

ESTUDO DA TAXA DE HIDROXIPROLINA TECIDUAL  
NOS DIVERSOS SEGMENTOS DO CANAL  
ALIMENTAR NORMAL DO CÃO PELO MÉTODO  
FOTOCOLORIMÉTRICO UTILIZANDO  
O REATIVO DE EHRlich

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná — Nível de Mestrado.

Coordenador do Curso: Prof. Dr. Osvaldo Malafaia

17/10/2

ULRICH ANDREAS DIETZ

ESTUDO DA TAXA DE HIDROXIPROLINA TECIDUAL NOS  
DIVERSOS SEGMENTOS DO CANAL ALIMENTAR NORMAL  
DO CÃO PELO MÉTODO FOTOCOLORIMÉTRICO  
UTILIZANDO O REATIVO DE EHRLICH

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em  
Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde da  
Universidade Federal do Paraná - Nível de Mestrado.

Coordenador do Curso: Prof. Dr. Osvaldo Malafaia

CURITIBA

1993

Orientador:

Prof. Dr. Nicolau Gregori Czecko

"Cultivar a tradição não significa guardar as cinzas,  
significa manter a chama."

Helmut Thielicke

"Die Warum-Frage wird nicht beantwortet, aber der Fragende  
braucht sie nicht mehr zu stellen. Er ist frei.  
Daß der Gebundene von seinen Fragen frei ist, das ist das Äußerste,  
das in dieser Welt zu erreichen ist. Die Einsicht in die  
Geheimnisse Gottes und die Lösung der Rätsel  
wird uns - vielleicht - die andere Welt gewähren."

Jörk Zink

**Aos meus pais**

**Astrid e Emil**

**À memória de meu amigo**

**Dr. theol. Gerhard Sautter,**

**que já está na outra - eterna - vida.**

## AGRADECIMENTOS

*"Rendei graças ao Senhor, porque ele é bom,  
porque a sua misericórdia dura para sempre."*

Salmo 136:1

Ao Prof. Dr. **Nicolau Gregori Czezko**, amigo e orientador deste trabalho, que pela sua paciência e sabedoria, mostrou-me limitações e ajudou-me a superá-las.

Ao Prof. Dr. **Oswaldo Malafaia**, Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná, pela confiança em mim depositada e pela constante porta aberta, amiga e conselheira.

Ao Dr. **Benur Polonio**, pela constante amizade, por ter me cedido o tema do presente estudo, acompanhado incansavelmente o trabalhoso aprendizado desta técnica e pelas valiosas sugestões em todas as fases da realização deste.

Ao Prof. Dr. **João Carlos Domingues Repka**, pela amizade e pelos constantes conselhos técnicos, fundamentais para as dosagens bioquímicas.

Aos colegas Dr. **Paulo Afonso Nunes Nassif**, Dra. **Luciane Bittencourt Carias de Oliveira**, Dr. **Roberto Duarte-Bogado**, Dra. **Ana Bordón** e Dra. **Graciela Medina Insfrán**, bem como aos acadêmicos da Faculdade Evangélica de Medicina do Paraná, **Marcel Heibel**, **Pablo Fabian Aviles Cabrera**, **Magnum Zanelatto** e **Artur Zanelatto**, pelo auxílio nas incontáveis horas de laboratório.

Ao amigo Dr. med. **Friedemann Ruß** (Alemanha), pelo valioso auxílio na busca internacional de literatura.

Ao Prof. Dr. **Sérgio Brenner**, à Prof<sup>a</sup>. Dra. **Mirnaluci Gama**, ao Prof. Dr. **Ari Leon Jurkiewics**, ao Prof. Dr. **Coriolano Caldas Silveira da Motta**, ao Prof. Dr. **Acir Mulinari**, ao Prof. Dr. **Miguel Carlos Riella**, ao Prof. Dr. **João Carlos Simões** e ao Dr. **Luiz Ernesto Wendler**, pelo exemplo de vida e de médicos. Vocês marcaram de forma decisiva minha formação.

Ao amigo, Sr. **Alcides Carlos Pereira**, da CIRUMÉDICA S.A., pela confiança ao desconhecido, que viabilizou este trabalho.



## SUMÁRIO

	<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>xi</b>
	<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>xv</b>
	<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>xvi</b>
	<b>FARMACOPÉIA .....</b>	<b>xvii</b>
	<b>RESUMO .....</b>	<b>xviii</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODO .....</b>	<b>19</b>
3.1	Fase pré-estudo .....	20
3.2	Obtenção das amostras teciduais, das soluções-padrão de trabalho de hidroxiprolina e das soluções brancas ..	20
3.2.1	Indução anestésica e sacrifício dos cães .....	20
3.2.2	Retirada e acondicionamento dos fragmentos teciduais .	21

3.2.3	Recorte e pesagem das amostras teciduais .....	21
3.2.4	Obtenção das soluções-padrão de trabalho de hidroxiprolina e brancas .....	22
3.3	Preparo de tubos de vidro e dos reagentes .....	24
3.3.1	Preparo de tubos de vidro .....	24
3.3.2	Preparo dos reagentes .....	24
3.4	Determinação bioquímica da hidroxiprolina .....	26
3.4.1	Hidrólise ácida das amostras .....	26
3.4.2	Oxidação .....	26
3.4.3	Formação de pirrol .....	28
3.4.4	Leitura em espectrofotômetro .....	29
3.5	Cálculo final da hidroxiprolina .....	30
3.6	Determinação da curva de linearidade .....	32
3.7	Avaliação estatística .....	32
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>33</b>
4.1	Peso dos animais .....	33
4.2	Peso das amostras teciduais .....	33
4.3	Soluções-padrão .....	35

4.4	Solução branca .....	36
4.5	Concentração de hidroxiprolina em miligramas por grama de amostra tecidual nos diversos segmentos estudados .....	37
4.5.1	Esôfago cervical .....	37
4.5.2	Esôfago torácico .....	38
4.5.3	Estômago .....	39
4.5.4	Duodeno .....	40
4.5.5	Jejuno-ílio .....	41
4.5.6	Colo transverso .....	42
4.5.7	Colo sigmóide .....	43
4.5.8	Retos .....	44
4.6	Correlação entre o peso corpóreo dos cães e a taxa de hidroxiprolina .....	45
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>47</b>
5.1	Escolha do animal .....	48
5.2	Fase pré-estudo .....	48
5.3	Obtenção dos fragmentos teciduais .....	48
5.4	Armazenamento dos fragmentos teciduais .....	49

5.5	Métodos de identificação da hidroxiprolina .....	49
5.6	Determinação bioquímica quantitativa da hidroxiprolina .....	50
5.6.1	Hidrólise ácida das amostras .....	51
5.6.2	Oxidação .....	52
5.6.3	Formação e extração do pirrol .....	54
5.6.4	Leitura espectrofotométrica .....	54
5.6.5	Cálculo final .....	55
5.7	Peso das amostras teciduais .....	56
5.8	Soluções-padrão .....	57
5.9	Concentração de hidroxiprolina em miligramas por grama de tecido da amostra .....	57
5.10	Correlação entre o peso corpóreo e a taxa de hidroxiprolina tecidual .....	59
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>60</b>
	<b>ABSTRACT .....</b>	<b>61</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>62</b>

## LISTA DE TABELAS

1	Distribuição das amostras teciduais conforme o segmento do canal alimentar e o seu respectivo número .....	22
2	Distribuição das soluções-padrão de trabalho de hidroxiprolina nas diversas concentrações (em microgramas por mililitro) e das soluções brancas, bem como as suas respectivas identificações numéricas ....	23
3	Distribuição dos animais por peso corpóreo em quilogramas .....	33
4	Distribuição do peso das amostras teciduais em gramas e a média (m) do peso, conforme os segmentos estudados e os seus respectivos números (n <sup>o</sup> ) .....	34
5	Correlação entre o volume (V) da solução-padrão de estoque de hidroxiprolina (36 mg / ml), a concentração das soluções-padrão de trabalho de hidroxiprolina (C-SPT) e os valores de absorbância (Abs.) obtidos pela leitura espectrofotométrica das diversas amostras (n <sup>o</sup> ) .....	35

- 6 Correlação entre o número (n<sup>o</sup>) da amostra tecidual, seu peso em gramas (g), a leitura da absorvância do seu cromógeno (Abs.), a diferença entre a absorvância do cromógeno da amostra tecidual e a absorvância da solução branca (Abs-b), a taxa de hidroxiprolina em miligramas por mililitro de cromógeno (mg/ml), a razão entre o peso da amostra tecidual e o volume de diluição do hidrolisado (g/15ml) e a concentração final de hidroxiprolina em miligramas por grama, obtidos para o esôfago cervical dos cães (amostras teciduais n<sup>o</sup> 01-08) ..... 37
- 7 Correlação entre o número (n<sup>o</sup>) da amostra tecidual, seu peso em gramas (g), a leitura da absorvância do seu cromógeno (Abs.), a diferença entre a absorvância do cromógeno da amostra tecidual e a absorvância da solução branca (Abs-b), a taxa de hidroxiprolina em miligramas por mililitro de cromógeno (mg/ml), a razão entre o peso da amostra tecidual e o volume de diluição do hidrolisado (g/15ml) e a concentração final de hidroxiprolina em miligramas por grama, obtidos para o esôfago torácico dos cães (amostras teciduais n<sup>o</sup> 09-16) ..... 38
- 8 Correlação entre o número (n<sup>o</sup>) da amostra tecidual, seu peso em gramas (g), a leitura da absorvância do seu cromógeno (Abs.), a diferença entre a absorvância do cromógeno da amostra tecidual e a absorvância da solução branca (Abs-b), a taxa de hidroxiprolina em miligramas por mililitro de cromógeno (mg/ml), a razão entre o peso da amostra tecidual e o volume de diluição do hidrolisado (g/15ml) e a concentração final de hidroxiprolina em miligramas por grama, obtidos para o estômago dos cães (amostras teciduais n<sup>o</sup> 17-24) ..... 39

9	<p>Correlação entre o número (n<sup>o</sup>) da amostra tecidual, seu peso em gramas (g), a leitura da absorbância do seu cromógeno (Abs.), a diferença entre a absorbância do cromógeno da amostra tecidual e a absorbância da solução branca (Abs-b), a taxa de hidroxiprolina em miligramas por mililitro de cromógeno (mg/ml), a razão entre o peso da amostra tecidual e o volume de diluição do hidrolisado (g/15ml) e a concentração final de hidroxiprolina em miligramas por grama, obtidos para o duodeno dos cães (amostras teciduais n<sup>o</sup> 25-32) .....</p>	40
10	<p>Correlação entre o número (n<sup>o</sup>) da amostra tecidual, seu peso em gramas (g), a leitura da absorbância do seu cromógeno (Abs.), a diferença entre a absorbância do cromógeno da amostra tecidual e a absorbância da solução branca (Abs-b), a taxa de hidroxiprolina em miligramas por mililitro de cromógeno (mg/ml), a razão entre o peso da amostra tecidual e o volume de diluição do hidrolisado (g/15ml) e a concentração final de hidroxiprolina em miligramas por grama, obtidos para o jejuno-íleo dos cães (amostras teciduais n<sup>o</sup> 33-40) .....</p>	41
11	<p>Correlação entre o número (n<sup>o</sup>) da amostra tecidual, seu peso em gramas (g), a leitura da absorbância do seu cromógeno (Abs.), a diferença entre a absorbância do cromógeno da amostra tecidual e a absorbância da solução branca (Abs-b), a taxa de hidroxiprolina em miligramas por mililitro de cromógeno (mg/ml), a razão entre o peso da amostra tecidual e o volume de diluição do hidrolisado (g/15ml) e a concentração final de hidroxiprolina em miligramas por grama, obtidos para o colo transversal dos cães (amostras teciduais n<sup>o</sup> 41-48) .....</p>	42

- 12 Correlação entre o número (n<sup>o</sup>) da amostra tecidual, seu peso em gramas (g), a leitura da absorbância do seu cromógeno (Abs.), a diferença entre a absorbância do cromógeno da amostra tecidual e a absorbância da solução branca (Abs-b), a taxa de hidroxiprolina em miligramas por mililitro de cromógeno (mg/ml), a razão entre o peso da amostra tecidual e o volume de diluição do hidrolisado (g/15ml) e a concentração final de hidroxiprolina em miligramas por grama, obtidos para o colo sigmóide dos cães (amostras teciduais n<sup>o</sup> 49-56) ..... 43
- 13 Correlação entre o número (n<sup>o</sup>) da amostra tecidual, seu peso em gramas (g), a leitura da absorbância do seu cromógeno (Abs.), a diferença entre a absorbância do cromógeno da amostra tecidual e a absorbância da solução branca (Abs-b), a taxa de hidroxiprolina em miligramas por mililitro de cromógeno (mg/ml), a razão entre o peso da amostra tecidual e o volume de diluição do hidrolisado (g/15ml) e a concentração final de hidroxiprolina em miligramas por grama, obtidos para o reto dos cães (amostras teciduais n<sup>o</sup> 57-64) ..... 44



## LISTA DE FIGURAS

1	Extrato de tolueno (camada superior), contendo o pirrol (cromóforo).....	28
2	Reação formadora de cor pelo reativo de EHRLICH: cromógeno.....	29
3	Leitura da absorbância em espectrofotômetro.....	30
4	Curva de correlação (r) das soluções-padrão de trabalho de hidroxiprolina.....	36
5	Comparação entre as taxas de hidroxiprolina nos diferentes segmentos do canal alimentar dos cães.....	45
6	Índice de correlação (r) entre a taxa de hidroxiprolina e o peso corpóreo dos animais, avaliados no conjunto de amostras teciduais estudados para cada segmento.....	46

## LISTA DE ABREVIATURAS

*N* = normal

*M* = molar

pH = potencial de hidrogênio

HCl = ácido clorídrico

KCl = cloreto de potássio

KOH = hidróxido de potássio

H<sub>2</sub>O = água

μg = micrograma

mg = miligrama

g = grama

kg = quilograma

mm = milímetro

cm = centímetro

cm<sup>2</sup> = centímetro quadrado

°C = graus centígrados

## FARMACOPÉIA

- Ácido bórico (Código 165 - E. Merck, Alemanha).  
Ácido clorídrico 0,05N (Quimibras - RJ).  
Ácido clorídrico, P.A. (HCl)(Código 30650, Labsynth - SP).  
Ácido sulfúrico concentrado ( $H_2SO_4$ )(Quimibras - RJ).  
Alanina (Código 1007 - E. Merck, Alemanha).  
Álcool etílico (Etanol, P.A., Quimibras - RJ).  
Cloramina-T (Código 2426 - E. Merck, Alemanha).  
Cloreto de potássio (KCl)(Código 4933 - E. Merck, Alemanha).  
*p*-Dimetilamino-benzaldeído (Código 3058 - E. Merck, Alemanha).  
Éter monometílico de etilenoglicol (Código 15118 - E. Merck, Alemanha).  
Fenoltaleína (Código 7233 - E. Merck, Alemanha).  
Hidroxiprolina (Código 4506 - E. Merck, Alemanha).  
Hidróxido de potássio (KOH)(Código 5021 - E. Merck, Alemanha).  
Mebendazol (Panfugan<sup>®</sup>, Byk)  
Nuvita<sup>®</sup> (adulto para cães, Nuvital).  
Polyvac-6<sup>®</sup> (Lema-Bilogic)  
Tiobarbiturato (1-metil-butil) etil sódico (Thionembotal<sup>®</sup>, Abbott)  
Tiosulfato de sódio ( $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ )(Código 6516 - E. Merck, Alemanha).  
Tolueno (Toluol, P.A., Quimibras - RJ).  
Vacina Anti-Rábica<sup>®</sup> (Instituto Tecnológico do Paraná - TECPAR)

## RESUMO

O presente estudo objetiva determinar a taxa de hidroxiprolina tecidual normal, presente em diversos segmentos do canal alimentar de cães. Para a determinação bioquímica da hidroxiprolina, utilizou-se a técnica proposta por KIVIRIKKO e cols. (1967) e modificada por IBBOTT (1974). O procedimento experimental constou da retirada e armazenamento de fragmentos teciduais de diversos segmentos do canal alimentar de oito cães. Os fragmentos foram recortados conforme um tamanho padrão, constituindo assim as amostras teciduais para o estudo. As amostras teciduais foram pesadas e submetidas a uma hidrólise ácida, sendo que em seguida, os hidrolisados teciduais foram processadas bioquimicamente para a determinação da taxa de hidroxiprolina tecidual. Em paralelo aos hidrolisados teciduais, foram processadas diversas soluções padrão de trabalho de hidroxiprolina (com quantidades conhecidas de hidroxiprolina) e soluções brancas (com ausência absoluta de hidroxiprolina), ambas para permitir uma análise comparativa entre os resultados obtidos pelos hidrolisados teciduais. Finalmente, realizou-se a leitura da absorbância espectrofotométrica das amostras e a determinação final da taxa de hidroxiprolina dos hidrolisados teciduais. A análise dos resultados obtidos a partir das soluções-padrão de trabalho de hidroxiprolina (36, 18, 9 e 4,5  $\mu\text{g/ml}$ ) apresentou alta correlação ( $r=0,9875$ ), demonstrando assim a sensibilidade da técnica. A concentração média de hidroxiprolina presente nas amostras teciduais foi de 6,298 mg/g para o esôfago cervical; 8,688 mg/g para o esôfago torácico; 6,385 mg/g para o estômago; 2,187 mg/g para o duodeno; 3,716 mg/g para o jejuno-ílio; 6,154 mg/g para o colo transverso; 7,289 mg/g para o colo sigmóide; e 8,253 mg/g para o reto. Não encontrou-se correlação entre a taxa de hidroxiprolina tecidual presente nos segmentos do canal alimentar dos cães estudados, em relação ao seu peso corpóreo.

## 1 INTRODUÇÃO

A proteína colágena perfaz cerca de 20-25% do total protéico do organismo e é o principal componente do tecido conjuntivo. Já HALSTED em 1887, em estudos sobre anastomoses intestinais, postula que a resistência mecânica do tubo digestivo está na dependência da camada colágena contida na tela submucosa. Apesar de ser uma molécula complexa, o colágeno é constituído por uma seqüência de três aminoácidos, representados geralmente pela glicina e alanina somados à prolina ou à hidroxiprolina. A única proteína mamífera que contém quantidades significantes de hidroxiprolina é o colágeno. O fato da alta concentração de hidroxiprolina contida no colágeno (aproximadamente 14%) faz dos métodos de determinação da primeira uma maneira muito útil para se estimar as taxas do segundo.

Segundo revisão de BLUMENKRANTZ e HANSEN (1977), a biossíntese celular do colágeno passa por uma série de etapas: 1) síntese intracelular de protocolágeno, 2) hidroxilação de resíduos de prolil e lisil em hidroxiprolina e hidroxilisina, 3) após a glicosilação de resíduos de hidroxilisil, a macromolécula está pronta para ser extrusada para o compartimento extracelular e 4) a macromolécula extrusada é chamada de pró-colágeno. É necessária a liberação enzimática de peptídeos suplementares não-colágenos da molécula de pró-colágeno. A presença dos peptídeos extras confere à molécula de pró-colágeno sua característica solúvel e permite com que ela atue como a forma de transporte do colágeno, prevenindo a fibrilogênese intracelular. Com a liberação dos peptídeos extras a macromolécula é convertida em tropocolágeno, que assume a forma de hélice tripla. 5) Após a desaminação oxidativa de certos resíduos de lisil e hidroxilisil do tropocolágeno, ocorre a formação das ligações inter e intramoleculares, necessárias para a estabilização da molécula de colágeno formada.

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

A determinação bioquímica da taxa de hidroxiprolina contida num fragmento de tecido normal ou em um fragmento de cicatriz tecidual, permite assim, uma avaliação comparativa quantitativa entre as amostras, função direta da qualidade do reparo cicatricial.

O presente estudo objetiva:

1. Reproduzir a linearidade da curva de absorvância espectrofotométrica para padrões previamente conhecidos de hidroxiprolina, utilizando-se a reação colorimétrica pelo reativo de EHRLICH;

2. Realizar a determinação bioquímica da taxa de hidroxiprolina contida em amostras normais do esôfago cervical, do esôfago torácico, do estômago, do duodeno, do intestino delgado, do colo transversal, do colo sigmóide e do reto de cães e analisar comparativamente os resultados obtidos; e

3. Observar a correlação entre o peso corpóreo do cão e a taxa de hidroxiprolina encontrada nos diversos segmentos de seu canal alimentar normal.

pg 60

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

FISCHER (1902), apud DAKIN (1920), foi o primeiro autor a isolar a hidroxiprolina, a partir de uma amostra de gelatina, encontrando como produto final uma quantidade de 3% de hidroxiprolina. DAKIN observa que segundo o processo proposto por FISCHER, a maior parte da hidroxiprolina transforma-se num éster, e assim é perdida.

LANGHELD (1909), apud LANG (1933), foi o primeiro a demonstrar que o hipoclorito transforma a prolina em *n*-pirrolina e analogamente a oxiprolina em *n*-oxipirrolina.

DAKIN (1920) apresenta uma metodologia pioneira no estudo dos aminoácidos constituintes da gelatina e descreve em detalhes procedimentos específicos para a identificação de cada um destes aminoácidos, com especial ênfase à forma de sua extração. Segundo o autor, a hidroxiprolina pode ser extraída de hidrolisados de gelatina, em forma de éster pelo álcool butílico e subseqüentemente recuperada por processos de liberação do éster. Pela extração com o álcool butílico sob pressão normal, pode-se remover facilmente a alanina, a leucina e a fenilalanina, ao passo que sob baixa pressão extrai-se a prolina. Mediante o uso de álcool propílico completa-se a extração da hidroxiprolina. DAKIN sugere que a gelatina apresenta como produto final 14% de hidroxiprolina.

Até a publicação dos trabalhos de LANG (1933), não era possível a microanálise de prolina e oxiprolina, devido à falta de reações colorimétricas típicas e específicas. À exceção do método da extração pelos ésteres, dependia-se exclusivamente de métodos indiretos de análise. FÜRTH e MINNIBECK (1932), apud LANG, foram os primeiros a proporem um método de separação para estes aminoácidos, porém esta metodologia não era precisa e necessitava de uma amostra

inicial de várias gramas de proteína. O autor sugere demonstrativamente que a pirrolina e a oxipirrolina podem ser mensuradas em quantidades muito pequenas mediante reações colorimétricas e desta forma pode-se realizar a determinação quantitativa da prolina e da oxiprolina. Para o autor, a pirrolina e a oxipirrolina são condensados em um pigmento de coloração violeta mediante a reação com *p*-dimetilaminobenzaldeído em solução ácida. A reação descrita por LANG fundamenta-se nas seguintes etapas: a) a amostra inicial de um hidrolisado protéico é tratado com hipoclorito; com esta reação formam-se a pirrolina e a oxipirrolina, que são extraídas pela destilação hídrica; b) uma parte do destilado é usada para a determinação da soma de pirrolina e oxipirrolina pela reação com o *p*-dimetilaminobenzaldeído; c) a outra parte do destilado é utilizada para a determinação isolada de oxipirrolina mediante a condensação com isatina em ácido sulfúrico. A diferença das duas reações determina a quantidade de pirrolina. LANG ressalta que não há diferença nos resultados se a hidrólise da proteína é realizada com solvente ácido ou básico. A leitura da quantidade de cor formada deve ser realizada imediatamente, pois ocorre uma perda rápida na intensidade de cor.

Contemporâneo de LANG e trabalhando em outro laboratório, MORSE (1933) dispunha apenas de métodos indiretos para a determinação de proteínas da pele. O autor descreve uma técnica original que ele aceita ser uma reação colorimétrica específica e qualitativa para hidroxiprolina, acreditando que pela alta taxa de hidroxiprolina no colágeno este método poderá ser útil na avaliação do mesmo. Os reagentes utilizados por MORSE são: a) um álcool secundário; b) peróxido de sódio; e c) ácido clorídrico 5*N*. O fundamento deste método baseia-se no aquecimento do álcool secundário com a amostra e o acréscimo de peróxido de sódio. Segue-se uma mistura vigorosa e evaporação do conteúdo líquido e resfriamento. Mediante a adição de ácido clorídrico e novo aquecimento, origina-se a cor âmbar-rósea.

WALDSCHMIDT-LEITZ e AKABORI (1934) realizam uma análise crítica ao método descrito por LANG (1933); observam que este permite apenas a determinação de oxiprolina e não de prolina e sustentam esta afirmação em experimentos próprios, nos quais utilizaram solução de prolina livre de impurezas de oxiprolina e não obtiveram a formação de cor. Os autores também demonstram que pela ação do hipoclorito sobre a oxiprolina não se forma oxipirrolina e o produto final desta reação é na verdade o pirrol. Em estudos de recuperação, os



autores conseguem obter valores correspondentes a no máximo 80% do pirrol inicial, e desta forma concluem que o método proposto por LANG tem sua utilidade limitada à determinação qualitativa de hidroxiprolina.

McFARLANE e GUEST (1939) ressaltam que segundo LANG (1933) e WALDSCHMIDT-LEITZ e AKABORI (1934) a hidroxiprolina reage com hipoclorito para originar a 80% de pirrol e este último pode ser determinado colorimetricamente com *p*-dimetilaminobenzaldeído ou isatina. No presente estudo, realizam um teste qualitativo para a hidroxiprolina, com a finalidade de avaliar o seu possível valor na determinação quantitativa da mesma, sob os seguintes aspectos: a) apesar de a intensidade e nuance da cor vermelha originada na reação, a condensação do cromóforo com isatina pode fixar a estabilidade da mesma; b) a curva de absorvância pode ser melhor avaliada ao espectrofotômetro no comprimento de onda de 520 nm; c) a maior intensidade de cor obtida pela reação se dá com o uso de sulfato de cobre a 0,01M. Ressaltam ainda o tempo de fervura e a temperatura sobre a mistura, a concentração de ácido clorídrico e isatina e as condições ideais para a obtenção da cor.

NEUMAN e LOGAN (1950a) apresentam um método colorimétrico simples para a determinação da taxa de hidroxiprolina em hidrolisados com diminuto conteúdo de colágeno. Para os autores, a oxidação segundo o método proposto por McFARLANE e GUEST (1939), mediante o uso de peróxido de sódio, leva à formação de produtos que formam intensa cor em presença de *p*-dimetilaminobenzaldeído. Como o triptofano puro dá origem a 0,7% a mais de cor do que a hidroxiprolina, a formação de humina e a hidrólise ácida das proteínas eliminam esta interferência. No presente estudo os autores utilizam os seguintes reagentes: a) soluções padrão de hidroxiprolina; b) solução de sulfato de cobre 0,01M; c) hidróxido de sódio 2,5N; d) peróxido de hidrogênio a 6%; e) ácido sulfúrico a 3,0N; e f) *p*-dimetilaminobenzaldeído a 5% em *n*-propanol. Para o presente procedimento descrito por NEUMAN e LOGAN, são necessários nove tubos de vidro (18 x 150 mm) para a análise de cada amostra em estudo. Acrescenta-se a cada tubo em estudo (branco; concentrações prévias de hidroxiprolina conhecidas; e solução desconhecida) 1 ml de sulfato de cobre, 1 ml de hidróxido de sódio e 1 ml de peróxido de hidrogênio. As amostras são misturadas durante 5 minutos e então colocadas em banho-maria a 80°C durante outros 5 minutos. O aquecimento e o agitação vigorosos destroem o excesso de peróxido.

Após resfriamento dos tubos, acrescenta-se 4 ml da solução de ácido sulfúrico, sob agitação constante, para em seguida acrescentar 2 ml de *p*-dimetilaminobenzaldeído. Após resfriamento os tubos são levados para leitura em colorímetro fotoelétrico. A quantidade de hidroxiprolina em 1 ml de solução desconhecida é estabelecida mediante a transposição dos dados à curva formada pela leitura das soluções conhecidas. Para os autores a tirosina parece ser a única substância de interferência comumente encontrada em hidrolisados de proteínas e a diferenciação da cor formada pela tirosina pode ser avaliada melhor com filtro de número 540 e pode ser assim calculada a correção a ser aplicada.

NEUMAN e LOGAN (1950b) descrevem um método colorimétrico para a determinação de colágeno tecidual com intervalo de confiança em torno de  $\pm 5\%$ . O colágeno é tornado solúvel pela hidrólise com água, formando gelatina e purificado da elastina e outros componentes não dissolvidos pelo processo. Realizam a estimativa do conteúdo colágeno a partir do conteúdo de hidroxiprolina do extrato de hidrolisado ácido. Como previamente demonstrado pelos autores (NEUMAN e LOGAN, 1950a), a quantidade de hidroxiprolina contida no colágeno de vários mamíferos corresponde a  $13,5 \pm 0,24\%$  e aparentemente não está presente em mais nenhuma proteína, à exceção da elastina. A hidroxiprolina pode ser convertida em equivalência ao colágeno pela multiplicação pelo fator 7,46. Encontra-se o colágeno tissular em tendões, membranas ou em fibrilas constituindo as estruturas teciduais. Os autores descrevem a taxa de colágeno encontrada em diferentes tecidos da vaca, porco e rato, e em pele de humanos, porco da guiné, cão e rato; paralelamente realizam estimativas do conteúdo de elastina dos mesmos tecidos.

Segundo GRUNBAUM e GLICK (1956), a alta concentração de hidroxiprolina presente no colágeno faz dos métodos de sua estimativa uma maneira muito prática para se estimar as taxas do colágeno, o qual provavelmente é a única proteína que contém hidroxiprolina. Os autores argumentam que o procedimento de NEUMAN e LOGAN (1950a) é muito útil na determinação de valores em escala micro, e de acordo com o método proposto no presente estudo, é possível reduzir a quantidade de amostra requerida para a análise em mais de mil vezes (pico). Os autores confirmam a especificidade da cor produzida pela reação do *p*-dimetilaminobenzaldeído com a hidroxiprolina hidrolisada pelo peróxido de hidrogênio e ressaltam que uma concentração de peróxido de hidrogênio menor do que a recomendada leva à formação de uma coloração mais intensa e reduz para

menos de 1% a interferência da tirosina eventualmente presente na amostra. Os autores concluem que a curva de absorbância da hidroxiprolina em diversas concentrações demonstra linearidade, mesmo com um aumento de concentração na ordem de 50 vezes e a concentração ideal de *p*-dimetilaminobenzaldeído é de 1%.

RADHAKRISHNAN e MEISTER (1957) foram os primeiros autores a proporem que o produto da oxidação da hidroxiprolina é o ácido pirrol-2-carboxílico e estudos subseqüentes demonstraram que a *D*-aminoácido-oxidase renal hidrolisa a hidroxid-prolina em um componente intermediário que parece ser o ácido  $\Delta^1$ -pirrol-4-hidroxi-carboxílico. Descrevem os experimentos da formação do ácido pirrol-2-carboxílico por métodos diversos, quais sejam: pela oxidação enzimática, pela transaminação enzimática e não-enzimática e pela oxidação não enzimática da hidroxiprolina pelo peróxido de hidrogênio. Em seguida apresentam uma descrição das diversas etapas destas reações.

PROCKOP e UDENFRIEND (1960) apresentam um método quantitativo simples que pode ser aplicado diretamente sobre tecidos naturais ou hidrolisados de proteínas contendo menos do que 0,01% de hidroxiprolina ou à urina contendo menos de 2  $\mu\text{g/ml}$  de hidroxiprolina. Para os autores, apesar da sensibilidade dos métodos disponíveis, é comum a obtenção de resultados alterados dado à dificuldade em se controlar a etapa da oxidação; apresentam a fórmula química da reação da oxidação da hidroxiprolina em pirrol: hidroxiprolina  $\rightarrow$  ácido  $\Delta^1$  pirrol-4-hidroxi-2-carboxílico  $\rightarrow$  ácido pirrol-2-carboxílico  $\rightarrow$  pirrol. No presente estudo, a oxidação da hidroxiprolina se dá em presença de um excesso conhecido de alanina e conseqüentemente a presença de aminoácidos ou substâncias afins na urina e em hidrolisados de tecidos não têm influência sobre a quantidade do pirrol formado. A especificidade desta reação é conseguida mediante a extração do pirrol em tolueno. Dado que os produtos iniciais da oxidação da hidroxiprolina (ácido  $\Delta^1$  pirrol-4-hidroxi-2-carboxílico e ácido pirrol-2-carboxílico) não são solúveis em tolueno, materiais que possam interferir na reação são extraídos em tolueno antes da formação do pirrol. Estas precauções possibilitam a análise de 5  $\mu\text{g}$  de hidroxiprolina em soluções contendo mais do que 50 mg de outros aminoácidos. Os autores utilizam as seguintes soluções: a) soluções tampão de pirofosfato de sódio com pH 8,7 e tampão borato de potássio com pH 8,7; b) solução de alanina; c) solução de cloramina-T a 0,02 M; d) tiosulfato de sódio a 3,6 M; e) reagente de EHRLICH; f) precipitador de humina; e g) aminoácidos diversos. No delineamento

que se segue, os autores realizam dois experimentos, o primeiro para estudar a hidroxiprolina em soluções purificadas e o segundo para o estudo da hidroxiprolina em urina e outras soluções complexas; ambos baseiam-se na hidrólise do material em análise em HCl, seguida de centrifugação e neutralização, oxidação da hidroxiprolina e extração em tolueno. Os autores determinam a recuperação da hidroxiprolina pela adição de uma quantidade de hidroxiprolina aproximadamente igual à presente na solução. Mesmo com pesos moleculares acima de 300.000 o método é capaz de detectar um único resíduo de hidroxiprolina por molécula de proteína.

PROCKOP, UDENFRIEND e LINDSTEDT (1961) apresentam uma metodologia simples para determinar a atividade específica da hidroxiprolina mediante a mensuração cintilográfica do pirrol oriundo da hidroxiprolina previamente marcada com C<sup>14</sup>. Segundo os autores, como a metodologia descrita não envolve o isolamento químico da hidroxiprolina, é importante evitar-se que outros componentes, em especial aminoácidos, não sejam transformados em produtos da oxidação sujeitos de darem origem a substâncias capazes de produzirem cor. Sobre a importância da cloramina-T, PROCKOP e cols. ressaltam que a quantidade necessária da mesma para a reação depende de fatores como o pH da solução, a temperatura em que se processa a oxidação, a concentração dos sais empregados e a qualidade do reagente de cloramina-T.

Em seu estudo da determinação da hidroxiprolina, WOESSNER Jr. (1961) desenvolve um método com a finalidade de eliminar interferências originadas pela presença de tirosina e outros aminoácidos, que possam ser considerados como impurezas, na presença de quantidades pequenas de hidroxiprolina. Este método envolve inicialmente uma modificação do método de STEGEMANN (1958) para aumentar a sensibilidade da reação e a estabilidade do cromógeno da hidroxiprolina e secundariamente um tratamento do cromógeno para eliminar a interferência de outros aminoácidos. O procedimento exposto por WOESSNER Jr., corresponde a dois métodos consecutivos: a) método I: resulta da introdução de várias mudanças no método de STEGEMANN (1958), quais sejam: redução na concentração do HCl, aumento na concentração do *p*-dimetilaminobenzaldeído e aumento no tempo de aquecimento; b) método II: corresponde a uma expansão do método de STEGEMANN (1958) mediante a inclusão da extração pelo benzeno e do tratamento com peróxido, permitindo desta forma a análise da hidroxiprolina em amostras

contendo grandes quantidades de outros aminoácidos.

BERGMAN e LOXLEY (1963) apresentam uma metodologia baseada nos trabalhos de STEGEMANN (1958) e de NEUMAN e LOGAN (1950), para a determinação espectrofotométrica de hidroxiprolina. Os autores observam que há mais de 18 métodos descritos, baseados na oxidação da hidroxiprolina em um componente relacionado ao pirrol e sua subsequente condensação com o reagente de EHRLICH para a formação de um corante avermelhado. Ressaltam que o espectro de cores obtido é altamente proporcional à concentração de hidroxiprolina, independentemente de diferenças maiores de concentração. Seguem uma descrição e uma análise crítica de todos os reagentes utilizados em ambos os métodos, bem como considerações sobre a estabilidade para a estocagem dos mesmos, principalmente em relação à solução oxidante (cloramina-T), ao tampão de acetato/citrato, ao reagente de EHRLICH e ao padrão de hidroxiprolina. Este último deve ser conservado em meio ácido a 0,001M de HCl, para evitar a degradação bacteriana. Observam que a leitura espectrofotométrica deve ser realizada em 558 nm. Ressaltam que a formação de cor depende da temperatura de aquecimento, da concentração ácida ou do tipo de solvente orgânico empregado. BERGMAN e LOXLEY não analisam a hipótese proposta por RADHAKRISHNAN e MEISTER (1957) que referem o ácido  $\Delta^1$ -pirrol-4-hidroxi-2-carboxílico como produto final da oxidação da hidroxiprolina.

JUVA e PROCKOP (1966) apresentam a primeira demonstração de que os precursores polipeptídeos do colágeno são acumulados no intracelular e são subsequentemente convertidos em colágeno extracelular.

Segundo KIVIRIKKO, LAITINEN e PROCKOP (1967), a hidroxiprolina pode ser convenientemente oxidada a um pirrol e este pirrol pode ser convertido em um cromógeno relativamente específico com *p*-dimetilaminobenzaldeído; no presente estudo, os autores descrevem algumas alterações para a metodologia original proposta por PROCKOP e UDENFRIEND (1960), as quais tornam o procedimento mais rápido, sem contudo acarretar em perdas na sua especificidade e acurácia. As soluções utilizadas são: a) tampão borato de potássio com pH 8,7; b) alanina a 10%; c) cloramina-T 0,2M em metil-celossolve; d) tiosulfato de sódio a 3,6M em 100 ml de água destilada; e e) reagente de EHRLICH. O procedimento descrito no presente estudo inclui três etapas principais: a hidrólise da amostra com HCl, a oxidação da

hidroxiprolina pela cloramina-T e a reação colorífica do pirrol extraído em tolueno com o reativo de EHRLICH e leitura em espectrofotômetro em 560 nm. A modificação do método introduzida pelos autores consiste na eliminação da etapa da precipitação da humina, na redução dos volumes pela metade e em mudanças nas condições de oxidação para a obtenção de cor. O método também pode ser usado para a avaliação de amostras teciduais, porém para tanto deve-se submeter a amostra a uma hidrólise ácida com HCl 6*N* durante pelo menos 10 horas, a 120°C.

Numa revisão extensa sobre os aspectos dinâmicos da biologia do colágeno, PEACOCK (1967) levanta questões tanto filosóficas quanto técnicas. Para PEACOCK, ser capaz de acelerar o processo de cicatrização de feridas certamente é um objetivo honesto, porém olhar para a pesquisa relacionada ao colágeno apenas com a finalidade de acelerar a cicatrização é comparável a ver no estudo da embriologia apenas uma maneira de se produzir bebês de maneira mais rápida; provavelmente é mais importante alterar a condição caótica das propriedades físicas e químicas de um tecido cicatricial produzido, a acelerar sua formação. Com relação à cicatrização, o conteúdo colágeno total não mais se altera após o 42º dia pós-operatório, apesar de a ferida continuar a ganhar em resistência tênsil durante os seguintes dois anos; assim, não há uma relação direta entre a concentração de colágeno e a resistência tênsil da cicatriz. O principal aspecto é observar que o que no passado era visto como uma substância adinâmica, na realidade está sujeito a um processo dinâmico de formação e metabolismo.

STEGEMANN e STALDER (1967) reavaliam uma metodologia anteriormente proposta anteriormente por um dos autores (STEGEMANN, 1958) para a análise da hidroxiprolina de hidrolisados de tecidos, plasma sangüíneo e urina apresentando algumas modificações que tornam o método mais rápido e mais sensível. As questões discutidas no presente estudo são as seguintes: a) a concentração ideal de cloramina-T é de 0,017*M* e um aumento da mesma só irá ser de utilidade se a quantidade de hidroxiprolina na amostra for muito grande e será no sentido de acelerar a velocidade da reação; b) o valor do pH da reação deverá ser próximo do neutro; c) o tempo de ação da cloramina-T como oxidante não afeta a reação, permitindo assim que seja processado um grande número de amostras simultaneamente; d) um aumento na concentração do reativo de EHRLICH não aumenta a estabilidade do cromógeno formado; e e) em função de uma melhor estabilidade da solução para períodos de até anos, os autores substituem o metil-

celossolve (éter glicol-monometílico) pelo n-propanol.

PIKKARAINEN (1968) estuda o conteúdo colágeno de amostras de tecidos de doze espécies de mamíferos, na tentativa de demonstrar a correlação filogenética entre as mesmas. Para tanto utiliza-se do método de determinação de hidroxiprolina segundo STEGEMANN (1958) e modificado por WOESSNER Jr. (1961). O colágeno é a proteína mais importante dos mamíferos e corresponde a um terço do total protéico do organismo. Pode-se estimar o total de colágeno por duas maneiras: a) multiplicando-se o total de hidroxiprolina por 7,3; ou b) multiplicando-se o total de nitrogênio por 5,55.

Em estudos sobre a recuperação da resistência à insuflação de ar em anastomoses cólicas, CRONIN, JACKSON e DUNPHY (1968) encontram um aumento na resistência da parede intestinal não só ao nível da anastomose, mas também nos segmentos proximal e distal da parte lesada. A resistência do intestino está na dependência da camada colágena contida na tela submucosa. A metodologia empregada pelos autores compreende 5 grupos de 30 ratos, os quais são submetidos a uma anastomose cólica em plano único contínuo do tipo LEMBERT, com fio de categute cromado 5/0, e avaliados nos dias 3, 5, 7, 10 e 14 de pós-operatório. Realizam a mensuração da resistência à insuflação de ar e a dosagem de hidroxiprolina no segmento intestinal estudado. Para o processamento bioquímico, realizam a pesagem das peças e posterior desidratação, seguida de hidrólise em HCl e a determinação da dosagem de hidroxiprolina conforme a metodologia preconizada por WOESSNER Jr. (1961). Os autores observam que a metade das anastomoses apresenta-se cicatrizada no quinto dia pós-operatório e a outra metade apresenta aderências capazes de garantir a segurança da anastomose. Neste estudo a pressão necessária para romper o intestino normal é de aproximadamente 150 mmHg. No terceiro dia pós-operatório a anastomose não apresenta resistência à insuflação de ar, sendo que o início do ganho de força tênsil é observado em torno do quinto dia pós-operatório. Após o 14º dia pós-operatório não observam mais incremento algum na força tênsil. Com relação à determinação do conteúdo colágeno do segmento intestinal anastomosado, durante os primeiros três dias de pós-operatório a taxa de colágeno da reduz em até 40%, fenômeno este também observado nos segmentos justa-anastomóticos.

BERGMAN e LOXLEY (1970) apresentam uma metodologia adaptada para a dosagem fotocolorimétrica de hidroxiprolina para utilização em escala comercial em laboratórios de análises clínicas. Os reagentes propostos neste estudo são: a) soluções-padrão, com diluições de 1  $\mu\text{g/ml}$ , 2  $\mu\text{g/ml}$  etc., de hidroxiprolina diluída em isopropanol; b) solução oxidante, composta por 57 g de acetato de sódio (3  $\text{H}_2\text{O}$ ), 37,5 g de citrato trissódico (2  $\text{H}_2\text{O}$ ), 5,5 g de ácido cítrico ( $\text{H}_2\text{O}$ ) e 385 ml de isopropanol, acrescidos de um volume de água para completar um litro; esta solução-tampão é estável por tempo indefinido; imediatamente antes da execução do método, preparar uma solução a 7% de cloramina-T: a solução oxidante é obtida mediante a mistura de uma parte de cloramina-T para quatro partes de solução-tampão; c) reagente de EHRLICH (para desenvolvimento de cor a  $60^\circ\text{C}$ ): 17,6 g de *p*-dimetilaminobenzaldeído são dissolvidos em 40,8 g de ácido perclórico a 60% e completados a um volume total de 100 ml com isopropanol; para o desenvolvimento de cor durante o período da noite: 10,6 g de *p*-dimetilaminobenzaldeído são dissolvidos em 24,5 g de ácido perclórico; esta mistura é completada a 100 ml com isopropanol. Segundo BERGMAN e LOXLEY, sendo a urina a amostra em estudo, a maneira mais segura de se obter a solução branca é mediante a adição de substância oxidante à solução de EHRLICH: a cloramina-T é inativada pelo ácido e qualquer desenvolvimento de cor deve-se a impurezas outras que não a hidroxiprolina. Com relação ao procedimento de neutralização da solução, os autores preferem o hidróxido de lítio ao hidróxido de sódio, pois este último pode ocasionar a precipitação de eventuais sais. Os autores argumentam que o produto da oxidação da hidroxiprolina pela cloramina-T é mais estável do que o produto gerado pela peróxido-oxidação alcalina catalisada pelo cobre (1,2-dehidrohidroxiprolina). Finalmente, os autores sugerem que o emprego de concentrações elevadas de reativo de EHRLICH e de isopropanol favorecem o surgimento e aumentam a estabilidade da cor.

IBBOTT (1974) ressalta que a única proteína mamífera que contém quantidades significantes de hidroxiprolina é o colágeno e aceita os produtos da oxidação da hidroxiprolina como sendo pirrol e ácido pirrol-2-carboxílico. A metodologia proposta por IBBOTT para a dosagem da hidroxiprolina a partir de amostras de urina ou tecidos, baseia-se na descrição de KIVIRIKKO e cols. (1967). Inicialmente submete a amostra a uma hidrólise ácida, em seguida retira pigmentos precipitados mediante centrifugação e realiza a oxidação da hidroxiprolina com cloramina-T e interrompe a oxidação pela adição de tiosulfato e em seguida retira



impurezas pela extração com tolueno. Os produtos iniciais da oxidação da hidroxiprolina, ácido  $\Delta^1$ -pirrol-4-hidroxi-2-carboxílico e ácido pirrol-2-carboxílico não são solúveis em tolueno. Após aquecimento, o pirrol produzido é extraído em tolueno e a reação colorífica é realizada com reativo de EHRLICH. Para a determinação da fração livre de hidroxiprolina, IBBOTT omite a hidrólise ácida e acrescenta um excesso de alanina para eliminar a influência de outros aminoácidos sobre a quantidade de pirrol formada. O método é altamente específico para hidroxiprolina, mesmo havendo na solução a presença de quantidades 10.000 vezes maior de outros aminoácidos. A taxa de recuperação de hidroxiprolina adicionada à urina observada no presente estudo é de 90-104%. Os reagentes utilizados pelo autor são: a) HCl 1N e 0,05N; b) fenolftaleína; c) tampão borato de potássio com pH 8,7; d) alanina a 10%; e) cloramina-T 0,2 M; f) tiosulfato de sódio 3,6 M; g) reagente de EHRLICH; h) solução-padrão de estoque a 36 mg / 100 ml e de trabalho a 36  $\mu$ g / ml. A metodologia envolve a hidrólise ácida da amostra em estudo, seguida de neutralização e saturação com KCl. Segue o acréscimo de alanina e a subsequente oxidação com cloramina-T, mantida com tiosulfato de sódio. Após uma primeira extração de impurezas pelo tolueno, IBBOTT submete a amostra ao aquecimento para a formação do pirrol, o qual é retirado por uma nova extração por tolueno e pelo acréscimo de reativo de EHRLICH leva à formação de coloração rósea. A leitura em espectrofotômetro é realizada após repouso por 30 minutos e a absorção é lida contra tolueno como branco a 560 nm. Para IBBOTT, a absorção deve ficar entre 0,1-0,6 e se a leitura for muito alta, recomenda uma diluição do extrato de tolueno.

O cálculo final proposto por IBBOTT é o seguinte:

$$\text{mg total de hidroxiprolina/ml} = \frac{A_x - A_b}{A_s - A_b} \times 0,036,$$

onde:

$A_x$  = solução desconhecida (em estudo)

$A_s$  = solução *standard*

$A_b$  = solução branca.

Segundo BLUMENKRANTZ e HANSEN (1977), a biossíntese do colágeno e suas glicoproteínas relacionadas passa por uma série de etapas, quais sejam: a) formação de protocolágeno, um polipeptídeo precursor do colágeno, rico em resíduos de prolil e lisil, no qual ocorre uma extensão peptídica não-colagenosa

suplementar no terminal-C ou no terminal-N; b) hidroxilação de resíduos de prolil e lisil em hidroxiprolina e hidroxilisina mediante a ação da hidroxilase protocolágena-prolina (PPH) e da hidroxilase protocolágena-lisina (PLH), mediante a participação dos co-fatores ácido ascórbico,  $\alpha$ -cetogluturato, íons  $\text{Fe}^{2+}$  e oxigênio atmosférico ( $\text{O}_2$ ); a formação da hidroxiprolina está diretamente relacionada ao espiralamento do colágeno; c) glicosilação de resíduos de hidroxilisil; esta etapa consiste de duas sub-etapas: c-1) galactosilação de resíduos de hidroxilisil pela transferase galactolisil-colágena na presença dos co-fatores  $\text{Mn}^{2+}$  e galactose uridina-difosfato (UDPGal) e c-2) galactosilação de resíduos de hidroxilisil pela transferase glucosil-colágena na presença dos co-fatores  $\text{Mn}^{2+}$  e glicose uridina-difosfato (UDPGlu); nesta etapa a macromolécula está pronta para ser extrusada para o compartimento extracelular; d) A macromolécula extrusada é chamada de pró-colágeno e é necessária a ação da enzima pró-colágeno-peptidase para a liberação de peptídeos suplementares não-colágenos da molécula de pró-colágeno (a presença destes peptídeos confere à molécula de pró-colágeno sua característica solúvel e permite com que ela atue como a forma de transporte do colágeno, prevenindo a fibrilogênese intracelular); com a liberação dos peptídeos suplementares a macromolécula é convertida em tropocolágeno; e) a desaminação oxidativa de certos resíduos de lisil e hidroxilisil pela lisil-oxidase precede a fase final, a qual corresponde à formação das ligações cruzadas inter e intramoleculares necessárias para a estabilização da molécula de colágeno neoformada. BLUMENKRANTZ e HANSEN descrevem três metodologias para a determinação de hidroxiprolina marcada com  $^{14}\text{C}$ . Descrevem também um método para a determinação da protocolágeno-prolina-hidroxilase, um método para a determinação de lisina marcada com  $^{14}\text{C}$ , um método para a determinação de pró-colágeno-lisina-hidroxilase assim como um método para a avaliação da galactosil-colagenase e da glucosil transferase. Observam que a determinação concomitante dos dois aminoácidos típicos para o colágeno (isto é, hidroxiprolina e hidroxilisina) é importante, pois em condições patológicas pode haver um desequilíbrio entre ambas. Em sua metodologia para a dosagem da hidroxiprolina e da prolina em amostras únicas e múltiplas, os autores lançam mão dos seguintes reagentes: a) utilizam a solução de tampão borato com pH 8,7 (61,84 g de ácido bórico e 225 g de KCl são misturadas em 800 ml de água destilada e o pH é ajustado para 8,7 com solução de KOH, completando-se em seguida o volume para 1000 ml com água destilada); b) solução de alanina 0,112M (10 g de alanina são dissolvidos em 90 ml de água destilada, o pH é ajustado para 8,7 e o volume final ajustado para 1000 ml com água destilada); c) tampão borato-

alanina (realizam a mistura de 100 ml da solução de tampão-borato com 50 ml da solução de alanina); d) tampão de pirofosfato a 0,2M e a 1M, com pH ajustado para 8,0; e) tampão de ácido cítrico (50 g de ácido cítrico  $1H_2O$  é acrescido a 12 ml de ácido acético 96%, 120 g de acetato de sódio  $3H_2O$  e 34 g de NaOH e a mistura final diluída em 1000 ml de água destilada); f) solução de cloramina-T a 0,2M; e g) reagente de EHRLICH. No desenvolvimento da metodologia realizam a hidrólise transnoite de amostras de urina, cartilagens e colágeno purificado, em HCl 6N a  $118^{\circ}C$ ; em seguida submetem as amostras à evaporação a  $60^{\circ}C$  em câmara de vácuo e realizam a determinação da dosagem de hidroxiprolina conforme descrito por KIVIRIKKO (1967).

JIBORN, AHONEN e ZEDERFELDT (1978) realizam um estudo para comparar a influência de anastomoses em plano único contínuas ou em pontos separados, em colo de 193 ratos Sprague Dawley. As anastomoses foram realizadas com fio de polipropilene e o período de avaliação correspondeu ao 5<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup>, 10<sup>o</sup>, 14<sup>o</sup> e 28<sup>o</sup> dias pós-operatórios. Os autores realizam a determinação da taxa de colágeno segundo PIKKARAINEN (1968) e submetem as peças a uma desidratação prévia a  $100^{\circ}C$  durante 3-4 dias, até a obtenção de um peso constante. O registro da concentração da taxa de hidroxiprolina é assinalado em  $\mu g/mg$  de tecido desidratado. Os autores ressaltam que a tela submucosa da parede intestinal é uma membrana fibrosa resistente, constituída principalmente por colágeno e fibras elásticas e apresenta a maior resistência tênsil dentre todas as camadas do intestino. Os autores demonstram que após uma ressecção de colo esquerdo seguida de anastomose, ocorre uma redução importante nas taxas de hidroxiprolina nas proximidades da anastomose, redução esta que corresponde a 30% na sutura contínua e a 23% na sutura em pontos separados. Distalmente à anastomose não observam alteração alguma nas taxas de hidroxiprolina em ambas as técnicas de sutura empregadas. Proximalmente à anastomose, todavia, ocorre uma redução importante nas taxas de hidroxiprolina e esta redução é mais importante na técnica de sutura contínua se comparada com a sutura em pontos separados, durante a primeira semana da cicatrização. No presente estudo os níveis de hidroxiprolina tecidual retornam aos padrões normais entre o décimo e décimo quarto dias de pós-operatório. JIBORN e cols. sugerem que a redução precoce nas taxas de hidroxiprolina deve estar relacionada a um aumento na lise da mesma, devida a um provável aumento na quebra da molécula de hidroxiprolina.

Com a objetivo de analisar o equilíbrio entre a lise e a síntese de colágeno em segmentos cólicos, JIBORN, AHONEN e ZEDERFELDT (1980a) realizam um estudo avaliando a concentração total de hidroxiprolina, a atividade específica do colágeno, a radioatividade total (após marcação prévia de prolina pelo  $C^{14}$ ) e a porcentagem de síntese de colágeno em colo de ratos. Para tanto, submetem as peças à secagem em estufa até atingirem um peso constante, a  $100^{\circ}C$ . Após a determinação do peso seco, as amostras são hidrolisadas em HCl 6N a  $130^{\circ}C$  durante 3 horas e a taxa de hidroxiprolina é determinada segundo PIKKARAINEN (1968). Segundo revisão realizada pelos autores, a hidroxiprolina é encontrada em tecidos de vertebrados quase que exclusivamente no colágeno, constituindo aproximadamente 14% de seu peso e não é encontrada em quantidades expressivas em nenhuma outra proteína. Os autores citam PROCKOP (1960), segundo o qual a prolina é incorporada ao prócolágeno durante a síntese de colágeno; após esta incorporação uma certa porcentagem de prolina residual é hidroxilada em hidroxiprolina por uma enzima específica, a prolil-hidroxilase. JIBORN e cols. observam que há duas formas de colágeno: o colágeno solúvel e o colágeno insolúvel; este último tipo corresponde ao componente estrutural do tecido conjuntivo. A fração de colágeno solúvel encontrada pelos autores é de 3,4 a 5,4% do total de colágeno. Setenta e cinco a 93% da radioatividade mensurada está relacionada à fração insolúvel do colágeno. Em amostras de controle, não submetidos à cirurgia, a atividade específica do colágeno é baixa em todos os segmentos cólicos. Há, contudo, uma diferença significativa entre os segmentos proximais e distais do colo. A atividade específica nos primeiros é menor do que nos últimos. Nos animais com uma anastomose com 4 dias de evolução, a síntese de colágeno demonstra estar aumentada em todos os segmentos. Apesar desta síntese aumentada de colágeno, a sua concentração apresenta-se acentuadamente diminuída (25 a 50%) nos segmentos anastomóticos e nos segmentos imediatamente proximais às anastomoses. Estes achados evidenciam que a atividade de lise do colágeno é maior nos segmentos proximais à anastomose do que nos distais à mesma. No sétimo dia de pós-operatório JIBORN e cols. observam que o balanço entre a síntese e a degradação do colágeno passa a tender em favor da síntese.

JIBORN, AHONEN e ZEDERFELDT (1980b) apresentam a seqüência de seus estudos, enfocando as alterações no metabolismo do colágeno na parede cólica, comparativamente, nas anastomoses realizadas de forma contínua ou em pontos separados. A síntese de colágeno é mensurada *in vivo*, mediante o uso de prolina

marcada radioativamente como precursor; os resultados são comparados às mensurações da taxa de hidroxiprolina tecidual no colo. Os autores observam uma redução importante nas taxas de colágeno na região de anastomose, após uma ressecção de colo esquerdo. Proximalmente esta redução é importante numa extensão de 2 a 3 cm e distalmente esta redução é observada em apenas 0,5 cm da anastomose. Apesar de uma taxa de síntese de colágeno muito aumentada, a concentração de colágeno nesta área de anastomose é muito reduzida; isto se dá em função de uma atividade de lise também aumentada. Os autores citam estudos experimentais em gatos e cães, que relacionam a inervação cólica ao metabolismo colágeno. Segundo estes, os nervos parassimpáticos sacrais (que inervam os dois terços distais do colo) penetram na parede cólica na região pélvica e distribuem-se intramuralmente em direção distal para proximal, enquanto que os nervos cólicos simpáticos lombares distribuem-se através dos mesos. Assim, uma ressecção de colo esquerdo vai levar a uma denervação parassimpática proximal à linha de anastomose e levar, ao menos temporariamente, a um comprometimento da motilidade cólica bem como a uma redução do fluxo sanguíneo da tela submucosa e a uma redução da produção de muco proximal à anastomose, fatos estes que podem levar a uma redução da resistência à invasão bacteriana com aumento local da reação inflamatória.

ANGELELI, BURINI e OLIVEIRA (1982) realizam estudos referentes às várias fases do método proposto por BERGMAN e LOXLEY (1970) para dosagem de hidroxiprolina e analisam o método com base em amostras de urina humana e de ratos e avaliam a linearidade da curva de absorção em vários aparelhos de espectrofotometria. Na metodologia empregada as etapas são as seguintes: a) hidrolisação da urina com HCl 6N, mantendo em estufa a 110°C durante 24 horas; b) neutralização com solução de hidróxido de lítio; c) a 1 ml do hidrolisado de urina, 1 ml de solução branca e 1 ml de solução-padrão, adiciona-se 2 ml de isopropanol e 1 ml de solução oxidante (cloramina-T); d) após 4 minutos adiciona-se 2 ml de reagente de EHRLICH e incuba-se a mistura a 60°C durante 21 minutos; e) repouso da solução por 60 minutos e leitura nos diversos espectrofotômetros a 562 nm. Os autores realizam estudo de recuperação da hidroxiprolina, mediante acréscimo de quantidades conhecidas do aminoácido e não observam diferença nos resultados obtidos pelas leituras nos diversos aparelhos em estudo, demonstrando que o método é confiável e de fácil execução. ANGELELI e cols. observam que os picos de absorção máxima situam-se entre 558 e 562 nm e chamam a atenção para o fato

de o padrão de hidroxiprolina ser lábil e não poder ser armazenado por muito tempo.

NARESSE, LUCCHIARI, ANGELELI, BURINI, RODRIGUES, CURI e KOBAYASI (1988) realizam estudo da cicatrização de uma anastomose do intestino delgado e utilizam 32 cães mestiços, divididos em três grupos avaliados no 3º, 7º, 14º e 28º dias de pós-operatório. O procedimento é sutura contínua em plano único extra-mucoso, sutura com pontos separados em plano único extra-mucoso e sutura contínua em dois planos (um total e um seromuscular), realizadas com fio de nylon 4/0. Os autores avaliam a qualidade da cicatrização mediante a resistência à força de ruptura em extensômetro de resistência elétrica; mediante a determinação da fração de hidroxiprolina tecidual segundo a metodologia de BERGMANN e LOXLEY (1963) modificada por ANGELELI e col. (1982); e estudo histológico pelas colorações de MASSON e hematoxilina-eosina. NARESSE e cols. observam que a análise estatística da dosagem de hidroxiprolina tecidual não mostra diferenças significativas entre as três técnicas empregadas. No presente estudo os autores encontraram uma variação muito grande nas concentrações pré-operatórias de hidroxiprolina. Na técnica de sutura em dois planos, encontraram no 21º dia pós-operatório uma concentração de hidroxiprolina maior do que no controle pré-operatório. Este fato apresenta paralelismo à avaliação histológica.

### 3 MATERIAL E MÉTODO

Utilizou-se 8 cães (*Canis familiaris*) sem raça definida, adultos, masculinos, com peso corpóreo variando de 7 a 11 kg, sem sinais de doença, provenientes do canil da Prefeitura Municipal de Curitiba. Estes animais foram submetidos a avaliação prévia pelo médico veterinário responsável, antes da inclusão no protocolo.

O procedimento experimental constou da retirada e armazenamento de fragmentos teciduais de diversos segmentos do canal alimentar do cão, os quais foram recortados conforme um tamanho padrão, constituindo assim as amostras teciduais para o estudo. As amostras teciduais foram pesadas e submetidas a uma hidrólise ácida sendo que em seguida, os hidrolisados teciduais foram processadas bioquimicamente para a determinação da taxa de hidroxiprolina tecidual. Em paralelo aos hidrolisados teciduais, foram processadas diversas soluções padrão de trabalho de hidroxiprolina (com quantidades conhecidas de hidroxiprolina) e soluções brancas (com ausência absoluta de hidroxiprolina), ambas para permitir uma análise comparativa entre os resultados obtidos pelos hidrolisados teciduais. Finalmente, realizou-se a leitura da absorbância espectrofotométrica das amostras e determinação final da taxa de hidroxiprolina dos hidrolisados teciduais.

No presente estudo utilizou-se a metodologia proposta KIVIRIKKO e cols. (1967) e modificada por IBBOTT (1974). As dosagens bioquímicas da hidroxiprolina foram realizadas, pelo autor, nas dependências no Laboratório de Imunologia e Microbiologia da Faculdade Evangélica de Medicina do Paraná. Aplicou-se as normas para referências bibliográficas e abreviatura de títulos e periódicos e as normas para apresentação de trabalhos da Universidade Federal do Paraná (1992) bem como a Nomina Anatomica Veterinária (1983).

### 3.1 Fase pré-estudo

Os cães foram albergados no Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná durante um período de observação de 15 dias, onde receberam alimentação mediante ração balanceada para a espécie (Nuvita®), tendo livre acesso à água, conforme recomendado por ROMERO e FUENZALIDA (1989). Foram tratados contra ectoparasitas (banho com Assuntol Pó®). Cada animal recebeu um total de 800 mg de mebendazol (200 mg/dia). Os cães foram vacinados com Vacina Anti-Rábica® e vacina contra cinomose, hepatite, parainfluenza, parvovirose, leptospirose, (Polyvac-6®). Ao final de 15 dias de observação pré-estudo, os animais foram incluídos no protocolo e identificados de maneira aleatória pelas letras de A - H.

### 3.2 Obtenção das amostras teciduais, das soluções-padrão de trabalho de hidroxiprolina e das soluções brancas

#### 3.2.1 Indução anestésica e sacrifício dos cães

O cão foi trazido à sala de cirurgia experimental e amordaçado com fita crepe. Em seguida, realizou-se a secção dos pelos rente à pele, na face lateral do terço distal de um de seus membros pélvicos. Induziu-se a anestesia com solução de Thionembutal®, por via intravenosa, na dose de 25 mg para cada quilograma de peso corpóreo, mediante a prévia punção percutânea da veia metatársica plantar<sub>IV</sub>, realizada com *butterfly* n° 21.

Após a indução da anestesia, o cão foi sacrificado mediante a injeção, por via intravenosa, de 20 ml de cloreto de potássio a 19,1%. O animal apresentou parada cardíaca seguida de parada respiratória. Assim procedeu-se de forma a não propiciar sofrimento ao animal e para obter amostras de peças com a qualidade de uma biópsia cirúrgica, permitindo comparações futuras de resultados com estudos experimentais.



### 3.2.2 Retirada e acondicionamento dos fragmentos teciduais

Constatado o óbito do animal, colocou-se o mesmo sobre uma mesa cirúrgica e realizou-se a retirada de fragmentos tubulares com aproximadamente 2 centímetros de comprimento ou fragmentos de área aproximada de 2 cm<sup>2</sup>, de diversos segmentos do canal alimentar. Os fragmentos foram retiradas mediante dois acessos cirúrgicos: o primeiro foi uma cervicotomia ventral mediana para a retirada de um fragmento de esôfago cervical (*Pars cervicalis*); o segundo acesso cirúrgico foi mediante uma laparotomia mediana xifo-púbica e secção do hiato esofágico do diafragma, para a obtenção de amostras de esôfago torácico (*Pars thoracica*), parede anterior de corpo do estômago (*Corpus ventriculi*), 2<sup>a</sup> porção de duodeno (*Pars descendens*), jejuno-ílio (*Jejunum, Ileum*), colo transverso (*Colon transversum*), colo sigmóide (*Colon sigmoideum*) e reto (*Rectum*).

Os fragmentos teciduais foram acondicionadas em solução fisiológica a 0,9% em frascos individuais e guardados em congelador a -20°C.

### 3.2.3 Recorte e pesagem das amostras teciduais

Os fragmentos teciduais foram descongelados à temperatura ambiente e secos com papel-toalha absorvente. Realizou-se o recorte dos fragmentos teciduais por vazamento, mediante um instrumento com área de secção transversa circular com diâmetro de 9 mm: obteve-se assim as amostras teciduais. Determinou-se o peso das amostras teciduais, em gramas, em uma balança de precisão Helmac HM 3300, levando-se em conta duas casas decimais. O valor obtido para o peso das amostras teciduais foi transferido para um quadro geral de tabulação dos dados. A distribuição das amostras teciduais conforme o segmento do canal alimentar e o respectivo número de identificação, pode ser observada na tabela 1.

**Tabela 1**

Distribuição das amostras teciduais conforme o segmento do canal alimentar e o seu respectivo número

Segmento	Número da amostra tecidual
Esôfago cervical	1-8
Esôfago torácico	9-16
Estômago	17-24
Duodeno	25-32
Jejuno-íleo	33-40
Colo transverso	41-48
Colo sigmóide	49-56
Reto	57-64

#### 3.2.4 Obtenção das soluções-padrão de trabalho de hidroxiprolina e brancas

Inicialmente faz-se necessário incluir-se no delineamento deste estudo um mecanismo para estabelecer-se um padrão de absorvância espectrofotométrica conhecido, tanto da presença quanto da ausência de hidroxiprolina numa solução. Assim, as absorvâncias espectrofotométricas relativas à quantidade de cor produzida pela reação final do método aqui empregado, obtidas para as soluções-padrão de trabalho de hidroxiprolina, bem como para as soluções brancas (ambas serão processadas concomitantemente com as amostras teciduais), constituirão o valor de referência para a análise dos resultados espectrofotométricos obtidos após o processamento bioquímico dos hidrolisados teciduais em estudo.

Para a obtenção das soluções-padrão de trabalho de hidroxiprolina, é necessário realizar-se a diluição prévia de um volume de solução-padrão de estoque de hidroxiprolina, da forma como segue:

a. Solução-padrão de estoque de hidroxiprolina, contendo 36 mg / 100 ml de volume: obteve-se esta solução mediante a dissolução de 9 mg de hidroxiprolina em 10 ml de água destilada em frasco volumétrico de 25 ml. Adicionou-se 0,1 ml de HCl concentrado e diluiu-se até um volume final de 25 ml com água destilada.

Esta solução foi preparada no dia do processamento bioquímico das amostras de estudo.

b. Soluções-padrão de trabalho de hidroxiprolina, contendo 36, 18, 9 e 4,5  $\mu\text{g} / \text{ml}$ : obteve-se estas soluções mediante a diluição de 1,0, 0,5, 0,25 e 0,125 ml, respectivamente, da solução-padrão de estoque de hidroxiprolina em 10 ml de água destilada. Estas soluções foram preparadas imediatamente antes do uso.

c. Solução branca: para representar esta solução, utilizou-se água destilada.

A distribuição das soluções-padrão de trabalho de hidroxiprolina com relação às suas concentrações e das soluções brancas bem como suas respectivas identificações numéricas, podem ser observadas na tabela 2.

**Tabela 2**

Distribuição das soluções-padrão de trabalho de hidroxiprolina nas diversas concentrações (em microgramas por mililitro) e das soluções brancas, bem como as suas respectivas identificações numéricas

Solução	Concentração $\mu\text{g} / \text{ml}$	Número da amostra
Soluções-padrão de trabalho de hidroxiprolina	36	65
	18	66
	9	67
	4,5	68
Soluções brancas	-	69-70

(-) = Ausência de hidroxiprolina.

Convencionou-se identificar ao conjunto formado pelas amostras teciduais, pelas soluções-padrão de trabalho de hidroxiprolina e pelas soluções brancas, pelo vocábulo isolado **amostras**.

### 3.3 Preparo de tubos de vidro e dos reagentes

Previamente à execução do processamento bioquímico, para a determinação fotocolorimétrica da hidroxiprolina pelo reativo de EHRLICH a partir das amostras teciduais, das soluções-padrão de trabalho de hidroxiprolina e das soluções brancas, foram necessárias duas etapas preparatórias, a saber: o preparo de tubos de vidro e o preparo de reagentes químicos.

#### 3.3.1 Preparo de tubos de vidro

Utilizou-se tubos de vidro com tampa de rosca de teflon e tubos de vidro sem tampa de rosca, assim divididos:

Foram necessárias duas séries de tubos de vidro com tampa de rosca de teflon no tamanho de 18 x 150 mm. A primeira série de tubos foi utilizada para a realização da hidrólise ácida das amostras teciduais; estes tubos foram graduados previamente para um volume exato de 15 ml. A segunda série de tubos foi utilizada para as etapas de oxidação e formação do pirrol. Conforme demonstrado na tabela 1, realizou-se o processamento de 64 amostras teciduais, de 4 soluções-padrão de trabalho de hidroxiprolina e de 2 soluções brancas. Assim, utilizou-se 140 destes tubos de vidro, os quais foram numerados nas duas séries de 1 a 70.

Para a leitura espectrofotométrica final, utilizou-se uma nova série de 70 tubos de vidro no tamanho de 13 x 75 mm. Numerou-se os tubos desta terceira série de 1 a 70.

#### 3.3.2 Preparo dos reagentes

No dia anterior ao da execução do processamento bioquímico deste estudo, realizou-se a preparação dos reagentes necessários para as suas diversas etapas. Os reagentes utilizados foram o hidróxido de potássio, a fenoltaleína, o tampão borato de potássio, a alanina, a cloramina-T, o tiosulfato de sódio e o reativo de EHRLICH e foram obtidos da seguinte maneira:

a. Hidróxido de potássio. Realizou-se três diluições do sal para a obtenção das concentrações 12*N*, 1*N* e 0,1*N*, como segue:

KOH 12 <i>N</i>	168,3 g KOH + 250 ml H <sub>2</sub> O,
KOH 1 <i>N</i>	14,02 g KOH + 250 ml H <sub>2</sub> O e
KOH 0,1 <i>N</i>	1,40 g KOH + 250 ml H <sub>2</sub> O.

b. Fenolftaleína: dissolveu-se 1 g em 100 ml de etanol para a obtenção da solução de fenolftaleína.

c. Tampão borato de potássio com pH 8,7: dissolveu-se 6,18 g de ácido bórico e 22,5 g de KCl em 80 ml de água destilada. Ajustou-se o pH com um medidor de pH (pH-metro B374, Micronal - SP) até 8,7, mediante adição gota-a-gota de KOH 12*N* e KOH 1*N*. Completou-se com água destilada até um volume final de 100 ml.

d. Alanina 10%: dissolveu-se 5 g de alanina em aproximadamente 45 ml de água destilada. Ajustou-se o pH para 8,7 com um medidor de pH e completou-se o volume com água destilada até 50 ml.

e. Cloramina-T 0,2*M*. Dissolver de 5,64 g de cloramina-T em 100 ml de éter monometílico de etilenoglicol para análise de aminoácidos, livre de peróxidos. Este reagente foi preparado imediatamente antes do uso.

f. Tiosulfato de sódio 3,6*M*. Dissolveu-se 267,9 g de tiosulfato de sódio penta-hídrico em 300 ml de água destilada, aquecendo-se levemente o frasco sob mistura contínua, até a diluição total do sal.

g. Reativo de EHRLICH: Para a obtenção deste reagente, foi necessário o preparo prévio de duas soluções, A e B, como segue:

Solução A - Adicionou-se lentamente 6,85 ml de ácido sulfúrico concentrado a 50 ml de etanol em frasco de vidro. Realizou-se o concomitante resfriamento do frasco sob água de torneira corrente durante a adição do ácido, pois realiza-se uma reação produtora de calor.

Solução B - Adicionou-se 50 ml de etanol a 30 g de *p*-dimetilamino-benzaldeído. Procedeu-se ao seu aquecimento a 37°C e à mistura contínua até que se obteve a dissolução completa do sal.

Obteve-se o reagente de EHRLICH pela adição lenta da solução A à solução B, resfriando-se concomitantemente o frasco sob água de torneira corrente.

h. Ácido clorídrico 0,05*N*. Diluiu-se 0,76 ml de HCl concentrado em 500 ml de água destilada.

### 3.4 Determinação bioquímica da hidroxiprolina

O processamento bioquímico para a determinação das taxas de hidroxiprolina das amostras teciduais, das soluções-padrão de trabalho de hidroxiprolina e das soluções brancas pode ser desdobrado em três etapas principais: a hidrólise ácida, a oxidação e a formação do pirrol.

#### 3.4.1 Hidrólise ácida das amostras

Transferiu-se as amostras teciduais para os respectivos tubos de vidro da primeira série; pipetou-se alíquotas de 1 ml de cada uma das soluções-padrão de hidroxiprolina nos tubos respectivos; pipetou-se um volume de 1 ml de água destilada em cada um dos tubos assinalados como brancos.

Realizou-se a hidrólise ácida mediante o adição de 1 ml de ácido clorídrico concentrado em cada um dos tubos de vidro contendo as amostras. Fechou-se firmemente as tampas de rosca. Na seqüência, aqueceu-se estes tubos em banho-maria a 100°C durante 14 horas.

#### 3.4.2 Oxidação

Completada a etapa da hidrólise ácida, resfriou-se os tubos sob água de torneira corrente e realizou-se a centrifugação das amostras em centrífuga DONNER CD100, a 4000 rpm durante 5 minutos, para a separação de eventuais impurezas presentes sob forma de partículas sólidas.

a. Adicionou-se 1 gota da solução de fenolftaleína. Em seguida, ajustou-se o pH para uma coloração rosada pela adição de 0,95 ml de KOH 12*N* seguida de 0,5 ml de KOH 1*N*, obtendo-se o ajuste final mediante a adição gota-a-gota de KOH 0,1*N*. A fenolftaleína é um indicador de pH e apresenta viragem para uma coloração rósea num pH básico entre 8,2 e 9,8.

b. Diluiu-se os hidrolisados referentes ao item 3.4.2.a com água destilada, até a marca de 15 ml.

c. Transferiu-se alíquotas de 3 ml das soluções dos tubos da etapa anterior (3.4.2.b) para os tubos respectivos da segunda série. Os tubos da primeira série foram nesta etapa alocados para depósito em lugar protegido da luz; assim, na seqüência da presente descrição, far-se-á referência inicial apenas aos tubos de vidro da segunda série.

d. Adicionou-se 1 ml de água destilada a todos os tubos, para totalizar um volume final de solução de 4 ml.

e. Acrescentou-se 1 gota de solução de fenolftaleína para realização de um novo reajuste do pH, obtendo-se a coloração róseo-clara com KOH 0,05N ou HCl 0,05N.

f. Realizou-se o saturamento da solução, acrescentando-se aproximadamente 3 g de KCl à amostra.

g. Pipetou-se 0,5 ml de reagente de alanina e 1,0 ml de tampão borato de potássio em cada um dos tubos das amostras. Misturou-se bem em misturador mecânico (Modelo AT-56, Phoenix) e deixou-se em repouso à temperatura ambiente por 30 minutos. Neste intervalo de tempo, repetiu-se novamente a mistura em agitador mecânico.

h. Induziu-se o processo de oxidação propriamente dito mediante o adição de 1,0 ml de solução de cloramina-T 0,2M sob homogenização concomitante em misturador mecânico. Deixou-se as amostras em repouso por 25 minutos, com agitação ocasional dos frascos. Como produto da oxidação da hidroxiprolina, obtém-se nesta fase os ácidos  $\Delta^1$ -pirrol-4-hidroxi-carboxílico e pirrol-2-carboxílico.

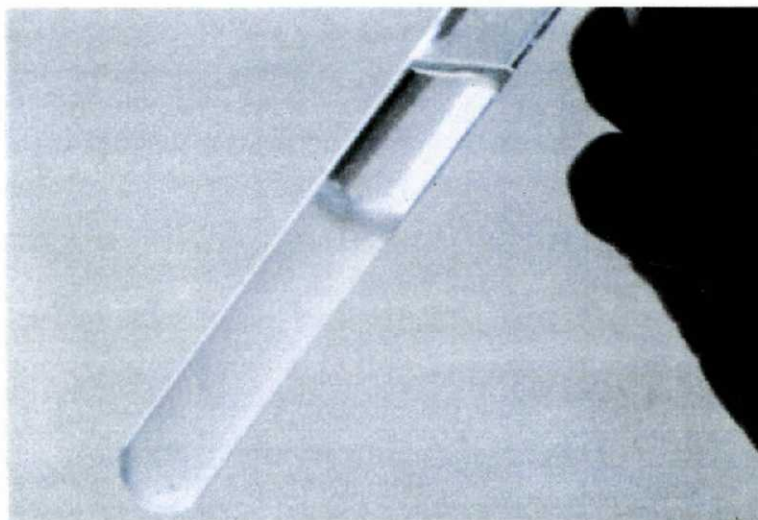
i. Adicionou-se aos tubos da etapa anterior (3.4.2.h), 3,0 ml de tiosulfato de sódio 3,6M para interromper o processo de oxidação. Após mistura vigorosa da solução em misturador mecânico, adicionou-se 5,0 ml de tolueno. Fechou-se firmemente os tubos de vidro com as respectivas tampas de teflon.

j. Finalmente, realizou-se novo agitação vigoroso dos tubos, durante 5 minutos, em misturador mecânico, seguido da retirada por aspiração, da camada de tolueno junto com as impurezas por ele extraídas. Os ácidos  $\Delta^1$ -pirrol-4-hidroxi-carboxílico e pirrol-2-carboxílico formados pela oxidação da hidroxiprolina pela cloramina-T (etapa 3.4.2.h) não são extraídos pelo processo, por não serem solúveis em tolueno. O tolueno e as impurezas retirados foram descartados. Recolocou-se as tampas firmemente sobre os tubos.

### 3.4.3 Formação de pirrol

Cumpridas as etapas de hidrólise ácida e de oxidação da hidroxiprolina em ácido  $\Delta^1$ -pirrol-4-hidroxi-carboxílico e ácido pirrol-2-carboxílico, realiza-se o aquecimento da solução para a transformação térmica dos referidos ácidos em pirrol.

a. Colocou-se os tubos da etapa 3.4.2.j em banho-maria a 100°C, pelo período de 30 minutos. Nesta etapa ocorre a formação do pirrol, ao qual convencionou-se chamar de **cromóforo** (Figura 1).



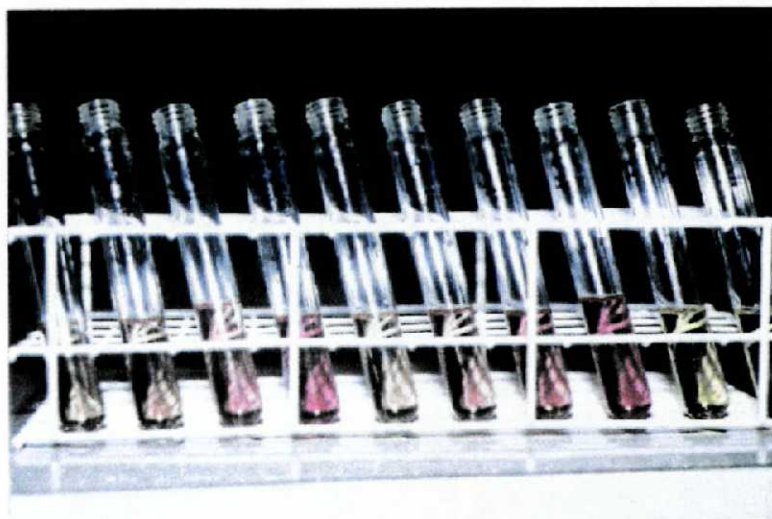
**Figura 1** - Extrato de tolueno (camada superior), contendo o pirrol (cromóforo).

b. Resfriou-se os tubos sob água de torneira corrente e adicionou-se exatos 5,0 ml de tolueno. Em seguida fechou-se novamente os tubos e realizou-se novo agitação vigoroso em misturador mecânico, por 5 minutos. Como o pirrol é solúvel em tolueno, ele passa a integrar o extrato de tolueno.

c. Pipetou-se exatos 2,5 ml do extrato de tolueno da etapa anterior (3.4.3.b) nos tubos de vidro menores, correspondentes à terceira série, e adicionou-se 1,0 ml de reagente de EHRLICH sob agitação concomitante em misturador mecânico. Neste instante ocorreu a imediata formação de cor e à esta solução final convencionou-se



chamar de **cromógeno** (Figura 2). Assim obteve-se os cromógenos das amostras teciduais e os cromógenos das soluções-padrão de trabalho de hidroxiprolina.



**Figura 2** - Reação formadora de cor pelo reativo de EHRlich: cromógeno.

#### 3.4.4 Leitura em espectrofotômetro

Manteve-se as amostras em repouso por 30 minutos a fim de se alcançar a estabilidade do cromógeno e conseqüentemente da reação formadora de cor. Realizou-se a leitura em espectrofotômetro da absorção contra a solução branca, a 560 nm. Utilizou-se o espectrofotômetro de fluxo contínuo CELM E210D, com unidade de impressão CELM SB-215P (Figura 3). Nos casos em que a capacidade de leitura do aparelho foi ultrapassada em seu limite superior, realizou-se a diluição de 1 ml do cromógeno em 2 ml de solução branca.

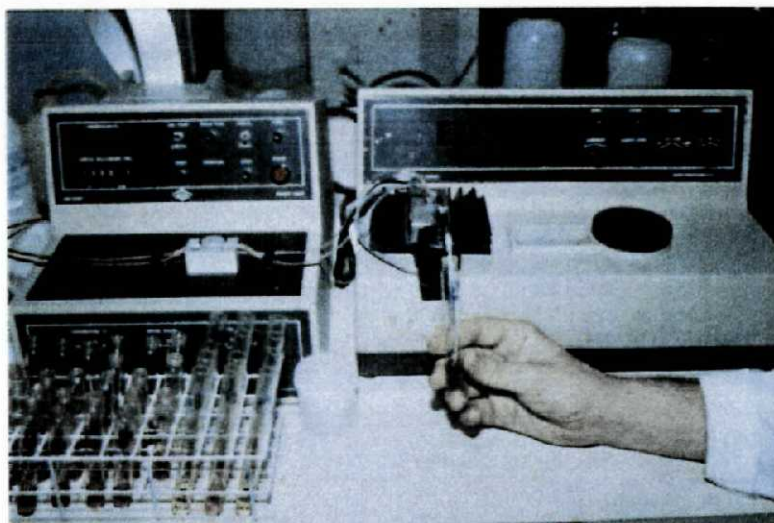


Figura 3 - Leitura da absorbância em espectrofotômetro.

### 3.5 Cálculo final da hidroxiprolina

Com base nos valores de referência obtidos pelo peso da amostra tecidual e pelo valor da absorbância do cromógeno, pode-se, finalmente, determinar a taxa de hidroxiprolina tecidual presente na amostra tecidual. Vale ressaltar que a taxa de hidroxiprolina contida nas soluções-padrão de trabalho é previamente conhecida.

Para o cálculo final da quantidade de hidroxiprolina presente na amostra tecidual em miligramas de hidroxiprolina por grama de tecido (Fórmula nº 3a,b), utiliza-se a razão da quantidade de hidroxiprolina em miligramas por mililitro de solução (Fórmula nº 1), pelo peso da amostra tecidual em gramas de tecido por mililitro (Fórmula nº 2).

a. Fórmula nº 1:

$$\text{mg total de hidroxiprolina / ml} = \frac{A_x - A_b}{A_p - A_b} \times 0,0036$$

onde:

$A_x$  = Absorbância do cromógeno da amostra tecidual

$A_p$  = Absorbância do cromógeno da solução-padrão de trabalho de hidroxiprolina

$A_b$  = Absorbância da solução branca

b. Fórmula nº 2:

$$\text{Total de tecido / ml} = \frac{\text{g de peso da amostra}}{15 \text{ ml (diluição inicial)}}$$

c. Fórmula nº 3a:

$$\text{mg de hidroxiprolina / g de tecido} = \frac{\text{mg de hidroxiprolina / ml}}{\text{g de tecido / ml}}$$

ou Fórmula nº 3b:

$$\text{mg de hidroxiprolina / g de tecido} = \frac{(\text{mg de hidroxiprolina / ml}) \times 3}{\text{g de tecido / ml}}$$

Utilizou-se a fórmula nº 3b nos casos em que foi realizada a diluição do cromógeno com solução branca.

### 3.6 Determinação da curva de linearidade

Extrapolou-se as leituras da absorbância das soluções-padrão de hidroxiprolina para um gráfico e testou-se os resultados para a sua correlação mediante regressão linear ( $r$ ), obtendo-se os valores para o coeficiente angular ( $a$ ) e o coeficiente linear ( $b$ ) da reta correspondentes à fórmula  $y=ax+b$ . Realizou-se estes cálculos com auxílio de calculadora eletrônica científica<sup>1</sup>. Nesta fórmula, ( $y$ ) corresponde ao valor obtido para a absorbância da amostra, podendo-se assim obter ( $x$ ), que corresponde à concentração de hidroxiprolina.

### 3.7 Avaliação estatística

Os resultados para cada um dos segmentos estudados, foram analisados com relação ao cálculo da média e do desvio-padrão da média, conforme BEIGUELMAN<sup>2</sup> (1988).

---

<sup>1</sup>CASIO, Calculadora programável FX702P.

<sup>2</sup>BEIGUELMAN, B. Curso prático de bioestatística. Ribeirão Preto, Revista Brasileira de Genética, 1988. p.15-19.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Peso dos animais

A distribuição do peso dos animais, em quilogramas, pode ser observado na tabela 3.

**Tabela 3**

Distribuição dos animais por peso corpóreo em quilogramas

Animal Peso		Animal Peso	
A	11	E	11
B	7	F	10
C	8	G	11
D	8	H	7

### 4.2 Peso das amostras teciduais

O peso das amostras teciduais demonstrou homogeneidade em cada um dos segmentos isoladamente. A distribuição dos segmentos estudados e das amostras teciduais conforme o seu número e a média do peso em cada segmento, pode ser observada em relação aos pesos das amostras teciduais, em gramas, na tabela 4.

Tabela 4

Distribuição do peso das amostras teciduais em gramas e a média (m) do peso, conforme os segmentos estudados e os seus respectivos números (n<sup>o</sup>)

EC n <sup>o</sup>	peso	ET n <sup>o</sup>	peso	E n <sup>o</sup>	peso
01	0,22	09	0,18	17	0,10
02	0,17	10	0,22	18	0,24
03	0,16	11	0,20	19	0,18
04	0,12	12	0,21	20	0,20
05	0,20	13	0,19	21	0,19
06	0,22	14	0,15	22	0,24
07	0,22	15	0,18	23	0,22
08	0,18	16	0,10	24	0,16
(m) = 0,185		0,178		0,191	
D n <sup>o</sup>	peso	JI n <sup>o</sup>	peso	CT n <sup>o</sup>	peso
25	0,14	33	0,21	41	0,16
26	0,13	34	0,17	42	0,15
27	0,13	35	0,18	43	0,24
28	0,15	36	0,16	44	0,20
29	0,14	37	0,18	45	0,16
30	0,13	38	0,15	46	0,21
31	0,13	39	0,15	47	0,26
32	0,14	40	0,18	48	0,24
(m) = 0,136		0,172		0,202	
CS n <sup>o</sup>	peso	R n <sup>o</sup>	peso		
49	0,20	57	0,14		
50	0,20	58	0,17		
51	0,14	59	0,17		
52	0,17	60	0,18		
53	0,14	61	0,23		
54	0,15	62	0,20		
55	0,20	63	0,23		
56	0,22	64	0,23		
(m) = 0,177		0,193			

EC = esôfago cervical; ET = esôfago torácico; E = estômago; D = duodeno;  
 JI = jejuno-íleo; CT = colo transversal; CS = colo sigmóide; R = reto.

### 4.3 Soluções-padrão

Os valores de referência de absorvância obtidos para as soluções-padrão de trabalho de hidroxiprolina, bem como o índice representativo da linearidade dos resultados, podem ser observados na tabela 5.

**Tabela 5**

Correlação entre o volume (V) da solução-padrão de estoque de hidroxiprolina (36 mg / ml), a concentração das soluções-padrão de trabalho de hidroxiprolina (C-SPT) e os valores de absorvância (Abs.) obtidos pela leitura espectrofotométrica das diversas amostras (n<sup>o</sup>)

n <sup>o</sup>	(V)	C-SPT	Abs.
65	1,000 ml	36 µg/ml	1.568
66	0,500 ml	18 µg/ml	0.667
67	0,250 ml	9 µg/ml	0.421
68	0,125 ml	4,5 µg/ml	0.342

Analisou-se os valores de absorvância obtidos para as diluições das soluções-padrão de trabalho de hidroxiprolina em relação com as concentrações das mesmas, para o estudo do índice de correlação (r) dos dados. Obteve-se um valor de correlação (r) de 0,9875 . Como a maior correlação de linearidade possível é obtida para o valor absoluto 1, o índice encontrado no presente estudo pode ser considerado como altamente satisfatório. Extrapolando-se estes dados para a fórmula de uma reta ( $y=ax+b$ ), obteve-se para o coeficiente angular (a) um valor de 0,0773 e para o coeficiente linear (b) um valor de 0,0398.

A figura 4 ilustra a curva de correlação obtida entre as diversas concentrações da solução-padrão de trabalho de hidroxiprolina e os respectivos valores de absorvância obtidos.

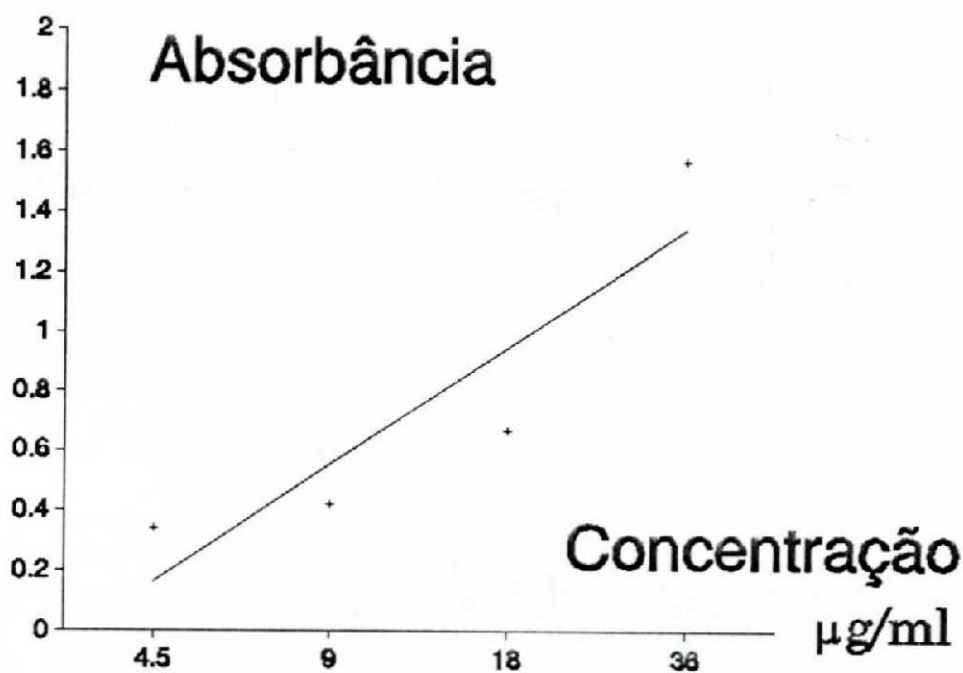


Figura 4 - Curva de correlação (r) das soluções-padrão de trabalho de hidroxiprolina.

#### 4.4 Solução branca

Obteve-se para as soluções brancas uma leitura espectrofotométrica igual a 0,025, contra tolueno como 0,000.



#### 4.5 Concentração de hidroxiprolina em miligramas por grama de amostra tecidual nos diversos segmentos estudados

##### 4.5.1 Esôfago cervical

Obteve-se uma taxa de hidroxiprolina tecidual média (m) igual a 6,298 mg/g com um desvio padrão ( $\Delta p$ ) de 2,589 mg/g. Os valores individuais da taxa de hidroxiprolina do esôfago cervical em cada animal podem ser observados na tabela 6.

**Tabela 6**

Correlação entre o número (n<sup>o</sup>) da amostra tecidual, seu peso em gramas (g), a leitura da absorbância do seu cromógeno (Abs.), a diferença entre a absorbância do cromógeno da amostra tecidual e a absorbância da solução branca (Abs-b), a taxa de hidroxiprolina em miligramas por mililitro de cromógeno (mg/ml), a razão entre o peso da amostra tecidual e o volume de diluição do hidrolisado (g/15ml) e a concentração final de hidroxiprolina em miligramas por grama, obtidos para o esôfago cervical dos cães (amostras teciduais n<sup>o</sup> 01-08)

n <sup>o</sup>	g	Abs.	Abs-b	mg/ml	g/15ml	mg/g
01	0,22	1,549(*)	1,524	0,034	0,015	6,800
02	0,17	0,047	0,022	0,000	0,011	0,000
03	0,16	1,310	1,285	0,029	0,010	2,900
04	0,12	0,984	0,959	0,022	0,008	2,750
05	0,20	1,641(*)	1,616	0,037	0,013	8,538
06	0,22	1,502(*)	1,477	0,033	0,015	6,600
07	0,22	1,590(*)	1,565	0,035	0,015	7,000
08	0,18	1,704(*)	1,679	0,038	0,012	9,500

(\*) Valores de absorbância após a diluição de 1 ml do cromógeno em 2 ml de solução branca.

## 4.5.2 Esôfago torácico

Obteve-se uma taxa de hidroxiprolina tecidual média (m) igual a 8,688 mg/g com um desvio padrão ( $\Delta p$ ) de 2,404 mg/g. Os valores individuais da taxa de hidroxiprolina do esôfago torácico em cada animal podem ser observados na tabela 7.

Tabela 7

Correlação entre o número (n<sup>o</sup>) da amostra tecidual, seu peso em gramas (g), a leitura da absorbância do seu cromógeno (Abs.), a diferença entre a absorbância do cromógeno da amostra tecidual e a absorbância da solução branca (Abs-b), a taxa de hidroxiprolina em miligramas por mililitro de cromógeno (mg/ml), a razão entre o peso da amostra tecidual e o volume de diluição do hidrolisado (g/15ml) e a concentração final de hidroxiprolina em miligramas por grama, obtidos para o esôfago torácico dos cães (amostras teciduais n<sup>o</sup> 09-16)

n <sup>o</sup>	g	Abs.	Abs-b	mg/ml	g/15ml	mg/g
09	0,18	1,941(*)	1,916	0,043	0,012	10,750
10	0,22	1,793(*)	1,768	0,040	0,015	8,000
11	0,20	0,919(*)	0,894	0,020	0,013	4,615
12	0,21	1,354(*)	1,329	0,030	0,014	6,428
13	0,19	1,657(*)	1,632	0,037	0,012	9,250
14	0,15	1,807(*)	1,782	0,041	0,010	12,300
15	0,18	1,544(*)	1,519	0,035	0,012	8,750
16	0,10	0,987(*)	0,962	0,022	0,007	9,428

(\*) Valores de absorbância após a diluição de 1 ml do cromógeno em 2 ml de solução branca.

## 4.5.3 Estômago

Obteve-se uma taxa de hidroxiprolina tecidual média (m) igual a 6,385 mg/g com um desvio padrão ( $\Delta$ )p de 1,218 mg/g. Os valores individuais da taxa de hidroxiprolina do estômago em cada animal podem ser observados na tabela 8.

Tabela 8

Correlação entre o número (n<sup>o</sup>) da amostra tecidual, seu peso em gramas (g), a leitura da absorbância do seu cromógeno (Abs.), a diferença entre a absorbância do cromógeno da amostra tecidual e a absorbância da solução branca (Abs-b), a taxa de hidroxiprolina em miligramas por mililitro de cromógeno (mg/ml), a razão entre o peso da amostra tecidual e o volume de diluição do hidrolisado (g/15ml) e a concentração final de hidroxiprolina em miligramas por grama, obtidos para o estômago dos cães (amostras teciduais n<sup>o</sup> 17-24)

n <sup>o</sup>	g	Abs.	Abs-b	mg/ml	g/15ml	mg/g
17	0,10	- (*/†)	-	-	0,007	-
18	0,24	1,587(*)	1,562	0,036	0,016	6,750
19	0,18	1,474(*)	1,449	0,033	0,012	8,250
20	0,20	1,433(*)	1,408	0,032	0,013	7,384
21	0,19	0,944(*)	0,919	0,021	0,012	5,250
22	0,24	1,566(*)	1,541	0,035	0,016	6,562
23	0,22	1,083(*)	1,058	0,024	0,015	4,800
24	0,16	0,863(*)	0,838	0,019	0,010	5,700

(\*) Valores de absorbância após a diluição de 1 ml do cromógeno em 2 ml de solução branca.

(†) A absorbância extrapolou a capacidade de leitura do aparelho, apesar de diluição do cromógeno.

(-) Resultado não obtido por impossibilidade de leitura da absorbância.

## 4.5.4 Duodeno

Obteve-se uma taxa de hidroxiprolina tecidual média (m) igual a 2,187 mg/g com um desvio padrão ( $\Delta p$ ) de 1,350 mg/g. Excluindo-se os valores encontrados nas amostras teciduais de números 25 e 28, os quais se encontram afastados da média em mais de um desvio-padrão, encontrou-se uma taxa de hidroxiprolina tecidual média (m) igual a 2,807 mg/g com um desvio padrão ( $\Delta p$ ) de 0,829 mg/g. Os valores individuais da taxa de hidroxiprolina do duodeno em cada animal pode ser observada na tabela 9.

Tabela 9

Correlação entre o número ( $n^{\circ}$ ) da amostra tecidual, seu peso em gramas (g), a leitura da absorbância do seu cromógeno (Abs.), a diferença entre a absorbância do cromógeno da amostra tecidual e a absorbância da solução branca (Abs-b), a taxa de hidroxiprolina em miligramas por mililitro de cromógeno (mg/ml), a razão entre o peso da amostra tecidual e o volume de diluição do hidrolisado (g/15ml) e a concentração final de hidroxiprolina em miligramas por grama, obtidos para o duodeno dos cães (amostras teciduais  $n^{\circ}$  25-32)

$n^{\circ}$	g	Abs.	Abs-b	mg/ml	g/15ml	mg/g
25	0,14	0,272	0,247	0,005	0,009	0,555‡
26	0,13	0,890	0,865	0,020	0,008	2,500
27	0,13	1,538	1,513	0,035	0,008	4,375
28	0,15	0,106	0,081	0,001	0,010	0,100‡
29	0,14	1,179	1,154	0,026	0,009	2,888
30	0,13	0,715	0,690	0,016	0,008	2,000
31	0,13	1,009	0,984	0,022	0,008	2,750
32	0,14	0,957	0,932	0,021	0,009	2,333

(‡) Valores abaixo de um desvio-padrão da média.

## 4.5.5 Jejuno-ílio

Obteve-se uma taxa de hidroxiprolina tecidual média (m) igual a 3,716 mg/g com um desvio padrão ( $\Delta p$ ) de 2,178 mg/g. Excluindo-se o valor encontrado na amostra tecidual de número 33, o qual apresenta-se afastado da média em mais de um desvio-padrão, encontrou-se uma taxa de hidroxiprolina tecidual média (m) igual a 4,145 mg/g com um desvio padrão ( $\Delta p$ ) de 1,954 mg/g. Os valores individuais da taxa de hidroxiprolina do jejuno-ílio em cada animal podem ser observados na tabela 10.

Tabela 10

Correlação entre o número (n<sup>o</sup>) da amostra tecidual, seu peso em gramas (g), a leitura da absorbância do seu cromógeno (Abs.), a diferença entre a absorbância do cromógeno da amostra tecidual e a absorbância da solução branca (Abs-b), a taxa de hidroxiprolina em miligramas por mililitro de cromógeno (mg/ml), a razão entre o peso da amostra tecidual e o volume de diluição do hidrolisado (g/15ml) e a concentração final de hidroxiprolina em miligramas por grama, obtidos para o jejuno-ílio dos cães (amostras teciduais n<sup>o</sup> 33-40)

n <sup>o</sup>	g	Abs.	Abs-b	mg/ml	g/15ml	mg/g
33	0,21	0,458	0,433	0,010	0,014	0,714‡
34	0,17	1,005(*)	0,980	0,022	0,011	6,000
35	0,18	1,063(*)	1,038	0,024	0,012	6,000
36	0,16	1,262	1,237	0,028	0,010	2,800
37	0,18	1,675	1,632	0,037	0,012	3,083
38	0,15	0,958(*)	0,933	0,022	0,010	6,600
39	0,15	1,000	0,975	0,022	0,010	2,200
40	0,18	1,246	1,221	0,028	0,012	2,333

(\*) Valores de absorbância após a diluição de 1 ml do cromógeno em 2 ml de solução branca.

(‡) Valor abaixo de um desvio-padrão da média.

## 4.5.6 Colo transverso

Obteve-se uma taxa de hidroxiprolina tecidual média (m) igual a 6,154 mg/g com um desvio padrão ( $\Delta p$ ) de 2,362 mg/g. Excluindo-se o valor encontrado na amostra tecidual de número 43, o qual apresenta-se afastado da média em mais de um desvio-padrão, encontrou-se uma taxa de hidroxiprolina tecidual média (m) igual a 6,873 mg/g com um desvio padrão ( $\Delta p$ ) de 1,301 mg/g. Os valores individuais da taxa de hidroxiprolina do colo transverso em cada animal podem ser observados na tabela 11.

Tabela 11

Correlação entre o número ( $n^{\circ}$ ) da amostra tecidual, seu peso em gramas (g), a leitura da absorbância do seu cromógeno (Abs.), a diferença entre a absorbância do cromógeno da amostra tecidual e a absorbância da solução branca (Abs-b), a taxa de hidroxiprolina em miligramas por mililitro de cromógeno (mg/ml), a razão entre o peso da amostra tecidual e o volume de diluição do hidrolisado (g/15ml) e a concentração final de hidroxiprolina em miligramas por grama, obtidos para o colo transverso dos cães (amostras teciduais  $n^{\circ}$  41-48)

$n^{\circ}$	g	Abs.	Abs-b	mg/ml	g/15ml	mg/g
41	0,16	1,317(*)	1,292	0,030	0,010	9,000
41	0,15	0,939(*)	0,914	0,023	0,010	6,900
43	0,24	0,302(*)	0,277	0,006	0,016	1,125‡
44	0,20	0,978(*)	0,953	0,022	0,013	5,076
45	0,16	0,835(*)	0,810	0,019	0,010	5,700
46	0,21	1,441(*)	1,416	0,032	0,014	6,857
47	0,26	1,667(*)	1,642	0,038	0,017	6,705
48	0,24	1,852(*)	1,827	0,042	0,016	7,875

(\*) Valores de absorbância após a diluição de 1 ml do cromógeno em 2 ml de solução branca.

(‡) Valor abaixo de um desvio-padrão da média.

## 4.5.7 Colo sigmóide

Obteve-se uma taxa de hidroxiprolina tecidual média (m) igual a 7,289 mg/g com um desvio padrão ( $\Delta p$ ) de 2,994 mg/g. Excluindo-se o valor encontrado na amostra tecidual de número 49, o qual apresenta-se afastado da média em mais de um desvio-padrão, encontrou-se uma taxa de hidroxiprolina tecidual média (m) igual a 8,286 mg/g com um desvio padrão ( $\Delta p$ ) de 1,083 mg/g. Os valores individuais da taxa de hidroxiprolina do colo sigmóide em cada animal podem ser observados na tabela 12.

Tabela 12

Correlação entre o número ( $n^{\circ}$ ) da amostra tecidual, seu peso em gramas (g), a leitura da absorbância do seu cromógeno (Abs.), a diferença entre a absorbância do cromógeno da amostra tecidual e a absorbância da solução branca (Abs-b), a taxa de hidroxiprolina em miligramas por mililitro de cromógeno (mg/ml), a razão entre o peso da amostra tecidual e o volume de diluição do hidrolisado (g/15ml) e a concentração final de hidroxiprolina em miligramas por grama, obtidos para o colo sigmóide dos cães (amostras teciduais  $n^{\circ}$  49-56)

$n^{\circ}$	g	Abs.	Abs-b	mg/ml	g/15ml	mg/g
49	0,20	0,242	0,217	0,004	0,013	0,307‡
50	0,20	1,786(*)	1,761	0,040	0,013	9,230
51	0,14	1,227(*)	1,202	0,027	0,009	9,000
52	0,17	1,128(*)	1,103	0,025	0,011	6,818
53	0,14	1,214(*)	1,189	0,027	0,009	9,000
54	0,15	1,031(*)	1,006	0,023	0,010	6,900
55	0,20	1,525(*)	1,500	0,034	0,013	7,846
56	0,22	1,891(*)	1,866	0,043	0,014	9,214

(\*) Valores de absorbância após a diluição de 1 ml do cromógeno em 2 ml de solução branca.

(‡) Valor abaixo de um desvio-padrão da média.

## 4.5.8 Reto

Obteve-se uma taxa de hidroxiprolina tecidual média (m) igual a 8,253 mg/g com um desvio padrão ( $\Delta p$ ) de 1,652 mg/g. Os valores individuais da taxa de hidroxiprolina do reto em cada animal podem ser observados na tabela 13.

Tabela 13

Correlação entre o número ( $n^{\circ}$ ) da amostra tecidual, seu peso em gramas (g), a leitura da absorbância do seu cromógeno (Abs.), a diferença entre a absorbância do cromógeno da amostra tecidual e a absorbância da solução branca (Abs-b), a taxa de hidroxiprolina em miligramas por mililitro de cromógeno (mg/ml), a razão entre o peso da amostra tecidual e o volume de diluição do hidrolisado (g/15ml) e a concentração final de hidroxiprolina em miligramas por grama, obtidos para o reto dos cães (amostras teciduais  $n^{\circ}$  57-64)

$n^{\circ}$	g	Abs.	Abs-b	mg/ml	g/15ml	mg/g
57	0,14	1,226(*)	1,201	0,028	0,009	9,333
58	0,17	0,835(*)	0,810	0,018	0,011	4,909
59	0,17	1,614(*)	1,589	0,036	0,011	9,818
60	0,18	1,485(*)	1,460	0,033	0,012	8,250
61	0,23	1,784(*)	1,759	0,040	0,015	8,000
62	0,20	1,829(*)	1,804	0,041	0,013	9,461
63	0,23	1,760(*)	1,735	0,040	0,015	8,000
64	0,23	- ( $\uparrow$ /*)	-	-	0,015	-

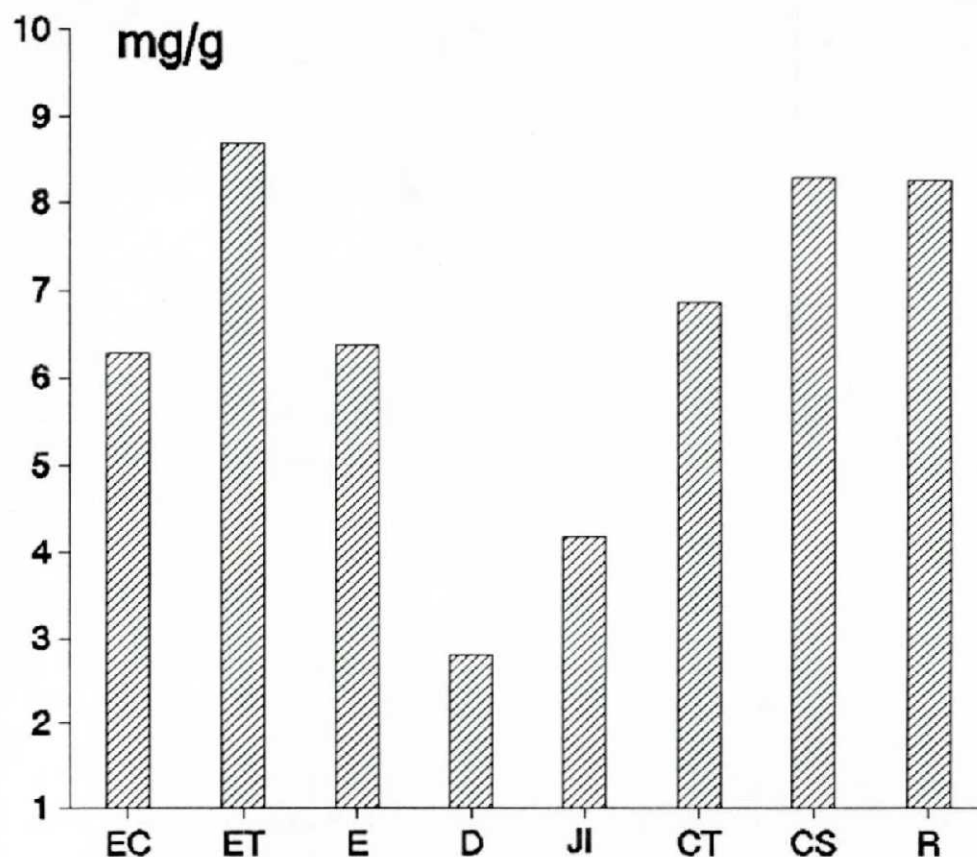
(\*) Valores de absorbância após a diluição de 1 ml do cromógeno em 2 ml de solução branca.

( $\uparrow$ ) A absorbância extrapolou a capacidade de leitura do aparelho, apesar de diluição do cromógeno.

(-) Resultado não obtido por impossibilidade de leitura da absorbância.



A figura 5 ilustra as taxas de hidroxiprolina comparativamente entre as diferentes amostras teciduais estudadas, agrupadas por segmentos.



**Figura 5** - Comparação entre as taxas de hidroxiprolina nos diferentes segmentos do canal alimentar dos cães. EC = esôfago cervical; ET = esôfago torácico; E = estômago; D = duodeno; JI = jejuno-fílio; CT = colo transverso; CS = colo sigmóide; R = reto.

#### 4.6 Correlação entre o peso corpóreo dos cães e a taxa de hidroxiprolina

A comparação entre a taxa de hidroxiprolina encontrada no conjunto de amostras teciduais em cada um dos segmentos do canal alimentar dos cães com o respectivo peso dos animais, apresentou pequena correlação. Os índices de correlação ( $r$ ) encontrados foram: 0,2895 para as amostras de esôfago cervical, 0,5007 para as de esôfago torácico, -0,5775 para as de estômago, -0,0972 para as de duodeno, -0,1998 para as de intestino delgado, 0,0877 para as de colo transverso, -0,3321 para as de colo sigmóide e 0,4389 para as amostras de reto; estes dados podem ser visualizados na figura 6.

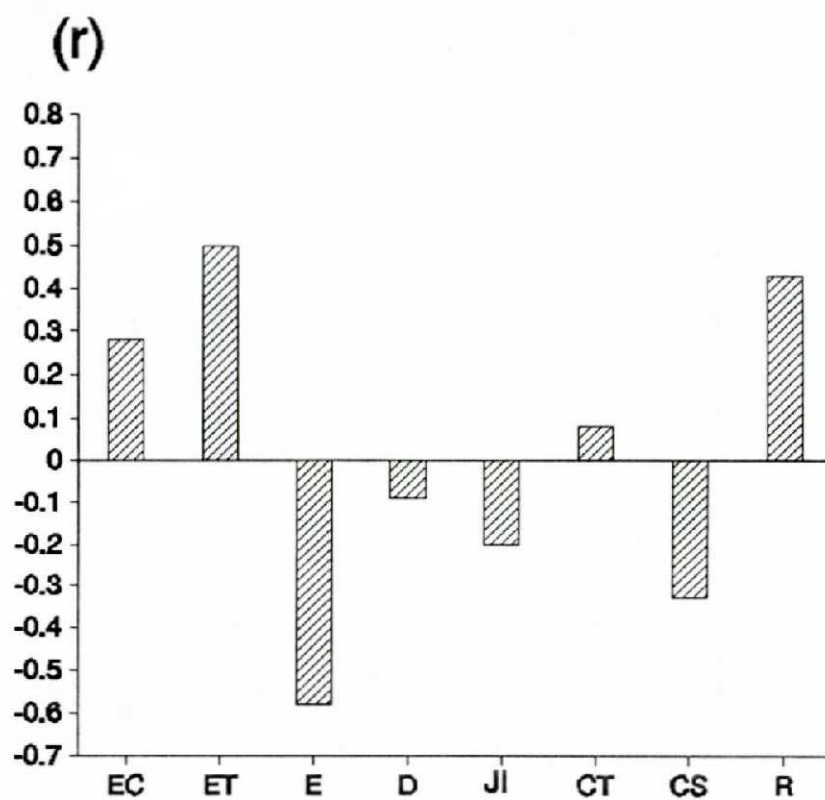


Figura 6 - Índice de correlação (r) entre a taxa de hidroxiprolina e o peso corpóreo dos animais, avaliados no conjunto de amostras teciduais estudadas para cada segmento. EC = esôfago cervical; ET = esôfago torácico; E = estômago; D = duodeno; JI = jejuno-íleo; CT = colo transverso; CS = colo sigmóide ; R = reto.

## 5 DISCUSSÃO

A determinação quantitativa do conteúdo colágeno em associação com a avaliação da resistência tênsil do tecido à tração e/ou da resistência à insuflação de ar atmosférico em um segmento do canal alimentar, constituem-se atualmente nas principais técnicas de avaliação qualitativa do processo cicatricial de um tecido ou de uma anastomose (PEACOCK, 1967; CRONIN e cols., 1968; PIKKARAINEN, 1968; JIBORN e cols., 1980b; NARESSE e cols., 1988; DEBUS, 1989; MARTENS e HENDRICKS, 1991; POLONIO, 1992; CZECHKO, 1992).

O comportamento e a dinâmica do colágeno podem ser ilustrados de uma maneira prática no exemplo da cicatrização de uma anastomose. Durante os primeiros 5 dias após a realização de uma anastomose, predomina o catabolismo do colágeno; nesta fase o material de síntese oferece sustentação e vedação ao canal alimentar. Após o 6º dia, inicia-se uma fase de síntese de colágeno, e pode ser observado um aumento progressivo no conteúdo colágeno até o 42º dia de pós-operatório. Concomitantemente, observa-se na cicatriz um ganho progressivo de força tênsil até dois anos após a confecção da anastomose. Aceita-se que não apenas a taxa absoluta do colágeno, mas também a forma de disposição de suas fibras - as quais são rearranjadas no transcurso do tempo - são responsáveis pela resistência tecidual. Segundo as palavras de PEACOCK (1967), "*...collagen is a dynamically changeable substance which may be seemingly inert for years, only to remodel or disappear with amazing rapidity when stimulated to do so.*"

Assim, o estudo da quantidade de colágeno, representado pela taxa de hidroxiprolina tecidual, permite uma análise valiosa, porém parcial, de uma cicatriz. Técnicas recentes, que lançam mão de precursores do colágeno marcados com isótopos radioativos, estão acrescentando novas variáveis a este campo (PROCKOP e cols., 1961; PEACOCK, 1967; e MARTENS e HENDRICKS, 1991). Apesar de

envolverem uma tecnologia avançada, estas técnicas permanecem devendo à comunidade científica avanços objetivos em relação aos conceitos introduzidos pelos métodos fotolorimétricos clássicos e não afastam de si a crítica de serem apenas variações sobre uma avaliação de momento, necessitando igualmente da complementação de parâmetros físicos de estudo (PROCKOP e cols., 1961; PEACOCK, 1967; BLUMENKRANTZ e HANSEN, 1977; DEBUS, 1989; MARTENS e HENDRICKS, 1991).

### **5.1 Escolha do animal**

O cão (*Canis familiaris*) foi escolhido, por ser um animal muito utilizado em cirurgia experimental relacionada ao canal alimentar. Como na presente revisão de literatura não encontrou-se descrição dos valores médios normais da taxa de hidroxiprolina em miligramas por grama de tecido para os diferentes segmentos do canal alimentar, aplicou-se a presente técnica com a finalidade de propor parâmetros normais médios que permitam futuras comparações em estudos de cicatrização de anastomoses.

### **5.2 Fase pré-estudo**

Fez-se premente um tratamento prévio à inclusão dos animais no protocolo, com a finalidade de obter-se animais livres de ectoparasitas e sem doenças infecciosas, bem com detentores de um padrão nutricional semelhante.

### **5.3 Obtenção dos fragmentos teciduais**

Obteve-se os fragmentos teciduais após anestesia dos animais com solução de Thionembatal, seguida de sacrifício mediante dose letal de KCl. Procedeu-se desta forma a fim de obter-se fragmentos teciduais com qualidade semelhante aos obtidos durante procedimentos de cirurgia experimental. A retirada dos fragmentos

teciduais foi realizada imediatamente na seqüência, apesar de PIKKARAINEN (1968) relatar a retirada dos fragmentos num período de até uma hora após a morte do animal.

#### **5.4 Armazenamento dos fragmentos teciduais**

Os fragmentos teciduais foram colocados em frascos individuais e armazenadas em solução fisiológica a  $-20^{\circ}\text{C}$ , durante um período de 24 horas. Sabe-se que é viável manter-se proteínas a  $4^{\circ}\text{C}$  durante várias horas e congeladas durante meses ou até anos. PIKKARAINEN (1968) armazena suas amostras em gelo. Tratamento semelhante das peças é relatado por NARESSE e cols. (1988), que armazenam suas peças em congelador para processamento bioquímico posterior. DEBUS (1988) armazena suas peças em nitrogênio líquido: este é provavelmente o melhor processo de armazenamento de amostras biológicas. O acondicionamento dos fragmentos teciduais em congelador, nas condições aplicadas neste estudo, mostrou ser satisfatório e de fácil execução. Da mesma forma, não ocorreram perdas de fragmentos teciduais por desnaturação protéica.

#### **5.5 Métodos de identificação da hidroxiprolina**

A técnica pioneira para a identificação de hidroxiprolina presente na gelatina, descrita por FISCHER (1902), apud DAKIN (1920), consistia no estudo do resíduo obtido após a esterificação dos aminoácidos convencionais da amostra. FISCHER encontrou 3% de hidroxiprolina na gelatina. A inespecificidade desta técnica, pode ser avaliada no fato de atualmente aceitar-se uma participação de 13,5 - 14% de hidroxiprolina na constituição do colágeno. DAKIN, em 1920, procurou melhorar a sensibilidade desta técnica original, porém poucos anos mais tarde seriam introduzidos princípios revolucionários na abordagem bioquímica desta questão e a dosagem da hidroxiprolina presente em hidrolisados passou a uma fase mais objetiva e menos empírica: passou ao domínio da colorimetria.

A demonstração inicial de que o hipoclorito transforma a prolina em *n*-pirrolina e em analogia a oxiprolina em *n*-oxipirrolina, coube a LANGHELD (1909), apud LANG (1933). Baseadas nestes conceitos, surgiram reações colorimétricas para a determinação da hidroxiprolina, mediante reações produtoras de cor com a isatina, a ninidrina e o reativo de EHRLICH. Mais recentemente, após a demonstração inicial por WEIGELE e cols. (1973) da transformação da hidroxiprolina em uma amina primária, tornou-se possível a sua reação com a fluoresceína e o *o*-ftalaldeído, permitindo desta forma a determinação fluorométrica mediante cromatografia líquida de alto fluxo. Finalmente, pode-se ainda lançar mão de precursores da hidroxiprolina marcados com isótopos radioativos para estudos de incorporação de colágeno em cicatrizes.

Apesar de uma rica diversidade em relação às fases intermediárias necessárias para a dosagem bioquímica colorimétrica da hidroxiprolina, a maior parte dos estudos da presença deste aminoácido em hidrolisados protéicos diversos, em urina e em amostras teciduais do canal alimentar, lança mão da reação produtora de cor mediante o uso de reativo de EHRLICH. Provavelmente a estabilidade final do cromógeno seja o motivo desta predileção. Conforme esta tendência observada na presente revisão de literatura, optou-se pelo uso do reativo de EHRLICH neste estudo.

## 5.6 Determinação bioquímica quantitativa da hidroxiprolina

A metodologia empregada no presente estudo baseia-se no técnica descrita originalmente por KIVIRIKKO e cols. (1967) e adaptada por IBBOTT (1974). Dividir-se-á a discussão deste processo bioquímico em três itens distintos, quais sejam:

- a) A hidrólise ácida da amostra tecidual.
- b) A oxidação da hidroxiprolina em ácido pirrol-2-carboxílico.
- c) A formação e extração do pirrol e sua leitura espectrofotométrica.

### 5.6.1 Hidrólise ácida das amostras

O processo de hidrólise corresponde à decomposição química, em que uma substância é fragmentada em componentes mais simples pela adição ou retirada de água. As proteínas são formadas por aminoácidos, unidos por meio de ligações peptídicas que no processo de hidrólise são quebradas pela adição de moléculas de água. O aquecimento de polipeptídeos com HCl 6*N* em excesso, a uma temperatura que varia entre 100 - 120°C, durante 10 a 24 horas em tubo fechado, é o processo usual para a hidrólise completa de proteínas. Nessas condições ocorre pouca ou nenhuma racemização dos aminoácidos (Na racemização ocorre a transformação de um produto em um componente sem atividade óptica). A opção teórica à hidrólise ácida é a hidrólise alcalina.

LANG (1933) era da opinião de que seria indiferente o tipo de hidrólise a que deveria-se submeter a amostra protéica em análise, se ácida ou alcalina. Posteriormente demonstrou-se que o triptofano, a serina e a treonina são parcialmente destruídos pela hidrólise ácida, enquanto que a cisteína, a cistina, a serina e a treonina são destruídas pela hidrólise alcalina, a qual concomitantemente leva à racemização de todos os aminoácidos. Desta forma, autores como NEUMAN e LOGAN (1950a); PROCKOP e UDENFRIEND (1960); WOESSNER Jr. (1961); BERGMAN e LOXLEY (1963); KIVIRIKKO e cols. (1967); STEGEMANN e STALDER (1967); CRONIN e cols. (1968); IBBOTT (1974); BUTCHER e LOWRY (1976); e BLUMENKRANTZ e HANSEN (1977) utilizam a hidrólise ácida para a separação das moléculas de hidroxiprolina do colágeno.

A relação entre o tempo de hidrólise e a temperatura sob a qual se processa a reação apresenta uma proporcionalidade indireta: aumentando-se a temperatura pode-se reduzir o tempo da reação e aumentando-se o tempo, pode-se reduzir a temperatura da reação. Assim, NEUMAN e LOGAN (1950a); GRUNBAUM e GLICK (1956); WOESSNER Jr. (1961); e JIBORN e cols. (1978), utilizam temperaturas elevadas (entre 130 - 170°C) e um tempo de reação em torno de 3 horas. Já autores como LANG (1933); BERGMAN e LOXLEY (1963); KIVIRIKKO e cols. (1967); IBBOTT (1974); BLUMENKRANTZ e HANSEN (1977); e ANGELELI e cols. (1982) lançam mão de uma temperatura menor, entre 100 - 110°C, e um tempo de hidrólise ácida maior, entre 16 - 24 horas. No presente

estudo obteve-se uma hidrólise completa das amostras teciduais, em 14 horas a 100°C e com o uso de apenas 1 ml do ácido. Quando as amostras teciduais forem de peso maior do que as aqui processadas, será necessário aumentar-se o volume de HCl para obter-se a hidrólise completa.

### 5.6.2 Oxidação

A oxidação corresponde ao processo da combinação de uma substância com o oxigênio. LANGHELD (1909), apud LANG (1933), foi o primeiro a sugerir que o hipoclorito transforma, por oxidação, a prolina em *n*-pirrolina e em analogia a oxiprolina em *n*-oxipirrolina. Da mesma forma, LANG propõe o tratamento da hidroxiprolina com hipoclorito de sódio, para dar origem à formação de *n*-oxipirrolina. WALDSCHMIDT-LEITZ e AKABORI (1934), numa análise crítica à técnica proposta por LANG (1933), sugerem que o elemento produtor de cor (cromóforo) na reação de oxidação da hidroxiprolina, seja o pirrol e não a *n*-oxipirrolina. RADHAKRISHNAN e MEISTER (1957) confirmam a opinião de WALDSCHMIDT-LEITZ e AKABORI, demonstrando que a hidroxiprolina pode ser oxidada em ácido pirrol-2-carboxílico apresentando na reação um componente intermediário que provavelmente é o ácido  $\Delta^1$ -pirrol-4-hidroxi-carboxílico.

Várias são as técnicas utilizadas para a oxidação da hidroxiprolina em ácido pirrol-2-carboxílico. Merecem destaque a oxidação enzimática, as transaminações enzimática e não-enzimática, bem como as reações de oxidação pelo peróxido de hidrogênio e pela cloramina-T. Apesar do desenvolvimento de inúmeros métodos colorimétricos que se fundamentam nestas reações, BERGMAN e LOXLEY (1961) permitem-se questionarem sua veracidade, sem todavia postularem uma explicação alternativa.

As duas substâncias mais citadas para a oxidação da hidroxiprolina são o peróxido (de hidrogênio ou de sódio) e a cloramina-T. Sobre o peróxido de hidrogênio, BERGMAN e LOXLEY (1963) ressaltam que a formação de cor da reação depende diretamente da concentração do peróxido e da concentração de hidroxiprolina. McFARLANE e GUEST (1939); NEUMAN e LOGAN (1950a); GRUNBAUM e GLICK (1956); e WOESSNER Jr. (1961) utilizam o processo de



oxidação pelo peróxido em seus métodos de determinação quantitativa da hidroxiprolina.

PROCKOP e UDENFRIEND (1960); BERGMAN e LOXLEY (1963); STEGEMANN e STALDER (1967); KIVIRIKKO e cols. (1967); IBBOTT (1974); e BLUMENKRANTZ e HANSEN (1977), utilizam a cloramina-T como reativo oxidante da hidroxiprolina, conforme proposto originalmente por STEGEMANN em 1958, apud PROCKOP e UDENFRIEND (1960). Segundo BERGMAN e LOXLEY (1970) e IBBOTT (1974), o pirrol (cromóforo originado pela oxidação da hidroxiprolina pela cloramina-T) é mais estável do que a 1,2-dihidrohidroxiprolina (cromóforo originado pela oxidação da hidroxiprolina pelo peróxido). BLUMENKRANTZ e HANSEN (1977) ressaltam que uma discreta acidez da solução não interfere com a oxidação, porém a presença de alcalinidade pode reduzir a intensidade final de cor formada, quando se usa a cloramina-T. IBBOTT (1974) interrompe a etapa da oxidação após 25 minutos pela adição de tiosulfato de sódio.

O pirrol formado pela oxidação da hidroxiprolina pela cloramina-T é altamente estável e praticamente não sofre alterações pela presença de outros produtos de oxidação ou mesmo pela presença de altas concentrações de cloramina-T. Além do mais, enquanto faz-se premente a retirada dos vestígios do peróxido de hidrogênio da solução antes da etapa de formação de cor, a cloramina-T não se constitui em fator interferente nesta fase. Desta forma, adotou-se no presente protocolo experimental a cloramina-T como agente oxidante. Deve-se ressaltar que a obtenção da solução de cloramina-T não oferece maiores dificuldades e a mistura imediata da solução à medida em que se acrescenta a mesma à amostra em estudo, garante uma oxidação eficiente.

Finalmente, utiliza-se a presença intencional de alanina na etapa da oxidação da hidroxiprolina, o que é, segundo PROCKOP e UDENFRIEND (1960), uma forma de diminuir-se a interferência da presença de outros aminoácidos ou substâncias afins ao mesmo tempo em que não se altera a quantidade do pirrol formado. DEBUS (1988) também relata o uso de alanina nesta fase da oxidação.

### 5.6.3 Formação e extração do pirrol

Cumprida a etapa da oxidação da hidroxiprolina à temperatura ambiente, obtém-se a formação do ácido pirrol-2-carboxílico (RADHAKRISHNAN e MEISTER, 1957). Nesta etapa, pode-se lançar mão de uma forma muito efetiva de retirada de impurezas: realiza-se a extração das mesmas pelo tolueno, pois o ácido  $\Delta^1$ -pirrol-4-hidroxi-carboxílico e o ácido pirrol-2-carboxílico não são extraídos pelo processo por não serem solúveis em tolueno (PROCKOP e UDENFRIEND, 1960; KIVIRIKKO e cols., 1967; e IBBOTT, 1974). É necessária assim uma próxima etapa para a origem de pirrol (cromóforo): esta transformação ocorre aquecendo-se a amostra durante 30 minutos em banho-maria com água fervente. Na fase seguinte, após o período de aquecimento, realiza-se a extração do pirrol em tolueno, o qual, por ser solúvel, passará a fazer parte do extrato (Figura 1). No presente estudo, observou-se que esta etapa de aquecimento é de fundamental importância e valor decisivo para o desenvolvimento posterior de coloração rósea pela reação com o reativo de EHRLICH.

### 5.6.4 Leitura espectrofotométrica

Na última etapa da determinação quantitativa da hidroxiprolina presente em hidrolisados protéicos processados conforme o método empregado no presente estudo, realiza-se a leitura espectrofotométrica da quantidade de cor formada pela reação do pirrol com o reativo de EHRLICH (cromógeno; Figuras 2 e 3). No presente estudo seguiu-se as indicações de BERGMAN e LOXLEY (1963); KIVIRIKKO e cols. (1967); IBBOTT (1974); e DEBUS (1988), os quais ressaltam que a leitura espectrofotométrica deve ser realizada em 560 nm. WOESSNER Jr. (1961) sugere esta leitura em 557 nm. ANGELELI e cols. (1982) não observaram diferenças nos resultados obtidos por leituras de amostras iguais realizadas em diversos aparelhos de espectrofotometria; para os autores, os picos de absorção máxima situam-se entre 558 e 562 nm.

Observou-se no presente estudo, uma grande frequência de amostras cuja quantidade de cromógeno excedeu à capacidade de leitura do espectrofotômetro.

Nestes casos, realizou-se a diluição do cromógeno com solução branca. Provavelmente o peso médio das amostras teciduais do canal alimentar dos cães, nas proporções aplicadas neste trabalho, tangenciam o limite superior de concentração de hidroxiprolina por mililitro, capaz de ser determinada pela leitura espectrofotométrica (como obtido pela fórmula nº 1). Eventualmente a utilização de amostras teciduais de peso menor ou a aplicação de uma diluição inicial maior do hidrolisado ácido, poderão facilitar esta fase da técnica. O fator limitante para a diminuição do tamanho das amostras teciduais em experimentos de cicatrização de anastomoses, poderá ser a necessidade de se incluir na amostra uma cicatriz, muitas vezes de proporções consideráveis. Para estes casos, a diluição final do cromógeno antes da leitura espectrofotométrica será uma opção prática.

WOESSNER Jr., em 1961, preocupou-se com a qualidade do cromógeno conforme o método original de STEGEMANN (1958), apud WOESSNER Jr. (1961), e reporta que conseguiu mantê-lo estável por pelo menos uma hora. A leitura da cor formada pela reação do pirrol com o reativo de EHRLICH, segundo preconizado por KIVIRIKKO e cols. (1967), deverá ser feita aproximadamente 30 minutos após. A estabilidade da cor é apenas frágil, pois observou-se no presente estudo uma nítida perda de sua intensidade com o passar de horas. Segundo STEGEMANN e STALDER (1967) e BERGMAN e LOXLEY (1970), um aumento na concentração do reativo de EHRLICH não aumenta a estabilidade do cromógeno formado. Esta variável não foi avaliada no presente trabalho.

#### 5.6.5 Cálculo final

A relação segundo a qual se apresentam os resultados finais dos métodos de quantificação da hidroxiprolina, apresenta uma extensa variação na literatura. As maneiras de expressar os resultados podem ser em microgramas ou miligramas por peso de tecido úmido, microgramas ou miligramas por peso de tecido seco, microgramas ou miligramas por área de tecido ou ainda microgramas ou miligramas por conteúdo de nitrogênio. GRUNBAUM e GLICK (1956); CRONIN e cols. (1968); PIKKARAINEN (1968); JIBORN e cols. (1980a); e DEBUS (1988) realizam a desidratação prévia das amostras, obtendo assim o cálculo final em razão do peso seco. No presente estudo os resultados são calculados em miligramas de

hidroxiprolina por grama de tecido, a partir da amostra não desidratada, conforme utilizado por STEGEMANN e STALDER (1967); NARESSE e cols. (1988); MARTENS e GLICK (1991); POLONIO (1992); e CZECZKO (1992). Esta é uma das relações de concentração que propicia um melhor entendimento do resultado por parte do médico, pois refere-se objetivamente ao tecido, tal qual o mesmo é manipulado, na intimidade, pelo cirurgião.

### 5.7 Peso das amostras teciduais

As amostras teciduais foram obtidas após o descongelamento dos fragmentos teciduais, mediante recorte de uma área circular com 9 mm de diâmetro, com auxílio de um molde vazador, à exemplo de POLONIO (1992) e CZECZKO (1992). Cada amostra apresentou assim uma área equivalente de todas as camadas do órgão, desde a túnica mucosa até a túnica adventícia ou serosa, com preservação da sua espessura normal. À exceção das amostras de duodeno, as quais apresentaram um peso médio de 0,136 g, todas as amostras dos demais segmentos apresentaram pesos iniciais semelhantes, variando entre 0,172 - 0,202 g (Tabela 4). Esta diferença entre os pesos é devida à espessura do órgão. A homogeneidade das amostras é preservada pelo fato de as áreas das amostras estudadas serem correspondentes (aproximadamente 63,58 mm<sup>2</sup>).

Determinou-se o peso das amostras após a secagem da umidade superficial das mesmas com papel absorvente, à semelhança do procedimento preconizado por WOESSNER Jr. (1961), NARESSE e cols. (1988), MARTENS e HENDRIKS (1991), POLONIO (1992), CZECZKO (1992) e citado por KORUDA e ROLANDELLI (1990). CRONIN e cols. (1968) e JIBORN e cols. (1978) sugerem a pesagem da amostra após prévia desidratação pelo calor, para evitar o que os autores denominam de efeito diluidor da eventual presença de edema, tese esta não aplicável ao presente estudo, por tratarem-se de amostras teciduais de segmentos normais do canal alimentar. GRUNBAUM e GLICK (1956) realizam a desidratação por congelamento de fragmentos microtomizados de tecido. PIKKARAINEN (1968) realiza a homogeneização das amostras congeladas com gral e pistilo. A completa hidrolisação ácida obtida no presente trabalho sugere que o procedimento de PIKKARAINEN não acrescenta vantagens proporcionais à adição de uma etapa a

mais à técnica.

### 5.8 Soluções-padrão

No presente estudo avaliou-se quatro diluições conhecidas do padrão de trabalho de hidroxiprolina, contendo 36, 18, 9 e 4,5 microgramas de hidroxiprolina por mililitro. A análise da correlação dos valores de absorbância obtidos em relação às concentrações de hidroxiprolina (Figura 4) forneceu uma reta ( $y=ax+b$ ) com linearidade igual a 0,9875. Conhecendo-se os valores obtidos para o coeficiente angular (a) igual a 0,0773 e o coeficiente linear (b) igual a 0,0398, e sendo (x) o valor da absorbância obtido pela leitura espectrofotométrica, pode-se calcular (y), que é a concentração de hidroxiprolina em miligramas por mililitro. Como o índice de linearidade obtido aproxima-se muito do índice absoluto de linearidade de uma reta, o qual corresponde a 1, ficou demonstrada a sensibilidade do método com relação à leitura espectrofotométrica.

### 5.9 Concentração de hidroxiprolina em miligramas por grama de tecido da amostra

As semelhanças relativas entre as características de técnica operatória no canal alimentar do cão e no tubo digestivo do homem, incentivam a realização de estudos experimentais comparativos de cicatrização de anastomoses nos primeiros. Com o advento de aparelhos de sutura mecânica como os grampeadores e os anéis de anastomose (biofragmentáveis ou não), bem como com o constante avanço no desenvolvimento de novas gerações de fios de sutura, como os fios monofilamentares absorvíveis a médio prazo, tornou-se necessário discutir os padrões histológicos, bioquímicos e físicos do processo de cicatrização de uma anastomose em animais de experimentação e particularmente no cão. Aceita-se atualmente, que a análise em conjunto, da avaliação bioquímica da taxa de hidroxiprolina tecidual e das características físicas de resistência à força de tração linear e/ou resistência à insuflação de ar atmosférico, oferecem um parâmetro razoável para a comparação qualitativa entre as anastomoses dos grupos controle e

experimental (CRONIN e cols., 1968; JIBORN e cols., 1978; JIBORN e cols., 1980a; JIBORN e cols., 1980b; NARESSE e cols., 1988; DEBUS, 1989; KORUDA e ROLANDELLI, 1990; POLONIO, 1992; e CZECZKO, 1992).

Na revisão de literatura obtida, não encontrou-se uma tabulação das taxas normais de hidroxiprolina tecidual nos diversos segmentos do canal alimentar do cão, em miligramas por grama de tecido da amostra. NEUMAN e LOGAN (1950) realizaram a determinação da taxa de colágeno em diversos tecidos de animais e encontraram uma porcentagem de 12,0% no duodeno e 23,7% no cárdia de ratos. CRONIN e cols. (1968) determinaram a quantidade de colágeno de anastomoses cólicas de ratos em gramas por cento de tecido. JIBORN e cols. (1978; 1980a; 1980b) determinaram a quantidade de colágeno em anastomoses cólicas em ratos, na unidade de microgramas por miligrama de tecido. NARESSE e cols (1988), por sua vez, determinaram a taxa de hidroxiprolina em anastomoses do intestino delgado de cães, na unidade de microgramas por 100 miligramas de tecido e encontram no 21º dia de pós-operatório uma taxa média de 619,29  $\mu\text{g}/100\text{mg}$ . POLONIO (1992) encontrou em anastomoses colorretais em reto extraperitoneal de cães uma taxa média de hidroxiprolina de 21,98 mg/g de tecido no grupo de sutura manual e 1,57 mg/g no grupo de anastomose com o anel biofragmentável, ambas as avaliações no 30º dia de pós-operatório. CZECZKO (1992), estudando anastomoses colorretais em reto extraperitoneal de cães, encontrou uma taxa média de hidroxiprolina tecidual de 13,33 mg/g de tecido no grupo de sutura mecânica com grampeador e de 1,497 mg/g de tecido no grupo de sutura mecânica com anel biofragmentável, ambas as avaliações no 30º dia de pós-operatório. Uma análise destas informações demonstra que os dados pertinentes ao questionamento principal do presente estudo vêm a contribuir com os atualmente disponíveis, no sentido de propor taxas normais de hidroxiprolina tecidual no canal alimentar do cão (Tabelas 5 a 12; Figura 5).

Sabe-se que o esôfago é um órgão que está sujeito a um regime de altas pressões intraluminares durante os movimentos de propulsão do bolo alimentar, o qual muitas vezes é grosseiro e semi-sólido. DALLMAN (1988) demonstra que a camada esofágica mais eficiente em oferecer sustentação a uma sutura esofágica em cães é a tela submucosa. No presente estudo, observam-se taxas de hidroxiprolina tecidual elevadas em ambos os segmentos esofágicos estudados, sendo que no segmento do esôfago torácico distal (média de 8,688 mg/g) encontrou-se uma taxa de hidroxiprolina tecidual comparável à encontrada no reto (média de 8,2530 mg/g).

Analisando-se comparativamente os resultados obtidos para o canal alimentar do cão, observa-se as menores taxas de hidroxiprolina tecidual no duodeno (média de 2,1876 mg/g) e no jejuno-flíco (média de 3,7162 mg/g). Concomitantemente pode-se observar uma tendência de aumento progressivo da taxa de hidroxiprolina tecidual, representando naturalmente a taxa de colágeno, à medida em que se afasta dos segmentos duodeno-jejunais e se aproxima dos segmentos colorretais. É possível reconhecer-se aqui um paralelismo entre a taxa de colágeno da tela submucosa e a pressão fisiológica intraluminal crescentes à medida em que se chega aos segmentos mais aborais do intestino, que naturalmente estão sujeitos a um regime de maiores pressões.

#### **5.10 Correlação entre o peso corpóreo e a taxa de hidroxiprolina tecidual**

Finalmente, resta a pergunta, se há ou não correlação entre o peso corpóreo do animal e a taxa de hidroxiprolina tecidual contida nos diversos segmentos de seu canal alimentar. Para tanto, comparou-se a relação do peso corpóreo e as taxas de hidroxiprolina tecidual em cada um dos segmentos estudados, com a finalidade de obter-se o índice de correlação, em analogia à avaliação matemática a que foram submetidos os resultados relativos às absorvências das soluções padrão de trabalho de hidroxiprolina.

Todos os segmentos estudados apresentaram uma correlação apenas discreta entre o peso corpóreo do animal e a taxa de hidroxiprolina tecidual obtida (Figura 6). A maior correlação foi observada para o estômago ( $r=-0,5775$ ) e a menor para o duodeno ( $r=-0,0972$ ). Portanto não se encontrou embasamento para a correlação especulativa sobre taxas de colágeno no canal alimentar de cães em função única de seu peso corpóreo.

## CONCLUSÕES

A avaliação dos resultados obtidos no presente estudo permite concluir que:

1. A análise da correlação dos valores de absorvância obtidos para as soluções-padrão de trabalho de hidroxiprolina em relação às suas respectivas concentrações (36, 18, 9 e 4,5 $\mu$ g/ml), em conjunto, apresentou o índice 0,9875. Ficou assim, demonstrada a alta sensibilidade da técnica.

2. As taxas médias de hidroxiprolina tecidual obtidas para os diversos segmentos do canal alimentar dos cães são as seguintes: 6,298 mg/g para o esôfago cervical; 8,688 mg/g para o esôfago torácico; 6,385 mg/g para o estômago; 2,187 mg/g para o duodeno; 3,716 mg/g para o jejuno-íleo; 6,154 mg/g para o colo transverso; 7,289 mg/g para o colo sigmóide; e 8,253 mg/g para o reto.

3. Os resultados da taxa de hidroxiprolina tecidual em miligramas por grama de tecido encontrados para os diversos segmentos do canal alimentar dos cães estudados, demonstram um paralelismo em relação às pressões intraluminares fisiológicas relativas aos segmentos respectivos.

4. Não observou-se correlação entre o peso corpóreo dos cães e a taxa de hidroxiprolina tecidual nos diferentes segmentos do canal alimentar.



## ABSTRACT

The aim of the present study, was to determine the normal tissue hydroxyprolin rate, of the various segments of the dog's alimentary canal. The technique used for the biochemical determination of hydroxyprolin, was the one described by KIVIRIKKO et. all. (1967), and modified by IBBOTT (1974). The steps of the experiment were: a) Tissue samples of different segments of the alimentary canal of eight dogs were obtained and stored in saline solution at  $-20^{\circ}\text{C}$ . b) The samples were re-cutted in a standardized size, dried with absorbent paper, weighed, and hydrolized with 6N HCl and oxidized with chloramine-T. The final color reaction was done with Ehrlich's reagent. c) Different hydroxyprolin standard and white solutions were also processed. d) The final hydroxyprolin rate present in the hydrolyzed tissue samples was determined by spectrophotometry. The high sensibility of the technique was demonstrated by the correlation rate ( $r = 0.9875$ ) obtained within the hydroxyprolin standards. The mean hydroxyprolin rate obtained for each of the studied segments was: 6.298 mg/g in the cervical esophagus, 8.688 mg/g in the thoracic esophagus, 6.385 mg/g in the stomach, 2.187 mg/g in the duodenum, 3.716 mg/g in the jejuno-ileum, 6.154 mg/g in the transverse colon, 7.289 mg/g in the sigmoid colon and 8.253 in the rectum. There was no correlation between the tissue hydroxyprolin rate of the different segments of the dog's alimentary canal and the body weight.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANGELELI, A.Y.; BURINI, R.C.; OLIVEIRA, J.E.D. Padronização da metodologia para determinação das frações da hidroxiprolina na urina. **Rev. Bars. Pat. Clín.**, Rio de Janeiro, v.18, n.5, p.124-127, 1982.
- BERGMAN, I.; LOXLEY, R. Two improved and simplified methods for the spectrophotometric determination of hydroxiprolina. **Anal. Chem.**, Washington, v.35, n.12, p.1961-1965, 1963.
- BERGMAN, I.; LOXLEY, R. The determination of hydroxiprolina in urine hydrolysates. **Clin. Chim. Acta**, Amsterdam, v.27, p.347-349, 1970.
- BLUMENKRANTZ, N.; HANSEN, G.A. Methods for analysis of connective-tissue macromolecules by determination of ceratin constituents. **Methods of Biochemical Analysis**, New York, v.24, p.39-91, 1977.
- BUTCHER, E.C.; LOWRY, O.H. Measurement of nanogram quantities of protein by hydrolysis followed by reaction with orthophthalaldehyde or determination of glutamate. **Anal. Biochem.**, Duluth, v.76, p.502-523, 1976.
- CRONIN, K.; JACKSON, D.S.; DUNPHY, J.E. Changing bursting strenght and collagen content of the healing colon. **Surg. Gynecol. & Obstet.**, Chicago, v.126, p.747-753, abr. 1968.
- CZECZKO, Nicolau Gregori. **Estudo comparativo entre as anastomoses colorretais mecânicas com grampeador e com anel biofragmentável no reto extraperitoneal de cães**. Curitiba, 1992. Tese (Doutorado em Clínica Cirúrgica) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.
- DAKIN, H.D. Amino-acids of gelatin. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.44, p.499-529, 1920.
- DALLMAN, M.J. Functional suture-holding layer of the esophagus in the dog. **J. Am. Vet. Med. Ass.**, Schaumburg, v.192, n.5, p.638-640, 1988.

- DEBUS, Eike Sebastian. **Untersuchungen in vivo zur Wirkung der gezielten Minderdurchblutung und Nahtmaterialimplantation auf den Kollagenstoffwechsel im Kolon des Kaninchens.** Kiel, 1989. Dissertação (Doutorado em Medicina) - Abteilung Allgemeine Chirurgie im Zentrum Operative Medizin I, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
- GRUNBAUM, B.W.; GLICK, D. Studies in histochemistry. XLV. Determination of hydroxyproline in microgram amounts of tissue. **Arch. Biochem. Biophys.**, Orlando, v.65, p.260-267, 1956.
- HALSTED, W.S. Circular suture of the intestine - An experimental study. **Am. J. Med. Scie.**, Hagerstown, v.94, p.436-461, 1887.
- IBBOTT, F.A. Amino acids and related substances. In: HENRY, R.J.; CANNON, D.C.; WINKELMANN, J.W. **Clinical Chemistry - Principles and Technics.** 2nd. ed., New York, Harper & Row Publishers, 1974. p. 608-614.
- JIBORN, H.; AHONEN, J.; ZEDERFELDT, B. Healing of experimental colonic anastomoses: The effect of suture technic on collagen concentrations in the colonic wall. **Am. J. Surg.**, New York, v.135, p.333-340, mar. 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.**, New York, v.139, p.398-405, mar. 1980a.
- JIBORN, H.; AHONEN, J.; ZEDERFELDT, B. Healing of experimental colonic anastomoses: IV. effect of suture technique on collagen metabolism in the colon wall. **Am. J. Surg.**, New York, v.139, p.406-413, mar. 1980b.
- JUVA, K.; PROCKOP, D.J. Hydroxylation of proline and the intracellular accumulation of a polypeptide precursor of collagen. **Science**, Washington, v.152, p.92-94, abr. 1966.
- KIVIRIKKO, K.I.; LAITINEN, O.; PROCKOP, D.J. Modification of a specific assay for hydroxyproline in urine. **Anal. Biochem.**, Duluth, v.19, p.249-255, 1967.
- KORUDA, M.J.; ROLANDELLI, R.H. Experimental studies on the healing of colonic anastomoses. **J. Surg. Res.**, New York, v.48, n.5, p.504-515, 1990.
- LANG, K. Eine Mikromethode zur Bestimmung des Prolins und des Oxyprolins. **Z. phys. Chem.**, Wiesbaden, v.219, p.148-154, 1933.

- MARTENS, M.F.W.C. & HENDRICKS, Th. Postoperative changes in collagen synthesis in intestinal anastomoses of the rat: differences between small and large bowel. *Gut*, London, v.32, p.1482-1487, 1991.
- McFARLANE, W.D.; GUEST, G.H. A new colorimetric method for the determination of hydroxyproline and its application to gelatin hydrolyzates. *Can. J. Res.*, Ottawa, v.17, sec.B, p.139-142, 1939.
- MORSE, W. Chemistry of the integument. V. A new color reaction for hydroxyproline and its use in distinguishing the scleroproteins. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v.100, p.373-377, 1933.
- NARESSE, L.E.; LUCCHIARI, P.H.; ANGELELI, A.Y.; 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.*, São Paulo, v.3, p.106-112, out./dez. 1988.
- NEUMAN, R.E.; LOGAN, M.A. The determination of collagen and elastin in tissues. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v.186, p.549-556, 1950a.
- NEUMAN, R.E.; LOGAN, M.A. The determination of collagen and elastin in tissues. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v.186, p.549-556, 1950b.
- PEACOCK, E.E. Dynamic aspects of collagen biology. Part II: degradation and metabolism. *J. Surg. Res.*, New York, v.7, n.10, p.481-497, 1967.
- PIKKARAINEN, J. The molecular structures of vertebrate skin collagens. A comparative study. *Acta Phys. Scand.*, Stockholm, Suppl. 309, n.23, p.4-63, 1968.
- POLONIO, Benur. **Estudo comparativo entre as anastomoses colorretais em plano único extramucoso e com anel biofragmentável em reto extraperitoneal de cães.** São Paulo, 1992. Tese (Mestrado) - Técnica Operatória e Cirurgia Experimental, Escola Paulista de Medicina.
- PROCKOP, D.J.; UDENFRIEND, S. A specific method for the analysis of Hydroxyproline in Tissues and urine. *Anal. Biochem.*, Duluth, v.1, p.228-239, 1960.
- PROCKOP, D.J.; UDENFRIEND, S.; LINDSTEDT, S. A simple technique for measuring the specific activity of labeled hydroxyproline in biological materials. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v.236, n.5, p.1395-1398, 1961.

- RADHAKRISHNAN, A.N.; MEISTER, A. Conversion of hydroxyproline to pyrrole-2-carboxylic acid. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.226, p.559-571, 1957.
- ROMERO, S.; FUENZALIDA, L. **Manual de manejo de animales de laboratorio de medio y pequeno portes.** Instituto de Salud Pública de Chile, 1989.
- STEGEMANN, H.; STALDER, K. Determination of hydroxyproline. **Clin. Chim. Acta**, Amsterdam, v.18, p.267-273, 1967.
- UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. Biblioteca Central. **Normas para apresentação de trabalhos.** 2ª edição, Curitiba, Editora da Universidade Federal do Paraná, 1992. 8v.:il.
- WALDSCHMIDT-LEITZ, E. e AKABORI, S. Bestimmung von Oxyprolin. Zur Methode nach K. Lang. **Z. phys. Chem.**, Wiesbaden, v.224, p.187-192, 1934.
- WEIGELE, M.; DeBERNARDO, S.L.; LEIMGRUBER, W. Fluorometric assay of secondary amino acids. **Biochem. Biophys. Res. Comun.**, New York, v.50, n.2, p.352-356, 1973.
- WOESSNER Jr., J.F. The determination of hydroxyproline in tissues and protein samples containing small proportions of this imino acid. **Arch. Biochem. Biophys.**, Orlando, v.93, p.440-447, 1961.