colágeno III. DOILLON, DUNN e BENDER (1985) evidenciaram que a deposição e o remodelamento das fibras de colágeno I são os principais determinantes do ganho de força da área em cicatrização exercendo influência sobre a integridade anastomótica.

JONSSON et al. (1983) e HENDRIKS e MASTBOOM (1990) estabeleceram a correlação clínica dessas evidências. Verificaram que havia um período mais vulnerável para deiscência anastomótica (entre 4º e 7º PO), que correspondia aos momentos de déficit mecânico e de baixa qualidade de colágeno depositado na anastomose.

FIGURA 4 - SÍNTESE E DEGRADAÇÃO DO COLÁGENO NA CICATRIZAÇÃO



LEGENDA: Tensile Strength = força tênsil; Days = dias; Resultant curve = curva resultante; Strength of new collagen increases with synthesis = força do colágeno novo aumenta com a síntese; Strength of old collagen decreases due to lysis = força do colágeno antigo diminui devido à lise.

FONTE: THORNTON; BARBUL, 1997.

#### 2.1.4. Avaliação histológica da cicatrização de anastomoses colônicas

O colágeno é uma proteína rica em aminoácidos básicos, os quais reagem fortemente com corantes ácidos. As moléculas de colágeno dispõem-se em orientação espacial paralela, apresentando birrefringência característica.

SWEAT, PUCHTLER e ROSENTHAL (1964) adotaram o uso do Sirius-red F3BA (SRF) como corante alternativo na identificação do colágeno tecidual devido ao rápido desbotamento da coloração de picrofucsina. As moléculas de SRF (ácido) interagem individualmente com as moléculas de colágeno mantendo um relacionamento espacial paralelo com as mesmas, ressaltando a birrefringência. A combinação seletiva com o colágeno permite sua visualização como fibras amarelo-brilhantes, sendo que o uso da microscopia polarizada aumenta a especificidade, a sensibilidade e a resolução do método (CONSTANTINE; MOWRY, 1968).

JUNQUEIRA, BIGNOLAS e BRENTANI (1979) padronizaram a metodologia de uso do SRF e após a análise histológica de cortes teciduais de 15 espécies de vertebrados, consideraram a coloração específica para o colágeno tecidual. Em outro estudo, JUNQUEIRA, COSSERMELLI e BRENTANI (1978) compararam o colágeno de diferentes regiões de animais demonstrando correlação entre diferentes cores e birrefringências e a distribuição bioquímica dos colágenos I e III (SRF + polarização). Esses autores observaram que o colágeno tipo I apresentava-se como fibras espessas, fortemente birrefringentes e com coloração que variava do amarelo ao vermelho, diferentemente do colágeno tipo III (fibras finas, fracamente birrefringentes e esverdeadas).

A cor e a intensidade da birrefringência correlacionam-se diretamente com a espessura da fibra de colágeno (diferentes padrões de agregação física das moléculas) e do tecido analisado (JUNQUEIRA; MONTES; SANCHES, 1982; DAYAN; HISS; HIRSHBERG; BUBIS; WOLMAN, 1989).

DAYAN et al. (1989) analisaram vários tipos de fibras colágenas e evidenciaram que a espessura da fibra não era o único fator determinante do padrão de birrefringência. Constataram que o alinhamento das moléculas e o entrelaçamento das fibras afetavam a refração da luz, sendo que fibras espessas e entrelaçadas apresentavam-se laranja-avermelhadas (fibras de colágeno tipo I - maduras), enquanto que fibras finas e pouco entrelaçadas apresentavam-se esverdeadas (fibras de colágeno tipo III - imaturas).

RABAU, HIRSHBERG, HISS e DAYAN (1995) realizaram estudo da concentração de colágeno em anastomoses intestinais de ratos utilizando SRF e polarização. Verificaram que no intestino de ratos não operados havia predomínio de fibras colágenas de coloração que variava do amarelo ao laranja. Por outro lado, durante a primeira semana pós-operatória a maioria das fibras no sítio anastomótico apresentavam-se finas, de colágeno imaturo com coloração que variava do verde ao amarelo e pouco integradas. Entretanto, as fibras gradualmente retornavam às suas colorações pré-operatórias até o 21º PO, acompanhando as modificações mecânicas da ferida, sugerindo que a qualidade das fibras de colágeno tem importância na integridade da anastomose intestinal durante sua cicatrização.

A quantificação de fibras maduras e imaturas de acordo com a sua coloração permite avaliação qualitativa do colágeno em estudos de cicatrização de anastomoses. No entanto, os parâmetros histológicos mesmo quando examinados por patologistas experientes podem apresentar variabilidade inter-observadores. A utilização de equipamentos que digitalizam imagens histológicas permite a quantificação de dados morfológicos com minimização de vieses. Com esse propósito, vários estudos informatizaram a análise histológica (LEMOS, 2002; COSTA et al., 2003; TRUBIAN, 2004).

Mediante esses recursos pode-se realizar estudo densitométrico que avalia a concentração e qualidade do colágeno, determinando sua maturação no tecido cicatricial. LEMOS (2002) verificou o efeito da desnutrição intra-uterina na cicatrização da parede abdominal em ratos lactentes e acrescentou às quantificações histológicas de colágeno o índice de maturação do colágeno – IMaC (QUADRO 1). Esse índice reflete a maturidade do colágeno presente em determinado campo histológico ao estabelecer a razão entre as porcentagens de colágeno tipo I e tipo III.

#### 2.1.5 Avaliação mecânica da cicatrização de anastomoses colônicas

As forças mecânicas envolvidas nas anastomoses refletem de forma objetiva a integridade da mesma (KORUDA; ROLANDELLI, 1990). Essas variáveis podem ser

determinadas de diferentes formas sem haver metodologia ideal. A avaliação da força tênsil da anastomose é freqüentemente utilizada em estudos experimentais com resultados que refletem com elevada precisão as propriedades biofísicas do tecido.

#### QUADRO 1 - ÍNDICE DE MATURAÇÃO DO COLÁGENO (IMaC)

$$\text{IMaC} = \frac{\% \text{ Colágeno Tipo I}}{\% \text{ Colágeno Tipo III}}$$

LEGENDA: IMaC = Índice de Maturação do colágeno; % = porcentagem  
 FONTE: LEMOS, 2002.

Em 1853, PAGET, citado por BALLANTYNE (1983), introduziu a medida de força tênsil de tecidos ao seccionar e reparar cirurgicamente tendões de coelhos. Mediante tecnologia rudimentar observou que o segmento reparado ganhava força ao longo do período pós-operatório. Os primeiros estudos de força tênsil em anastomoses intestinais foram realizados em 1899 por CHLUMSKY, citado por BALLANTYNE (1983), que abandonou essa metodologia em função da sua baixa sensibilidade.

HOWES, SOOY e HARVEY (1929) renovaram o interesse pelo método ao sistematizarem a técnica de medida da força tênsil através de dispositivo mecânico (tensiômetro) que apresentava resultados reprodutíveis. Esse instrumento foi descrito por FAST, NELSON e DENNIS (1947) e sofreu várias críticas e aprimoramentos durante as últimas décadas.

Através dos estudos de HOWES et al. (1929) conseguiu-se estabelecer relação entre o ganho de força e o evento de fibroplasia da cicatrização. Este período (fibroplasia) se inicia após o 4º dia pós-operatório de uma anastomose colônica em ratos (IKEUCHI; ONODERA; AUNG; KAN; KAWAMOTO; IAMAMURA; MAETANI, 1999), quando há menor influência dos materiais de sutura na força tênsil do tecido avaliado. Da mesma forma, evidenciou-se que o tipo de sutura tinha pouca interferência nos resultados da força tênsil da anastomose nesse momento da cicatrização (BALLANTYNE, 1983).

JONSSON et al. (1983) associaram um componente eletrônico fornecendo maior sensibilidade ao sistema e adotaram o método de força de tração, no qual o aparelho tracionava o corpo de prova (anastomose centrada num segmento de intestino excisado) a partir de uma das suas extremidades deixando a outra fixa até que ocorresse a ruptura da peça cirúrgica. BLOMQUIST, JIBORN e ZEDERFELDT (1984) estabeleceram a importância do aumento de força de forma contínua na avaliação dos resultados. NARESSE, MENDES, CURI, LUCCHIARI e KOBAYASI (1987) utilizaram o equipamento evidenciando que o mesmo apresentava erros mínimos de leitura, recomendando sua utilização em investigações experimentais de cicatrização intestinal e de outras feridas cirúrgicas. Nos últimos anos, os tensiômetros foram informatizados e a indústria disponibilizou vários modelos facilitando o emprego dessa metodologia.

VAN WINKLE (1969) revisou a literatura e reuniu evidências de que a resistência de um tecido cicatrizado, habitualmente, nunca é igual ou superior à sua forma íntegra. Esse autor definiu dois tipos de força para a avaliação mecânica de uma ferida: Tensão (quantificação da carga aplicada para rompê-la, considerando a dimensão do tecido analisado) e Força de Ruptura (força necessária para rompê-la).

IKEUCHI et al. (1999) desdobraram a variável força de ruptura em dois componentes: força mínima de tração (força necessária para romper parte da anastomose) e força máxima de tração (força necessária para realizar a disjunção total da anastomose). Nesse estudo, a força mínima de tração foi considerada medida padrão na avaliação biológica da cicatrização anastomótica, refletindo com maior acurácia as modificações mecânicas da mesma. Os autores testaram outro método de avaliação mecânica de anastomoses (Pressão de ruptura) e verificaram a imprecisão dessa variável na avaliação de anastomoses em fases precoces da cicatrização, sem encontrar correlação da mesma com a força de ruptura. Outros estudos também mostraram vantagens na avaliação da força tênsil utilizando a força de ruptura que, diferente da pressão de ruptura, correlaciona-se estreitamente com a deposição de colágeno a partir do 4º PO de anastomoses intestinais (JIBORN; AHONEN; ZENDERFELDT, 1978; BRASKEN, 1991).

As forças mecânicas envolvidas na anastomose podem ser, igualmente, avaliadas através de um tira de tecido correspondendo a uma amostra da alça intestinal contendo uma parte da anastomose no centro como NARESSE, LUCCHIARI e KOBAYASI (1988) e NARESSE, LUCCHIARI, ANGELELI, BURINI, RODRIGUES, CURI e KOBAYASI (1988), ou através da análise da anastomose na alça intestinal íntegra como descreveram LEITE, NARESSE, KOBAYASI, MINOSSI, BURINI, CURI e HOSSNE (1993) e NARESSE, LEITE, RODRIGUES, ANGELELI, MINOSSI e KOBAYASI (1993).

Os níveis de aderências podem influenciar a determinação de forças de uma anastomose. GARCIA-OLMO, LUCAS, PAVA e LOPEZ-FANDO (1994) verificaram a influência da formação de aderências sobre a força tênsil de anastomose colônica de ratos. Seus resultados demonstraram que o maior nível de aderências sobre a área anastomótica exercia influência direta sobre a força necessária para ruptura da anastomose.

HERRMANN et al. (1964) realizaram estudo da cicatrização de anastomose colônica de ratos. Dividiram uma amostra de 220 animais e mediram a força tênsil de anastomoses colônicas em diversos períodos de tempo compreendidos entre 3h e 1 ano após o procedimento cirúrgico. Evidenciaram que entre três e 14 dias havia o maior ganho de força tênsil da anastomose, constituindo-se no melhor período para estudar os parâmetros biofísicos da cicatrização do cólon anastomosado de ratos.

#### 2.1.6 Fatores que influenciam a cicatrização

Muitas falhas dos mecanismos de cicatrização do cólon são relacionadas aos aspectos técnicos-cirúrgicos, entretanto a otimização desses fatores não evita as deiscências, pois outras condições influenciam os processos de reparo. SAVASSI-ROCHA e LOPES (1994) relacionaram vários fatores que prejudicam a cicatrização de anastomoses e dos tecidos em geral (quadro 2).

Diversos estudos relacionam a desnutrição à prejuízos na cicatrização de anastomoses intestinais. A depleção nutricional está associada à debilidade da força

anastomótica e elevado número de deiscências pós-operatórias (DALY et al., 1972; IRVIN; GOLIGHER, 1973; IRVIN; HUNT, 1974b; THORNTON; BARBUL, 1997; MÄKELÄ et al., 2003).

## QUADRO 2 - FATORES QUE INFLUENCIAM A CICATRIZAÇÃO ANASTOMÓTICA

• Hipertensão intra-luminal à jusante	• Desnutrição
• Doença intestinal	• Idade maior que 60anos
• Tensão na linha de sutura	• Sepses
• Radioterapia prévia	• Hipotensão transoperatória
• Presença de drenos	• Obesidade
• Tumores fixos	• Hipovitaminoses
• Alta carga fecal	• Deficiência de zinco
• Má vascularização	• Coagulopatia
• Ressecções extra-peritoneais	• Duração prolongada da cirurgia
• Infecção	• Medicamentos
• Trauma	• Uremia
• Corpo estranho	• Neoplasia

FONTE: SAVASSI-ROCHA, 1994.

## 2.2. DESNUTRIÇÃO E CICATRIZAÇÃO

### 2.2.1 Considerações gerais

Eventos cirúrgicos sobre estados nutricionais desfavoráveis constituem ambiente adverso para a recuperação orgânica. O mecanismo adaptativo da desnutrição inclui diminuição da demanda metabólica compatível com o nível mais baixo de nutrientes disponíveis. Por outro lado, o trauma cirúrgico desencadeia resposta hipercatabólica na tentativa de preservar a cicatrização e as defesas imunes do organismo.

O conceito da Prioridade Biológica da Cicatrização (MOORE, 1959) sustenta a evidência de que a maioria das feridas cicatriza independentemente de alterações

nutricionais. Entretanto, ao longo do tempo, surgiram estudos que revelaram prejuízos da desnutrição, também, sobre os eventos de reparo tecidual. Esse fato motivou o desenvolvimento de pesquisas que tentassem otimizar a cicatrização mediante modulação dos efeitos deletérios da desnutrição.

Um dos primeiros estudos relacionando desnutrição e cicatrização foi realizado por CLARK em 1919. Esse autor realizou medidas seriadas da dimensão de feridas na superfície cutânea de cães e verificou a influência de dois tipos de dieta (protéica e lipídica) nos mecanismos de reparo. Constatou benefícios da dieta protéica com encurtamento da fase de latência (lag-period). No entanto, HARVEY e HOWES (1930) evidenciaram que, na verdade, a proteína estimulava a multiplicação e maturação de fibroblastos com rápido ganho de força tênsil na fase fibroblástica.

THOMPSON, RAVDIN e FRANK (1938) foram os primeiros a relacionar a desnutrição com deiscência de feridas operatórias. Esses pesquisadores realizaram laparotomia em cães que receberam dieta hipoprotéica e verificaram que em 72% deles ocorreu déficit de cicatrização da parede abdominal.

Em 1958, SISSON, LANG, SERKES e PAREIRA compararam a cicatrização de feridas em diversos estados de déficit nutricional. Os autores evidenciaram que o grau de desnutrição protéico-calórica correlacionava-se diretamente com a deficiência de força da ferida.

Embora os eventos cicatriciais sejam comuns a todas as feridas, a desnutrição afeta diferentemente os tecidos. HARKNESS, HARKNESS e JAMES (1958) e CABAK, DICKERSON e WIDDOWSON (1963) demonstraram que o colágeno da pele era mais preservado que o colágeno visceral durante a desnutrição. Essa evidência implicou na necessidade da avaliação individualizada dos prejuízos da desnutrição na cicatrização de diferentes órgãos.

### 2.2.2 Desnutrição na cicatrização de anastomoses colônicas

Estudos experimentais confirmam que a desnutrição afeta a cicatrização do cólon. Embora sua influência possa ser discreta, pode explicar parte das complicações advindas das falhas de cicatrização nas anastomoses colônicas.

DALY et al. (1972) realizou anastomose em segmento descendente do cólon de 124 ratos, os quais foram divididos em oito grupos de acordo com o tempo de nutrição pré-operatória (1, 2, 4 e 6 semanas) e o tipo de dieta fornecida (hipoprotéica e normal). Após a cirurgia os ratos continuaram a receber a mesma dieta até o dia do sacrifício (7º PO). A perda ponderal entre os ratos desnutridos (dieta hipoprotéica) variou de 2% a 26%, enquanto o grupo controle ganhou em média 12% de peso. Em todos os grupos desnutridos houve diminuição significativa da pressão de ruptura anastomótica comparada aos respectivos controles, enfatizando o prejuízo da desnutrição sobre as propriedades mecânicas da anastomose colônica.

IRVIN e HUNT (1974b) determinaram a força tênsil e a deposição de colágeno em 260 ratos submetidos à anastomose colônica. Os animais foram divididos em grupos controle e desnutrido, sendo este último subdividido de acordo com o tempo de desnutrição (3, 5 e 7 semanas) e a data do sacrifício (3º ou 7º PO). Apenas animais desnutridos durante sete semanas e sacrificados no 7º PO tiveram diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) das medidas de força e de colágeno da anastomose em relação aos seus controles. As medidas de pressão de ruptura não tiveram correlação com as alterações do colágeno na avaliação de graus menores de desnutrição, sugerindo que essa variável mecânica não seria um método sensível nesses casos. Os autores concluem sugerindo que intervenções nutricionais na tentativa de reverter o quadro de desnutrição poderiam melhorar esses resultados.

### 2.2.3. Terapia nutricional na desnutrição associada à anastomose colônica

Ao mesmo tempo em que a desnutrição ganhava importância nos resultados adversos de cirurgias com anastomoses de cólon, surgiam alternativas para tentar

compensar os efeitos deletérios dos déficits nutricionais. Muitos estudos começaram a pesquisar os efeitos de intervenções nutricionais como forma de otimizar a cicatrização intestinal e diminuir a morbimortalidade associada.

STEIGER, ALLEN, DALY, VARS e DUDRICK (1971) utilizaram dieta hipoprotéica para desnutrir 41 ratos durante seis semanas. Os animais foram divididos em três grupos conforme o tipo de dieta parenteral administrada durante os primeiros sete dias pós-operatórios (dextrose 30% + aminoácidos 5%; dextrose 35% e dextrose 5%). As médias de pressão de ruptura das anastomoses em cada grupo foram 203, 142 e 149 mm Hg respectivamente. Esse trabalho demonstrou que pequenos períodos de nutrição parenteral pós-operatória melhoraram a força tênsil de anastomoses colônicas de ratos desnutridos.

IRVIN (1978) examinou os efeitos da nutrição perioperatória sobre a cicatrização de anastomose colônica em ratos desnutridos. Desnutriu 70 ratos em diferentes períodos (1, 3, 5, 7 e 8 semanas) com dieta desproteinizada e dez dos ratos desnutridos por 7 semanas receberam suplemento protéico por 7 dias antes e depois da operação. Os grupos foram comparados com 20 animais eutróficos que receberam ração durante todo estudo (controles). Os testes mecânicos sobre a anastomose colônica de ratos desnutridos durante 8 semanas e no grupo realimentado não tiveram diferenças significativas, porém a tensão de ruptura nesses grupos foi menor que no grupo controle ( $p < 0,05$ ). Não houve diferenças significativas do conteúdo de colágeno anastomótico entre os grupos desnutrido e realimentado. O autor concluiu que a realimentação não teve efeito sobre as medidas de força tênsil e de colágeno tecidual na cicatrização de anastomoses colônicas.

WARD, DANZI, LEWIN, RENNIE e CLARK (1982) simularam o nível de desnutrição comumente visto em pacientes submetidos à anastomose coloretal (12,5% peso corporal) e avaliaram a influência dessa depleção nas propriedades mecânicas de anastomoses em cólon esquerdo de ratos. Dividiram 42 ratos em três grupos: Grupo A (18 ratos que receberam ração normal durante todo estudo); Grupo B (12 ratos que receberam dieta hipoprotéica antes da cirurgia e ração normal no pós-operatório) e Grupo C (12 ratos que receberam dieta hipoprotéica durante todo estudo). Os animais

foram alimentados com as respectivas dietas durante sete dias antes da operação e sacrificados no 7º PO. Os resultados demonstraram que os grupos A e B tiveram médias de pressão de ruptura similares, que foram significativamente maiores que a média do grupo C ( $p < 0,01$  e  $p < 0,005$  respectivamente). Os autores concluíram que a desnutrição, mesmo em graus menores, afetou as propriedades mecânicas da anastomose, sendo que o suporte nutricional adequado no pós-operatório conseguiu prevenir seus efeitos adversos. Nesse estudo sugeriram-se duas vias pelas quais a desnutrição poderia influenciar a cicatrização colônica: 1) a depleção protéica poderia ter efeitos diretos sobre a avaliabilidade de aminoácidos para o processo de reparo; 2) a desnutrição poderia prejudicar a imunocompetência predispondo à infecção, a qual está envolvida na fisiopatologia das fistulas anastomóticas.

GONÇALVES (2005) avaliou a cicatrização colônica de ratos desnutridos comparando os efeitos da nutrição pré-operatória quanto à deposição de colágeno maduro e força de ruptura da anastomose. Utilizou 80 ratos Wistar mantidos individualmente em gaiolas metabólicas e divididos em quatro grupos de acordo com o tipo de dieta que receberam: grupo controle 1 (ração *ad libitum* durante 21 dias), grupo desnutrido (metade da quantidade diária de ração do grupo controle 1 - Pair Feeding - durante 21 dias), grupo controle 2 (ração *ad libitum* durante 28 dias) e grupo desnutrido e realimentado (metade da quantidade diária de ração do grupo controle 2 - Pair Feeding - durante 21 dias e realimentado com ração *ad libitum* durante 7 dias). No 21º dia (controle 1 e desnutrido) ou 28º dia do estudo (controle 2 e desnutrido + realimentado) os ratos foram anestesiados e submetidos a duas transecções colônicas (uma a 5 cm da válvula ileocecal e outra 6 cm distais à primeira). Após as colotomias, a reconstrução intestinal foi realizada com duas anastomoses término-terminais em plano único de sutura total interrompida com 8 pontos de nylon 6-0 em cada. No período pós-operatório os ratos tiveram livre acesso à água e ração, sendo sacrificados no 5º PO, quando as duas anastomoses foram ressecadas e submetidas à teste de tração e estudo histológico de densitometria do colágeno, respectivamente. Os resultados demonstraram que a força de ruptura total da anastomose foi significativamente mais baixa no grupo desnutrido comparado ao grupo controle 1 ( $0,05 \pm 0,00$  vs.  $0,10 \pm$

0,01;  $p = 0,039$ ) e houve menor área de colágeno tipo I na anastomose do grupo desnutrido que do grupo controle 1 ( $3,83 \pm 0,35$  vs.  $6,13 \pm 0,39$ ;  $p = 0,0001$ ). Não houve diferença estatística da força de ruptura entre o grupo desnutrido realimentado e o grupo desnutrido ( $0,09 \pm 0,01$  vs.  $0,05 \pm 0,00$ ;  $p = 0,05$ ) e entre o grupo controle 2 e o grupo desnutrido realimentado ( $0,10 \pm 0,01$  vs.  $0,09 \pm 0,01$ ;  $p = 0,56$ ). A deposição de colágeno maduro também foi menor no grupo desnutrido e realimentado que no controle 2 ( $4,90 \pm 0,36$  vs.  $6,13 \pm 0,39$ ;  $p = 0,010$ ). Não foi observada correlação entre as variáveis de força e a porcentagem de colágeno entre os grupos. A autora demonstrou que a desnutrição em ratos Wistar diminui a força máxima de tração, a resistência à ruptura total de anastomoses colônicas e a área percentual ocupada pelo colágeno maduro no 5º dia pós-operatório, evidenciando que esses efeitos são parcialmente revertidos com a utilização de nutrição pré-operatória.

## 2.3. GLUTAMINA

### 2.3.1. Considerações gerais

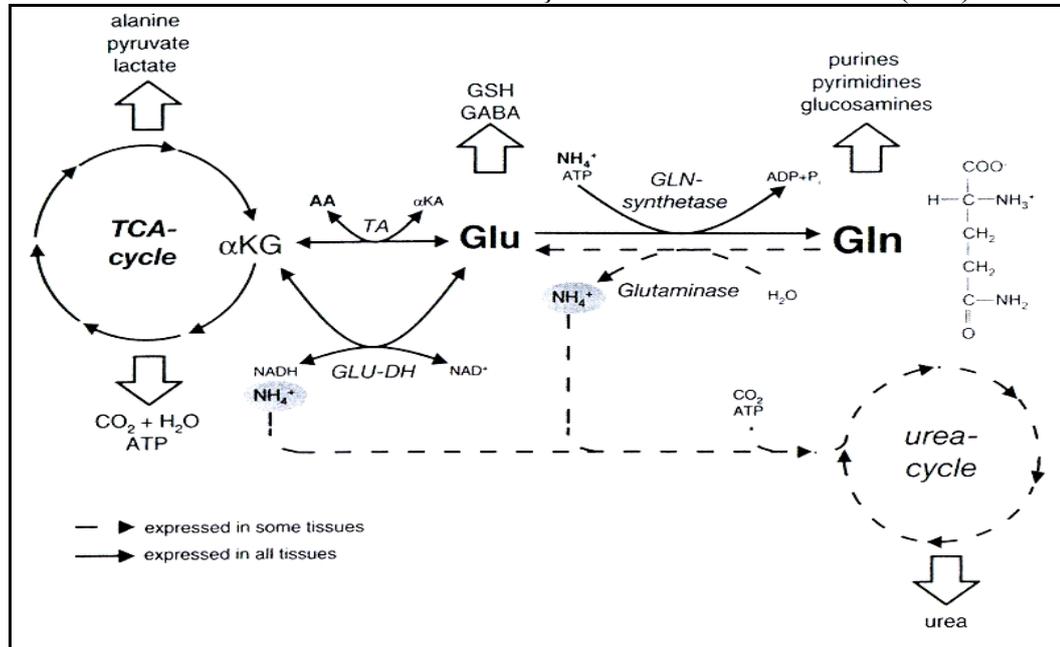
A Glutamina (Gln) é um aminoácido envolvido no metabolismo do nitrogênio, dos carboidratos, dos ácidos nucleicos e dos fosfolipídios. Sua produção e degradação são mediadas por duas enzimas: Gln-sintetase e Glutaminase, respectivamente (FIGURA 5).

A Gln é absorvida no intestino delgado e concentra-se, principalmente, na musculatura esquelética. Dos órgãos que consomem Gln o intestino é o principal, direcionando sua utilização na produção de energia (FIGURA 6).

Diversos estudos comprovam que o aminoácido é importante substrato oxidativo em enterócitos e colonócitos (ARDAWI; NEWSHOLME, 1985; SOUBA et al., 1985; SOUBA, 1991; WINDMUELLER, 1982). No entanto, essas células apresentam dependência importante de fontes exógenas de Gln para o seu metabolismo. Isso resulta da relativa ausência de Gln-sintetase no TGI, associada à

presença de Glutaminase com atividade intensa no intestino delgado e intermediária no cólon (ELIA; LUNN, 1997).

FIGURA 5 - SÍNTESE E DEGRADAÇÃO DA GLUTAMINA (Gln)



LEGENDA: alanine = alanina; pyruvate = piruvato; lactate = lactato; TCA-cycle = ciclo do ácido tricarboxílico;  $\alpha$ KG = alfacetoglutarato; TA = transaminases; AA = aminoácido; Glu = glutamato; GSH = glutationa; GABA = gama-aminobutirato; GLN-synthetase = Gln-sintetase; purines = purinas; pyrimidines = pirimidinas; glucosamines = glicosaminas; Gln = Glutamina; GLU-DH = glutamato desidrogenase; ATP = adenosina tri-fosfato; ADP = adenosina di-fosfato; urea-cycle = ciclo da uréia; urea = uréia; expressed in some tissues = expressado em alguns tecidos; expressed in all tissues = expressado em todos os tecidos.

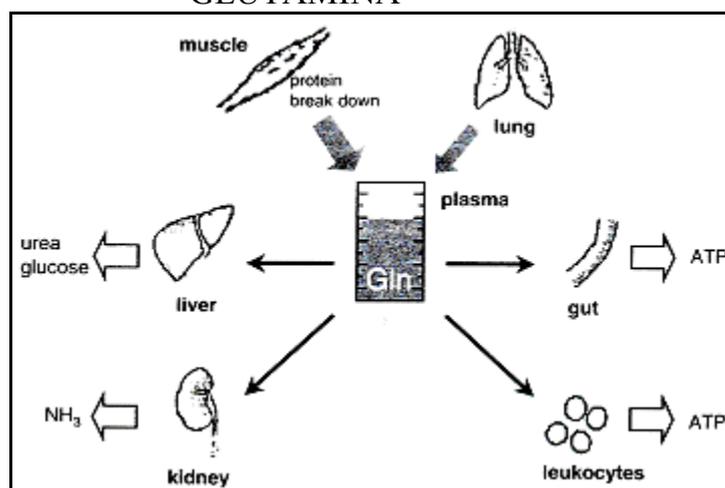
FONTE: Oehler; Roth, 2004.

A Gln mantém relação estreita com os eventos cicatriciais. Participa como substrato da gliconeogênese fornecendo energia para as células inflamatórias e estimulando a resposta imune precoce. É essencial na proliferação linfocítica e importante precursora da síntese de nucleotídeos em fibroblastos e macrófagos (WILLIAMS; BARBUL, 2003). Além disso, alguns dos seus metabólitos finais (hidroxiprolina, gama-aminobutirato e glutationa) fazem parte da estruturação da molécula do colágeno (HALL; HELL; McCAULEY, 1996).

Estados de hipercatabolismo e desnutrição levam à depleção dos depósitos de Gln. Nessas condições, a produção de Gln não alcança as necessidades da demanda, há diminuição dos níveis plasmáticos do aminoácido e o organismo recupera Gln a partir

do consumo protéico da musculatura esquelética. Esta característica levou alguns pesquisadores a classificarem esse aminoácido como condicionalmente essencial (LACEY; WILMORE, 1990).

FIGURA 6 - SÍNTESE E CONSUMO DA GLUTAMINA



LEGENDA: muscle = músculo; protein break down = quebra de proteína; lung = pulmão; gut = intestino; leukocytes = leucócitos; kidney = rim; liver = fígado; urea = uréia; glucose = glicose.

FONTE: Oehler, Roth, 2004.

Entretanto, a relação direta entre a concentração de Gln muscular livre e a taxa de síntese protéica sugeriu que a manutenção do conteúdo de Gln intracelular poderia promover conservação da proteína muscular durante o estresse catabólico. KAPADIA, COLPOYS, JIANG, JOHNSON, SMITH e WILMORE (1985) demonstraram, então, que a administração de L-Gln tinha efeitos positivos no balanço nitrogenado e no fluxo de aminoácidos da musculatura esquelética, promovendo retenção de nitrogênio. Outras evidências também confirmaram os benefícios da suplementação de Gln em situações de hipercatabolismo (HAMMARGVIST; WERNERMAN; ALI; DECKEN; VINNARS, 1989; FURST; POGAN; STEHLE, 1997; SCHLOERB, 2001) e de desnutrição (SOUBA et al., 1990; FURST, 2001).

Apesar da eficácia da suplementação de Gln nas alterações produzidas pelo hipercatabolismo e pela desnutrição e da sua influência sobre os eventos cicatriciais, não há comprovação dos seus efeitos sobre os resultados da cicatrização (WILLIAMS;

BARBUL, 2003). FURST (2001), no entanto, considerou que o adequado fornecimento de Gln como suplemento nutricional seria uma importante medida de suporte da cicatrização e de redução da morbimortalidade em situações adversas.

### 2.3.2 Utilização da Gln como suplemento nutricional

Não há consenso na dosagem ou na forma de administração de Gln para obtenção dos seus benefícios. DUGGAN, GANNON e WALKER (2002) revisaram estudos envolvendo a suplementação dietética de Gln evidenciando multiplicidade de doses e vias de administração e diversos problemas metodológicos que dificultaram a comparação entre os mesmos, estabelecendo a necessidade de mais pesquisas para sistematizar sua utilização. Alguns estudos experimentais em ratos utilizam Gln em doses de aproximadamente 1,5 g/Kg/dia e controle isonitrogenado e isocalórico com Glicina (Gly) (COSTA et al., 2003; JENSEN; NWOKEDI; BAKER, 1992; FAHR; KORNBLUTH; BLOSSOM; SCHAEFFER; KLIMBERG, 1994).

McCAULEY, PLATELL, HALL e McCULLOCH (1991) avaliaram o efeito da glutamina na cicatrização de anastomoses colônicas de ratos desnutridos. Os animais receberam dieta com ágar 3,5% durante seis dias que determinou perda ponderal média de 10%. Após a desnutrição foi realizado inserção de cateter jugular para nutrição parenteral e colotomia seguida de anastomose de cólon ascendente em plano único com pontos separados, término-terminal, com fio de nylon 9.0. Dividiram os ratos em três grupos de acordo com o tipo de nutrição parenteral (NP) recebida durante 6 dias pós-operatórios: ração, NP + Gly e NP + Gln 1,2%. Após esse período os ratos foram sacrificados, colheu-se sangue da veia cava inferior para dosagem de nitrogênio, ressecou-se segmento de 3 cm do cólon ascendente que continha a anastomose em posição central para teste de pressão de ruptura e pesou-se o restante da mucosa colônica que foi encaminhada para dosagens do seu conteúdo protéico. Os resultados demonstraram: conteúdo de nitrogênio plasmático semelhante entre os grupos, peso e concentração protéica da mucosa colônica significativamente maior no grupo que recebeu ração e pressão de ruptura sem diferença significativa entre os

grupos, sendo que todas anastomoses romperam fora da linha anastomótica. Este estudo não evidenciou nenhuma melhora da cicatrização do cólon de ratos desnutridos com a utilização de NP enriquecida com Glutamina.

WEIR, ANDERSON, McCAIGUE, HALLIDAY e ROWLANDS (1993) estudaram o efeito da Gln suplementar na recuperação da mucosa colônica de ratos com colite induzida experimentalmente. Dividiram os animais em quatro grupos: I) colite e alimentação suplementada com Gln 5%; II) colite e alimentação suplementada com Gly 5%; III) colite e ração normal e IV) ração normal. No sacrifício dos animais o cólon foi ressecado e encaminhado para estudo histológico. O grupo que foi suplementado com Gln teve o melhor padrão morfológico entre os grupos com colite, sugerindo melhor desempenho dos mecanismos de reparo.

MANDIR e GOODLAD (1999) estudaram os efeitos da glutamina na proliferação de células intestinais de ratos. Utilizaram seis grupos de animais divididos conforme a dieta administrada: 1) NP padrão; 2) NP + alanina 2%; 3) NP + Gln 0,5 %; 4) NP + Gln 1,5%; 5) NP + Gln 2% e 6) ração VO. Os animais foram sacrificados no 6º dia após o início do estudo e amostras de cólon foram excisadas, pesadas e encaminhadas para análise histológica. O peso das amostras de cólon foi significativamente maior no grupo de animais que recebeu dieta oral ( $p < 0,001$ ). Houve maior atividade mitótica em todos segmentos do cólon nos grupos que receberam Gln, não havendo relação entre Gln e sua dose utilizada e os diferentes segmentos avaliados. Este estudo demonstrou efeitos modestos da Gln na proliferação celular do cólon.

PAULO (2002) avaliou os efeitos da suplementação oral de L-Gln nas alterações tróficas do cólon induzidas pela colostomia. Dividiu 26 ratos em três grupos (controle, colostomia e colostomia + L-Gln) e observou que no grupo colostomizado houve diminuição significativa do volume da camada mucosa e da altura das criptas intestinais comparado ao grupo controle, enquanto que a L-Gln utilizada na dose de 1g/Kg/dia durante quatro semanas foi eficaz em prevenir essas alterações epiteliais.

EL-MALT, CELEN, BOTERBERG, CLAEYS, HEMPTINNE, NEVE e PATTYN (2003) testaram os efeitos da suplementação de glutamina na cicatrização de

anastomoses colônicas de ratos submetidos à radioterapia pré-operatória (RTX) e NPT. O cólon dos animais irradiados com 25 cGy foi anastomosado com o ceco 5 dias após a RTX. Os ratos foram divididos em três grupos conforme o tipo de nutrição pós-operatória: via oral, NP e NP enriquecida com glutamina 2%. Os resultados demonstraram: ganho significativo de peso no grupo alimentado VO ( $p < 0,01$ ); menor pressão e tensão de ruptura da anastomose no grupo que recebeu NP ( $p < 0,01$ ), sendo que essas variáveis não alcançaram diferença significativa entre os outros dois grupos. Esse estudo concluiu que a suplementação de Gln foi eficaz em neutralizar os efeitos negativos da NP e da irradiação na cicatrização de anastomoses colônicas.

COSTA et al. (2003) avaliaram a influência da Gln oral na cicatrização de anastomoses colônicas em ratos. Distribuíram individualmente 48 ratos Wistar nutridos em gaiolas metabólicas com livre acesso à ração e água. Os animais foram divididos em dois grupos de acordo com o tipo de nutrição perioperatória: L-gln 10% (grupo Gln) ou Gly 10% (grupo Gly) em soluções isonitrogenadas e isovolumétricas de 1,5g/Kg/dia fornecidas durante sete dias pré-operatórios até 2 a 7 dias pós-operatórios conforme os subgrupos sacrificados no 3º PO (Gln 3 e Gly 3) ou 8º PO (Gln 8 e Gly 8) respectivamente. Realizaram duas colotomias (a 6 cm distais da válvula ileocecal e 5 cm distais da primeira) que foram reconstruídas com anastomoses término-terminais em plano único total com 8 pontos interrompidos de fio monofilamentar de nylon 6.0. Os autores analisaram o índice de aderências intra-abdominais, as alterações de peso e de consumo nutricional dos animais, a força tênsil da anastomose proximal e as alterações histológicas da anastomose distal (processo inflamatório e deposição de colágeno). Não houve diferenças significativas na quantidade de ração consumida, na variação de peso dos ratos nos diferentes períodos do estudo (pré e pós-operatório), na mortalidade e no índice de aderências entre os grupos. A força tênsil anastomótica foi analisada mediante as forças tênsil máxima (MTS) e de ruptura total (TRS), sendo que a única diferença significativa favoreceu o grupo Gln que apresentou os maiores valores de TRS que o grupo Gly ( $P = 0,04$ ). Na avaliação de parâmetros histológicos inflamatórios foi identificada diferença significativa, apenas na quantificação de monócitos que foi mais alta no grupo Gly ( $p$

= 0,04). A densitometria de colágeno revelou maior percentual de área ocupada pelo colágeno maduro (tipo I) nos subgrupos suplementados com Gln, enquanto que o colágeno imaturo (tipo III) predominou em ratos suplementados com Gly. Este estudo concluiu que a suplementação peri-operatória de Gln beneficiou a cicatrização de anastomoses colônicas de ratos ao aumentar sua resistência à ruptura total e a área percentual ocupada pelo colágeno maduro.

CIHAN, ORGUZ, ANCUN, UÇAN, ARMUTCU, GÜREL e ULUKENT (2004) testaram diferentes dietas na cicatrização de anastomoses colônicas de camundongos em estado nutricional normal. Os autores distribuíram 50 animais Balb-C em cinco grupos diferentes de acordo com a dieta enteral fornecida durante sete dias pós-operatórios: ração normal, Ensure®, Alitraq®, Impact® e Benefiber® Resource®. Utilizaram a determinação da pressão de ruptura da anastomose e o nível de hidroxiprolina para avaliação da cicatrização intestinal, sem identificação de diferenças significativas entre os cinco grupos, não demonstrando vantagens na cicatrização anastomótica colônica de animais nutridos que receberam dieta que continha suplemento de Gln.

Até o momento, nenhum estudo verificou o resultado da interação entre os efeitos positivos da nutrição oral perioperatória com Gln e os prejuízos da desnutrição na cicatrização de anastomoses colônicas em ratos.

### **3 MATERIAL E MÉTODO**

---

### 3. MATERIAL E MÉTODO

Esse estudo faz parte da linha de pesquisa em cicatrização de órgãos e tecidos do Programa de pós-graduação da UFPR. Realizado de acordo com as normas de pesquisa animal dispostas na legislação nacional, obedeceu aos Princípios Éticos na Experimentação Animal postulados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi previamente aprovado no comitê de ética em pesquisa animal da UFPR.

As descrições anatômicas deste trabalho basearam-se na *Nomina Anatomica Veterinaria* (1975) e sua normatização seguiu as recomendações do Sistema de Bibliotecas (SIBI) da Universidade Federal do Paraná (UFPR) estabelecidas nas Normas para Apresentação de Documentos Científicos (2001).

#### 3.1 MATERIAL

##### 3.1.1 Animais

Foram utilizados 46 ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), machos, com peso médio de  $242,8 \pm 21,95$  g, oriundos do biotério de criação da UFPR, Curitiba/PR.

##### 3.1.2 Ração

Os ratos receberam ração peletizada Nuvilab-CR1<sup>®</sup> (Nuvital-Curitiba/PR) com composição básica demonstrada no QUADRO 3.

##### 3.1.3 Aminoácidos

Os aminoácidos utilizados foram a L-Glutamina (L-GLN) e a Glicina (GLY) (Ajinomoto Interamericana Indústria e Comércio Ltda, São Paulo-SP) na forma cristalizada.

QUADRO 3 - COMPOSIÇÃO DA RAÇÃO UTILIZADA PARA ALIMENTAR OS ANIMAIS

COMPOSIÇÃO BÁSICA DO PRODUTO	
CARBONATO DE CÁLCIO, FARELO DE MILHO, FARELO DE SOJA, FARELO DE TRIGO, FOSFATO BICÁLCICO, CLORETO DE SÓDIO, PREMIX MINERAL VITAMÍNICO, AMINOÁCIDOS (DL-METIONINA E LISINA)	
UMIDADE	12,5 %
PROTEÍNA BRUTA	22 %
CÁLCIO	1,4 %
FÓSFORO	0,8 %
EXTRATO ETÉREO	4 %
MATERIAL MINERAL	10 %
MATÉRIA FIBROSA	8 %
VITAMINAS: A, D, E, K, B1, B2, B6, B12, NIACINA, ÁCIDO PANTOTÊNICO, ÁCIDO FÓLICO, BIOTINA e COLINA	
MICROELEMENTOS: FERRO, ZINCO, COBRE, IODO, MANGANÊS, SELÊNIO e COBALTO	

## 3.2 MÉTODO

### 3.2.1 Considerações ambientais

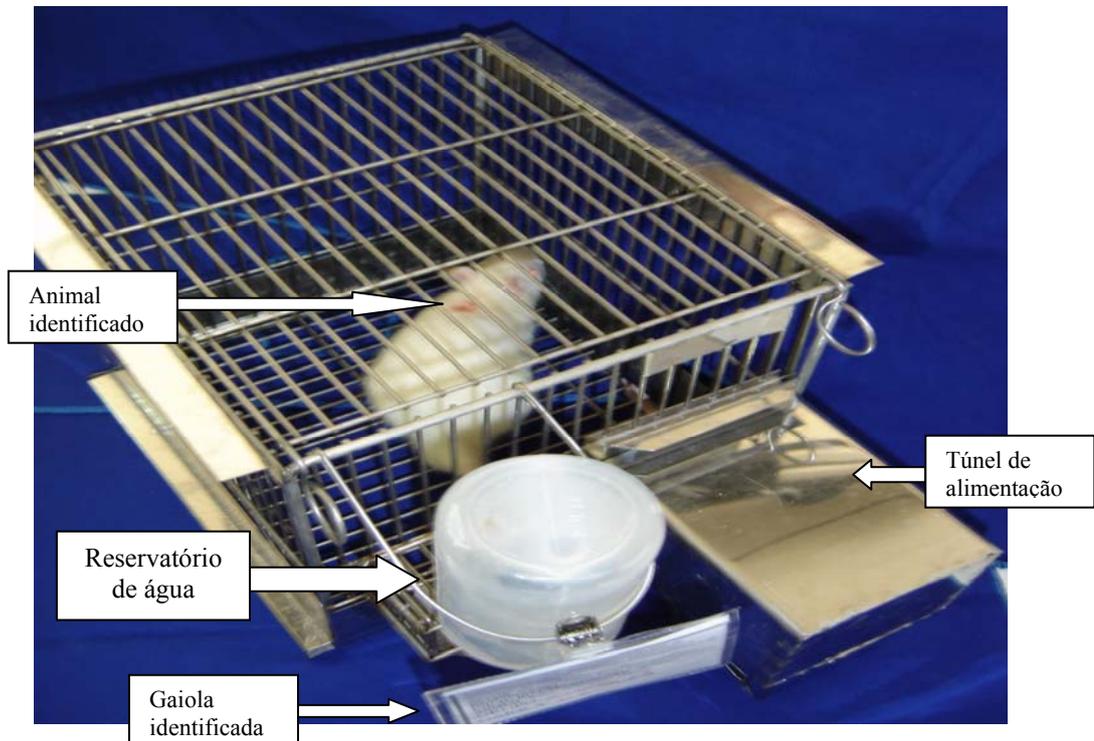
O experimento foi realizado no Laboratório de Cirurgia Experimental do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da UFPR. As condições ambientais foram controladas eletronicamente (Cronomat<sup>®</sup>, Mallory do Brasil, São Paulo-SP), sendo mantido temperatura de  $22 \pm 1$  °C e ciclo claro-escuro de 12 horas. As gaiolas foram acomodadas sobre estantes horizontais em grupos de 12 como mostra a FIGURA 7.

Os animais foram identificados e mantidos, individualmente, em gaiolas metabólicas de aço inoxidável (FIGURA 8). Durante período de aclimação de três dias antes do início do experimento (BOELEN, 2003) os ratos receberam água potável e ração *ad libitum*.

FIGURA 7 – ESTANTES HORIZONTAIS COM GAIOLAS



FIGURA 8- GAIOLA METABÓLICA



### 3.2.2 Grupos

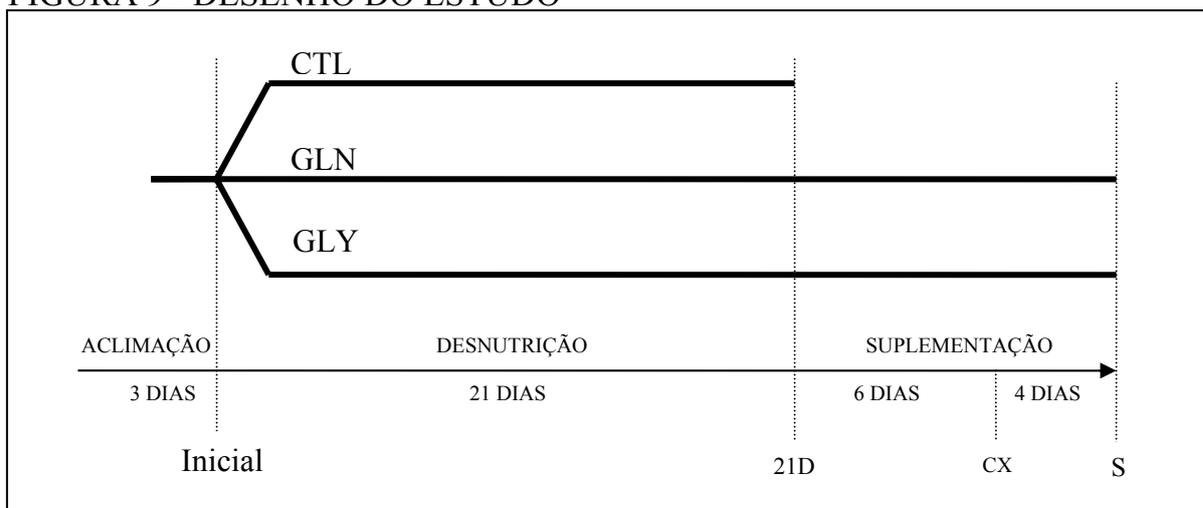
Após o período de aclimação os animais foram pesados e divididos de forma randomizada em três grupos de acordo com o tipo de dieta que receberam durante o experimento: grupo controle de desnutrição (CTL) com 14 ratos e grupos Glutamina (GLN) e Glicina (GLY) com 16 ratos cada.

### 3.2.3 Desenho do estudo

O método de desnutrição dos animais (*Pair Feeding*) envolveu o grupo CTL que recebeu água e ração *ad libitum* após o período de aclimação, com controle diário do seu consumo de ração. Para os ratos dos dois grupos em estudo (GLN e GLY) foi fornecida a metade da média do consumo diário de ração do grupo CTL durante os 21 dias da fase de desnutrição, com o fornecimento de água mantido sem restrições durante esse período. Após a fase de desnutrição, o grupo controle foi descartado, e iniciou-se a fase de suplementação, subdividida em fases pré e pós-operatórias, com nutrição normal dos grupos GLN e GLY (água e ração *ad libitum*) associada à administração diária de aminoácidos via gavagem: L-Gln 10% na dose de 1,5 g/Kg/dia (GLN) ou Gly em dose isonitrogenada e isovolumétrica, respectivamente (GLY). Os ratos foram operados após seis dias de suplementação pré-operatória com aminoácidos, sendo mantido a mesma dieta durante a fase pós-operatória. O sacrifício dos animais foi realizado no quinto dia pós-operatório (FIGURA 9).

Adotou-se terminologia padronizada para designar os diferentes períodos do estudo e facilitar a interpretação dos resultados: Fases de Desnutrição (D) pré (PRÉ-OP) e pós-operatório (PÓS-OP); dia final da desnutrição (21D), dia final da suplementação pré-operatória (6S), dia da operação (CX) e dia do sacrifício (S).

FIGURA 9 - DESENHO DO ESTUDO



LEGENDA: CTL = grupo controle; GLN = grupo Glutamina; GLY = grupo Glicina; 21D = dia final da desnutrição; CX = dia da cirurgia; S = dia do sacrifício

### 3.2.4 Diluição dos aminoácidos

Tanto a L-Gln quanto a Gly foram diluídas diariamente em água destilada em dose calculada para cada rato, de modo a fornecer 1,5g/Kg/dia, administrada imediatamente após o preparo.

### 3.2.5 Gavagem

A suplementação com L-Gln e Gly foi realizada através sondagem do *cavum gaster* (cavidade gástrica) dos animais sem sedação. A sonda metálica, com dimensões de 11,5 cm de comprimento e 1,4 mm de diâmetro, foi confeccionada especificamente para o procedimento (FIGURA 10). A solução de aminoácidos foi injetada com seringa pela sonda metálica em dose única e no mesmo horário por seis dias antes e quatro dias após a cirurgia sem ultrapassar os limites seguros de volume (LAMBERT, 1965).

FIGURA 10 - PROCEDIMENTO DE GAVAGEM



NOTA: cânula metálica com marcação da transição tóraco-abdominal no rato (em vermelho) limite da inserção da cânula e procedimento de gavagem.

### 3.2.6 Controle de peso e ingesta

O controle de peso dos animais foi realizado no início do experimento (após a aclimação), semanalmente na fase de desnutrição e diariamente nas fases pré e pós-operatórias. Utilizou-se balança eletrônica (AM 5500<sup>®</sup> Marte, São Paulo, SP) para a aferição e a unidade utilizada foi o grama (g). As medidas serviram para avaliação nutricional e orientação da dose de aminoácido administrada. Da mesma forma, a ração foi pesada todos os dias, tanto para o cálculo da restrição dietética na fase de desnutrição, como para controle da ingesta de ração durante as fases pré e pós-operatórias. No cálculo da quantidade de ração ingerida observou-se a diferença diária entre o peso de ração ofertada no dia anterior e o peso de ração restante no dia seguinte.

### 3.2.7 Morbimortalidade

Durante o estudo, todos os eventos de morbimortalidade foram documentados e todos os ratos que morreram antes do término da pesquisa foram submetidos a laparo-toracotomia em busca da *causa mortis*. Esses animais foram excluídos sem participação na análise estatística dos parâmetros morfológicos e tensiométricos, porém os resultados foram computados e analisados comparativamente.

### 3.2.8 Anestesia

O procedimento anestésico foi realizado com isoflurane (Isothane<sup>®</sup> Baxter, Guayama, Porto Rico) através de sistema de vaporização calibrada. Com o rato contido, induziu-se a anestesia infundindo mistura de isoflurane e oxigênio a 2% até atingir plano anestésico. Os gases chegaram ao rato através do duto de saída do vaporizador, o qual foi adaptado à boca e narinas do animal com máscara emborrachada. No momento da perda de reflexos, o fluxo dos gases era reduzido e mantido em concentração de 1,2%, sendo as alterações no plano anestésico manejadas com adequação da calibração do vaporizador.

### 3.2.9 Ato cirúrgico

A equipe cirúrgica foi composta de um único cirurgião (autor) e um auxiliar que deu suporte para as reavaliações e ajustes anestésicos. O animal anestesiado foi fixado à mesa cirúrgica em decúbito dorsal, com elásticos de látex, colocando os quatro membros em extensão para expor o campo operatório. Em seguida, realizou-se antisepsia e tricotomia da *regio abdominis media* (região abdominal média). Uma laparotomia mediana de cerca de 4 cm de comprimento dava acesso ao *cavum abdominis* (cavidade abdominal) como mostra a FIGURA 11.

Após realização do inventário da cavidade foi realizado duas secções completas do cólon com preservação dos rami colici (vasos cólicos), a primeira na *flexura coli dextra* (flexura cólica menor) 5 cm distais ao *ostium ileale* (válvula íleo-cecal) e a segunda 3 cm acima da reflexão peritoneal do reto, no *cólon descendens* (cólon distal).

A reconstrução colônica foi realizada com anastomose término-terminal suturada em plano único total com 8 pontos interrompidos de fio monofilamentar de nylon 6.0 (mononylon<sup>®</sup> 6.0, Ethicon, São José dos Campos, SP) (FIGURA 12).

FIGURA 11 - PROCEDIMENTO CIRÚRGICO



NOTA: rato anestesiado fixado à mesa cirúrgica com laparotomia mediana, instrumental cirúrgico e anestésico evidenciados.

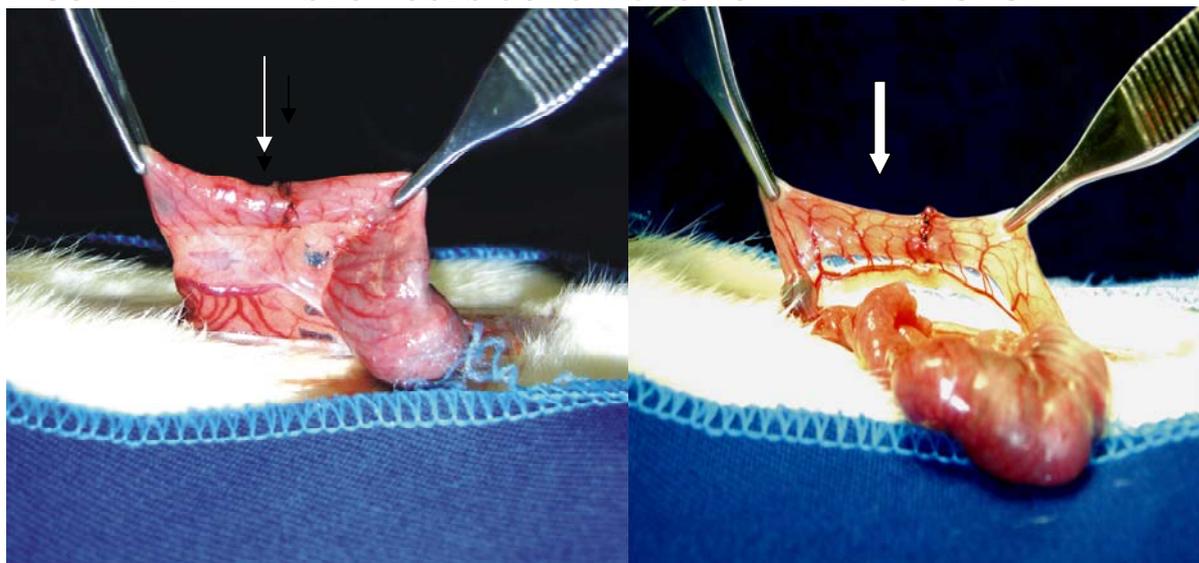
Durante todo o procedimento cirúrgico as alças intestinais foram irrigadas, intermitentemente, com soro fisiológico a 0,9% removendo detritos e sangue da cavidade e hidratando as alças.

A síntese cirúrgica da parede abdominal foi realizada com fio de nylon 4-0 (Shalon, São Luis de Montes Belo, GO) em dois planos de sutura contínua (músculo-aponeurótico e cutâneo).

### 3.2.10 Pós-operatório

O fluxo de isoflurane foi suspenso logo após a síntese da parede abdominal, e o rato passou a inalar oxigênio a 100% até o despertar. A recuperação anestésica completa ocorreu dentro de sua própria gaiola, em ar ambiente. O fornecimento de ração foi normalizado no primeiro dia pós-operatório e passou-se, então, a monitorizar as evacuações dos animais para descartar obstrução intestinal.

FIGURA 12 - ANASTOMOSES COLÔNICAS NO DIA DA CIRURGIA



NOTA: anastomose proximal (seta fina) e distal (seta grossa)

### 3.2.11 Sacrifício

No quinto PO os animais foram sacrificados com dose letal de éter etílico em sistema fechado de campânula de vidro. Imediatamente após constatação do óbito, cada rato foi submetido a laparotomia mediana com inspeção cuidadosa da cavidade e classificação das aderências intra-abdominais segundo método estabelecido por KNIGHTLY, AGOSTINO e CLIFFTON em 1962 (QUADRO 4).

QUADRO 4 - CLASSIFICAÇÃO DE ADERÊNCIAS

GRAU	DESCRIÇÃO
0	AUSÊNCIA DE ADERÊNCIAS
1	ADERÊNCIA ÚNICA, FINA E FACILMENTE SEPARÁVEL
2	ADERÊNCIAS EM PEQUENA EXTENSÃO, FRACAS E QUE SE ROMPEM COM PEQUENA TRAÇÃO
3	ADERÊNCIAS VISCERAIS EXTENSAS QUE SE ESTENDEM ATÉ A PAREDE
4	ADERÊNCIAS NUMEROSAS, EXTENSAS E DENSAS QUE ENVOLVEM O MESENTÉRIO, INTESTINO, OMENTO E PAREDE ABDOMINAL

FONTE: KNIGHTLY et al., 1962

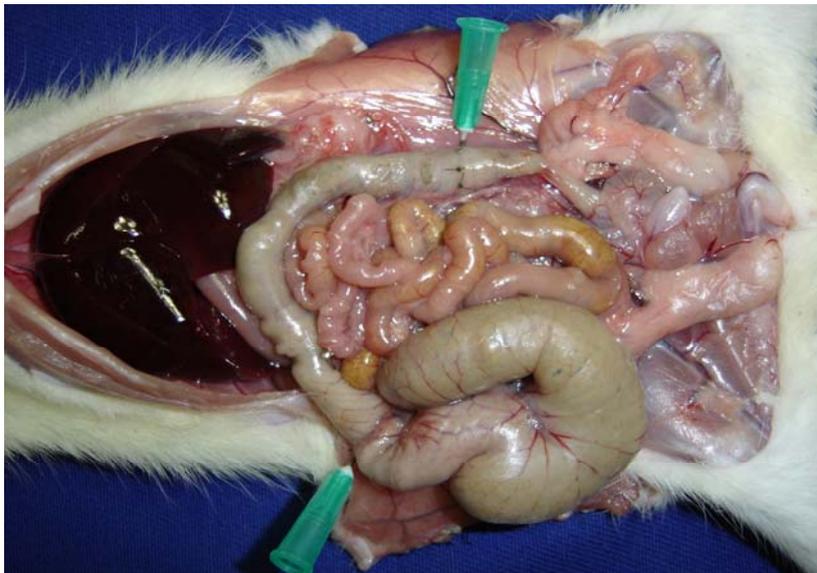
Após a lise das aderências, as duas anastomoses (FIGURA 13) foram ressecadas sendo a proximal (corpo de prova), centralizada em segmento de 6cm de comprimento, mantida em recipiente como soro fisiológico 0,9% para teste de tração. A distal foi seccionada longitudinalmente na borda anti-mesentérica, estendida sobre pedaço de papel filtro e armazenada em frasco com formol a 10% para estudo anatomopatológico (FIGURA 14).

### 3.2.12 Teste de tração

A análise mecânica dos corpos de prova foi realizada mediante teste de tração da anastomose comandado automaticamente por equipamento mecânico-eletrônico universal de ensaio de tração EMIC<sup>®</sup>, modelo DL500MF (EMIC, São José dos Pinhais, PR). Para avaliação da força tênsil o corpo de prova (CP) de cada animal foi fixado, manual e individualmente, em presilhas de pressão ajustáveis do equipamento de tração, de forma a conter a anastomose em sua porção média eqüidistante de suas extremidades (FIGURA 15). A tração desenvolveu-se com velocidade constante de 50 mm/minuto utilizando carga de 10 Kg e o equipamento permitiu sensibilidade de 50g com limite de força de 4500 Kgf até o colapso de 100% da anastomose do CP com margem de erro de 0,5% até sua ruptura total.

Todos os corpos de prova foram submetidos ao teste em intervalo de tempo de até duas horas após sua ressecção e a aquisição dos resultados ocorreu através do software TESC, versão 2.0, acoplado ao sistema que permitiu cálculo da força máxima e da força de ruptura da anastomose de cada CP, bem como a análise gráfica do evento. A Força máxima de tração (FMT) foi definida como a força máxima suportada pela anastomose imediatamente antes do início da ruptura e a Força de ruptura total (FRT) foi considerada a força requerida para romper completamente a anastomose, sendo as unidades desses parâmetros o quilograma-força (VAN WINKLE, 1969).

FIGURA 13 - ANASTOMOSES COLÔNICAS  
NO DIA DO SACRIFÍCIO



NOTA: na extremidade dos marcadores verdes encontram-se as anastomoses proximal (marcador inferior) e distal (marcador superior)

FIGURA 14 - PEÇA HISTOLÓGICA E CORPO DE PROVA



NOTA: segmento distal do cólon seccionado longitudinalmente apoiado sobre papel filtro branco expondo a superfície interna da anastomose distal (peça histológica) e segmento proximal do cólon com anastomose em seu ponto médio (corpo de prova, adjacente e superior à fita métrica)

FIGURA 15: TENSIÔMETRO (EMIC DL500MF)



NOTA: Tensiômetro acoplado à sistema computadorizado de interpretação de dados, demonstrando no detalhe corpo de prova fixado (anastomose central) antes da execução do teste

### 3.2.13 Avaliação histológica

Nas peças armazenadas para avaliação histológica foi realizado duas secções perpendiculares ao maior eixo da linha de sutura e após os processos de desidratação e diafanização as peças foram emblocadas paralelamente em parafina. Assim, um único corte do micrótomo (4  $\mu\text{m}$  de espessura) retirou três amostras da mesma anastomose.

Foram produzidas três lâminas por segmento de cólon analisado, corando-se cada uma com três corantes diferentes; hematoxilina-eosina (HE), Tricrômio de Masson e Picosirius-red F3BA (PSR).

Analisou-se os cortes histológicos corados por HE através de microscópio óptico marca Olympus® modelo BX-51, com oculares de 22mm de diâmetro. O objetivo foi quantificar a maturação do processo inflamatório através da contagem de polimorfonucleares (SOUSA; SOARES; APRILLI, 1991; VIZZOTTO, 2001; COSTA, 2003; GRECA, 2004; GONÇALVES, 2005) presentes na interface anastomótica de cada lâmina em uma área equivalente a um quarto de campo de 400x como demonstrado na FIGURA 16.

FIGURA 16 - FOTOMICROGRAFIA DA ANASTOMOSE COLÔNICA CORADA COM H/E



NOTA: marcador amarelo circunscrito campo histológico da interface anastomótica

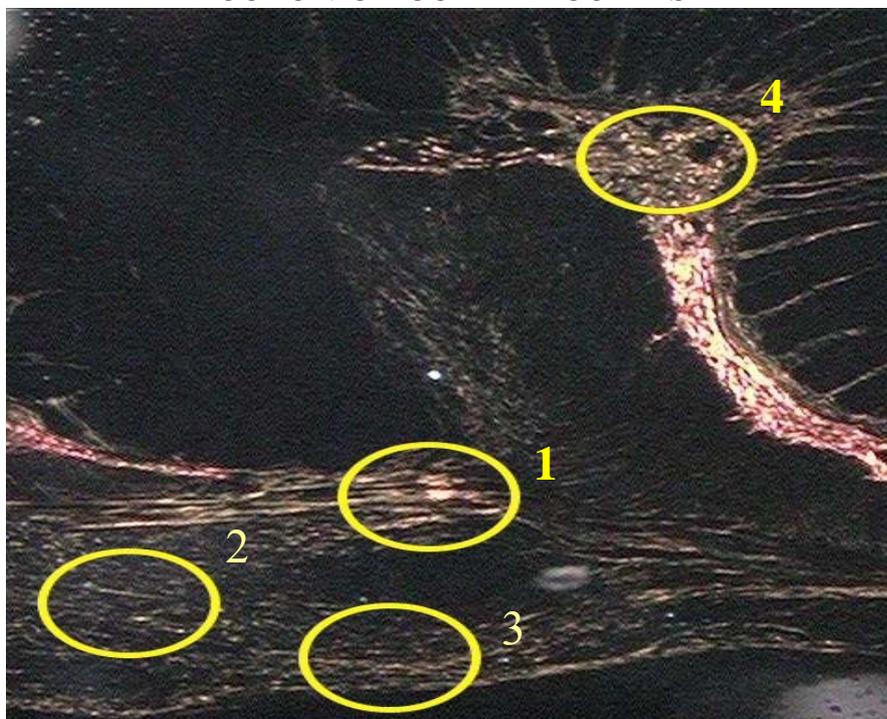
A coloração de tricrômio delimitou as camadas da parede intestinal, oferecendo precisão na escolha dos campos para análise de colágeno.

As lâminas coradas com PSR serviram para determinação computadorizada da densitometria do colágeno, mediante microscopia de polarização. As avaliações na região da anastomose foram realizadas a partir de dados obtidos da média de colágeno de quatro diferentes regiões padronizadas da parede colônica de cada rato. Quatro

campos microscópicos de 200 vezes representativos da área anastomótica, foram capturados utilizando-se microscópio Olympus<sup>®</sup> BX-51, com polarizador de luz, seguindo padronização (FIGURA 17):

- um campo de 200x na altura da submucosa (medida 1);
- um campo de 200x na altura da camada muscular (medida 2);
- um campo de 200x na altura da serosa/subserosa (medida 3);
- um campo de 200x no centro da área da anastomose (medida 4).

FIGURA 17 – FOTOMICROGRAFIA DA ANASTOMOSE COLÔNICA CORADA COM PSR



NOTA: marcadores amarelos circunscrito campos histológicos sistematizados como medidas 1 (submucosa), 2 (muscular), 3 (serosa) e 4 (interface anastomótica)

Conectado a uma câmera digital Sony<sup>®</sup> CCD 101 (Sony, Tokyo, Japan), as imagens foram transmitidas do microscópio para um monitor colorido Trinitron Sony<sup>®</sup>, sendo congeladas e digitalizadas através de placas Oculus TCX. A seguir, foi realizada a análise das mesmas através do aplicativo Image Pro-plus versão 4.5.1.23 para Windows 98/NT/ME/200/XP Professional (Copyright 1993-2002 Media Cybernetics inc.) em computador Pentium<sup>®</sup> III 733 MHz. A calibragem do sistema foi

baseada na densidade ótica dos pontos de resolução (pixels) que formam a imagem. Todas as lâminas foram avaliadas sob as mesmas condições de regulagem, dentro dos parâmetros exigidos pelo referido aplicativo.

No sistema RGB (*Red, Green, Blue*) as fibras colágenas mais espessas e fortemente birefringentes apresentam-se coradas em vermelho-alaranjado (colágeno tipo I - maduro), e as fibras mais finas, dispersas, fracamente birrefringentes, coram-se de tons verdes (colágeno tipo III - imaturo) (FIGURAS 18 e 19).

FIGURA 18 – FOTOMICROGRAFIA DE REGIÃO ANASTOMÓTICA CORADA COM PSR

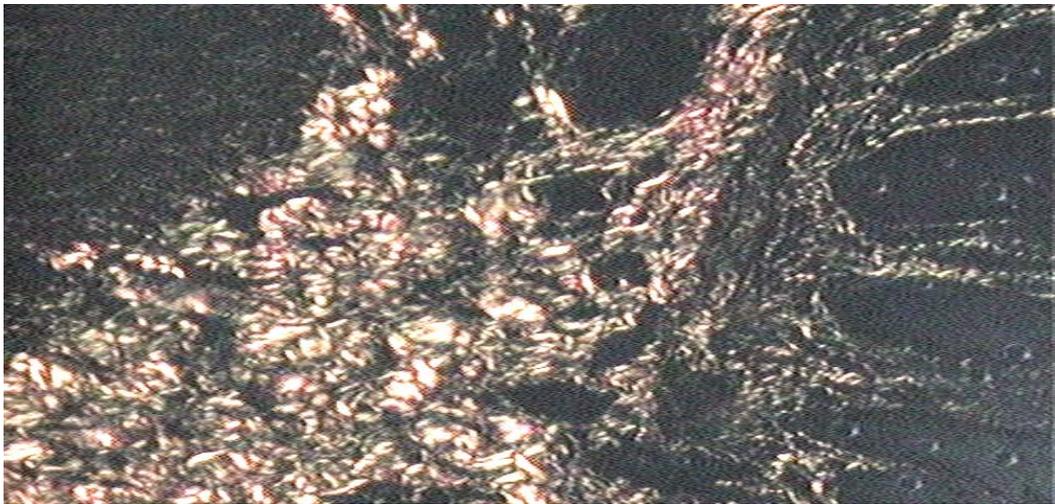
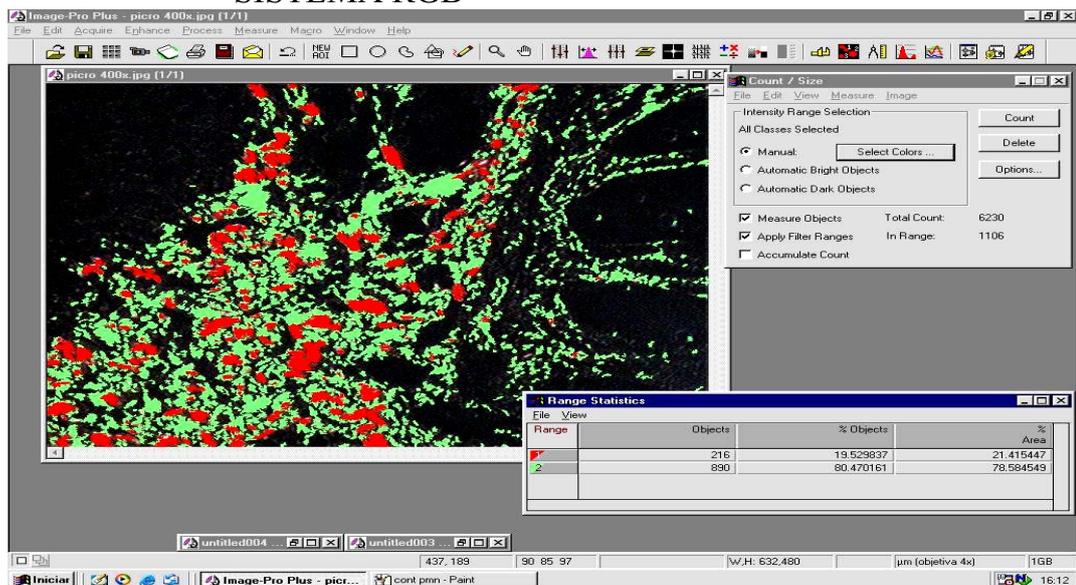


FIGURA 19 - CAPTAÇÃO DE IMAGEM HISTOLÓGICA NO SISTEMA RGB



NOTA: imagen da FIGURA 18 digitalizada pelo software Image Pro-plus, demonstrando áreas coradas de verde (Colágeno III) e de vermelho (Colágeno I)

Através desse sistema foi possível a quantificação da área ocupada por cada tipo de colágeno em cada campo pré-determinado de corte histológico (JUNQUEIRA, CORSEMELLI e BRENTANI, 1978), bem como o cálculo do índice de maturação do Colágeno - IMaC (LEMOS, 2002).

#### 3.2.14. Análise estatística

Procedeu-se ao tratamento estatístico conforme a natureza dos dados dos grupos GLN, GLY e CTL, sendo padronizada a medida do erro padrão (EP) e adotando-se nível de significância  $p < 0,05$ .

Foi utilizado o teste de Mann-Whitney para comparação dos graus de aderência intra-abdominal aferida pelo índice de *Knighly* entre os grupos GLN e GLY. Para a análise estatística da comparação das freqüências das variáveis complicações e óbitos entre os grupos GLN e GLY utilizou-se a Probabilidade Exata de Fisher.

Para as variáveis quantitativas observou-se o pré-requisito da distribuição normal (Gaussiana) para a escolha do teste estatístico. Na análise paramétrica foi utilizado o teste t de Student para a avaliação das diferenças das médias das variáveis: ingesta alimentar média - fases pré e pós-operatório, entre e dentro dos grupos GLN e GLY; pesos - dia inicial, 21º dia de desnutrição e 5º dia pós-operatório entre os grupos GLN e GLY; pesos - dia inicial e 21º dia de desnutrição entre os grupos GLN e CTL, e os grupos GLY e CTL; pesos - dia inicial e 21º dia de desnutrição, inicial e 5º dia pós-operatório, e, 21º dia de desnutrição e 5º dia pós-operatório dentro do grupo GLN; pesos - entre os dias inicial, 21º dia de desnutrição, pré-operatório, dia da cirurgia e 5º dia pós-operatório dentro do grupo GLY; pesos - dia inicial e 21º dia de desnutrição dentro do grupo CTL; IMaC dos colágenos e número de polimorfonucleares entre os grupos GLN e GLY.

Na análise não-paramétrica foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis para as variáveis: ingesta alimentar média - na fase de desnutrição entre todos os grupos; pesos - pré-operatório e dia da cirurgia entre os grupos GLN e GLY; pesos - dia final da desnutrição e pré-operatório, e, dia da cirurgia e 5º dia pós-operatório, dentro do

grupo GLN; força máxima de tensão, força de ruptura total e colágeno maduro e imaturo dentro dos grupos GLN e GLY.



## 4. RESULTADOS

### 4.1 MORTALIDADE

Dos 46 ratos do início da pesquisa, seis foram a óbito antes que completassem todas as fases do estudo, sendo excluídos das análises mecânica e histológica. A taxa de mortalidade total foi de 13,04% e a maior parte dos óbitos ocorreu no grupo GLY (83,33%), não sendo estabelecido diferença significativa de mortalidade entre os dois grupos em estudo durante as fases pré e pós-operatórias (TABELA 1). Comparando-se a taxa de mortalidade de acordo com as fases do estudo, foi no período pós-operatório que ocorreu a maioria (50%) das mortes. Excluindo-se os óbitos ocorridos durante a desnutrição (um do grupo GLN no 17º dia e um do grupo GLY no 14º dia), os outros (66,66 %) foram relacionados a complicações advindas do procedimento de gavagem (um rato do grupo GLY morreu no terceiro dia da fase de suplementação e três do mesmo grupo morreram no 1º PO).

TABELA 1 - ANÁLISE ESTATÍSTICA DA COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DE ÓBITOS INTER-GRUPOS GLN E GLY APÓS A FASE DE DESNUTRIÇÃO

GRUPOS	ÓBITOS		TOTAL	P
	Sim	Não		
GLN	0	15	15	0,05
GLY	4	11	15	
TOTAL	4	26	30	

LEGENDA: p = nível de significância estatística; GLN = grupo suplementado com Gln; GLY= grupo suplementado com Gly.

### 4.2 MORBIDADE

Nenhum dos ratos evoluiu com deiscência anastomótica ou obstrução intestinal após a cirurgia, sendo que todos os animais apresentaram evacuações normais até o 2º PO. A morbidade entre os animais que terminaram o estudo foi de

11,53% (TABELA 2), afetando somente os ratos do grupo GLN e tiveram caráter infeccioso na sua totalidade (um abscesso pleural: GLN 14 e dois abscessos abdominais não relacionados à anastomose: GLN 4 e GLN 8).

TABELA 2 – COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DE COMPLICAÇÕES INTER-GRUPOS GLN E GLY APÓS A FASE DE DESNUTRIÇÃO

GRUPOS	COMPLICAÇÕES		TOTAL	P
	Sim	Não		
GLN	3	12	15	0,17
GLY	0	11	11	
TOTAL	3	23	26	

LEGENDA: p = nível de significância estatística; GLN = grupo suplementado com Gln; GLY = grupo suplementado com Gly.

#### 4.3 PESO

As médias de pesos dos animais variou conforme o grupo e a fase do estudo e foram representadas no GRÁFICO 1.

##### 4.3.1. Grupo CTL

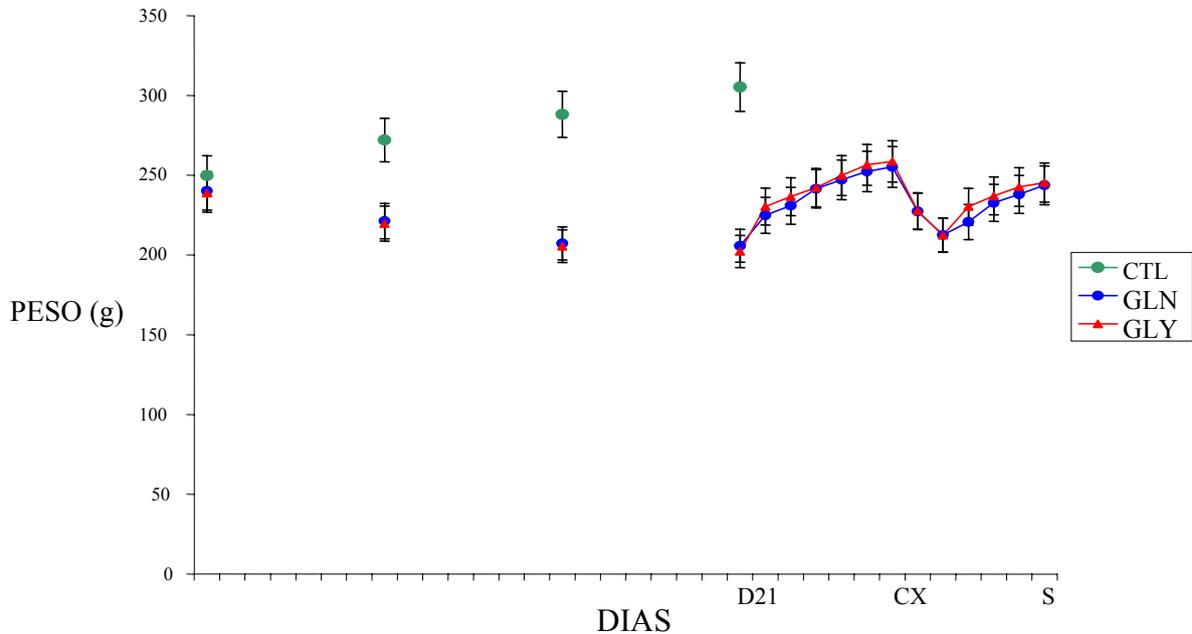
O grupo CTL obteve ganho ponderal médio de 22,2 % durante a fase de desnutrição, sendo que durante esse período o aumento atingiu diferença significativa (GRÁFICO 2).

##### 4.3.2 Grupo GLY

O grupo GLY teve perda de peso de 15,33% durante a fase de desnutrição e ganho ponderal de 27,96% e 7,75% durante as fases pré e pós-operatórias respectivamente. Nos períodos compreendidos entre o final da desnutrição e o término

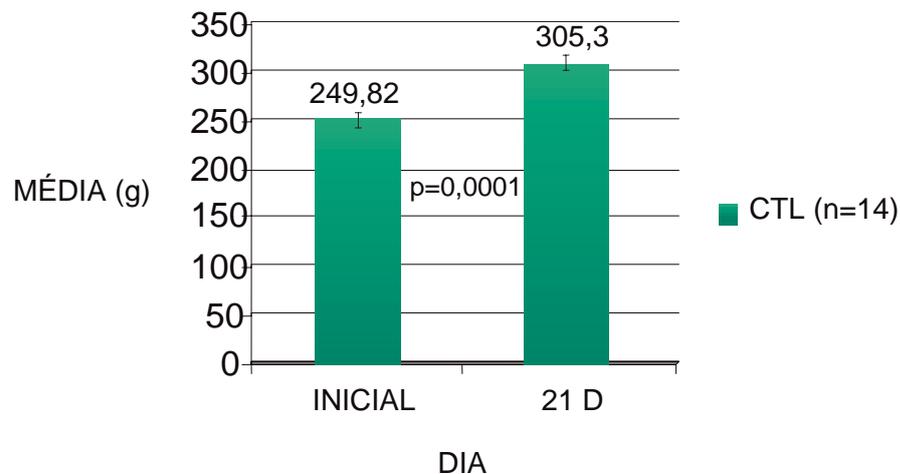
do experimento e entre o início e o fim do estudo houve ganho de peso de 21,35% e 2,74% respectivamente (TABELA 3).

GRÁFICO 1 – MÉDIAS DE PESOS DOS GRUPOS CTL, GLN E GLY



LEGENDA: CTL = grupo controle; GLN = grupo Glutamina; GLY = grupo Glicina; D21 = dia final da desnutrição; CX = dia da cirurgia; S = dia do sacrifício; g = grama

GRÁFICO 2 – DIFERENÇAS DAS MÉDIAS DE PESOS INTRA-GRUPO CTL NA FASE DE DESNUTRIÇÃO



LEGENDA: CTL = grupo controle; n = tamanho da amostra; p = nível de significância estatística; INICIAL = dia inicial da fase de desnutrição; 21D = dia final da fase de desnutrição; g = grama.

NOTA: Erro padrão: EP(Inicial) =  $\pm 7,44$  e EP(D21) =  $\pm 7,87$

TABELA 3- DIFERENÇAS DAS MÉDIAS DE PESOS NO GRUPO GLY ENTRE OS DIAS INICIAL, 21D, 6S, CX E FINAL

DIA	GLY (n =11) M ± EP	P
INICIAL	238,85 ± 5,54	0,0001
21D	202,22 ± 5,93	
21D	202,22 ± 5,93	0,0001
6S	258,77 ± 5,90	
CX	227,74 ± 5,71	0,03
FINAL	245,40 ± 5,25	
INICIAL	238,85 ± 5,54	0,40
FINAL	245,40 ± 5,25	
21D	202,22 ± 5,93	0,0001
FINAL	245,40 ± 5,25	
6S	258,77 ± 5,90	0,00002
1° PO	212,40 ± 3,98	

LEGENDA: GLY = grupo suplementado com Gly; n = tamanho da amostra; M = média; EP = erro padrão; p = nível de significância estatística; INICIAL = dia inicial da fase de desnutrição; 21D = dia final da fase de desnutrição; 6S = dia final da fase pré-operatória; CX = dia da cirurgia; FINAL = dia final do estudo; 1° PO = primeiro dia pós-operatório.

#### 4.3.3 Grupo GLN

No grupo GLN (TABELA 4) observou-se perda de peso de 14,32% durante a fase de desnutrição e ganho ponderal de 24,03% e 7,19% durante as fases pré e pós-operatórias, respectivamente. Nos períodos compreendidos entre o final da desnutrição e o término do experimento e entre o início e o fim do estudo houve ganho de peso de 18,43% e 1,46% respectivamente.

#### 4.3.4 Grupo CTL versus grupos GLN e GLY

As médias de pesos dos ratos dos grupos GLY e GLN foram individualmente comparados aos animais do grupo CTL no início e no final da fase de desnutrição

(TABELA 5). A redução ponderal média em relação à média de peso esperado (grupo CTL) para cada grupo em estudo alcançou 32,59% no grupo GLN e 33,76% no grupo GLY.

TABELA 4 – DIFERENÇAS DAS MÉDIAS DE PESOS INTRA-GRUPO GLN NOS DIVERSOS PERÍODOS DO ESTUDO

DIA	GLN (n =15) M ± EP	p
INICIAL	240,20 ± 5,28	0,0001
21D	205,79 ± 4,83	
21D	205,79 ± 4,83	0,0001
6S	255,26 ± 5,65	
CX	227,37 ± 4,76	0,06
FINAL	243,73 ± 6,08	
INICIAL	240,20 ± 5,28	0,66
FINAL	243,73 ± 6,08	
21D	205,79 ± 4,83	0,0001
FINAL	243,73 ± 6,08	
6S	255,26 ± 5,65	0,00004
1º PO	212,56 ± 4,46	

LEGENDA: GLN = grupo suplementado com Gln; n = tamanho da amostra; M = média; EP = erro padrão; p = nível de significância estatística; INICIAL = dia inicial da fase de desnutrição; 21D = dia final da fase de desnutrição; 6S = dia final da fase pré-operatória; CX = dia da cirurgia; FINAL = dia final do estudo; 1º PO = primeiro dia pós-operatório.

#### 4.3.5 Grupo GLN versus grupo GLY

Os grupos GLN e GLY foram comparados em cortes transversais de momentos críticos de alteração ponderal (TABELA 6). Esses dados confirmam a semelhante variação de pesos mostradas no gráfico 1.

TABELA 5 – DIFERENÇAS DAS MÉDIAS DE PESOS ENTRE OS GRUPOS GLN E CTL E GLY E CTL NA FASE DE DESNUTRIÇÃO

GRUPOS	INICIAL M ± EP	p	21D M ± EP	p
GLN (n = 15)	240,20 ± 5,28	0,30	205,79 ± 4,83	< 0,0001
CTL (n = 14)	249,82 ± 7,44		305,30 ± 7,87	
GLY (n = 11)	238,85 ± 5,54	0,27	202,22 ± 5,93	< 0,0001
CTL (n = 14)	249,82 ± 7,44		305,30 ± 7,87	

LEGENDA: GLN = grupo suplementado com Gln; CTL = grupo controle; GLY = grupo suplementado com Gly; n = tamanho da amostra; M = média; EP = erro padrão; p = nível de significância estatística; INICIAL = dia inicial da fase de desnutrição; 21D = dia final da fase de desnutrição.

TABELA 6 – DIFERENÇAS DAS MÉDIAS DE PESOS ENTRE OS GRUPOS GLN E GLY NOS DIAS INICIAL, 21D, 6S, CX E FINAL

DIA	GLN (n=15) M ± EP	GLY (n = 11) M ± EP	p
INICIAL	240,20 ± 5,28	238,85 ± 5,54	0,86
21D	205,79 ± 4,83	202,22 ± 5,93	0,64
6S	255,26 ± 5,65	258,77 ± 5,90	0,79
1º PO	212,56 ± 4,46	212,40 ± 3,98	0,94
CX	227,37 ± 4,76	227,74 ± 5,71	0,74
FINAL	243,73 ± 6,08	245,40 ± 5,25	0,84

LEGENDA: GLN = grupo suplementado com Gln; GLY = grupo suplementado com Gly; n = tamanho da amostra; M = média; EP = erro padrão; p = nível de significância estatística; INICIAL = dia inicial da fase de desnutrição; 21D = dia final da fase de desnutrição; 6S = dia final da fase pré-operatória; 1º PO = primeiro dia pós-operatório; CX = dia da cirurgia; FINAL = dia final do estudo.

#### 4.4 INGESTA

A quantidade média de ração consumida pelos animais durante o estudo foi avaliada cruzando-se os dados dos três grupos de animais (CTL, GLN e GLY) de acordo com as fases do experimento: desnutrição (D), Pré-operatório (PRÉ-OP) e pós-

operatório (PÓS-OP). As TABELAS 7 e 8 mostram os resultados dessas análises inter e intra-grupos, respectivamente, enquanto o GRÁFICO 3 demonstra as alterações de consumo de ração dos grupos CTL, GLN e GLY através das fases da pesquisa.

#### 4.5 ADERÊNCIAS

O índice de aderências grau 2 de KNIGHTLY foi predominante entre os grupos não sendo evidenciado nos animais índices zero, um ou quatro. Apenas em um rato de cada grupo (GLN 10 e GLY 11) evidenciou-se grau 3, correspondendo a 6,66% dos ratos do grupo GLN e 9,09% do grupo GLY (GRÁFICO 4).

TABELA 7 – DIFERENÇAS DAS MÉDIAS DE INGESTA NAS FASES D, PRÉ-OP E PÓS-OP INTER-GRUPOS GLN, GLY E CTL

FASE	GRUPOS ( n )	INGESTA M ± EP	p
D	GLY (11)	12,33 ± 0,11	0,0001
	CTL (14)	24,88 ± 0,96	
D	GLN (15)	12,41 ± 0,08	0,0001
	CTL (14)	24,88 ± 0,96	
D	GLN (15)	12,41 ± 0,08	0,60
	GLY (11)	12,33 ± 0,11	
PRÉ-OP	GLN (15)	26,25 ± 1,16	0,80
	GLY (11)	26,69 ± 1,29	
PÓS-OP	GLN (15)	19,04 ± 1,56	0,91
	GLY (11)	18,75 ± 1,86	

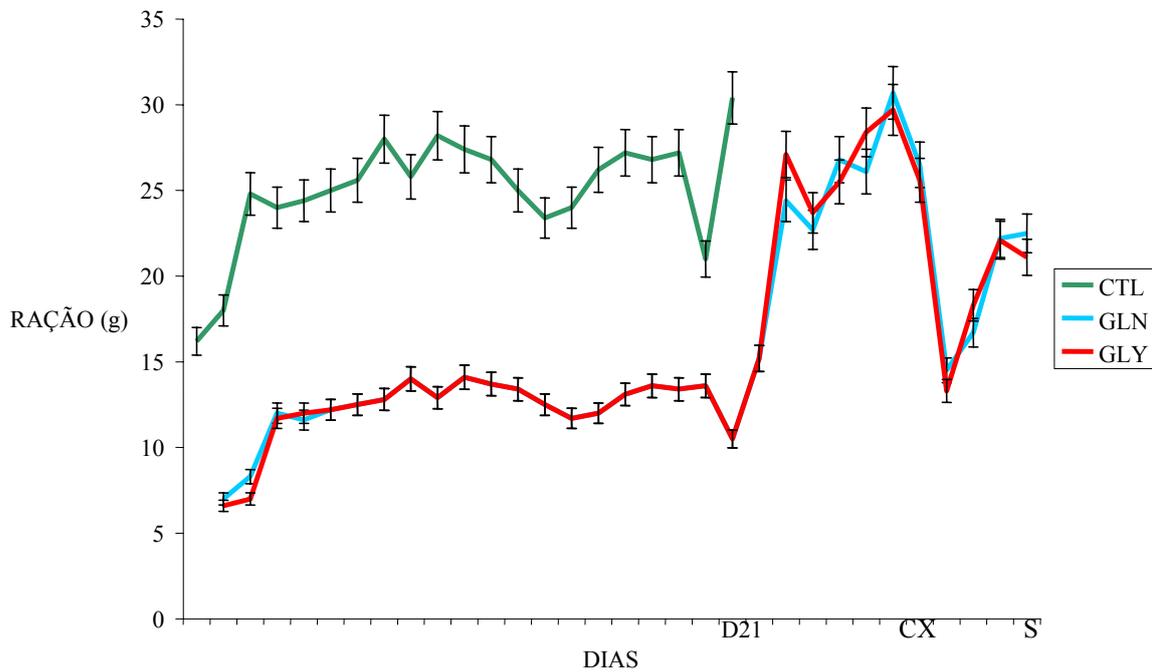
LEGENDA: n = tamanho da amostra; M = média; EP = erro padrão; p = nível de significância estatística; GLY = grupo suplementado com Gly; CTL = grupo controle; GLN = grupo suplementado com Gln; D = fase de desnutrição; PRÉ-OP = fase pré-operatória; PÓS-OP = fase pós-operatória.

TABELA 8 – DIFERENÇAS DAS MÉDIAS DE INGESTA NAS FASES PRÉ-OP E PÓS-OP INTRA-GRUPOS GLN E GLY

GRUPOS (n)	FASES	INGESTA MÉDIA M ± EP	p
GLN (15)	PRÉ – OP	26,25 ± 1,16	0,001
	PÓS – OP	19,04 ± 1,56	
GLY (11)	PRÉ – OP	26,69 ± 1,29	0,002
	PÓS – OP	18,75 ± 1,86	

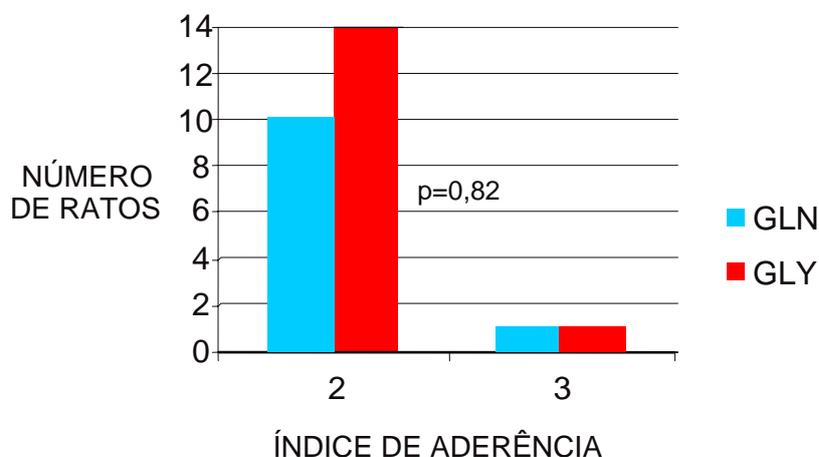
LEGENDA: n = tamanho da amostra; M = média; EP = erro padrão; p = nível de significância estatística; GLN = grupo suplementado com Gln; GLY = grupo suplementado com Gly; PRÉ - OP = fase pré-operatória; PÓS - OP = fase pós-operatória.

GRÁFICO 3 – MÉDIA DE INGESTA DOS GRUPOS CTL, GLN E GLY



LEGENDA: CTL = grupo controle; GLN = grupo Glutamina; GLY = grupo Glicina; D21 = dia final da desnutrição; CX = dia da cirurgia; S = dia do sacrifício; g = grama

GRÁFICO 4 – ÍNDICES DE KNIGHTLY ENTRE OS GRUPOS GLN E GLY



LEGENDA: GLN = grupo suplementado com Gln; GLY = grupo suplementado com Gly; p = nível de significância estatística.

#### 4.6 VARIÁVEIS DE FORÇA

A maior diferença entre os grupos nos testes de tração foi obtida na avaliação da FRT (TABELA 9). O grupo GLY contou com “n” de 10 animais na análise destas variáveis, pois quando foi realizado o ensaio mecânico um dos corpos de prova deste grupo rompeu fora da linha de anastomose e foi excluído. O sistema não conseguiu detectar a ruptura total da anastomose, por falta de sensibilidade do tensiômetro, em apenas um dos corpos de prova do grupo GLN, o qual foi excluído da avaliação da FRT.

TABELA 9 – DIFERENÇAS DAS MÉDIAS DAS VARIÁVEIS FORÇA MÁXIMA DE TRAÇÃO (FMT) E FORÇA DE RUPTURA TOTAL (FRT) ENTRE OS GRUPOS GLN E GLY

VARIÁVEIS	GLN	GLY	p
	M ± EP ( n )	M ± EP ( n )	
FMT	0,1767 ± 0,0101 (15)	0,1750 ± 0,0150 (10)	0,63
FRT	0,1264 ± 0,0098 (14)	0,1030 ± 0,0124 (10)	0,17

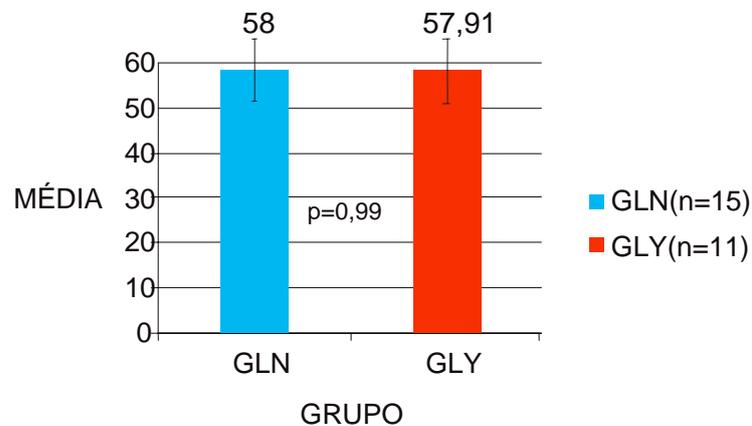
LEGENDA: GLN = grupo suplementado com Gln; GLY = grupo suplementado com Gly; M = média; EP = erro padrão; n = tamanho da amostra; p = nível de significância estatística; FMT = força máxima de tração; FRT = força de ruptura total

## 4.7 VARIÁVEIS HISTOLÓGICAS

### 4.7.1 Contagem de polimorfonucleares

A diferença do número de polimorfonucleares entre os grupos GLY e GLN é demonstrada no GRÁFICO 5.

GRÁFICO 5 – DIFERENÇAS DAS MÉDIAS DE POLIMORFONUCLEARES ENTRE OS GRUPOS GLN E GLY



LEGENDA: p = nível de significância estatística; n = tamanho da amostra; GLN = grupo suplementado com Gln; GLY = grupo suplementado com Gly.

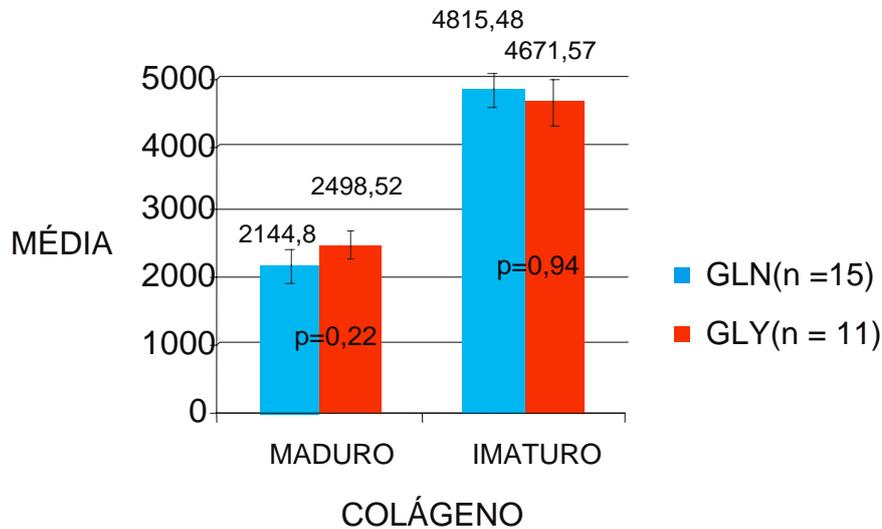
NOTA: Erro padrão: EP(GLN) = ± 6,92 e EP(GLY) = ± 7,22

### 4.7.2 Densitometria do colágeno

As médias de área ocupada de colágeno maduro e imaturo e a relação IMaC foram determinadas, estabelecendo a diferença inter e intra-grupos GLY e GLN, a partir de áreas padronizadas das peças histológicas da anastomose (GRÁFICOS 6 e 7).

A densitometria do colágeno também foi realizada estabelecendo a diferença inter-grupos GLY e GLN, a partir das medidas padronizadas 1,3 e 4 das peças histológicas da anastomose (GRÁFICOS 8 e 9), bem como análise isolada da medida 1 (GRÁFICOS 10 e 11).

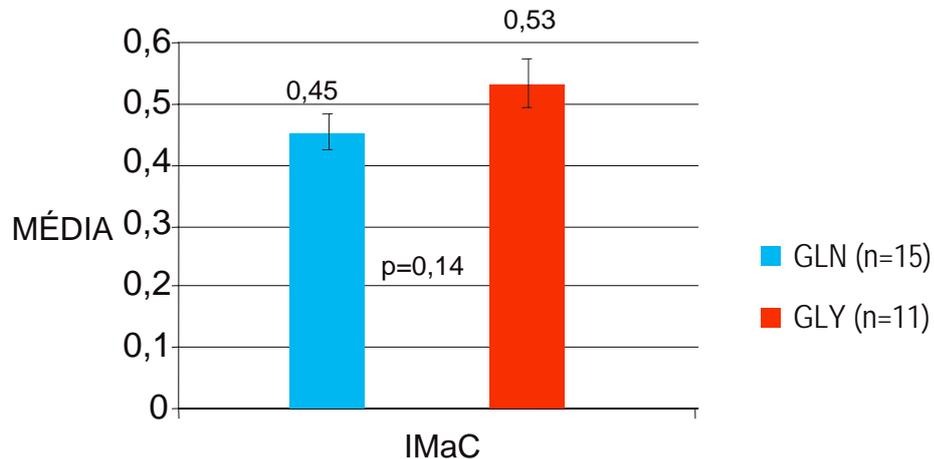
GRÁFICO 6 – DIFERENÇA DAS MÉDIAS DE COLÁGENO MADURO E IMATURO DAS ÁREAS 1,2, 3 E 4 INTER-GRUPOS GLN E GLY



LEGENDA: GLN = grupo suplementado com Gln; GLY = grupo suplementado com Gly; n = tamanho da amostra; M = média; EP = erro padrão; p = nível de significância estatística; Maduro = colágeno tipo I; Imaturo = colágeno tipo III;  $\mu^2$  = micrômetro quadrado

NOTA: Erro padrão: EP(GLN/maduro) =  $\pm 224,85\mu^2$ , EP(GLY/maduro) =  $\pm 205,71\mu^2$ , EP(GLN/imaturo) =  $\pm 283,42\mu^2$ , EP(GLY/imaturo) =  $\pm 315,01\mu^2$

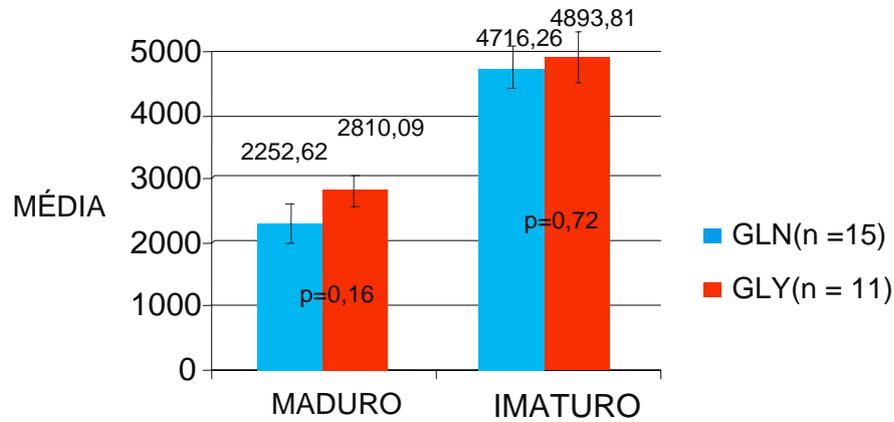
GRÁFICO 7 – DIFERENÇA DAS MÉDIAS DO IMAc ENTRE OS GRUPOS GLN E GLY



LEGENDA: n = tamanho da amostra; IMAc = índice de maturação do colágeno; p = nível de significância estatística; GLN = grupo suplementado com Gln; GLY = grupo suplementado com Gly.

NOTA: Erro padrão: EP(GLN) =  $\pm 0,04$  e EP(GLY) =  $\pm 0,03$

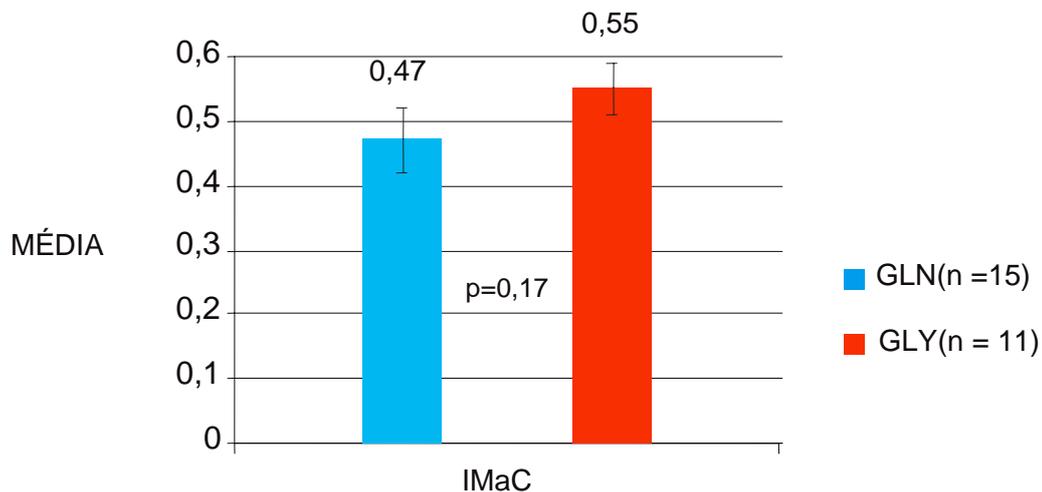
GRÁFICO 8 – DIFERENÇA DAS MÉDIAS DOS COLÁGENOS MADURO E IMATURO INTER-GRUPOS GLN E GLY NAS ÁREAS 1, 3 e 4



LEGENDA: GLN = grupo suplementado com Gln; GLY = grupo suplementado com Gly; n = tamanho da amostra; p = nível de significância estatística; Maduro = colágeno tipo I; Imaturo = colágeno tipo III.

NOTA: Erro padrão: EP(GLN/maduro) =  $\pm 294,14\mu^2$ , EP(GLY/maduro) =  $\pm 221,96\mu^2$ , EP(GLN/imaturo) =  $\pm 324,42\mu^2$ , EP(GLY/imaturo) =  $\pm 388,66\mu^2$

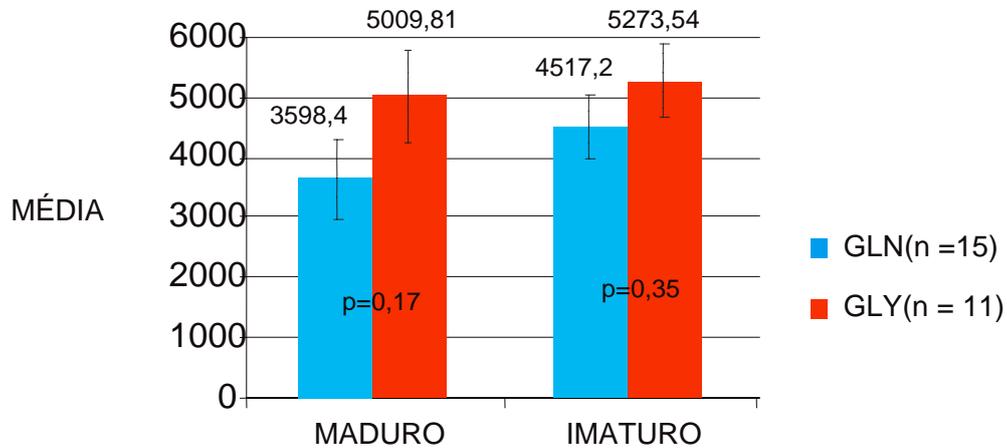
GRÁFICO 9 - DIFERENÇA DAS MÉDIAS DO IMaC DAS ÁREAS 1, 3 E 4 ENTRE OS GRUPOS GLN e GLY



LEGENDA: n = tamanho da amostra; IMaC = índice de maturação do colágeno; M = média; EP = erro padrão; p = nível de significância estatística; GLN = grupo suplementado com Gln; GLY = grupo suplementado com Gly.

NOTA: Erro padrão: EP(GLN) =  $\pm 0,05$  e EP(GLY) =  $\pm 0,04$

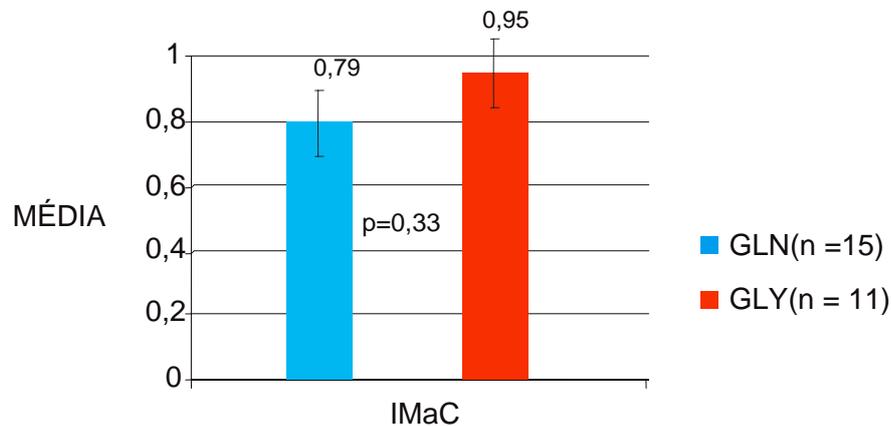
GRÁFICO 10 – DIFERENÇA DAS MÉDIAS DE COLÁGENOS MADURO E IMATURO DA ÁREA 1 INTER-GRUPOS GLN E GLY



LEGENDA: GLN = grupo suplementado com Gln; GLY = grupo suplementado com Gly; n = tamanho da amostra; p = nível de significância estatística; Maduro = colágeno tipo I; Imaturo = colágeno tipo III.

NOTA: Erro padrão: EP(GLN/maduro) =  $\pm 652,47\mu^2$ , EP(GLY/maduro) =  $\pm 752,63\mu^2$ , EP(GLN/imaturo) =  $\pm 519,64\mu^2$ , EP(GLY/imaturo) =  $\pm 615,72\mu^2$

GRÁFICO 11 - DIFERENÇA DAS MÉDIAS DO IMAc DA ÁREA 1 ENTRE OS GRUPOS GLN e GLY



LEGENDA: n = tamanho da amostra; IMAc = índice de maturação do colágeno; p = nível de significância estatística; GLN = grupo suplementado com Gln; GLY = grupo suplementado com Gly.

NOTA: Erro padrão: EP(GLN) =  $\pm 0,10$  e EP(GLY) =  $\pm 0,11$



## 5. DISCUSSÃO

Neste estudo foi avaliado o efeito da nutrição perioperatória suplementada com Glutamina oral na cicatrização de anastomoses colônicas de ratos desnutridos.

### 5.1 DO MÉTODO

#### 5.1.1 Escolha dos animais

A dificuldade de avaliar clinicamente a cicatrização colônica obriga que a maioria dos estudos seja realizada a partir de modelos experimentais. Boa parte deles, e esse estudo em particular, utilizam murinos para testar suas hipóteses. O rato é animal resistente, dócil, de baixo custo, prático em estudos experimentais, com microflora fecal similar à do homem e com boa resistência endógena à peritonite, a qual não influencia a cicatrização colônica (PULANSKI; NOYES; EVANS; BRAME, 1954). No entanto, apesar desses aspectos favoráveis, deve-se ter o cuidado ao extrapolar esses resultados para a prática clínica em função das diferenças entre as espécies. Estudos envolvendo desnutrição de ratos revelam a alta taxa metabólica basal por unidade de peso desses animais, sendo que moderada depleção ponderal em rato adulto representa injúria comparável em gravidade à perda de peso em um humano recém-nascido. Além disso, a tolerância ao jejum também é muito menor no rato que no homem, pois curtos períodos de jejum (menor que uma semana) geralmente são letais somente para o primeiro (ALBINA, 1994).

#### 5.1.2 Desnutrição

Para realizar esse estudo foi necessário causar desnutrição em ratos previamente eutróficos. Diversos métodos de desnutrição artificial são utilizados para esse propósito. Alguns experimentos utilizam dietas hipo ou aprotéicas com grande variabilidade de doses de diferentes substratos (IRVIN; HUNT, 1974; IRVIN, 1976;

WARD et al., 1982; ZAIZEN et al., 1990). Entretanto, o método pareado de desnutrição (*Pair Feeding*) utilizado neste estudo levou à depleção ponderal com eficácia semelhante a estudos realizados anteriormente por outros autores. GONÇALVES (2005) desnutriu dois grupos de ratos com peso médio inicial de  $350,50 \pm 9,14$  g (D) e  $306,50 \pm 10,14$  g (PRÉ) que após 21 dias de desnutrição atingiram média de  $258,71 \pm 4,57$  g e  $235,38 \pm 3,75$  g, representando redução ponderal de 26,88% e 23,2% respectivamente. LEMOS, 2002 desnutriu ratas com peso inicial médio de  $272,30 \pm 33,56$  g durante as duas primeiras semanas de gestação e obteve perda ponderal média de  $12,5 \pm 7,01$  g por semana.

No presente estudo os grupos de ratos tinham pesos médios de  $240,20 \pm 5,28$  g (grupo Glutamina) e  $238,85 \pm 5,54$  g (grupo Glicina) e alcançaram déficit ponderal de 14,32% e 15,33% ao final de 21 dias. Comparando-se com os estudos anteriores observa-se menor perda de peso, porém deve-se levar em conta que no estudo de GONÇALVES (2005) os ratos apresentavam maior peso inicial e no estudo de LEMOS (2002) os animais eram fêmeas em diferente estado metabólico sob influência do período gestacional. Entretanto, o objetivo de desnutrir os ratos foi obtido em todos os estudos anteriores, sendo que neste estudo a perda de peso dos grupos GLN e GLY somado ao ganho de peso do grupo controle (22,2%) marca a eficácia deste método de desnutrição, que apresentou diferenças significativas de peso ao final da fase D entre os grupos em estudo e o grupo CTL ( $p < 0,01$ ).

Esse método de depleção ponderal apresenta vantagens adicionais ao prescindir de dietas especializadas e possibilitar que eventuais alterações ambientais afetem igualmente os animais. Dessa forma, as variações no consumo de dieta sofridas pelo grupo controle são transmitidas aos grupos em estudo. Além disso, esse modelo permite que a desnutrição ocorra acompanhando as alterações fisiológicas de crescimento dos animais, diferentemente de quando é fixada certa quantia de ração diária.

Independente do método de desnutrição alguns autores discutem a intensidade do processo de depleção necessário para exercer efeito sobre as propriedades mecânicas de anastomoses colônicas em ratos. DALY et al. (1972) demonstraram

diminuição significativa da pressão de ruptura anastomótica em ratos com apenas uma semana de desnutrição e perda de apenas 2% do peso inicial. Por outro lado, no estudo de IRVING e HUNT (1974), os autores só conseguiram demonstrar os efeitos prejudiciais da desnutrição sobre a pressão de ruptura de anastomoses colônicas em ratos desnutridos durante sete semanas quando a perda de peso atingiu 34%, sem evidenciar prejuízos naqueles ratos que foram desnutridos por 3 a 5 semanas. O experimento de GONÇALVES (2005) demonstrou que a desnutrição durante 21 dias exerceu efeitos negativos sobre a força tênsil da anastomose colônica e serviu de referência para o tempo de desnutrição utilizado neste estudo.

### 5.1.3 Nutrição perioperatória

A utilização de nutrição perioperatória dos ratos foi baseada em comprovações clínicas e experimentais de que a mesma pode melhorar os resultados pós-operatórios em situações de desnutrição (THE VETERANS AFFAIRS TOTAL PARENTERAL NUTRITION COOPERATIVE STUDY GROUP, 1991; BOZZETTI et al., 2000; BEATTIE et al., 2000; GONÇALVES, 2005).

### 5.1.4 Data do sacrifício

A anastomose no 5º PO permite a avaliação da cicatrização colônica em período favorável de observação através da metodologia utilizada neste estudo e dentro da fase mais crítica do aparecimento de deiscências. LAW e ELLIS (1989) estabeleceram diferenças mecânicas entre anastomoses colônicas de ratos desnutridos e controles eutróficos, principalmente entre o 4º e 7º PO, considerando o 5º PO como o momento mais apropriado para a avaliação das forças intrínsecas envolvidas na manutenção da integridade anastomótica. SOUZA, SOARES e APPRILLI (1991) verificaram que durante os três primeiros dias pós-operatórios a resistência da anastomose é principalmente determinada pelas suturas. HÖRGSTRÖM et al. (1985) estabeleceram que a partir do 4º PO o colágeno começa a se acumular passando a

determinar as propriedades mecânicas da anastomose colônica. HENDRIKS e MASTBOOM (1990) consideraram o período entre 4º e 7º PO como o momento mais vulnerável de deiscências anastomóticas de cólon devido ao déficit mecânico e a baixa qualidade de colágeno depositado.

Além disso, outras evidências influenciaram para a escolha do 5º PO. GRECA, BIONDO-SIMÕES, IOSHI, SANTOS, CHIN, TAWIL e STALBSCHMIDT (2000) não conseguiram avaliar as forças mecânicas da anastomose em período precoce (3º PO), enquanto WU, AYRIZONO, FAGUNDES, COY, GÓES e LEONARDI (2003) obtiveram 100% de ruptura na linha anastomótica em peças analisadas no 5º PO. No estudo de COSTA et al. (2003) houve maior número de rupturas fora da linha anastomótica, provavelmente em função de um maior índice de aderências que se formam ao redor da anastomose impossibilitando as análises de força tênsil a partir do 7º PO.

#### 5.1.5 Anestesia

Devido à realização de anastomoses intra-abdominais evitou-se a utilização de anestésicos via intra-peritoneal, optando-se por agente inalatório. A rusticidade, o potencial irritativo, a difícil regulação de dose e a não desprezível perda de amostras com a utilização de éter estimularam a busca por agente anestésico com propriedades mais favoráveis. Em concordância com esse estudo, a utilização de Isoflurano em anestesia inalatória de ratos em procedimentos cirúrgicos de média duração demonstrou-se seguro, com boa tolerância e sem mortalidade associada (GOTOH; MATSUMOTO; IMAMURA, 2004). EGER e JOHNSON (1987) utilizaram Isoflurano em ratos de três meses de vida e da mesma forma verificaram rápida indução e recuperação anestésicas.

### 5.1.6 Anastomose colônica

A técnica cirúrgica usada neste estudo baseou-se nos princípios de HALSTED (1887). A anastomose colônica término-terminal com oito pontos de nylon 6-0 em sutura interrompida faz parte da padronização de modelo utilizado em estudos antecedentes da mesma linha de pesquisa (COSTA et al., 2003 e GONÇALVES, 2005) com boa reprodutibilidade. No entanto, diferentemente dos anteriores em que os autores realizaram alternância das peças anastomóticas durante a análise mecânica e histológica optou-se por se fixar a anastomose proximal para análise mecânica e a distal para análise histológica, visto que a produção de colágeno no cólon de ratos segue um padrão diferente de acordo com o segmento analisado (JIBORN et al., 1980).

O tipo de fio utilizado evitou que reação inflamatória secundária intensa pudesse interferir na avaliação cicatricial (KORUDA; ROLANDELLI, 1990). Foi optado por manter o fio da sutura *in situ* durante as avaliações mecânicas devido à debilidade anastomótica e à perda da integridade da mesma ao se retirar os pontos. A sutura interrompida foi descrita por alguns autores como favorecedora de melhor cicatrização com menor degradação de colágeno (HOWES, 1929; JIBORN et al., 1978).

### 5.1.7 Glutamina

As evidências recentes dos efeitos da Gln nos eventos cicatriciais, sobre os mecanismos de reparação do cólon e sua condição essencial em momentos de estresse agruparam propriedades importantes desse substrato que podem otimizar os resultados da cicatrização de anastomoses colônicas, freqüentemente afetada pelos efeitos prejudiciais da desnutrição. A utilização de Gln em estudos experimentais apresenta variação de doses, formas e vias de administração. O único estudo identificado da literatura que contempla o uso desse substrato na avaliação de anastomoses colônicas de ratos desnutridos administrou Gln através de via parenteral (McCAULEY et al.,

1991). A L-Gln na forma cristalizada foi utilizada nesse estudo em função da disponibilidade e fácil manipulação do substrato. A dose e a via de administração da Gln seguiu o protocolo utilizado por SALVALAGGIO (2000) e COSTA et al. (2003), no entanto a gavagem foi realizada sem sedação. BOELENS et al. (2003) também utilizou dose e via semelhante de Gln (12,5% via enteral). A gavagem foi fundamental na opção por suplementação enteral, pois garantiu que a dose calculada para administração fosse integralmente consumida pelos animais. A utilização da via enteral evita as complicações da rota parenteral, é mais econômica e permite a utilização de Gln pelo intestino através das rotas sistêmica e transluminal.

A metodologia utilizada nesse estudo exigiu o uso de controle isonitrogenado, pois os benefícios da glutamina poderiam estar relacionados com o maior aporte de aminoácidos. Não há substrato controle ideal (POTSIC; HOLLIDAY; LEWIS; SAMUELSON; DeMARCO; NEU, 2002), entretanto há substancial volume de trabalhos utilizando Gly como controle isonitrogenado da Gln. Parte deles utilizam Gly independentemente de evidências recentes sugerirem algumas propriedades imunológicas e anti-oxidantes associadas ao seu uso (HALL, 1998; BUCHMAN, 2001).

## 5.2. DOS RESULTADOS

### 5.2.1 Morbimortalidade

No período de desnutrição a mortalidade foi idêntica entre os grupos GLN e GLY, atingindo 6,25% (um rato) em cada grupo. DALY et al. (1972) obteve resultados semelhantes de mortalidade ao desnutrir ratos com dieta hipoproteica durante 2 a 4 semanas, encontrando mortalidade de 5 a 10%, respectivamente.

A partir da fase de suplementação os óbitos atingiram somente o grupo GLY, em todos esses casos foi evidenciado acúmulo de líquido pleural *pós-mortem*, que possivelmente foi resultante de complicação aspirativa de material administrado através da gavagem. Apesar dos altos índices de mortalidade com a gavagem os

limites infundidos foram de 2,4 a 4,36 ml de solução, sem extrapolar os limites de segurança estabelecidos por LAMBERT (1965) de 5 a 7,5 ml. A velocidade de infusão é outro fator relacionado aos índices de complicações da gavagem. A administração rápida de volumes adequados de líquidos através dessa intervenção geralmente é causa de aspiração. O nível de estresse acumulado dos ratos (desnutrição, gavagem e operação) contribuiu para que os animais ficassem mais agitados durante a gavagem, o que impedia que a infusão de suplemento se fizesse em velocidade lenta e constante.

COSTA et al. (2003) administraram Gln e Gly através de gavagem em ratos sedados e observou apenas uma morte indiretamente relacionada ao procedimento, já que o rato morreu por depressão respiratória ocasionada pelo éter. Com essa metodologia os autores conseguiram manter a velocidade de infusão de forma lenta e constante sem complicações aspirativas, porém todos animais necessitaram de intervenção anestésica. Da mesma forma, nesse trabalho os autores não tiveram morte de animais por perfuração esofágica com a cânula de gavagem apesar do risco teórico com essa técnica invasiva.

No grupo GLN ocorreu a maior morbidade representada por afecções infecciosas na sua totalidade (3 abscessos). O maior número de mortes do grupo GLY e o maior número de complicações do grupo GLN provavelmente reflete uma melhor condição desses animais para suportar intercorrências infecciosas em momentos de estresse. Uma explicação para esse fato são as elevações das concentrações de Taurina em ratos suplementados com Gln. A taurina (TAU) tem propriedades anti-oxidantes que poderiam explicar a menor morbidade nesses animais (BOELEN, 2003).

Outra possibilidade para a maior mortalidade no grupo GLY é o fato de que o estresse e a desnutrição contribuíram para a imunodepressão dos animais que não tiveram os benefícios da suplementação de Gln. Já foi discutido que a Gln mantém as funções do sistema imunológico, visto que a enzima glutaminase possui atividade aumentada no sistema linfóide e parece melhorar a resposta imunológica ao estimular a recuperação de linfócitos no pós-operatório, os quais produzem leucotrienos que contêm glutatona, outro potente antioxidante.

Outro fato que pode responder pela mortalidade é que a redução de Gln causa supressão de linfócitos T. O'RIORDAIN, FEARON, ROSS, ROGERS, FALCONER, BARTOLO, GARDEN e CARTER (1994) demonstraram que a suplementação de Gln (dipeptídeo) em NP causou aumento significativo na síntese de DNA de céls T em pacientes submetidos à ressecção coloretal, sendo em modelo experimental de ratos queimados foi verificado que esse aumento de resposta de linfócitos T foi associado a reduzida suscetibilidade a infecção (HORGAN; MANNICK; DUBRAVEC; RODRICK, 1990).

### 5.2.2 Peso

Verificou-se similaridade nas variações de peso em determinados momentos do estudo entre os grupos GLY e GLN (GRÁFICO 1) e não houve correlação estatística, apenas no período PO em que o grupo GLY obteve ganho significativo de peso ( $p = 0,03$ ) diferentemente do grupo GLN ( $p = 0,06$ ). A variação ponderal entre os grupos foi similar nesse período (GLY =  $227,74 \pm 5,71$  a  $245,40 \pm 5,25$  e GLN =  $227,37 \pm 4,76$  a  $243,73 \pm 6,08$ ) e possivelmente aquela diferença estatística poderia ser eliminada se a amostragem fosse maior.

Entre 6S e 1º PO os ratos permaneceram em jejum para redução do conteúdo fecal pré-operatório, simulação da condição clínica, preparo pré-anestésico e manutenção do padrão da linha de pesquisa. Esse período resultou em perda ponderal de 16,72 % no grupo GLN e 17,91 % no grupo GLY. Apesar da diferença percentual, essa redução de peso maior no grupo GLY pode representar melhor manutenção ponderal no grupo que recebeu suplementação com Gln. Essa observação está de acordo com a evidência de que a manutenção do pool de Gln intracelular promove conservação da proteína muscular durante estados catabólicos (JEPSON et al. 1988 e MACLENNAN et al. 1988).

COSTA et al. (2003) analisaram as variações de peso entre ratos (sem desnutrição prévia e gavagem sob sedação) durante o pré e o pós-operatório de anastomoses colônicas. Nesse estudo os autores não encontraram diferença

significativa de variação de peso entre grupos de ratos suplementados com Gln ou Gly sacrificados no 3º ou 8º PO em qualquer fase do experimento, inclusive no período de suplementação pré-operatória. O maior nível de estresse entre os ratos (desnutrição, gavagem sem sedação) e o intervalo de tempo PO analisado podem responder pelas diferenças encontradas entre esse estudo e o de COSTA et al. (2003).

No estudo de McCAULEY et al. (1991) os autores não realizaram nutrição pré-operatória, mas também não foi identificado diferença significativa de peso entre ratos desnutridos que receberam NP enriquecida com Gln durante seis dias pós-operatórios e o grupo controle.

BOELENS et al. (2003) também não encontrou diferença significativa de ganho ponderal e ingesta em ratos eutróficos que receberam 14 dias de alimentação enteral suplementada com Gln ou controle isonitrogenado.

### 5.2.3 Ingesta

A ingesta tem estreita relação com os eventos de cicatrização e toda variação sofrida em um dos grupos do estudo tende a influenciar os resultados na avaliação da força anastomótica (GREENHALGH; GAMELLI, 1987; DALY et al., 1972 e IRVING; HUNT, 1974).

As variações na ingesta sofridas pelo grupo CTL foram transmitidas aos grupos GLY e GLN, como demonstrado no GRÁFICO 3. Entretanto, a ingesta de ração pelos grupos GLY e GLN não foi idêntica no início da fase D, em função das flutuações no consumo, momento em que alguns ratos ainda não estavam totalmente adaptados. Essa variação não prejudicou a fase D, visto que ao final da desnutrição a análise inter-grupos (GLY e GLN) não demonstrou diferença significativa de pesos ( $p = 0,60$ ) e tanto o grupo GLN como o GLY atingiram perda significativa de peso ( $p < 0,0001$ ) em comparação ao grupo controle.

Durante os períodos pré e pós-operatórios a Gln não foi capaz de induzir diferença significativa na ingesta entre os animais dos grupos GLY e GLN. Esses resultados foram semelhantes aos obtidos no estudo de COSTA et al. (2003), que da

mesma forma não encontrou diferenças significativas na ingesta dos animais independentemente da utilização de Gln ou Gly.

#### 5.2.4 Força tênsil da anastomose

Os prejuízos causados pela desnutrição sobre as propriedades mecânicas da anastomose colônica foram bem documentados por DALY et al. (1972) e recentemente por GONÇALVES (2005). Neste último estudo a autora conseguiu demonstrar o benefício da nutrição pré-operatória na melhoria dos parâmetros biofísicos da anastomose em ratos desnutridos. Entretanto, os resultados da FMR e da FRT em ratos desnutridos e realimentados permaneceram inferiores aos resultados em ratos eutróficos sem desnutrição prévia, evidenciando a necessidade de otimização do processo de cicatrização colônica em ratos desnutridos com intuito de alcançar os valores em ratos eutróficos.

COSTA et al. (2003) realizaram teste mecânico em anastomoses de ratos eutróficos e, sem interferência da desnutrição sobre seus resultados, verificaram que a FRT foi significativamente maior no grupo que recebeu Gln enteral, porém sem diferença significativa na análise da FMT entre os grupos suplementados com Gln ou Gly.

Nesse estudo, os resultados das médias da FMR e da FRT das anastomoses demonstram que a Gln não foi suficiente para garantir melhora significativa das propriedades mecânicas da anastomose. Apesar do grupo GLN atingir médias maiores de FMT e FRT que o grupo GLY, essas diferenças não atingiram significância estatística. Considerando a FMT como o parâmetro com maior acurácia na medida da força de anastomoses colônicas, os resultados deste estudo foram semelhantes ao de COSTA et al. (2003).

Independentemente das diferenças metodológicas entre esse estudo e o de McCAULEY et al. (tempo de desnutrição, tempo de suplementação, dose de Gln, via nutricional e pressão de ruptura), houve concordância de resultados, pois os autores

também não demonstraram melhoria das propriedades mecânicas de anastomoses colônicas de ratos desnutridos suplementados com Gln parenteral.

#### 5.2.5 Aderências

Aderências constituem influências benéficas sobre anastomoses colônicas de ratos, aumentando a resistência mecânica das mesmas no 5º PO do reparo tecidual (WU, 2003). Apesar de ser medida subjetiva, a análise dessa variável foi utilizada por outros autores (COSTA et al, 2003; GONÇALVES, 2005) contribuindo na constatação da similaridade de gravidade de trauma cirúrgico, reforçando a semelhança inter-grupos na avaliação de resultados de testes mecânicos.

Nesse estudo, as aderências distribuíram-se uniformemente entre os grupos GLY e GLN sem diferença estatística significativa. A semelhança desses índices eliminou o viés que as aderências poderiam causar na avaliação mecânica das anastomoses.

#### 5.2.6 Contagem de polimorfonucleares

Alguns parâmetros histológicos são utilizados em estudos de cicatrização para estabelecer o grau de maturação do processo inflamatório da área de reparo (SOUSA et al., 1991; VIZZOTTO, 2001; COSTA et al., 2003; GONÇALVES, 2005). Com o mesmo intuito procurou-se um parâmetro objetivo para esse tipo de avaliação. Excluindo-se a subjetividade do grau de edema e possíveis fatores confusionais advindos da contagem de fibroblastos, restou a contagem de PMN como única variável que pode ser valorizada.

Nesse estudo essa avaliação não demonstrou diferença estatística entre os grupos, assim colaborou para atestar a semelhança na fase cicatricial entre os grupos durante a análise histológica (5º PO). Em concordância com esse resultado, COSTA et al. (2003) utilizou a contagem de PMN na análise da resposta inflamatória aguda e da

mesma forma não identificou diferença significativa entre o grupo suplementado ou não com Gln.

### 5.2.7 Densitometria do colágeno

De acordo com HALSTED (1887) o colágeno se deposita principalmente na submucosa e é o principal responsável pelas propriedades mecânicas da anastomose. Assim, esse estudo contou com a avaliação isolada do colágeno submucoso (medida 1), a qual não demonstrou diferença estatística significativa na quantidade anastomótica de colágenos I e III e, também, na relação IMaC entre os grupos GLY e GLN.

BRÁSKEN et al. (1991) identificaram que a expressão de RNAm de colágenos I e III em anastomoses colônicas de ratos ocorreu principalmente em fibroblastos da submucosa, serosa e interface anastomótica. Dessa forma, buscou-se avaliar as diferenças nessas regiões críticas através da determinação de colágenos (I e III) e IMaC nas áreas histológicas 1,3 e 4. Esses resultados, também, não demonstraram diferença estatística entre os grupos GLY e GLN.

Para aumentar a sensibilidade da densitometria ampliou-se a área de amostragem de colágeno mediante determinação dos colágenos (I e III) e do IMaC a partir da análise conjunta de quatro áreas (1,2,3 e 4) e de uma medida panorâmica através óptica microscópica menor (estudo piloto, com resultados não apresentados) que abrangeu a totalidade das camadas na mesma medida. Esses dois tipos de medidas de colágeno não se excluem e reforçam os resultados. Porém, em nenhuma das avaliações obteve-se diferença significativa entre os grupos GLY e GLN.

Em concordância com as medidas mecânicas da anastomose, a determinação da densitometria do colágeno, também, não demonstrou benefícios na cicatrização de anastomose colônica de ratos desnutridos suplementados com Gln.

No estudo de COSTA et al. (2003), o autor evidenciou diferenças significativas entre os grupos de animais em estudo havendo maior deposição de colágeno I em ratos suplementados com Gln e maior quantidade de colágeno III nas

anastomoses de ratos suplementados com Gly, demonstrando que o processo cicatricial no cólon de animais que receberam Gln se encontrava em fase mais avançada. Essas diferentes evidências podem ser explicadas pela ausência da desnutrição e seus efeitos negativos sobre a cicatrização no estudo de COSTA et al. (2003). Além disso, no estudo de COSTA et al. (2003) não houve ótima correlação entre os achados mecânicos e histológicos, diferentemente do que ocorreu neste estudo, que contou ainda com evidências reforçadas através dos diferentes cruzamentos histológicos com resultados sempre constantes.

### 5.3 PERSPECTIVAS FUTURAS

Os complexos eventos de cicatrização alteram-se, significativamente, durante estados de desnutrição e hipermetabolismo. A falha da cicatrização colônica traz graves prejuízos com elevação da morbimortalidade. Independentemente do local em que se desenrola o reparo tecidual o objetivo deve ser prover o organismo com ótima nutrição para que sua priorização da cicatrização de ferida possa ocorrer dentro de um ambiente hospedeiro ideal.

A utilização de Gln pode ser entendida como suprimento de uma deficiência já que em grande parte das dietas esse substrato não está incluído. Várias evidências confirmam sua importância durante estados de hipermetabolismo, porém sua utilização visando compensar os déficits produzidos pela desnutrição no processo cicatricial não se demonstrou suficiente.

Além da nutrição otimizada, com suprimento de eventuais déficits, é necessário investigar a influência de outros nutrientes como o butirato, verificar a influência de outros imunonutrientes como a arginina e testar, também, a influência de um composto desses vários elementos na cicatrização do cólon.

Deve-se buscar elemento isonitrogenado e totalmente inerte para que se possa fazer controle ideal da investigação. Outra possibilidade seria a utilização de um composto de aminoácidos para controlar os possíveis efeitos benéficos de um aminoácido em especial.

A utilização da imunohistoquímica na comprovação dos resultados histológicos é metodologia promissora no estudo da cicatrização. Marcadores específicos de colágeno e de outros componentes do processo de cicatrização garantirão mais exatidão e segurança de resultados.



## **6. CONCLUSÃO**

Com base nos resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que a suplementação da realimentação oral perioperatória com Glutamina não tem efeito significativo na cicatrização de anastomoses colônicas em ratos desnutridos avaliados mediante parâmetros morfológicos e tensiométricos.

## REFERÊNCIAS

ABETE, M.; RONCHETTI, V.; CASANO, A., PESCIO; G., **Anastomotic leakage after traditional surgery of the colon and rectum.** *Minerva Chir.* 58(2):167-74, 2003.

ALBINA, J.E. **Nutrition and Wound Healing.** *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition;* 18:367-376, 1994.

ARDAWI, M.S.M.; NEWSHOLME, E.A. **Fuel utilization in colonocytes of the rat.** *Biochem J.* 231:713-719, 1985.

BALLANTYNE GH. **Intestinal Suturing: Review of the Experimental Foundations for Traditional Doctrines.** *Dis Colon Rectum;* 26:836-843, 1983.

BEATTIE; A.H., PRACH; A.T., BAXTER; J.P., PENNINGTON; C.R. **A randomized controlled trial evaluating the use of enteral nutritional supplements postoperatively in malnourished patients.** *Gut* 46:813-8, 2000.

BENNETT; N.T., SCHULTZ; G.S. **Growth factors and wound healing: biochemical properties of growth factors and their receptors.** *Am. J. Surg.* 165(6):728-37, 1993.

BLOMQUIST; P., JIBORN; H., ZEDERFELDT; B. **The effect of relative bowel rest on collagen metabolism and suture holding capacity in the colonic wall.** *Res. Exp. Med. Berl.* 184:221-6, 1984.

BOELENS, P.G.; NIJVELDT, R.J.; HOUDIJK, A.P.J. MEIJER, S.; LEEUWEN, P.A.V. **Glutamine alimentation in catabolic state.** *J Nutr.* 131:2569S-2577S, 2001.

BOELENS; P.G., HOUDIJK; A.P.J., THOUARS; H.N., TEERLINK; T., VAN ENGELAND; M.I.A., HAARMAN; H.J.T.M., VAN LEEUWEN; P.A.M. **Plasma taurine concentrations increase after enteral glutamine supplementation in trauma patients and stressed rats.** *Am. J. Clin. Nutr.* 77:250-6, 2003.

BOZZETTI F, GAVAZZI C, MICELI R, ROSSI N, MARIANI L, COZZAGLIO L, BONFANTI G, PIACENZA S. **Perioperative total parenteral nutrition in malnourished gastrointestinal câncer patients: a randomized clinical trial.** *J. Parent. Enteral Nutr,* 24(1):7-14, 2000.

BRÁSKEN; P., RENVALL; S., SANDBERG; M. **Fibronectin and collagen gene expression in healing experimental colonic anastomoses.** *Br.J.Surg.* 78(9):1048-1052, 1991.

BRASKEN; P. **Healing of experimental Colon Anastomosis.** Eur. J. Surg. Suppl. 566:1-51, 1991.

BUCHMAN; A.L. **Glutamine: commercially essential or conditionally essential ? A critical appraisal of the human data.** Am. J. Clin. Nutr. 74:25-32, 2001.

CABAK; V., DICKERSON; J.W.T., WIDDOWSON; E.M. **Response of young rats to deprivation of protein or of calories.** Br. J. Nutr. 17:601-5, 1963.

CAMPOS, A.C.; MEGUID, M.M.; COELHO, J.C. **Factors influencing outcome in patients with gastrointestinal fistula.** Surg Clin North Am. 76(5):1191-8, 1996.

CARREL; A. **The treatment of wounds.** J.A.M.A. 55:2148, 1910.

CHAMBERS, W.M.; MORTENSEN, N.J. **Postoperative leakage and abscess formation after colorectal surgery.** Best Pract Res Clin Gastroenterol. 18(5):865-80, 2004.

CHOWCAT, N.L., SAVAGE, F.J., HEMBRY, R.M., et al. **Role of collagenase in colonic anastomoses: A reappraisal.** Br J Surg 75: 330,1988.

CIHAN A, OGUZ M, ACUN Z, UÇAN BH, ARMUTCU F, GÜREL A, ULUKENT SC. **Comparison of early postoperative enteral nutrients versus chow on colonic anastomotic healing in normal animals.** Eur. Surg. Res. 36(2):112-5, 2004.

CLARK AH. **Effect of diet on healing of wounds.** Bull. Johns Hopkins Hosp. 30:117, 1919.

CLARK RAF: **Wound repair.** In: KUMAR, ROBBINS, COTRAN: **Pathologic Basis of Disease**, 7th ed., Ed. Saunders, p.112, 2005.

CONSTANTINE; V.S., MOWRY; R.W. **Selective staining of human dermal collagen: the use of picosirius red F3BA with polarization microscopy.** J. Invest Dermat. 50(5):419-24, 1968.

COSTA, M.R.M.; CAMPOS, A.C.L.; COELHO, J.C.U. BARROS e MATSUMOTO. **Oral Glutamine and the Healing of Colonic Anastomoses in Rats.** J.Parent.Enteral.Nutr. 27(3):182-6, 2003.

CRONIN; K., JACKSON; D.S., DUMPHY; J.E. **Changing bursting strength and collagen content of the healing colon.** Surg. Gynecol. Obstet. 126(4):747-53, 1968.

DALY, J.M.; VARS, H.M.; DUDRICK, S.J. **Effects of protein depletion on strength of colonic anastomoses.** Surg Gynecol Obstet. 134(1):15-21, 1972.

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

DOILLON C.J., DUNN M.G., BENDER E., et al. **Collagen fiber formation in repair tissue: Development of strength and toughness.** Coll Relat Res 5:481,1985.

DUGGAN; C., GANNON; J., WALKER; W.A. **Protective nutrients and functional foods for the gastrointestinal tract.** Am. J. Clin. Nutr. 75:789-808, 2002.

EGER; E.I., JOHNSON; B.H. **Rates of awakening from anesthesia with I-653, halothane, isoflurane, and sevoflurane: a test of the effect of anesthetic concentration and duration in rats.** Anesth. Analg. 66(10):977-82, 1987.

ELIA; M., LUNN; P.G. **The Use of Glutamine in the Treatment of Gastrointestinal Disorders in Man.** Nutrition. 13(7/8):743-7, 1997.

EL-MALT M, CELEN W, BOTERBERG T, CLAEYS G, DE HEMPTINNE B, NEVE W.D., PATTYN P. **Does the addition of glutamine to total parenteral nutrition have beneficial effect on the healing of colon anastomosis and bacterial translocation after preoperative radiotherapy.** Am J Clin Oncol 26(3):e54-9, 2003.

FAHR; M.J., KORNBLUTH; J., BLOSSOM; S., SCHAEFFER; R., KLIMBERG; V.S. **Glutamine enhances immunoregulation of tumor growth.** J. Parenter. Enteral Nutr. 18:471-6, 1994.

FAST; J., NELSON; C., DENNIS; C. **Rate of gain in strength in sutured abdominal wall wounds.** Surg. Gynecol. Obstet. 84:685-9, 1947.

FURST; P., POGAN; K., STEHLE; P. **Glutamine Dipeptides in Clinical Nutrition.** Nutrition 13(7/8):731-7, 1997.

FURST; P. **New developments in glutamine delivery.** J. Nutr. 131:2565S-2568S, 2001.

GARCIA-OLMO; D., LUCAS; F.J., PAVA; J., LOPEZ-FANDO; J. **The relation of the adhesion phenomenon and the experimental resistance of colonic anastomoses. The effect of epiploplasty.** Nutr. Hosp. 9(6):385-93, 1994.

GETZEN LC, HOLLOWAY CK. **Comparative study of intestinal anastomotic healing in inverted and everted closures.** Surg Gynecol Obstet. 123:1219-1227, 1966.

GOLIGHER, J.C.; GRAHAM, N.G.; DOMBAL, F.T. de **Anastomotic dehiscence after anterior resection of rectum and sigmoid.** Br J Surg 57(2):109-18, 1970.

GONÇALVES; C. **Cicatrização de anastomose colônica e nutrição pré-operatória em ratos desnutridos: estudo tensiométrico e de deposição do colágeno.** Curitiba, 2005. 80 f. Dissertação (Mestrado) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

GOTOH; H., MATSUMOTO; Y., IMAMURA; K. **General Anesthesia of Infant Mice by Isoflurane Inhalation for Median-Duration Surgery.** Exp. Anim. 53(1):63-5, 2004.

GRAHAM M.F., DRUCKER, D.E., DIEGELMANN R.F, ELSON CO. **Collagen synthesis by human intestinal smooth muscle cells in culture.** Gastroenterology 92:400, 1987.

GRECA; F.H., NORONHA; L., BENDHACK; M., FERES; A., SOCCOL; A., DUDA; J.R. **Use of small intestine submucosa as ureteral allograft in pigs.** Intern. Braz. J. Urol. 30(4):327-35, 2004.

GRECA; F.H., BIONDO-SIMÕES; M.L.P., IOSHI; S., SANTOS; E.A.A., CHIN; E.W.K., TAWIL; I.I.E., STALBSCHMIDT; F.L. **Cicatrização de anastomoses do colon esquerdo com doença inflamatória. Estudo experimental em ratos.** Acta Cir. Bras. 15:41S-46S, 2000.

GREENHALGH, D.G.; GAMELLI, R.L. **Is impaired wound healing caused by infection or nutritional depletion?** Surgery. 102(2):306-312, 1987.

GUENAGA, K.F.; ATALLAH, A.N.; CASTRO, A.A., MATOS; D.D.M., WILLE-JORGENSEN; P. **Mechanical bowel preparation for elective colorectal surgery.** The Cochrane Database Syst Rev. 25(1):CD001544. DOI: 10.1002/14651858.CD001544.pub2, 2005.

HALL; J.C., HELL; K., McCAULEY; R. **Glutamine.** Br. J. Surg. 83:305-12, 1996.

HALL; J.C. **Glycine.** J.Parent.Enteral.Nutr. 22(6):393-8, 1998.

HALSTED, W.S. **Circular Suture of the Intestine: an experimental study,** Am. J. Med. Sci. 94:436-461, 1887.

HAMMARGVIST; F., WERNERMAN; J., ALI; R., DECKEN; A.V.D. VINNARS; E. **Addition of Glutamine to Total Parenteral Nutrition After Elective Abdominal Surgery Spares Free Glutamine in Muscle, Counteracts the Fall in Muscle Protein Synthesis and Improves Nitrogen Balance.** Ann. Surg. 209(4):455-61, 1989.

HARVEY; S.C., HOWES; E.L. **Effect of high protein diet on the velocity of growth of fibroblasts in the healing wound.** Ann. Surg. 91:641-6, 1930.

HARKNESS; M., HARKNESS; R.D., JAMES; D.W. **The effect of a protein-free diet on the collagen content of mice.** J. Physiol. 144:307-10, 1958.

HAWLEY, P.R. **Collagenase activity and colonic anastomotic breakdown.** Br J Surg 57:256-61, 1970.

HENDRIKS T, MASTBOOM, W.J. **Healing of experimental intestinal anastomoses. Parameters for repair.** Dis Colon Rectum 33:891-901, 1990.

HERRMANN; J.B., WOODWARD; S.C., PULANSKI; E.J. **Healing of colonic anastomoses in the rat.** Surg. Gynecol. Obstet. 119:269-75, 1964.

HESP F, HENDRIKS T, SCHILLING PH, LUBBERS EJ, deBOER HH. **Histological features of wound repair: a comparison between experimental ileal and colonic anastomoses.** Br J Exp Pathol. 66:511-518, 1985.

HOIER-MADSEN, K.; HANSEN, J.B.; LINDENBERG, H.J. **Anastomotic leakage following resection for cancer of the colon and rectum.** Acta Chir Scand. 141(4):304-9, 1975.

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

HORGAN; P.G., MANNICK; J.A., DUBRAVEC; D.B., RODRICK; M.L. **Effect of low dose recombinant Interleukin-2 plus indomethacin on mortality after sepsis in a murine burn model.** Br. J. Surg. 77:401-4, 1990.

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

IKEUCHI; D., ONODERA; H., AUNG; T., KAN; S., KAWAMOTO; K., IAMAMURA; M., MAETANI; S. **Correlation of Tensile Strength with Bursting Pressure in the Evaluation of Intestinal Anastomosis.** Dig. Surg. 16:478-85, 1999.

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

IRVIN, T.T., GOLIGHER, J.C. **Aetiology of disruption of intestinal anastomoses.** Br J Surg 60:461-464, 1973.

IRVIN; T.T. **The effect of methionine on colonic wound healing in malnourished rats.** Br. J. Surg. 63:237-40, 1976.

IRVIN TT, HUNT TK. **Reappraisal of the healing process of anastomosis of the colon.** Surg Gynecol Obstet. 138:741-6, 1974a.

IRVIN, T.T., HUNT, T.K. **Effect of malnutrition on colonic healing.** Ann Surg 180(5): 765-72, 1974b.

JENSEN; J.C., NWOKEDI; E., BAKER; M.L. **Glutamine supports host while decreasing tumor glutathione after radiation injury.** Assoc. Acad. Surg, 1992.

JEPSON; M.M., BATES; P.C., BROADBENT; P., PELL; J.M., MILLWARD; D.J. **Relationship between glutamine concentration and protein synthesis in rat skeletal muscle.** Am. J. Physiol. 255:166-72, 1988.

JIBORN H, AHONEN J, ZEDERFELDT B. **Healing of experimental colonic anastomoses. The Effect of Suture Technic on Collagen Concentration in the Colonic Wall.** Am. J. Surg. 135:333-340, 1978.

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

JIMENEZ, P.A.; JIMENEZ, S.E. **Tissue and cellular approaches to wound repair.** The American Journal of Surgery. 187(5):56S-64S, 2004.

JONSSON; K., JIBORN; H., ZEDERFELDT; B. **Breaking strength of small intestinal anastomoses.** Am. J. Surg. 145:800-3, 1983.

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

JUNQUEIRA; L.C.U., COSSERMELLI; W., BRENTANI. **Differential staining of collagens tipe I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy.** Arch Histol Jpn 41:267-74, 1978.

JUNQUEIRA; L.C.U., MONTES; G.S., SANCHES; E.M. **The influence of tissue section thickness on the study of collagen by the Picrosirius-Polarization Method.** Histochemistry, 74:153-6, 1982.

KAPADIA; R.C., COLPOYS; M.F., JIANG; Z.M., JOHNSON; D.J., SMITH; R.J., WILMORE; D.W. **Maintenance of skeletal muscle intracellular glutamine during standard surgical trauma.** J. Parent. Enteral Nutr. 9:583-9, 1985.

KHOURY; G.A., WAXMAN; B.P. **Large bowel anastomoses: the Healing process and sutured anastomoses: a review.** Br. J. Surg. 70:61-3, 1983.

KNIGHTLY, J.J.; AGOSTINO, D.; CLIFFTON, E.E. **The effect of fibrinolisyn and heparin on the formation of peritoneal adhesions.** Surgery. 52:250-258, 1962.

KORUDA, M.J.; ROLANDELLI, R.H. **Experimental studies on the healing of colonic anastomoses.** J Surg Res 48:504, 1990.

LACEY, J.M.; WILMORE, D.W. **Is Glutamine a conditionally essential amino acid ?** Nutr Rev. 48:297-309, 1990.

LAMBERT; R. **Surgery of the Digestiv System in the Rat.** Ed. Charles C. Thomas 23:261-264, 1965.

LAW, N.W.; ELLIS, H. **The effect of parenteral nutrition on the healing of abdominal wall wounds and colonic anastomosis in protein-malnourished rats.** Surgery, 107(4):449-454, 1990.

LEITE, C.V.S.; NARESSE, L.E.; KOBAYASI, S.; MINOSSI, J.G.; BURINI, R.C.; CURI, P.R.; HOSSNE, W.S. **Efeito da desnutrição protéica na anastomose do cólon distal no rato. Estudo da força de ruptura e do colágeno tecidual.** Acta Cir. Bras., São Paulo. 8(4):145-150, 1993.

LEMOS, ICMC. **Influência da desnutrição intra-uterina na cicatrização da parede abdominal de ratos lactentes avaliada mediante estudo tensiométrico e da morfometria do colágeno.** Curitiba, 2002. Tese de Doutorado – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

MADDEN JW, PEACOCK EE Jr. **Studies on the biology of collagen during wound healing III: Dynamic metabolism of scar collagen and remodeling of dermal wounds.** Ann Surg. 174:511-15. 1971.

MÄKELÄ, J.T.; KIVINIEMI, H.; LAITINEN, S. **Risk factors for anastomotic leakage after left-sided colorectal resection with rectal anastomosis.** Dis Colon Rectum. 46(5):653-60, 2003.

MANDELBAUM; S.H., SANTIS; E.P.D., MANDELBAUM; M.H.S. **Cicatrização: Conceitos atuais e recursos auxiliares – Parte I.** An. Bras. Dermatol. 78(4):393-410, 2003.

MANDIR; N., GOODLAD; R.A. **The effects of Glutamine on intestinal epithelial cell proliferation in parenterally fed rats.** Gut 44:608-14, 1999.

MCCAULEY, R., PLATELL, C., HALL, J., MCCULLOCH; R. **Effects of glutamine infusion on colonic anastomotic strength in the rat.** J.P.E.N. 15(4):437-9, 1991.

MOORE; F.D. **Metabolic Care of the Surgical Patient**. WB Saunders Co, Philadelphia, 1959.

MORI, N., DOI, Y., HARA, K., YOSHIZUKA M, OHSATO K, FUJIMOTO S. **Role of multipotent fibroblasts in the healing colonic mucosa of rabbits. Ultrastructural and immunocytochemical study**. *Histol Histopathol* 7:583-86,1992.

NARESSE; L.E., MENDES; E.F., CURI; P.R., LUCCHIARI; P.H., KOBAYASI; S. **Aparelho para medida da força de ruptura das anastomoses intestinais**. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Méd. S. Paulo* 42(5):204-208, 1987.

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

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

NARESSE, L.E.; LEITE, C.V.S.; RODRIGUES, M.A.M.; ANGELELI, A.Y.O.; MINOSSI, J.G.; KOBAYASI, S. **Efeito da peritonite fecal na cicatrização do cólon distal no rato. Avaliação anatomopatológica, estudo da força de ruptura e da hidroxiprolina tecidual**. *Acta Cir. Bras.* 8(2):48-53, 1993.

OEHLER R., ROTH E. **Glutamine metabolism**. In: **Metabolic and therapeutic aspects of amino acids in clinical nutrition**. 2ª Edição. Ed. CRC Press 11:169-182, 2004.

ORGILL; D., DEMLING; R.H. **Current concepts and approaches to wound healing**. *Crit. Care Med.* 16(9):899-908, 1988.

O'RIORDAIN; M.G., FEARON; K.C.H., ROSS; J.A., ROGERS; P., FALCONER; J.S., BARTOLO; D.C.C., GARDEN; O.J., CARTER; D.C. **Glutamine-Supplemented Total Parenteral Nutrition Enhances T-Lymphocyte Response in Surgical Patients Undergoing Colorectal Resection**. *Ann. Surg.* 220(2):212-21, 1994.

PAULO FL. **Effects of oral supplement of L-glutamine on diverted colon wall**. *J Cell Mol Med.* 6(3): 377-82, 2002.

POTSIC; B., HOLLIDAY; N., LEWIS; P., SAMUELSON; D., DeMARCO; V., NEU; J. **Glutamine Supplementation and Deprivation: Effect on Artificially Reared Rat Small Intestinal Morphology**. *Pediatr. Res.* 52(3):430-6, 2002.

PULANSKI; E.J., NOYES; H.E., EVANS; J.R., BRAME; R.A. **The influence of antibiotics on experimental endogenous peritonitis.** Surg. Gyn. Obst. 99:391-6, 1954.

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. 62:160-5, 1995.

SALVALAGGIO; P.R.O., NETO; C.Z., TOLAZZI; A.R.D., GASPARETTO; E.L., COELHO; J.C.U., CAMPOS; A.C.L. **Oral Glutamine does not prevent bacterial translocation in rats subjected to intestinal obstruction and *Escherichia coli* challenge but reduces systemic bacteria spread.** Nutrition. 18:334-7, 2002.

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

SCHLOERB; P.R. **Immune-Enhancing Diets: Products, Components, and Their Rationales.** J.Parent. Enteral. Nutr. 25(2):S3-S7, 2001.

SISSON, R., LANG, S., SERKES, K., PAREIRA; M. **Comparison of wound healing in various nutritional deficiency states.** Surgery 44(4):613-7, 1958.

SOUBA, W.W.; SMITH, R.J.; WILMORE, D.W. **Glutamine metabolism by the intestinal tract.** J.Parent. Enteral Nutr. 9:608-17, 1985.

SOUBA, W.W.; KLIMBERG, V.S.; PLUMLEY, D.A. SALLOUM, R.M.; FLYNN, T.C.; BLAND, K.I.; COPELAND, E.M. **The role of glutamine in maintaining a healthy gut and supporting the metabolic response to injury and infection.** J Surg Res. 48(4):383-391, 1990.

SOUBA; W.W. **Glutamine: a key substrate for the splanchnic bed.** Annu. Rev. Nutr. 11:285-309, 1991.

SOUSA; J.B., SOARES; E.G., APPRILLI; F. **Effects of Diclofenac Sodium on Intestinal Anastomotic Healing.** Dis. Colon Rectum 34(7):613-7, 1991.

STEIGER; E., ALLEN; T.R., DALY; J.M., VARS; H.M., DUDRICK; S.J. **Beneficial effects of immediate post-operative total parenteral nutrition.** Surg Forum. 22:89-90, 1971.

SWEAT; F., PUCHTLER; H., ROSENTHAL; S.I. **Sirius Red F3BA as a Stain for Connective Tissue.** Arch. Pathol. 78:69-72, 1964.

THE VETERANS AFFAIRS TOTAL PARENTERAL NUTRITION COOPERATIVE STUDY GROUP. **Perioperative Total Parenteral Nutrition in Surgical Patients.** NEJM, 325(8):525-32, 1991.

THOMPSON, W.D., RAVDIN, I.S., FRANC, I.L. **The effect of hypoproteinemia on wound disruption.** Arch Surg. 36:500, 1938.

THORNTON, F.J., BARBUL, A. **Healing in the gastrointestinal tract.** Surg. Clin. North Am. 77(3):549-573, 1997.

TRUBIAN, P. **Octreotide subcutâneo e cicatrização de sutura gástrica em ratos: estudo tensiométrico e da morfometria do colágeno.** Curitiba, 2004. 68 f. Dissertação (Mestrado) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

VAN WINKLE; W. Jr. **The tensile strength of wounds and factors that influence it.** Surg. Gynecol. Obstet. 129(4):819-42, 1969.

VAN WINKLE; W. Jr., HASTINGS, J.C., BARKER, E. et al. **Role of the fibroblast in controlling rate and extent of repair in wounds of various tissues.** In KULONEN E., PIKKARAINEN, J. **Biology of Fibroblast.** New York, Academy Press, 559-570, 1973.

VAN WINKLE; W. Jr. **Wound contraction.** Surg Gynecol Obstet. 125:131, 1967.

VIZZOTTO Jr, A.O. **Influência da cisplatina administrada no pré e pós-operatório sobre a cicatrização de anastomoses colônicas em ratos testada pela força de resistência à tração.** Curitiba, 2001. 91f. Dissertação (Mestrado) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

WARD; M.W., DANZI; M., LEWIN; M.R., RENNIE; M.J., CLARK; C.G. **The effects of subclinical malnutrition and refeeding on the healing of experimental colonic anastomoses.** Br. J. Surg. 69(6)308-10, 1982.

WEIR; C.D., ANDERSON; N.H., McCAIGUE; M., HALLIDAY; M.I., ROWLANDS; B.J. **The effect of a Glutamine supplemented elemental diet on disease activity in a chronic colitis model.** J.Parent. Enteral.Nutr. 17(1):34S, 1993.

WILLIAMS, J.Z.; BARBUL, A. **Nutrition and wound healing.** Surg Clin North Am. 83(3) 571-596, 2003.

WILMORE, D.W. **The effect of glutamine supplementation in patients following elective surgery and accidental injury.** J Nutr. 131:2543S-2549S, 2001.

WINDMUELLER HG. **Glutamine utilization by the small intestine.** Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol. 53:201-37, 1982.

WISE L, McALISER W, STEIN T, SCHUCK P. **Studies on the healing of anastomoses of small and large intestine.** Surg Gynecol Obstet. 141:190-194, 1975.

WITTE, M.B., BARBUL, A. **General Principles of Wound Healing.** The Surgical Clinics of North America. W.B. Saunders Company; 77(3): 516, 1997.

WU; F.C., AYRIZONO; M.L.S., FAGUNDES; J.J., COY; C.S.R., GÓES; J.R.N., LEONARDI; L.S. **Estudos biomecânicos da ação de aderências sobre a anastomose cólica. Trabalho experimental em ratos.** Acta Cirur. Bras. 18(3):216-23, 2003.

ZAIZEN; Y., FORD; E.G., COSTIN; G., ATKINSON; J.B. **Stimulation of wound bursting strength during protein malnutrition.** J. Surg. Res. 49:333-6, 1990.