

MARCELO RIBAS ALVES

**INFLUÊNCIA DA NICOTINA, DURANTE A GESTAÇÃO E LACTAÇÃO,
NA CICATRIZAÇÃO DA PAREDE ABDOMINAL DE RATOS
LACTENTES: ESTUDO TENSIO MÉTRICO, MORFOMÉTRICO E
IMUNOISTOQUÍMICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde da
Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial
para a obtenção do grau de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Ligocki Campos

Co-orientador: Prof. Dr. Sérgio Ossamu Ioshii

Coordenador: Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias

CURITIBA

2006

Dedico este trabalho:

A Deus, o autor da vida.

Em memória de minha mãe Marilda, por ensinar o significado pleno da palavra amor.

Ao meu pai Osny, pelo exemplo inabalável de vida e amizade.

À minha querida esposa Karina, pelo seu amor, encorajamento e dedicação.

À Bárbara Lima, pela disposição e tolerância.

À minha irmã Cassiana, companheira na jornada da vida.

AGRADECIMENTOS

À CAPES e à Universidade Federal do Paraná, pelo aprendizado médico e crescimento científico.

Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Ligocki Campos, Professor Titular de Cirurgia do Aparelho Digestivo, orientador do trabalho, pelo apoio e incentivo desde a fase acadêmica no desenvolvimento de trabalhos científicos, pela disponibilidade, estímulo e influência marcantes; também pelo apoio incondicional à formação em nível de pós-graduação nesta Universidade e exemplo de comportamento ético e profissional;

Ao Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná, pela oportunidade de crescimento científico.

Ao Prof. Dr. Sérgio Ossamu Ioshii, co-orientador deste trabalho, por viabilizar a execução dos exames histológicos.

À Dra. Danielle Giacometti Sakamoto, pela análise e disponibilidade absoluta na realização dos exames histológicos.

Ao Prof. Dr. Dalton Andrade e Prof. Dr. Paulo Ogliari, pelo aconselhamento e execução da análise estatística do estudo.

À Sra. Ivanilde Maria Muxfeldt, pela disponibilidade e revisão do texto.

Ao Dr. Hugo Moraes Junior, pela ajuda na execução experimental do estudo.

À Sra. Regina Aparecida Sass Marques, pela ajuda constante.

Aos amigos, Marcos Valério Milani e Eduardo Silva Lucena, pela amizade e dedicação na realização da parte experimental do estudo.

Ao casal Rosana e Marco Aurélio Massolin, pela paciência, disponibilidade e apoio constante durante todo o estudo.

Resultados

Resultados exigem esforço, paciência e constância.
Suspeite de promessas miraculosas e soluções instantâneas.
Duvide de receitas e fórmulas para a conquista da felicidade.

Fraqueza, fadiga e ferrugem costumam a ceder,
Depois que se instalam no corpo, na mente e no espírito,
Somente força, fôlego e flexibilidade podem produzir mudança.

Otimismo só é útil onde existe ação planejada.
Pensamento positivo só funciona acompanhado de muito trabalho.
Sem objetivos e prazos bem definidos, esperança é pura ilusão.

Acredite em fatos, não em intenções;
Acredite em atitudes, não em discursos;
Acredite em posturas éticas, não em regras de moral para “os outros” seguirem;
Acredite em fazer acontecer, não em esperar que aconteça;
Acredite na força da criatividade, não no tamanho dos obstáculos.

O que importa são as tentativas – e não os acertos.
As vezes que a gente se levanta contam muito mais do que as que a gente cai.
O prazer de continuar buscando é infinitamente maior do que o sucesso de alcançar.

Toda transformação começa sempre caótica e desconfortável.
Os caminhos conhecidos são seguros e fáceis,
Mas só conduzem aos lugares onde já estamos – e não desejamos ficar.

O caminho do novo é cheio de riscos, surpresas e cansaço,
Mas sempre premia os que o escolhem,
Com a chance de um dia realmente experimentarem,
A vida que imaginaram viver.

Geraldo Eustáquio de Souza

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE GRÁFICOS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xii
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
1 INTRODUÇÃO	2
2 REVISÃO DA LITERATURA	6
2.1 TABAGISMO E NICOTINA	6
2.2 TABAGISMO NO PERÍODO GESTACIONAL	9
2.3 TABAGISMO NO PERÍODO DE LACTAÇÃO	14
2.4 PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO	19
2.4.1 Fase Inflamatória	19
2.4.2 Fase Proliferativa	21
2.4.2.1 Angiogênese	21
2.4.2.2 Proliferação fibroblástica e dos miofibroblastos	23
2.4.2.3 Reepitelização	25
2.4.3 Fase de Maturação	26
2.5 CICATRIZAÇÃO NO PERÍODO FETAL	27
2.6 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA CICATRIZAÇÃO	30
2.6.1 Tensiometria	30
2.6.2 Morfometria do Colágeno	32
2.6.3 Imunoistoquímica para Miofibroblastos e Vasos Sangüíneos	33

2.7 NICOTINA E CICATRIZAÇÃO	35
2.7.1 Estudos Clínicos	35
2.7.2 Estudos Experimentais	40
3 MATERIAL E MÉTODO	51
3.1 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	51
3.2 AMBIENTE DE EXPERIMENTAÇÃO	52
3.3 PERÍODO DE PREENHEZ	53
3.3.1 Administração de Nicotina ou Solução Fisiológica Pré-Operatórias	53
3.4 PERÍODO DE LACTAÇÃO	54
3.5 PERÍODO DE DESMAME	55
3.6 CIRURGIA	55
3.7 PÓS-OPERATÓRIO	57
3.8 MORTE DOS ANIMAIS	58
3.9 PREPARO DOS FRAGMENTOS PARA ESTUDO	58
3.10 ESTUDO DA RESISTÊNCIA À TRAÇÃO	59
3.11 ESTUDO ANATOMOPATOLÓGICO	62
3.11.1 Processamento Histológico	62
3.11.2 Coloração Imunoistoquímica	64
3.12 AVALIAÇÃO DO COLÁGENO, MIOFIBROBLASTOS E VASOS SANGÜÍNEOS	65
3.12.1 Morfometria do Colágeno	65
3.12.2 Número de Miofibroblastos	67
3.12.3 Número de Vasos Sangüíneos	69
3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA	70
4 RESULTADOS	73

4.1 ANÁLISE DAS MÃES	73
4.1.1 Peso das Mães na Gestação	73
4.1.2 Peso das Mães na Lactação	74
4.2 ANÁLISE DOS FILHOTES NA LACTAÇÃO	75
4.2.1 Peso dos Filhotes na Lactação	75
4.3 VARIÁVEIS DE FORÇA E TENSÃO	76
4.3.1 Força Máxima	77
4.3.2 Força de Ruptura	78
4.3.3 Tensão	79
4.4 AVALIAÇÃO DO COLÁGENO	80
4.4.1 Deposição do Colágeno Tipo I	80
4.4.2 Deposição do Colágeno Tipo III	81
4.4.3 Índice da Maturação do Colágeno (IMaC)	82
4.5 AVALIAÇÃO DOS MIOFIBROBLASTOS E VASOS SANGÜÍNEOS	84
4.5.1 Número de Miofibroblastos	84
4.5.2 Número de Vasos Sangüíneos	85
4.6 ANÁLISE DOS GRUPOS C E N NO INTERVALO 7 E 21 DIAS	86
4.6.1 Força Máxima	87
4.6.2 Força de Ruptura	87
4.6.3 Tensão	87
4.6.4 Deposição do Colágeno Tipo I	88
4.6.5 Deposição do Colágeno Tipo III	88
4.6.6 Índice da Maturação do Colágeno (IMaC)	88
4.6.7 Número de Miofibroblastos	88
4.6.8 Número de Vasos Sangüíneos	89

5 DISCUSSÃO	91
5.1 MÉTODO	91
5.1.1 Escolha do Animal de Experimentação	91
5.1.2 Escolha da Parede Abdominal	91
5.1.3 Uso da Nicotina	93
5.1.4 Variáveis Estudadas e Tempo de Aferição	95
5.1.5 Avaliação Microscópica	96
5.2 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	97
5.2.1 Peso dos animais	97
5.2.2 Tensiometria	98
5.2.3 Deposição do Colágeno	100
5.2.4 Número de Miofibroblastos	102
5.2.5 Número de Vasos Sangüíneos	103
5.3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	105
5.3.1 Nicotina e Cicatrização	105
6 CONCLUSÃO	108
REFERÊNCIAS	110
APÊNDICES	124

LISTA DE FIGURAS

FIGURA - 1 ADMINISTRAÇÃO DA NICOTINA SUBCUTÂNEA NO DORSO DO ANIMAL	54
FIGURA - 2 DEMARCAÇÃO DA INCISÃO TRANSVERSA DE PELE	56
FIGURA - 3 DIÉRESE DO PLANO MUSCULAR, APONEURÓTICO E PERITONIAL	56
FIGURA - 4 SUTURA DO PLANO MÚSCULO-APONEURÓTICO DA INCISÃO	57
FIGURA - 5 FECHAMENTO CUTICULAR DA INCISÃO TRANSVERSA	57
FIGURA - 6 ORGANOGRAMA DA OBTENÇÃO DA AMOSTRA	59
FIGURA - 7 RETALHO PARA ESTUDO DA TRAÇÃO E ANATOMOPATOLÓGICO	60
FIGURA - 8 MÁQUINA DE TRAÇÃO UTILIZADA NO EXPERIMENTO	61
FIGURA - 9 ESTUDO DE TRAÇÃO EM CORPOS DE PROVA. DOS GRUPOS C E N	61
FIGURA - 10 ESTUDO TENSOMÉTRICO COMPUTADORIZADO	62
FIGURA - 11 FOTOMICROGRAFIA DE PAREDE ABDOMINAL CORADA PELO PICROSÍRIUS	66
FIGURA - 12 FOTOMICROGRAFIA DE PAREDE ABDOMINAL CORADA PELO PICROSÍRIUS E IDENTIFICAÇÃO DO COLÁGENO TIPO I E TIPO III.....	67
FIGURA - 13 FOTOMICROGRAFIA DOS MIOFIBROBLASTOS CORADOS POR IMUNOISTOQUÍMICA ANTI- α -ACTINA MUSCULAR LISA	68
FIGURA - 14 FOTOMICROGRAFIA DOS VASOS SANGÜINEOS CORADOS POR IMUNOISTOQUÍMICA ANTIFATOR VIII	69

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – VARIAÇÃO MÉDIA DO PESO DAS RATAS DOS GRUPOS C E N NA GESTAÇÃO	73
TABELA 2 – VARIAÇÃO MÉDIA DO PESO DAS RATAS DOS GRUPOS C E N NA LACTAÇÃO	74
TABELA 3 – MÉDIAS DE PESO DOS FILHOTES DOS GRUPOS C E N NA LACTAÇÃO	75
TABELA 4 – MÉDIAS DAS VARIÁVEIS DE FORÇA E TENSÃO DOS SUBGRUPOS C7, N7, C21, N21	76
TABELA 5 – PERCENTAGENS MÉDIAS DA DEPOSIÇÃO DO COLÁGENO TIPO I E III DOS SUBGRUPOS C7, N7, C21, N21	80
TABELA 6 – MÉDIAS DO NÚMERO DE MIOFIBROBLASTOS E DE VASOS SANGÜÍNEOS DOS SUBGRUPOS C7, N7, C21, N21	84
TABELA 7 – COMPORTAMENTO DAS VARIÁVEIS NO INTERVALO 7 A 21 DIAS	89

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – MÉDIAS DA FORÇA MÁXIMA DOS SUBGRUPOS C7, N7, C21 E N21	77
GRÁFICO 2 – MÉDIAS DA FORÇA DE RUPTURA DOS SUBGRUPOS C7, N7, C21, N21	78
GRÁFICO 3 – MÉDIAS DA TENSÃO DOS SUBGRUPOS C7, N7, C21, N21	79
GRÁFICO 4 – MÉDIAS DA DEPOSIÇÃO DO COLÁGENO TIPO I DOS SUBGRUPOS C7, N7, C21, N21.....	81
GRÁFICO 5 – MÉDIAS DA DEPOSIÇÃO DO COLÁGENO TIPO III DOS SUBGRUPOS C7, N7, C21, N21.....	82
GRÁFICO 6 – MÉDIAS DO ÍNDICE DA MATURAÇÃO DO COLÁGENO DOS SUBGRUPOS C7, N7, C21, N21.....	83
GRÁFICO 7 – MÉDIAS DO NÚMERO DE MIOFIBROBLASTOS DOS SUBGRUPOS C7, N7, C21, N21	85
GRÁFICO 8 – MÉDIAS DO NÚMERO DE VASOS SANGÜÍNEOS DOS SUBGRUPOS C7, N7, C21, N21	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

µg	-	micrograma
ng	-	nanograma
mg	-	miligrama
g	-	grama
kg	-	kilograma
mol/l	-	mol por litro
µmol	-	micromol
µmol/l	-	micromol por litro
µl	-	microlitro
ml	-	mililitro
l	-	litro
mm	-	milímetro
m ²	-	metro quadrado
min	-	minuto
h	-	hora
mm/min	-	milímetro por minuto
pO ₂	-	pressão parcial de oxigênio
kgf	-	kilograma-força
kgf/mm ²	-	kilograma-força por milímetro quadrado
pH	-	potencial de hidrogênio iônico
IMaC	-	Índice da Maturação do Colágeno
vs.	-	versus
%	-	porcentagem
INCA	-	Instituto Nacional do Câncer
TECPAR	-	Instituto de Tecnologia do Paraná
a.C.	-	antes de Cristo
°C	-	graus Celsius
CO	-	monóxido de carbono
mmHg	-	milímetros de mercúrio
PDGF	-	Fator de Crescimento Derivado das Plaquetas
FGF	-	Fator de Crescimento de Fibroblasto
TGF	-	Fator Transformador de Crescimento
VEGF	-	Fator de Crescimento Endotelial
Actina-α-sm	-	Alfa-Actina muscular lisa
®	-	Marca Registrada
PG2	-	Prostaglandina 2
EUA	-	Estados Unidos da América do Norte
DNA	-	Ácido Desoxirribonucléico
DP	-	desvio padrão
EP	-	erro padrão
p	-	nível de significância estatística
α	-	alfa
β	-	beta

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi conhecer o efeito da nicotina na cicatrização da parede abdominal de ratos lactentes. Ratas prenhas foram divididas aleatoriamente em dois grupos; o primeiro grupo recebeu nicotina (GN) e o segundo grupo recebeu solução fisiológica a 0,9% (GC), a partir da constatação da gravidez e durante toda a lactação. Utilizou-se 60 ratos lactentes Wistar, divididos igualmente em 2 grupos, produto de mães que receberam nicotina na dose diária de 2mg/kg de peso ao dia, durante a gestação e lactação e os demais ratos produto de mães que receberam solução fisiológica a 0,9%, durante o mesmo período. Cada grupo foi dividido em dois subgrupos, com 15 animais cada, de acordo com o intervalo de tempo utilizado para a avaliação. Após o término do período de lactação (21 dias), todos os animais foram submetidos à laparotomia transversa e submetidos ao fechamento músculo-aponeurótico. As aferições foram realizadas no 7.º e no 21.º dias de pós-operatório, quando os animais foram sacrificados, 15 animais de cada subgrupo. Foram retirados os retalhos da parede abdominal contendo a linha de sutura, os quais foram submetidos à tensiometria (tensão, força máxima e força de ruptura); ao estudo da morfometria do colágeno (colágeno tipo I – maduro e colágeno tipo III – imaturo) e ao estudo de imunoistoquímica de miofibroblastos e vasos sanguíneos. Os resultados permitiram concluir que no subgrupo nicotina sacrificado no 7.º dia de pós-operatório (N7), a avaliação tensiométrica demonstrou, redução da força máxima ($p=0,0060$), da força de ruptura ($p=0,0047$) e da tensão ($p=0,0493$). Na avaliação da morfometria do colágeno do subgrupo N7 houve diminuição da deposição do colágeno tipo I (maduro) ($p=0,0079$) e aumento da deposição do colágeno tipo III (imaturo) ($p=0,0079$) e no estudo imunoistoquímico para o subgrupo N7, encontrou-se a redução do número de miofibroblastos ($p=0,007$) e do número de vasos sanguíneos ($p=0,031$). Para o subgrupo nicotina avaliado no 21.º dia de pós-operatório, na avaliação tensiométrica, observou-se a diminuição da força de ruptura ($p=0,0007$) e da tensão ($p=0,0056$).

Palavras-chave: Angiogênese, Cicatrização, Colágeno, Laparotomia, Miofibroblastos, Nicotina, Tensiometria.

ABSTRACT

The aim of this study was to analyse the effects of nicotine, on the healing of abdominal wall, weaning newborn rats were assessed. Pregnant rats were divided into two groups, one of the groups was administered subcutaneous nicotine at dose of 2mg/kg/day, during pregnancy and lactation (NG) and the other, control group (CG), received saline solution at the same period of time. Sixty baby rats were weaned at 21 days and the transverse laparotomy was performed. Each group was divided into two subgroups (containing 15 baby rats each one), in accordance with the date when the surgical scar was analyzed, on the 7th day of postoperative, control subgroup C7 and nicotine subgroup N7, or 21st day of the postoperative, control subgroup C21 and nicotine subgroup N21. The surgical scar in the healing area was analysed by tensiometric study assessed the maximum strength, rupture strength and tensile strength. Histological analysis using collagen morphometry and immunohistochemistry technique for blood vessels identification and for myofibroblasts identification. The results allowed the conclusion that the animals which received nicotine on 7th postoperative day presented smaller of maximum strength ($p=0,0060$), rupture strength ($p=0,0047$) and tensile strength ($p=0,0493$). The collagen morphometric on 7th postoperative day study presented smaller deposition of collagen type I ($p=0,0079$) and increased deposition of collagen type III ($p=0,0079$) and the immunohistochemistry analysis on 7th postoperative day presented smaller number of myofibroblasts ($p=0,007$) and smaller number of blood vessels ($p=0,031$). Subgroup nicotine on 21st postoperative day presented smaller rupture strength ($p=0,0007$) and tensile strength ($p=0,0056$).

Key-words: Angiogenesis, Collagen, Healing, Laparotomy, Myofibroblasts, Nicotine, Tensiometry.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Com a crescente preocupação e o debate permanente sobre os efeitos nocivos do tabagismo no organismo humano, muita atenção tem sido dispensada às conseqüências médicas adversas do ato de fumar. O custo com as doenças ligadas ao tabaco consome consideráveis recursos destinados à área da saúde em nosso país. As doenças cardiovasculares e respiratórias associadas são bem conhecidas; menor importância tem sido dada às complicações cirúrgicas associadas com o hábito de fumar (COSTA e SILVA, 1990; SACHAR, GOEL e WEISS, 1998).

O Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima que um terço dos brasileiros adultos fumam, e aproximadamente 11,2 milhões deles, são mulheres. Noventa por cento delas tornam-se dependentes em idade jovem, e a taxa de incidência de fumantes é alta nas idades entre 20 e 49 anos. O alto consumo registrado entre as mulheres brasileiras, em idade reprodutiva, de classe econômica e social baixas, demonstra que elas têm menos acesso à informação relativa à advertência do tabaco, ou são fortemente influenciadas (CABAR e CARVALHO, 2003).

O tabagismo na gestação acarreta prejuízos, devidamente reconhecidos e relatados, para o crescimento intra-uterino da criança. Na década de 90, do total de gestantes, 33,5% delas eram fumantes (HORTA, 1993). O maior risco de prematuridade e baixo peso ao nascer, em gestantes fumantes, ocorre no terceiro trimestre, e este risco aumenta proporcionalmente ao número de cigarros fumados (MAINOUS, 1994).

Assim como na gestação, as conseqüências do tabagismo materno sobre a lactação e a criança amamentada constituem somatório de efeitos prejudiciais ao desenvolvimento do lactente (OLIVEIRA NETTO, 1991).

Mais de 4.000 elementos químicos já foram identificados na fumaça do cigarro, e muitos são farmacologicamente ativos, mutagênicos e carcinogênicos (BYRD, 1992).

Dentre os vários componentes do tabaco que interferem na evolução da gravidez destaca-se a ação da nicotina e do monóxido de carbono (LEHTOVIRTA, 1978; LYMPEROPOLOU et al., 1996). A nicotina é o principal componente vasoativo da fumaça do tabaco, inodora e incolor, e quando inalada ou injetada pode liberar catecolaminas e resultar em vasoconstrição e diminuição da perfusão tecidual (FRICK e SEALS, 1994).

Vários estudos na literatura investigam os efeitos da nicotina sobre o processo de cicatrização. MOSELY e FINSETH (1977) foram os autores que inicialmente relataram os efeitos indesejáveis da nicotina na cicatrização tecidual, observando retardo no processo cicatricial de ferida na mão de um fumante.

Diversos estudos relataram inibição da proliferação de fibroblastos por ação direta da nicotina, assim como a diminuição da produção do colágeno (CHAMSON et al. 1980; TIPTON e DABBOUS, 1995) e da angiogênese (DAFTARI et al., 1994).

Vários estudos clínicos e experimentais, realizados em diversas áreas, têm tentado esclarecer os efeitos deletérios do tabagismo sobre a cicatrização tecidual (REUS, COLEN e STRAKER, 1992; HOLLINGER et al., 1999).

Diante dos estudos realizados para avaliar o efeito da nicotina na cicatrização, observa-se que a influência do tabagismo materno, durante a gestação e lactação, sobre a cicatrização de feridas em lactentes, não foi devidamente avaliada. Portanto, são necessários estudos complementares que poderão contribuir para o conhecimento deste importante tema.

1.1 OBJETIVO

O objetivo do presente estudo é avaliar, experimentalmente, a influência da nicotina, durante a gestação e lactação, no processo de cicatrização da parede abdominal de ratos lactentes nascidos e amamentados por ratas que receberam nicotina, em relação aos seguintes parâmetros:

1. tensiometria;
2. deposição do colágeno maduro e imaturo;
3. número de miofibroblastos;
4. número de vasos sanguíneos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 TABAGISMO E NICOTINA

O número de fumantes no mundo é de aproximadamente 1,1 bilhão, sendo o uso do tabaco legal em todos os países e associado às principais causas de morte por doenças que podem ser prevenidas. Estima-se que cerca de 10 milhões de pessoas devam morrer por doenças relacionadas diretamente com o tabaco no ano de 2030 e que cerca de 100 milhões de fumantes morreram devido ao seu vício durante o século XX (JHA e CHALOUKKA, 2000; COOKE e BITTERMAN, 2004).

No Brasil, estimativas mostram que um em cada sete óbitos apresenta causa diretamente envolvida com as doenças relacionadas ao uso do tabaco, em todas as suas formas, demonstrando a importância da epidemia do tabagismo em nosso meio (HIJJAR e COSTA E SILVA, 1991).

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

HIJJAR e COSTA E SILVA (1991), em estudo sobre a epidemiologia do tabagismo, relataram que cerca de 25% da população adulta brasileira é composta de fumantes, estando especialmente concentrados na faixa etária entre 20 e 49 anos de idade. No Sul do país encontra-se a maior concentração de fumantes, 42% dos habitantes.

Quando Cabral chegou ao Brasil no século XVI, encontrou nativos aspirando fumaça de rolos feitos de folhas, as quais, quando queimadas, aspiradas ou mascaradas, faziam parte do ritual religioso dos ameríndios, sendo relatado seu

uso também para fins medicinais. Estudos antropológicos registram que o uso do tabaco pelos astecas, no México, data de 1.000 anos a.C. Já no Brasil, nas escavações em Minas Gerais, foram encontrados cachimbos datados de dez mil anos atrás (COSTA e SILVA, 1990).

A disseminação pelo continente europeu da *Nicotinia tabacum*, a planta do tabaco, ocorreu pelas mãos dos portugueses, que trocavam suas folhas, então cultivadas em todas as aldeias, por outras mercadorias. Na Europa o produto popularizou-se por intermédio de Jean Nicot, embaixador francês em Lisboa, que levou o tabaco em seu retorno de Portugal, com a intenção de curar as dores de cabeça da rainha francesa. Nessa época, o fumo tornou-se parte importante da prática médica europeia, sendo utilizado como medicamento para cerca de 59 doenças, entre elas a sífilis, asma, tétano e epilepsia (COSTA e SILVA, 1990; HASS, 1992). Após a introdução do tabaco na Europa, seguiram-se quatro fases de sua utilização:

Século XVII – Surge o cachimbo e acentua-se o uso do tabaco pela alta sociedade;

Século XVIII – O tabaco é usado sob a forma de rapé e mascado;

Século XIX – Surge o charuto;

Século XX – Surge o cigarro, dissemina-se pela produção industrial e propaganda.

No Brasil, a manufatura de cigarros iniciou-se em 1903, no Rio de Janeiro. No entanto, a maior parte das plantações de fumo no país está localizada nos estados do Sul. Em 1994, o país alcançou o posto de quarto maior produtor mundial de tabaco (SHAFEY et al., 2002). A industrialização associada às mudanças sociais, às grandes guerras e à difusão da propaganda tornaram o cigarro um produto socialmente aceito (COSTA e SILVA, 1990).

Em revisão histórica sobre a nicotina, FLETCHER (1941) relatou que a mesma substância foi conhecida por séculos em seu estado impuro. Sua primeira descrição foi como de “óleo do tabaco”, publicada em 1572 pelo francês Jacques Gohory, discípulo e primeiro editor na França das obras de Paracelsus, ocorrendo cerca de 20 anos após a introdução do tabaco na Europa.

Nos séculos XVII e XVIII foram encontradas menções em farmacopéias sobre o óleo do tabaco, sempre obtido de alguma forma de destilação de suas folhas, sendo a obra mais completa publicada em Paris no ano de 1660, por Nicolas Le Fèvre, contendo descrição da destilação e uso medicinal do tabaco.

Com o desenvolvimento da química moderna, e após várias tentativas de se sintetizar o alcalóide nicotina em laboratório, finalmente Melseus chegou à fórmula correta, mas somente em 1904 o suíço Amé Pictet conseguiu sintetizar a droga.

BENOWITZ (1986) realizou trabalho de revisão sobre a farmacologia da nicotina e informou que após a sua absorção, a droga é difundida rapidamente para o cérebro, quando então seus níveis neste órgão caem de maneira abrupta e a mesma é distribuída para outros tecidos corporais. A nicotina é metabolizada primariamente no fígado, mas também, em menor extensão, pelos pulmões e rins; sua meia-vida é de duas horas e seus principais metabólitos são a cotinina e o 1-N-óxido de nicotina, sendo que nenhum destes parece ser farmacologicamente ativo. Tanto a nicotina quanto seus metabólitos são eliminados de maneira rápida pelos rins (GOODMAN e GILMAN, 1987).

Os cigarros industrializados contêm de 2 a 3mg de nicotina, a maior parte da qual é absorvida pelos pulmões (SHERWIN e GASTWIRTH, 1990).

2.2 TABAGISMO NO PERÍODO GESTACIONAL

No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima que um terço dos brasileiros adultos seja fumante, aproximadamente 11,2 milhões deles são mulheres. Noventa por cento tornam-se dependentes em idade jovem, e a taxa de incidência de fumantes é alta nas idades entre 20 e 49 anos. O alto consumo registrado entre as mulheres brasileiras de classe econômica e social baixas (C, D e E), demonstra que elas têm menos acesso à informação relativa a advertência do tabaco, ou são fortemente influenciadas (CABAR e CARVALHO, 2003).

A fumaça do cigarro no ambiente é derivada de duas origens: a fumaça central e a fumaça periférica. A fumaça central é formada quando o fumante traga o cigarro, é produzida em altas temperaturas, acima de 950°C, e polui o ambiente após ter sido puxada através do cigarro, filtrada pelos pulmões do fumante e em seguida exalada (WEISS, 1983; BAKER, 1984 e SCHERER, 1990).

A fumaça periférica é produzida a temperaturas mais baixas, 350°C, durante a queima lenta do cigarro, entre as tragadas. Cerca de 85% da fumaça do cigarro no ambiente resulta deste tipo de fumaça, que é liberada diretamente no ambiente a partir da queima espontânea da extremidade do cigarro. Este componente da queima do cigarro difere da fumaça central inalada pelo tabagismo ativo: ela não é filtrada, visto que não passa pelo filtro do cigarro nem pela coluna de tabaco e a nicotina nela encontrada está incluída na fase gasosa (WEISS, 1983; LAW, et al., 1996).

Cerca de 4.720 elementos diferentes já foram identificados na fumaça do cigarro (DUBE, et al., 1982; CHURG, 1985), e inclui muitos que são farmacologicamente ativos, mutagênicos e carcinogênicos. A composição de cada

cigarro pode variar conforme o tipo de folha do tabaco empregado na sua manufatura, a região onde foi plantada, as técnicas de processamento e a fermentação. Aproximadamente 10% desses compostos constituem a fase particulada da fumaça do cigarro, a qual contém nicotina e alcatrão – produtos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos: fenóis, benzopirenos, benzenos. Os 90% restantes contêm monóxido de carbono, dióxido de carbono, cianetos, aldeídos e diversos outros produtos orgânicos (BYRD, 1992).

O tabagismo produz efeitos deletérios sobre o organismo, causando diferentes malefícios à saúde, sendo as alterações do aparelho respiratório as mais importantes. Merecem destaque a Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica e a maior incidência do câncer de pulmão entre os fumantes, guardando relação com os índices crescentes de consumo de cigarros. Em outros órgãos, as doenças associadas ao tabaco são variadas, tanto no tabagismo ativo quanto no passivo: neoplasias de vários órgãos e tecidos, vasculopatias periféricas, insuficiência coronariana, impotência sexual, maior incidência de infecções respiratórias agudas em crianças, etc (HIJJAR e COSTA E SILVA, 1991).

Os efeitos agudos do tabagismo passivo na saúde humana são simples: irritação ocular e do trato respiratório e aqueles relacionados ao risco de incêndio. Cronicamente, contudo, os seus efeitos são importantes, mais graves e, muitos deles, de difícil comprovação.

A avaliação dos riscos à saúde humana imputados ao tabagismo passivo apresenta bases razoáveis para estudos epidemiológicos, em condições nas quais o risco relativo de tabagismo passivo, comparado a não-fumantes, é alto. Por exemplo, em não-fumantes casadas com fumantes, a exposição ao tabaco, baseada em medidas de cotinina, é em torno de 1% do tabagismo ativo, para um consumo de 20

cigarros por dia. No caso de doença, para a qual o risco de fumar 20 cigarros por dia seja um risco 20 vezes a mais, o risco adicional esperado para o tabagismo passivo seria de 20% e o risco relativo seria de 1,2 (LAW, 1996).

O tabagismo na gestação acarreta sérios prejuízos, já devidamente reconhecidos e relatados, para o crescimento intra-uterino da criança. O maior risco de prematuridade e baixo peso ao nascer, em gestantes fumantes, ocorre no terceiro trimestre, e este risco aumenta proporcionalmente ao número de cigarros fumados (MAINOUS, 1994). As mulheres que fumaram durante os segundo e/ou terceiro trimestres tiveram risco igual àquelas que fumaram durante toda a gravidez. Assim, provavelmente, é maior durante o terceiro trimestre a fase em que o fumo mais atua como fator de diminuição do desenvolvimento fetal (KIRKLAND, et al., 2000).

Geralmente o número de cigarros fumados pela mulher diminui ao longo da gestação. Nas últimas décadas observou-se pequena redução no percentual de gestantes fumantes (35% em 1982 para 33,5% em 1993), também vem diminuindo a quantidade de cigarros fumados na gravidez. Considerando apenas gestantes fumantes, cerca de 21% delas conseguiram abstinência quando atingiram a época do parto, conforme foi avaliado em estudo retrospectivo (HORTA, 1993).

O abandono do tabagismo na gravidez foi mais comum entre mulheres com melhor escolaridade e renda (SHULTE-HOBEIN, 1992; KIRKLAND, 2000). Contudo, este abandono parece não ser definitivo. Em estudo que avaliou a retomada do hábito de fumar entre puérperas, os autores observaram que seis semanas depois do parto, 26% de ex-fumantes voltaram a fumar e ao final do terceiro mês pós-parto, 43% tinham retomado o hábito (MULLEN, 1990).

As alterações do tabagismo materno sobre o feto abrem um capítulo à parte nas conseqüências do tabagismo sobre a saúde. O feto não é um fumante passivo

qualquer que inala fumaça de cigarro involuntariamente em um ambiente aéreo, ele é um ser altamente vulnerável, numa fase de risco para o comprometimento de seu desenvolvimento. A mulher, quando fuma durante a gestação, expõe seu feto não apenas aos componentes da fumaça do cigarro que cruzam a placenta, mas também às alterações na oxigenação e metabolismo placentário, e às mudanças no seu próprio metabolismo secundárias ao fumo (WILCOX, 1989).

Dentre os vários componentes do tabaco que interferem na evolução da gravidez, destacam-se a ação da nicotina e do monóxido de carbono. A nicotina age no sistema cardiovascular, provocando liberação de catecolaminas na circulação materna e, como consequência disso, ocorrem taquicardia, vasoconstrição periférica e redução do fluxo sanguíneo placentário (LEHTOVIRTA, 1978; LYMPEROPOLOU et al., 1996). A ação vascular da nicotina é bem conhecida. O seu efeito agudo causa diminuição do fluxo sanguíneo no espaço interviloso, fato este correlacionado com o aumento da produção de catecolaminas no sangue circulante materno. O resultado disso é a redução na perfusão útero-placentária e consequente má oxigenação e nutrição fetal (SUZUKI, 1980; MANDI, 1984). No feto, a nicotina reduz a perfusão placentária devido a sua ação vasoconstritora, além de atravessar facilmente as barreiras placentária e hematoencefálica, atingindo rapidamente o feto, podendo causar danos diretos sobre o mesmo (WESTFALL, 1986).

QUINGLEY et al., (1979) responsabilizaram a nicotina pelo aumento da frequência cardíaca fetal que ocorre após o uso do cigarro pela gestante. A ação da nicotina seria através do aumento da produção de catecolaminas, responsáveis por vasoconstrição e diminuição da perfusão uterina. Relataram ser improvável que esse aumento da frequência cardíaca ocorra pela passagem de catecolaminas maternas para o feto. A hipótese de a nicotina atravessar rapidamente a barreira placentária e

agir no sistema neuroendócrino do feto, liberando catecolaminas no sangue circulante, é a mais aceita (PIRANI, 1978). Mais recentemente, RAMA SASTRY et al. (1999) verificaram que a cotinina, o metabólito da nicotina, facilita a ação vasoconstritora da prostaglandina E2 e, o acúmulo de cotinina na circulação fetal, poderia contribuir para a indução do trabalho de parto prematuro e o aborto espontâneo em fumantes.

O monóxido de carbono (CO), ao combinar-se com a hemoglobina materna e fetal estabelece hipóxia na mãe e no feto, e poderia ser um dos fatores responsáveis pelo sofrimento fetal crônico nas gestantes fumantes. Estudos já realizados mostram que o CO em níveis elevados interfere prejudicialmente na gestação, levando ao quadro de hipoxemia crônica no feto (VIGGIANO et al., 1990; RODRIGUES-PINTO et al., 2000).

O CO é importante constituinte da fumaça do cigarro e atravessa a placenta rapidamente por provável difusão simples ou facilitada, chegando a apresentar nível de concentração no sangue fetal 10% a 15% maior do que no sangue materno. A hemoglobina possui afinidade pelo CO cerca de 220 vezes maior que pelo oxigênio. O CO, sendo ligado à hemoglobina, aumenta a afinidade do oxigênio para a hemoglobina remanescente. Isso desvia a curva de saturação da oxiemoglobina para a esquerda, o que significa que a tensão de oxigênio do sangue deve cair abaixo dos valores normais antes que uma quantidade de oxigênio seja liberada da hemoglobina. Este efeito pode ser particularmente importante para o feto, visto que sua pressão parcial de oxigênio no sangue arterial é normalmente baixa, aproximadamente 20 a 30mmHg, em comparação com valores do adulto, de aproximadamente 100mmHg. O CO, por deslocar o oxigênio da hemoglobina no sangue arterial, também diminui a capacidade de transporte do oxigênio sangüíneo.

Assim, o CO interfere com a oxigenação tecidual de duas maneiras: pela diminuição da capacidade de transporte sangüíneo de oxigênio e por desviar a curva de saturação da oxiemoglobina para a esquerda (LONGO et al., 1977).

Outros trabalhos referem que os fetos de mães fumantes apresentam aumento na circulação de lactatos com subsequente acidose láctica e incremento considerável de monóxido de carbono e hiperglobulia em sua circulação. Essa situação foi comprovada por VIGGIANO et al., (1990) que obtiveram níveis de hematócrito e hemoglobina, dosados no cordão umbilical, expressivamente mais elevados em conceptos de fumantes ativas do que nos conceptos de não-fumantes e fumantes passivas.

2.3 TABAGISMO NO PERÍODO DE LACTAÇÃO

A lactação constitui período importante para o desenvolvimento físico e psicológico da criança, e associa-se à redução da morbi-mortalidade infantil no primeiro ano de vida, em especial nos países em desenvolvimento. Como na gestação, o tabagismo da mulher durante a lactação se reduziu. Nas últimas décadas, HAUG et al., (1998) compararam a prevalência de tabagismo na lactação e observaram queda de 38% para 26% entre 1970 e 1991. Também como na gestação, no período de lactação, o tabagismo tem decrescido à medida que o grau de escolaridade e o nível de renda maternas aumentam.

O estudo realizado por HORTA et al. (1997) mostrou que crianças cujas mães eram tabagistas tiveram 1,34 mais chances de não terem sido amamentadas até os seis meses de idade. Observou-se ainda, que o padrão de resposta relacionado com a dose foi significativo neste caso e era proporcional ao número de

cigarros fumados pela mãe ao dia. As mães que fumaram durante os seis primeiros meses de vida da criança tinham tendência maior de amamentar por menos tempo.

As conseqüências do tabagismo materno e familiar sobre a lactação e a criança amamentada constituem somatório de efeitos que também lhe dão características próprias. Além das conseqüências do tabagismo passivo da criança, que está quase permanentemente com a mãe dentro do domicílio, se somam as conseqüências sobre a lactação propriamente dita. OLIVEIRA NETTO (1991) observou, no Rio Grande do Sul, que filhos de mães fumantes apresentavam níveis de cotinina urinária mais elevados, e que estes níveis eram maiores quando a mãe fumava durante a mamada. Isso reforça a importância da via aérea e da via láctea na exposição do lactente ao tabagismo materno, como também o fato de que esta exposição é significativamente mais intensa quando a mãe fuma durante o aleitamento. MASCOLA et al. (1998), procuraram avaliar a importância, separadamente, do aleitamento e da inalação passiva na exposição de lactentes aos produtos do tabaco. Observaram que filhos de mães fumantes que amamentam têm níveis de cotinina dez vezes mais elevados que filhos de mães fumantes alimentados com leite artificial, sugerindo que o aleitamento, mais do que a exposição passiva à fumaça do tabaco, a partir do ambiente domiciliar, é o determinante dos níveis de cotinina em crianças cujas mães fumam. Destaca-se que os níveis de cotinina detectados em crianças filhas de mães fumantes que amamentam são equivalentes aos dos fumantes ativos.

É importante lembrar que a cotinina é apenas um marcador biológico do tabagismo. A identificação e quantificação de outros componentes nocivos do tabaco que possam estar presentes no leite humano de nutrizas fumantes e os seus efeitos adversos para a saúde de lactentes e crianças é pouco conhecida. A própria

exposição, via leite, pode estar alterada em função da redução da produção láctea e da diminuição da gordura no leite materno provocadas pelo tabagismo (WICHELOW et al., 1979).

A nicotina é o segundo componente tóxico mais abundante no tabaco. Por ser um alcalóide básico (pH=7,8), alcança concentrações consideravelmente mais altas no leite do que no soro, em função do pH mais ácido do leite. Existe correlação entre a concentração de nicotina no leite e no soro e concentrações mais altas são encontradas dez minutos após fumar. Em função da sua curta meia vida, tanto no soro (80 minutos), quanto no leite (95 minutos), a real concentração da nicotina no leite não depende apenas do número de cigarros fumados por dia, mas do tempo decorrido entre o último cigarro consumido e o início da amamentação (MASCOLA et al., 1998).

Estudos em animais mostraram que a exposição ao tabagismo diminui a concentração de prolactina e inibe a produção de leite. Observações em mulheres que estão lactando também indicam que o tabagismo diminui a concentração de prolactina (VIO, 1993; SALAZAR et al., 1998). Além disso, crianças amamentadas, filhas de fumantes, ganham peso em velocidade menor que filhas de não-fumantes, sugerindo assim que o tabagismo pode afetar a produção de leite.

No Chile, VIO et al. (1993) estudaram a produção diária de leite por diluição de deutério, em mães fumantes entre um e três meses de lactação. Observaram que estas mães apresentavam produção diária de leite cerca de um terço menor do que as mães não-fumantes. Ao medir o ganho de peso em período de 14 dias, notaram que os filhos de fumantes apresentavam ganho ponderal médio 40% menor do que os filhos de não-fumantes. Em estudo posterior, SALAZAR et al. (1998) observaram entre um e três meses de idade, redução de 15% no ganho ponderal diário, sem

prejuízo do ganho estatural. Mães que fumavam na gestação mostravam períodos significativamente mais curtos de aleitamento exclusivo (2,6 meses) em comparação com não-fumantes (3,5 meses) e, também redução significativa do tempo de lactação (4,2 meses para as fumantes e 5,3 meses para as não-fumantes).

Têm sido aventados mecanismos hormonais e comportamentais para explicar estes achados. Estudos em animais, tabagismo experimental ou injeção de nicotina, têm demonstrado claramente o efeito inibitório dessa droga sobre a liberação de prolactina de ratas. A nicotina bloqueia o aumento da produção de prolactina induzido pela sucção, o que foi demonstrado em ratas puérperas sem, contudo, interferir na liberação do leite (HORTA et al., 1997). Em outro estudo, no quinto dia de lactação, ratas que receberam nicotina apresentavam níveis de prolactina nove vezes menor do que as não tratadas, o que indica que o efeito da nicotina na secreção de prolactina se deve à ativação de receptores nicotínicos de neurônios dopaminérgicos túbero-infundibulares, liberando dopamina como inibidor de prolactina (TERKEL et al., 1973).

Em seres humanos, observou-se que os níveis de prolactina foram 40% menores em mulheres fumantes, e o tempo de desmame foi menor. Diferente dos estudos com animais, os incrementos de prolactina sérica durante a mamada não foram significativamente diferentes entre tabagistas e não-tabagistas, nem foi obtida correlação entre os níveis de prolactina e de produção láctea (HULIHAN-GIBLIN et al., 1990).

Na mulher fumante, a justificativa de um único mecanismo de natureza hormonal interferindo sobre a produção láctea é difícil de ser estabelecido. Mães fumantes compartilham mais traços demográficos com mães que não amamentam; filhos de mães fumantes demoram mais tempo para sugar após o nascimento e

exercem menor pressão de sucção, o que também pode influenciar a resposta endócrina e a produção láctea (HOPKINSON et al., 1992). O conhecimento atual sobre a relação entre níveis hormonais e produção láctea não deixa claro qual seria a real relação causal para a diminuição da quantidade de leite nas mães que fumam. Os níveis de prolactina entre mães fumantes que desmamam ou continuam a amamentar não divergem significativamente (ANDERSON et al., 1984).

Mesmo em condições normais de lactação, sabe-se que alguma prolactina é necessária para a lactogênese e para a lactação continuada. Contudo, esforços repetidos para correlacionar produção láctea e produção materna de prolactina não têm produzido resultados consistentes (LAWRENCE, 1999).

Tanto a lactação, como o tabagismo, estão associados a mudanças do metabolismo das gorduras. WOODWARD et al. (1988) e HOPKINSON et al. (1992) estudando o leite de mães de prematuros, encontraram redução de 19% no teor de gordura no grupo das fumantes. Com base nesses dados, os autores discutem se a redução da atividade da lipase lipoprotéica encontrada no tabagismo não poderia explicar a baixa concentração de gordura do leite e a baixa produção láctea de mães fumantes.

Embora crianças de mães tabagistas tenham diferenças de comportamento ao amamentar, tais como mais episódios de cólica e redução da frequência e amplitude da sucção, essas diferenças não conseguem explicar a menor produção de leite entre as mães de crianças que não sugam. As bases fisiológicas para explicar a menor produção de leite de mulheres tabagistas necessitam ser melhor estudadas (SAID, 1984).

2.4 PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO

A cicatrização é processo dinâmico e interativo, e envolve mediadores químicos, células sangüíneas, matriz extracelular e células parenquimatosas. Caracteriza-se pelo desenvolvimento do tecido de reparação, mediante a aproximação das extremidades da ferida e da deposição, no local da injúria, inicialmente de tecido de granulação e tardiamente pela cicatriz propriamente dita (FORREST, 1983; SINGER e CLARK, 1999).

Com a finalidade de tornar didático, WITTE e BARBUL (1997) dividiram o processo cicatricial em três fases, as quais são inter-relacionadas e sobrepostas: fase inflamatória, fase proliferativa e fase de maturação.

2.4.1 Fase Inflamatória

Essencial na cicatrização, esta fase abrange desde o momento da lesão até o quarto ou quinto dia de evolução, é caracterizada pelo aumento da permeabilidade vascular, quimiotaxia de células oriundas da circulação para o local da injúria e pela liberação local de citocinas, que são fatores de crescimento, além da liberação de mediadores químicos.

Assim que ocorre a injúria, entra em ação o sistema de coagulação. Portanto, a hemostasia precede a fase inflamatória. A ruptura dos vasos expõe o colágeno às plaquetas, ocasionando a agregação das mesmas e a ativação da parte intrínseca da cascata da coagulação. O contato entre o colágeno e as plaquetas, na presença da trombina, fibronectina e seus fragmentos, resulta na liberação de várias

citocinas e fatores de crescimento, tais como: Fator Alfa de Necrose Tumoral, Fator de Crescimento Derivado das Plaquetas ou *PDGF* e Fator de Crescimento dos Fibroblastos ou *FGF*. Esses mediadores químicos levam ao aumento da permeabilidade vascular, liberação de prostaglandinas e ao estímulo à migração de neutrófilos e fibroblastos para o sítio da injúria.

A primeira onda celular que migra para o local da ferida é composta por neutrófilos, que atuam na fagocitose de possíveis microrganismos presentes na ferida, assim como na lise de tecido desvitalizado, mediante a liberação de proteases. Essas células apresentam vida curta, e sobrevivem somente poucas horas após a agressão. Na continuidade do processo, os linfócitos são as próximas células a serem atraídas para o local da lesão; essas células liberam mediadores químicos denominados linfocinas, que têm seu papel na quimiotaxia dos fibroblastos (WAHL, WAHL e MC CARTHY, 1978; ORGILL e DEMLING, 1988).

De acordo com estudos de FOLKMAN (1982), os linfócitos também liberam fator que estimula a angiogênese nos tecidos em cicatrização. Na seqüência ocorre a atração e ativação de macrófagos para o sítio da lesão, pela ação de mediadores tais como os produtos de degradação da fibrina, fatores plaquetários e linfocinas; cujas células podem ser oriundas do próprio tecido lesado ou da diferenciação de monócitos circulantes, e são consideradas as mais importantes da cascata inflamatória que inicia todo o processo de cicatrização. Tornam-se as células predominantes no tecido lesado durante os primeiros dias, exceto quando, pela presença de tecido necrótico e/ou bactérias, prolonga-se a presença dos neutrófilos. Outra fonte de fatores de crescimento são os macrófagos, os quais produzem fatores que estimulam a angiogênese, fibroplasia e a produção do colágeno (CLARK

et al., 1976; DIEGELMAN, COHEN e KAPLAN, 1981; ECKERSLEY e DUDLEY, 1988).

Estudos experimentais em pacientes diabéticos e tratados com corticoesteróides demonstraram redução da resposta inflamatória na fase inicial da cicatrização (WITTE e BARBUL, 1997). RISAU (1997) demonstrou que para a formação adequada de novos vasos no tecido cicatricial, o processo inflamatório deve estar presente.

2.4.2 Fase Proliferativa

Tem início ao redor do quarto dia e persiste até o 14.º dia, e é caracterizada por três processos: angiogênese, proliferação fibroblástica e reepitelização (HERTIG, 1935; ORGILL e DEMLING, 1988).

2.4.2.1 Angiogênese

Uma vez que a área lesada torna-se isquêmica, para que ocorra a cicatrização, o fluxo sanguíneo deve ser restaurado mediante a angiogênese.

Por volta do quarto dia após a lesão, macrófagos, fibroblastos e vasos sanguíneos iniciam processo de migração em direção ao tecido lesado, dando início à formação de tecido de granulação; os macrófagos produzem as citocinas, necessárias à fibroplasia e angiogênese; os fibroblastos constroem a matriz extracelular necessária para fornecer suporte à multiplicação celular e os vasos sanguíneos transportam oxigênio e nutrientes necessários à sustentação do metabolismo celular (TONNESEN, FENG e CLARK, 2000).

A hipóxia tecidual após a lesão é um estímulo bem conhecido para a neoformação vascular. Os macrófagos, quando na presença de baixa tensão de oxigênio e expostos ao aumento do ácido láctico, produzem substância conhecida como fator de angiogênese, o qual apresenta poder de atração química para células mesoteliais e do endotélio vascular. Outras citocinas angiogênicas são liberadas: *PDGF* liberado pelas plaquetas, Fator de Crescimento dos Fibroblastos Alfa e Beta (*FGF α e β*), Fator Transformador de Crescimento Alfa e Beta (*TGF α e β*) e Fator de Crescimento Endotelial (*VEGF*). Também são liberadas as interleucinas um a seis, que apresentam propriedades similares e são produzidas por diversos tipos celulares, de modo que diferentes fatores angiogênicos desenvolvem seu papel em diferentes etapas do processo de cicatrização (KNIGHTON et al., 1982; KNIGHTON et al., 1983; LINGEN, 2001).

Há dois mecanismos para a formação de novos vasos sangüíneos: vasculogênese e angiogênese. A vasculogênese é a formação de vasos pela agregação de células endoteliais, e apresenta importância durante o processo inflamatório. A angiogênese pode ser definida como o crescimento de novos vasos sangüíneos a partir de microvasos já existentes (BATTEGAY, 1995).

A angiogênese é essencial no processo de cicatrização, o suprimento sangüíneo abundante é necessário para suprir a grande demanda metabólica local necessária para o desbridamento e fibroplasia do tecido lesado. A célula endotelial tem papel na organização e regulação da cicatrização, e constitui-se atualmente em alvo primário para a manipulação terapêutica no processo de reparo. O processo de neoformação vascular tem início nos primeiros dias após a lesão, origina-se predominantemente nas vênulas, enquanto uma fina camada de superfície necrótica está presente. As células endoteliais são estimuladas pelos fatores angiogênicos, e

secretam proteases que degradam a membrana basal em torno do vaso, criando-se espaços entre as mesmas. São abertos espaços para projeções celulares que migram em direção ao tecido desvitalizado, proliferando e formando novos capilares nas margens da ferida. Esses brotamentos capilares formam redes circulares que se unem umas às outras, produzindo novo leito vascular. Se as margens da ferida estão aproximadas, os capilares podem atravessá-la, formando verdadeiras pontes (ARNOLD e WEST, 1991).

As hemácias e o plasma começam então a fluir através dos novos microvasos levando à união das redes capilares com redes vasculares mais profundas. A combinação de uma densa camada de neovasos com fibroblastos recebe o nome de tecido de granulação. Uma vez que existe a aproximação das bordas da lesão, ocorre a remodelação capilar, devido à regressão da demanda metabólica na área lesada e à secreção de fatores inibidores da angiogênese, o que leva à formação de cicatrizes maduras e relativamente avasculares (ORGILL e DEMLING, 1988; ARNOLD e WEST, 1991).

2.4.2.2 Proliferação fibroblástica e dos miofibroblastos

Os fibroblastos são as células mais comuns do tecido conjuntivo e os principais produtores de fibras colágenas e material intercelular amorfo, e são responsáveis pela síntese, deposição e remodelação da matriz extracelular (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1995).

Fatores de crescimento derivados principalmente de plaquetas, macrófagos e linfócitos, especialmente o *PDGF* e o *FGF*, estimulam os fibroblastos do tecido

circundante à lesão a proliferar e migrar para a área lesada (DIEGLMANN, COHEN e KAPLAN, 1981; NEILSON, PHILIPS e JIMENEZ, 1982).

A cicatrização da ferida depende de dois outros fenômenos: a epitelização, definida como a replicação e a mobilização das células epiteliais e a formação e contração do tecido de granulação. Este último é essencial, para manter a continuidade tecidual, pois reduz o tamanho da lesão e estimula a formação da cicatriz definitiva, e sua ação é completada pela epitelização (CARREL e HARTMANN, 1916; GABBIANI, 2003).

O fenômeno da contração cicatricial é caracterizado pelo movimento centrípeto de aproximação das bordas da ferida e envolve complexa interação entre células, matriz celular e citocinas. A partir do início da segunda semana da cicatrização, fibroblastos assumem o fenótipo de miofibroblastos, caracterizados pela presença de espessos feixes de actina-miosina, contêm microfilamentos dispostos ao longo de sua membrana citoplasmática e apresentam sítios de ligação intercelular e célula matriz (GRINNEL, 1994; SINGER e CLARK, 1999).

Foi descrita a presença, no tecido cicatricial, de fibroblastos modificados, contendo sistema fibrilar citoplasmático, lembrando células musculares, o que implicaria no importante papel na contração cicatricial (GABBIANI, RYAN e MAJNO, 1971). Em 1972, MAJNO et al., descreveram a presença de fibroblastos com características intermediárias entre fibroblastos típicos e células musculares lisas no tecido de granulação, demonstrando que o tecido de granulação é órgão contrátil e que o mesmo requer oxigênio para exercer suas funções, e sugeriram pela primeira vez o nome de miofibroblastos.

Os miofibroblastos foram definidos como células altamente diferenciadas que apresentam organelas especializadas, e apresentam características comuns a

fibras musculares e fibroblastos. Estruturalmente apresentam três elementos morfológicos essenciais: 1) feixes de actina paralelos ao maior eixo da célula; 2) sítios de ligação célula-estroma e 3) espaços para ligação intracelular. Essas células têm sua ativação intermediada por citocinas *PDGF* e *FGF*, assim como por interleucina dois (SCHURCH, SEEMAYER e GABBIANI, 1998).

SERINI e GABBIANI (1999) descreveram que os miofibroblastos são interconectados entre si por junções especiais e com a matriz extracelular pelo chamado fibronexus, uma complexa membrana que envolve microfilamentos intracelulares em continuidade com fibronectina extracelular. HINZ et al. (2001), LORENA et al. (2002) e TOMASEK et al. (2002), relataram também que estas células são importantes produtoras de colágeno dos tipos I e III, informando existir direta correlação entre o nível do principal marcador destas células, a actina α -sm e o grau de contração dos miofibroblastos. No processo de cicatrização normal, o tecido de granulação começa a desaparecer quando a reepitelização encontra-se em fase final, ocorrendo então maciça apoptose dos miofibroblastos e componentes vasculares, levando à formação de cicatriz com baixa celularidade.

2.4.2.3 Reepitelização

Esta fase envolve a replicação e o movimento de células epiteliais com o objetivo de reconstituir a continuidade tecidual. Para tanto, novas células estimuladas por citocinas liberadas entre outras células pelos miofibroblastos são formadas, oriundas da camada basal, e migram verticalmente para a região da ferida, formando inicialmente camada celular simples (ORGILL e DEMLING, 1988; POWELL et al., 1999).

2.4.3 Fase de Maturação

Essa fase inicia-se em torno da segunda semana após a lesão, e apresenta como característica marcante a deposição do colágeno no sítio da lesão. O colágeno é composto de três cadeias de polipeptídeos. Na sua produção ocorre a hidroxilação dos aminoácidos prolina ou lisina. Este processo é importante, pois confere estabilidade à molécula do colágeno. Clinicamente é a fase mais importante, pois a quantidade e a qualidade desta proteína determinará a força mecânica do tecido remodelado (DIEGELMANN, ROTHKOPF e COHEN, 1975; WITTE e BARBULL, 1997).

Existem mais de duas dezenas de tipos de colágeno já descritos na literatura. Os fibroblastos são as principais células produtoras do colágeno tipo I, o qual é o mais comum e perfaz aproximadamente 90% desta proteína no corpo dos mamíferos. Também produzem o colágeno tipo III, que freqüentemente encontra-se associado ao primeiro. A proteína colágena representa 30% do total de proteínas presentes no organismo humano (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1995).

O colágeno tipo III deposita-se inicialmente no tecido de cicatrização, e caracteriza-se por ser proteína imatura; mais tardiamente, com a remodelação, surge o tipo I, de características maduras. Nesta fase final da cicatrização ocorre a maturação do tecido de reparação, que progride gradualmente de estado altamente celular e vascularizado até a formação da cicatriz, com poucas células e vasos sangüíneos e com o resultado final de um tecido resistente e com fibras colágenas com alto grau de orientação (CRONIN, JACKSON e DUNPHY, 1968; GAFFNEY et al., 2002). O colágeno derivado do tecido de granulação difere do colágeno do tecido

intacto, pois apresenta maior hidroxilação e glicosilação, o que confere àquele diâmetro maior, assim como a organização paralela ao tecido vizinho das fibras colágenas não corresponde à organização dos tecidos intactos, que demonstram padrão de “cesto trançado” (FORREST, 1983).

Ainda, a deposição do colágeno do tipo III na ferida inicia-se precocemente, atinge seu pico em torno do 3.º dia e reduz-se progressivamente até o 7.º dia. A presença de colágeno do tipo I aumenta progressivamente após o 2.º dia por, pelo menos, quatro a cinco semanas (EHRlich; KRUMMEL, 1996).

Para que ocorra boa cicatrização é necessário que exista equilíbrio entre a formação e degradação do colágeno. Sua destruição é mediada pela enzima colagenase, que por sua vez é regulada por citocinas (WITTE e BARBUL, 1997).

2.5 CICATRIZAÇÃO NO PERÍODO FETAL

O estudo da cicatrização fetal é intrigante e pode resultar na descoberta do modelo ideal neste processo que poderia permitir a mínima formação de cicatriz. Feridas fetais em idade gestacional precoce podem ser curadas sem a formação de cicatriz. Os fatores contribuintes para a cicatrização fetal são a presença de poucos neutrófilos e maior quantidade de monócitos no período inflamatório da cicatrização, diferentes concentrações de citocinas, e maior proporção de colágeno tipo III, em contraste com a cicatrização de adultos (DANG et al., 2003).

A comparação entre a cicatrização da pele de coelhos no período fetal e recém-nascidos demonstrou que os fetos apresentavam infiltração leucocitária mínima, ausência de tecido de granulação e da contração da cicatriz, o que originou

linha de pesquisas para avaliar as diferenças entre a cicatrização fetal e pós-natal (SOMASUNDARAM e PRATHAP, 1970).

ADZICK et al. (1985) compararam a cicatrização em fetos, recém-nascidos e adultos quanto aos aspectos histológico, enzimo-histoquímico e dosagem da hidroxiprolina em coelhos. Utilizando cilindro de Gore-Tex[®], descrito por GOODSON e HUNT (1982), no tecido celular subcutâneo dos fetos e mães, introduzido no 23.º dia de gestação (termo em 32 dias) e dos recém-nascidos, no sétimo dia de vida. O sacrifício dos animais ocorreu no quarto, sétimo e nono dia do pós-operatório. Foi encontrado acúmulo de hidroxiprolina inverso à idade dos animais, ou seja, maior em fetos com redução em recém-nascidos e adultos, sendo a diferença significativa nos três grupos. O estudo histológico mostrou macrófagos no quarto dia e fibroblastos no sétimo dia de avaliação dos fetos (sem neutrófilos nas amostras), enquanto recém-nascidos e adultos apresentavam poucas células até o sétimo dia, com posterior surgimento de macrófagos, neutrófilos e poucos fibroblastos. As conclusões foram que em fetos a cicatrização é mais rápida às custas da proliferação celular e da deposição de colágeno, apesar da relativa hipoxemia fetal, e que a cicatrização é mais rápida em recém-nascidos do que em adultos.

Em pesquisa sobre a cicatrização no período fetal em ovelhas, a comparação da deposição do colágeno em fetos durante o segundo e terceiro “trimestres” gestacionais e adultos, mediante técnica de imunohistoquímica com uso de anticorpos anticolágeno tipo I, III, IV e VI, demonstrou todos os tipos de colágeno nas cicatrizes avaliadas. O momento do aparecimento de cada tipo e a forma de distribuição variou entre fetos e adultos. No segundo “trimestre” gestacional, as fibras de colágeno estavam presentes até 72h, depositadas paralelamente ao tecido normal em 5 dias e remodeladas dentro do padrão normal de tecido intacto em 14

dias. Nos fetos do terceiro “trimestre”, o colágeno foi detectado 72h após o ferimento com deposição similar ao segundo “trimestre” observada em 7 dias, porém, com cicatriz mínima aos 14 dias. O aparecimento das fibras de colágeno nos adultos ocorreu em 7 dias e havia cicatriz típica aos 14 dias. A conclusão foi que a deposição do colágeno é mais rápida e segue o padrão do tecido intacto em fetos. (LONGAKER et al., 1990).

JULIA et al. (1993) estudaram a tensão cicatricial em fetos de coelhos, incluíram 30 animais em cada grupo, e relacionaram a resistência da cicatriz no período fetal, neonatal e adulto. Foram estudadas a tensão, dosagem de hidroxiprolina e histologia em três tipos de ferida: fechada com pontos, aberta e com uso de eletrocautério. Os resultados obtidos em fetos foram que as cicatrizes com sutura tiveram o melhor aspecto cosmético, os ferimentos abertos e com eletrocautério não cicatrizaram de forma adequada e as cicatrizes continham menor número de células inflamatórias e de fibras colágenas. A tensão da cicatriz foi significativamente menor nos fetos do que nos recém-nascidos e adultos. Também houve diferença estatística entre estes, com predomínio dos últimos. A tensão da cicatriz resultou em 20% do tecido intacto em fetos e adultos, sendo 40% em recém-nascidos. Em adultos, a concentração da hidroxiprolina encontrava-se mais elevada do que nos fetos e recém-nascidos.

O Fator Transformador de Crescimento- β ($TGF-\beta$) especificamente, com baixos níveis de $TGF-\beta_1$ e $TGF-\beta_2$ e altos níveis de $TGF-\beta_3$, provavelmente, têm papel central na formação da cicatriz fetal, e estudos estão em andamento. Baixos níveis do Fator de Crescimento Derivado das Plaquetas ($PDGF$), alta quantidade do fator de crescimento epidérmico e de ácido hialurônico na matriz extracelular, têm sido descritos e sugerem processo de cicatrização mais eficiente em modelos fetais.

Notadamente, a deposição de colágeno em cicatrizes fetais é disposta em padrão reticular fino, que é indistinguível da pele não lesada, assim como a fibronectina mais abundante nas cicatrizes fetais têm sido responsabilizadas por acelerar a cicatrização em modelos fetais com ratos (MACKOOL et al., 1998).

2.6 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA CICATRIZAÇÃO

2.6.1 Tensiometria

HOWES, SOOY e HARVEY (1929) realizaram o primeiro estudo definitivo sobre a tensão em cicatrização de feridas cirúrgicas. No Brasil, NARESSE et al. (1987), construíram aparelho para medir a intensidade da força que pode romper anastomoses intestinais em ratos. Com o desenvolvimento de máquinas de tração computadorizadas é possível avaliar com precisão a força de ruptura, força máxima e tensão tecidual.

Segundo VAN WINKLE (1969), Tensão é medida em termos de quantidade de força suportada de área de secção e pode ser expressa em libras/polegada² e quilogramas/mm².

Força de ruptura é a força requerida para romper um tecido ou parede sem considerar suas dimensões. Em diversos tecidos do organismo, a força de ruptura varia em um mesmo tecido, porém, a tensão pode permanecer constante para um mesmo tecido com as mesmas dimensões. A força de ruptura de uma cicatriz tende a aumentar, mas sua tensão pode se manter constante ou inclusive decrescer, devido somente às mudanças na espessura do tecido. A idade pode aumentar a força de ruptura, mas não a tensão. A força de ruptura é a variável ideal a ser

estudada quando o tecido não é homogêneo, ou seja, quando a sua espessura não pode ser mensurada com total precisão (VAN WINCLE, 1969).

A força de ruptura da cicatriz nunca é igual à força do tecido intacto. A análise temporal da força de ruptura mostra que, após uma semana, a ferida possui apenas três por cento, após três semanas, 20% de sua força final e após três meses apresenta 80% da força da pele intacta, sem acréscimo após este período (LEVENSON et al., 1965; BARBUL e REGAN, 1993).

Força máxima é a força total exercida sobre o tecido. Tanto a força de ruptura como a força máxima são medidas em quilogramas-força. Sob o ponto de vista do cirurgião o importante é a observação da força de ruptura, no entanto, sob o ponto de vista físico a tensão é a medida mais importante (VAN WINCLE e HASTINGS, 1972).

No trato digestivo, a força da anastomose do cólon atinge 45% do cólon intacto em duas semanas e 75% em quatro meses (MAST, 1997). Estudos comparativos da cicatrização fascial demonstram que esta é mais prolongada em relação a outros tecidos, devido à sua celularidade e vascularização limitada e maior consumo de glicose pelos fibroblastos. Como resultado, o ganho de força da fásia é mais lento, atingindo 80% em relação ao tecido intacto em 14 semanas (TYRONE et al., 2000).

Nas dissertações de FERNANDEZ (1993) e COELHO (1999), realizadas em ratos adultos e jovens, respectivamente, a cicatriz obtida aos 14 e 21 dias de pós-operatório foi mais resistente à tração do que aos 7 dias, independentemente do tipo de incisão utilizada.

HOLM-PETERSEN e VIIDIK (1972) estudaram a cicatrização de ratos jovens (três meses de idade) e idosos (18 meses) submetidos a incisões dorsais. As

cicatrices foram avaliadas no 8.º e 21.º dias de pós-operatório. Os autores demonstraram que no oitavo dia não houve diferença entre os dois grupos, porém, aos 21 dias, a força máxima e de ruptura foram maiores nos ratos jovens e a resistência à tração menor.

PEACOCK (1960) avaliou a tensão da cicatriz em ratos nutridos e desnutridos por estudo tensiométrico e observou redução significativa nos animais debilitados.

O mesmo foi encontrado por COELHO (2003) que estudou o efeito da desnutrição intra-uterina sobre a cicatrização da parede abdominal dos filhotes, após o desmame, cujos valores tensiométricos foram inferiores para os animais desnutridos intra-útero.

2.6.2 Morfometria do Colágeno

O colágeno é formado por três cadeias polipeptídeas, as cadeias alfa, que são formadas por cerca de 1.000 aminoácidos. Estas são configuradas em hélice e unidas por pontes de hidrogênio, sendo cada uma delas codificada por um gene, dando origem a diversos tipos dessa proteína. As mais importantes para a cicatrização são do tipo I e III, presentes na pele e vasos sanguíneos, respectivamente (PROCKOP et al., 1979).

JUNQUEIRA, BIGNOLAS e BRENTANI (1979) descreveram que o método picrossírius (*picrossirius-red F3BA*), que em combinação com a microscopia de polarização, é considerado o melhor método para se visualizar individualmente as fibras colágenas, quantificá-las e determinar a sua extensão. Nesta coloração, os cortes histológicos são submetidos ao picrossírius para a identificação de colágenos

maduro e imaturo sob a técnica de luz polarizada, aliados a análise morfométrica computadorizada. Os valores são interpretados em porcentagem de área ocupada especificamente por determinado tipo de colágeno, utilizando-se o sistema *RGB* (*Red, Green, Blue*), no qual são considerados tons de vermelho (colágeno tipo I) e para tons de verde (colágeno tipo III).

2.6.3 Imunoistoquímica para Miofibroblastos e Vasos Sangüíneos

A imunoistoquímica é o método diagnóstico que tem como objetivo detectar um antígeno tissular ou celular, mediante a utilização de anticorpo específico dirigido contra este componente celular (TORRES et al., 1998).

WERNER (2002) definiu o método como sendo a aplicação dos princípios imunológicos da ligação antígeno-anticorpo para estudo de células e tecidos. A imunoistoquímica consiste na utilização de anticorpos específicos conhecidos e manipulados quimicamente para que, ao se ligarem aos seus antígenos celulares ou teciduais correspondentes, devido a diversas reações e utilização de cromógenos, produzam alteração de coloração visível à microscopia óptica, a qual indica o antígeno específico e o quantifica.

Em pesquisa sobre a cicatrização e angiogênese, RUITER et al. (1993) utilizaram como técnica imunoistoquímica o anticorpo *PAL-E*, que é altamente específico na identificação do endotélio vascular, porém é menos sensível do que outros marcadores, tais como o fator VIII e o *CD 34*, este último não é expresso em arteríolas.

No presente estudo, a quantificação de vasos sangüíneos foi realizada por meio da técnica de imunoistoquímica, utilizando-se anticorpo antifator VIII, também

denominado fator de Von Willebrand, o qual foi citado por WERNER (2002) como sendo altamente específico para tecido vascular. A utilização do fator VIII como marcador de vascularização foi realizada por outros estudos (JERDAN, MICHELS e GLASER, 1991; CHIBATA, 2003 e SKINOVSKY, 2005).

No presente estudo, a quantificação dos miofibroblastos igualmente foi realizada por meio de imunistoquímica, utilizando-se para tal anticorpo anti- α -actina muscular lisa (actina α -sm), o qual foi produzido pela primeira vez por SKALLI et al. (1986), cujos autores demonstraram positividade para a identificação dessas células, com o uso desse método.

HINZ et al. (2001), em estudo experimental, e LORENA et al. (2002), em estudo de revisão sobre a importância dos miofibroblastos no processo de cicatrização, relataram que existe correlação direta entre o nível de actina α -sm e a capacidade contrátil dos miofibroblastos, sendo a expressão da mesma considerada por SCHURCH, SEEMAYER e GABBIANI (1998) como o principal marcador bioquímico deste tipo celular.

2.7 NICOTINA E CICATRIZAÇÃO

2.7.1 Estudos Clínicos

LAMPSON (1935) estudou 20 tabagistas crônicos voluntários e determinou o fluxo sanguíneo e a temperatura cutânea na mão dos pacientes através de aparato. Observou que o tabagismo levou à considerável redução no fluxo sanguíneo periférico, relacionando o grau e a duração da vasoconstrição à quantidade de nicotina absorvida, durando em média 60 minutos.

SARIN, AUSTINE e NICKEL (1974) mensuraram a velocidade do fluxo sanguíneo digital em dois grupos de dez voluntários, um deles composto por fumantes de idades semelhantes, utilizando Doppler Ultrasônico de Fluxo. As medidas foram feitas antes e após o ato de fumar em ambos os grupos e respeitando os mesmos intervalos de tempo. Os autores concluíram que o ato de fumar apenas um cigarro reduz a velocidade do fluxo sanguíneo digital em 42%.

MOSELY e FINSETH (1977) relacionaram o retardo na cicatrização de lesão de partes moles na mão de um paciente diretamente com seu hábito de fumar, acreditando-se ser a causa deste efeito deletério a vasoconstrição associada com a nicotina e a isquemia decorrente. A cicatrização somente ocorreu após o paciente ter cessado o uso do tabaco.

DAVIS e DAVIS (1979) avaliaram a taxa de agregação plaquetária avaliada em 18 voluntários, antes e 20 minutos após fumarem 3 cigarros. Concluiu-se que houve aumento significativo da agregação plaquetária, o que indica que o fumo aumenta a formação de trombos e conseqüente isquemia.

CHAMSON et al. (1980) realizaram estudo utilizando culturas de fibroblastos humanos, foi adicionado extrato de tabaco, e foi então avaliada a multiplicação celular. Os resultados por microscopia eletrônica demonstraram que, com o uso de tabaco contendo de 15 a 30 μ mol/l de nicotina, importantes alterações morfológicas foram verificadas nos fibroblastos, tais como a diminuição da extensão do retículo

endoplasmático rugoso e aumento do número de mitocôndrias e vacúolos. Concluíram que a ultra-estrutura dos fibroblastos é modificada pelo tabaco, caracterizando toxicidade celular e inibição do crescimento destas células.

NADLER, VELASCO e HORTON (1983) estudaram 12 tabagistas crônicos e 12 não-fumantes. Após os tabagistas fumarem o equivalente a 1mg de nicotina, pelo período de 4 horas, uma unidade por hora, foi dosada a taxa de prostaglandina PG2 na urina, em ambos os grupos. Nos fumantes crônicos houve redução significativa da PG2, sugerindo que a produção de prostaglandinas seja inibida pela nicotina.

REES, LIVERETT e GUY (1984) estudaram retrospectivamente 1.186 pacientes consecutivos, submetidos à cirurgia plástica facial, com retalho cutâneo, num período de 7 anos (1975 a 1981). Concluíram que os pacientes fumantes apresentaram 12,46 vezes mais chance de desenvolver isquemia do retalho do que os não-fumantes. Diante deste fato, os autores recomendaram, que em cirurgias eletivas, os pacientes somente fossem operados após terem cessado o ato de fumar.

RENAUD et al. (1984) avaliaram a taxa de agregação plaquetária em relação aos níveis sanguíneos de nicotina e carboxihemoglobina em 10 tabagistas crônicos, 10 minutos antes e 10 minutos após fumarem cigarros com concentração da droga que variou de 0,07 a 1,44mg. Observou-se aumento na taxa de agregação plaquetária quando foram utilizadas concentrações entre 0,58 a 1,44mg de nicotina, sem haver correlação com a taxa sanguínea de carboxihemoglobina.

JONES e TRIPPLET (1992) realizaram implantes dentários em 15 pacientes, 5 pacientes fumantes e 10 não-fumantes. Cinco destes pacientes apresentaram problemas cicatriciais culminando com a perda do implante em 80% (4 casos), que

admitiram ter fumado no período perioperatório. Os autores concluíram que fumar é fator de risco associado com problemas de cicatrização.

REUS, COLEN e STRAKER (1992) em estudo retrospectivo, compararam 104 enxertos de tecidos livres, realizados eletivamente em 93 pacientes tabagistas e 51 pacientes não-tabagistas. Em ambos os grupos, a etiologia e sítios de recepção dos enxertos foram semelhantes, com exceção da doença pulmonar obstrutiva crônica dos tabagistas, não houve outros fatores de morbidade. Os autores concluíram que houve aumento da taxa de complicações isquêmicas na periferia dos enxertos, no grupo de pacientes tabagistas, sugerindo ser esta complicação decorrente da ação vasoconstritora da nicotina.

TIPTON e DABBOUS (1995) utilizaram culturas de fibroblastos oriundos da gengiva de um homem saudável não-tabagista e nestas foi adicionada nicotina em concentrações entre 0,001% e 0,05%, níveis comparáveis aos encontrados na saliva de fumantes crônicos. Foram realizadas medidas da proliferação de fibroblastos após 24 horas de incubação a 37°C e pesquisa da produção de colágeno tipo I e da atividade da colagenase após seis horas da incubação. Os resultados, comparados ao grupo controle sem adição da droga, mostraram que todas as concentrações testadas de nicotina causaram significativa inibição da proliferação fibroblástica, a qual é dose-dependente, sendo que nas concentrações entre 0,05% e 0,075% houve intensa vacuolização nos fibroblastos. Apenas na concentração da droga de 0,05% a produção de colágeno tipo I foi inibida de modo significativo e em concentrações iguais ou maiores a 0,075% houve aumento significativo da atividade da colagenase. Os autores concluíram que, *in vitro*, a nicotina exerce efeito inibitório sobre a proliferação de fibroblastos gengivais humanos, assim como na produção de

colágeno tipo I, enquanto estimula a lise desta proteína pelo aumento da atividade da collagenase.

GIANNOPOULOU, GEINOZE e CIMASONI (1999) pesquisaram os efeitos, *in vitro*, da nicotina na multiplicação e quimiotaxia de culturas de fibroblastos oriundos do ligamento periodontal de cinco homens voluntários. As concentrações testadas da droga variaram entre 5ng por ml a 250µg por ml, o estudo foi realizado após 1, 3, 6, 24 e 48 horas de incubação, comparando-se os resultados obtidos com grupos controle, sem adição de nicotina. No exame morfológico das células, encontrou-se intensa vacuolização nas concentrações de 1µg e 2µg, com intensa inibição fibroblástica na ordem de 92% (concentração de 2µg por ml) a 0% (5ng por ml). Houve inibição da migração celular dose-dependente, variando de 15% com a menor concentração de nicotina (50ng por ml) a até 90%, com a maior concentração (5µg por ml). Concluíram que a nicotina inibe a proliferação e quimiotaxia dos fibroblastos periodontais *in vitro*.

MOLLER et al. (2002) estudaram o efeito da abstinência ao fumo na taxa de complicações pós-operatórias em cirurgias de quadril e joelho. Foram estudados 120 pacientes, divididos igualmente em grupos controle e abstinência, cujos tabagistas cessaram ou pelo menos reduziram pela metade o ato de fumar, em período de seis a oito semanas antes da cirurgia. Foram excluídos do estudo oito pacientes do grupo controle e quatro do grupo abstinência, por terem sua operação adiada ou suspensa. A taxa de complicações foi de 18% no grupo abstinência e de 52% no grupo controle. Os autores concluíram que a abstinência ao fumo antes da cirurgia, por período de seis a oito semanas, reduz a morbidade e a taxa de complicações após cirurgias no quadril e joelho.

SORENSEN, KARLSMARK e GOTTRUP (2003) avaliaram a taxa de infecção de feridas em tabagistas e não-tabagistas. No estudo de 78 indivíduos (48 fumantes e 30 não-fumantes) por período de 15 semanas, todos os tabagistas utilizaram 20 cigarros ao dia na primeira semana, sendo então separados em três grupos: continuaram fumando 20 cigarros ao dia, cessaram o tabagismo e receberam disco intradérmico de nicotina ou ainda receberam disco intradérmico de placebo. Ao término da 1.^a, 4.^a, 8.^a e 12.^a semanas, foram realizadas feridas por punção da pele na face lateral da região sacral dos fumantes e dos não-fumantes. Nos tabagistas a taxa de infecção foi de 12%, comparada com 2% dos não-tabagistas. Houve menor taxa de infecção de ferida naqueles que pararam de fumar e receberam implante de nicotina, quando comparados aos que continuaram a fumar após 4, 8 e 12 semanas. Entre os indivíduos que receberam implante de nicotina ou placebo não houve diferença significativa. Concluiu-se que os fumantes apresentam taxa de infecção de ferida maior do que os não-tabagistas e que período de abstinência de quatro semanas reduz a incidência de infecção nas feridas.

FANG e SVOBODA (2005) realizaram estudo *in vitro*, com o cultivo de fibroblastos humanos do tecido gengival saudável de dois pacientes. As células foram tratadas com diferentes doses de nicotina na concentração de 0, 0,01, 0,1 e 0,5 μMol , por período de 2 horas e então incubadas com o Fator Transformador de Crescimento β (*TGF- β 1*) nas concentrações de 0, 0,25, 0,5, e 1ng por ml com ou sem nicotina por período de 30 horas. Os fibroblastos foram estudados com imunistoquímica para pesquisa de miofibroblastos através do marcador actina α -sm. Concluiu-se que a nicotina inibe a diferenciação dos fibroblastos do tecido gengival humano em miofibroblastos *in vitro*, suportando a hipótese de que o retardo

na cicatrização dos fumantes pode ser devido à diminuição da contração da ferida ocasionada pelos miofibroblastos.

CHAN, WITHNEY e BUTLER (2006) avaliaram 163 pacientes consecutivamente submetidas à mamoplastia redutora bilateral por período de 26 meses, das quais 38,5% eram tabagistas. As pacientes fumantes foram orientadas a parar de fumar por período mínimo de quatro semanas previamente à cirurgia. Observou-se que as pacientes fumantes tiveram 55,4% de problemas na cicatrização e o grupo de não-fumantes 33,7%. Do total de pacientes, 75% admitiram não terem cessado o hábito de fumar no período prévio de quatro semanas à cirurgia. Para o grupo de pacientes tabagistas que cessou o tabagismo em período prévio à cirurgia de quatro semanas, o índice de complicações de cicatrização foi de 33,3%, para o grupo que parou de fumar por período inferior a quatro semanas o índice de complicações da cicatrização foi de 52,6% contra 67,7% de complicações na cicatrização para aquelas pacientes que admitiram não terem parado de fumar.

2.7.2 Estudos Experimentais

Em 1975, RICHARDSON et al. realizaram estudo para avaliar os efeitos da exposição do tabaco na microcirculação mesentérica. Para tanto, utilizaram ratos fêmeas *Sprague-Dawley*, divididos em dois grupos, o primeiro submetido à máquina produtora de fumaça do tabaco por período de dois meses e o segundo controle. Concluíram que o uso do tabaco pode levar à redução da microcirculação capilar mesentérica em ratos, com conseqüente diminuição do aporte de nutrientes às células intestinais.

MOSELY, FINSETH e GOODY (1978) estudaram dez coelhos que receberam nicotina pela via intraperitoneal, na dose de 2mg por kg de peso, duas vezes ao dia e por período de cinco dias prévios à operação e por 21 dias no pós-operatório. Foram realizadas lesões cutâneas padronizadas na orelha dos animais, analisando-se a cicatrização por meio da medição macroscópica do tecido cruento, em intervalos de dois dias, até o 21.º dia de evolução. Comparando-se ao grupo controle, que recebeu placebo, concluiu-se que a nicotina retardou a cicatrização no intervalo do 6.º ao 10.º dia. Sugeriu-se a hipótese de que este efeito deletério poderia ser causado por dano direto aos macrófagos e fibroblastos, por efeito vasoconstritor, com conseqüente decréscimo do aporte sangüíneo ou ainda por inibição da epitelização.

NOLAN et al. (1985) realizaram estudo com o uso de retalhos pediculados, tipo *Mc Farlane*, confeccionados no dorso de 344 ratos *Fischer* fêmeas, expostos à fumaça de cigarros por meio de máquina produtora de fumaça padronizada, pelo período de 21 dias antes e sete dias após a cirurgia. Observaram que a taxa de necrose dos retalhos foi de 78% nos animais expostos à fumaça dos cigarros, enquanto que no grupo controle, exposto ao ar ambiente a taxa foi de 56%.

FORREST, PANG e LINDSAY (1985) realizaram dois experimentos utilizando ratos e cobaias. No primeiro, foram estudados retalhos cutâneos padronizados tipo *Mc Farlane* em 80 ratos *Sprague-Dawley*. A nicotina foi aplicada por via subcutânea em concentrações de 2, 4, 8 ou 16mg por kg de peso ao dia, divididas em duas aplicações. A aplicação ocorreu por quatro semanas prévias à realização dos retalhos e uma semana após os procedimentos cirúrgicos. A análise foi feita 30 dias após a cirurgia e comparada com os animais do grupo controle.

Observou-se que o tamanho da área viável foi significativamente menor nos animais expostos à nicotina.

No segundo experimento, 12 cobaias *Yorkshire* foram divididos em dois grupos, sendo o grupo A tratado com injeções intramusculares de solução salina e o grupo B com injeções intramusculares de nicotina, na dose de 8mg por kg de peso ao dia, divididas em duas aplicações. A administração foi realizada por quatro semanas antes e uma semana após a confecção de retalhos cutâneos padronizados na região dorsal. O fluxo sanguíneo na ponta dos retalhos foi estudado com o auxílio de técnica radioativa em três animais do grupo A e três animais do grupo B, seis horas após o procedimento cirúrgico. No restante dos animais a análise foi semelhante ao primeiro exposto. Os autores concluíram que o fluxo sanguíneo na ponta dos retalhos era menor nas cobaias tratadas com nicotina, e a área viável dos retalhos era também menor, comparados ao grupo controle.

FORREST, PANG e LINDSAY (1987) administraram nicotina por via subcutânea, em ratos *Sprague-Dawley*. Em seu primeiro experimento, 80 animais foram divididos em cinco grupos de 16; quatro grupos receberam nicotina subcutânea nas doses de 1, 2, 4 e 8mg por kg de peso, respectivamente, e o grupo controle 0,2ml de solução salina, por quatro semanas. Foi realizado retalho cutâneo padrão tipo *Mc Farlane* no dorso dos animais e, a nicotina foi mantida no pós-operatório por mais uma semana. Os resultados demonstraram diminuição da área de retalho viável a partir da dose de 2mg por kg de peso, duas vezes ao dia. No segundo experimento, o mesmo procedimento foi adotado, porém a administração de nicotina foi iniciada somente duas semanas antes da cirurgia. Não foi encontrada diferença na área viável dos retalhos entre o grupo controle e os grupo que receberam nicotina. Concluíram os autores que os efeitos deletérios da nicotina são

tempo e dose dependentes, pois somente foram identificados em doses iguais ou superiores a 2mg por kg de peso, em duas doses diárias e com uso no período prévio a operação maior do que duas semanas.

ZIMMERMAN e MC GEACHIE (1987) utilizaram microscopia eletrônica para quantificar as injúrias ultra-estruturais do endotélio, decorrentes da exposição à nicotina. A droga foi administrada em 14 camundongos, na água de beber, em dose equivalente diária de 5mg por kg de peso, por cinco semanas, sendo então os resultados comparados com o grupo controle, composto por 12 animais não expostos a nicotina. O segmento vascular estudado foi composto de porções da aorta, desde o arco até a bifurcação terminal. O grupo exposto à nicotina apresentou maior vacuolização citoplasmática do endotélio, edema mitocondrial e edema subendotelial, o que caracterizou dano na camada endotelial.

FORREST, PANG e LINDSAY (1991) estudaram a administração de nicotina por uso prolongado. Utilizaram baixa dose da droga (0,6mg/kg de peso, via subcutânea, duas vezes ao dia), administrada 24 semanas antes da cirurgia, nos grupos A e B, cada grupo com 15 ratos. Um terceiro grupo controle, com 15 animais recebeu solução fisiológica a 0,9%. O procedimento consistiu de retalhos cutâneos padronizados no dorso dos animais do grupo controle e do grupo A. Nestes últimos, o uso da nicotina permaneceu por mais sete dias, quando então os animais foram mortos e foi realizada a avaliação pós-operatória. No grupo B, a nicotina foi interrompida após 24 semanas e a operação foi realizada duas semanas após. O grupo A apresentou diminuição da área viável do retalho, comparado ao grupo controle; já o grupo B não apresentou diferença, comparado ao controle. Os autores concluíram que a administração de nicotina por tempo prolongado foi deletéria na viabilidade de retalhos cutâneos em ratos, reversíveis após duas semanas da

interrupção da administração da droga. Os efeitos deletérios da administração a longo prazo foram similares aos encontrados quando a nicotina foi utilizada em altas doses por período curto de tempo (2mg/kg, 2 vezes ao dia, por 4 semanas).

BARBOSA et al. (1995) estudaram as alterações de peso e histológicas, dos recém-nascidos de 80 ratas gestantes *Wistar*, submetidas à desnutrição e ao estresse crônico de nicotina. As ratas gestantes foram divididas em dois grupos, 40 animais do grupo controle e 40 animais do grupo desnutrida (diminuição de 50% da ingesta alimentar). Cada grupo foi subdividido em subgrupos com 10 animais, entre estes um subgrupo de ratas gestantes recebeu nicotina, via subcutânea, na dose de 900µg/kg de peso ao dia, a partir da constatação da gravidez até o 21.º dia da gestação. Outro subgrupo de ratas gestantes recebeu nicotina na dose de 2.700µg/kg, do mesmo modo. Os subgrupos foram comparados com grupos de ratas gestantes controle, que receberam 0,15ml de solução fisiológica durante o mesmo período. As ratas gestantes desnutridas que receberam nicotina apresentaram menor peso ao final da gestação, a perda de peso foi proporcional à dose de nicotina recebida. Do mesmo modo, os filhotes nascidos de ratas desnutridas que receberam nicotina apresentaram menor peso corporal e tecidual (fígado e pulmões) comparados ao controle. Concluíram que a nicotina utilizada pela rata gestante desnutrida, diminui a ingesta de ração durante a gravidez, e que se utilizada em altas doses, assim como a desnutrição por restrição de ração, produz desnutrição materna, o mesmo ocorrendo no seu recém-nascido.

RIEBEL et al. (1995) realizaram estudo sobre a influência da nicotina na revascularização de enxertos ósseos em 24 coelhos *New Zealand*. Os fragmentos ósseos para os enxertos foram retirados da crista ílica dos animais, sendo implantados em defeito ósseo criado na porção distal do fêmur dos mesmos. Foram

implantadas, no subcutâneo dos animais, minibolsas de liberação lenta de nicotina, as quais liberaram nicotina por um período de duas semanas. Seis animais foram sacrificados uma semana, 12 animais após duas semanas e o restante quatro semanas após cessar a liberação da nicotina. A árvore vascular foi estudada com a injeção de silicone e o grau de revascularização do enxerto foi determinado por meio de análise computadorizada da imagem. Os resultados, comparados com animais do grupo controle, demonstraram que os coelhos avaliados na primeira e segunda semanas apresentaram diminuição de cerca de 50% no crescimento vascular, sendo que na quarta semana não foi encontrada diferença significativa. Os autores concluíram que a nicotina inibe a revascularização de enxertos ósseos em coelhos e que este efeito é reversível após quatro semanas de eliminação da droga.

MARITZ e DENNIS (1998) investigaram o efeito da exposição materna à nicotina durante a gravidez e lactação no desenvolvimento pulmonar dos filhotes. Ratas *Wistar* grávidas receberam nicotina via subcutânea, na dose de 1mg por kg de peso, desde o primeiro dia da gestação até o desmame dos filhotes no 21.º dia. Os tecidos pulmonares dos ratos neonatos foram coletados nos dias 14, 21, 35 e 42 após o nascimento e preparados para estudo morfométrico. Os resultados obtidos demonstraram diminuição na formação de alvéolos nos pulmões dos filhotes e diminuição do número de capilares no septo alveolar, em comparação aos grupos controle. Os autores concluíram que a exposição materna à nicotina tem efeito deletério no desenvolvimento da área de troca gasosa nos pulmões de seus respectivos filhotes até o 42.º dia após o nascimento.

VILLABLANCA (1998) realizou experimento com o objetivo de pesquisar o papel da nicotina na arteriogênese. Para tanto, utilizou culturas de células endoteliais provenientes de artérias pulmonares bovinas, incubando-as com nicotina,

acrescentando ou não hidroxauréia (inibidor da síntese de *DNA*), plasma humano pobre em plaquetas e fator de crescimento endotelial derivado de plaquetas. Os resultados demonstraram que a nicotina estimulou, de maneira significativa, a síntese de *DNA* e a multiplicação de células endoteliais *in vitro*, quando comparada a outras substâncias testadas.

SKINOVSKY (2000) realizou estudo sobre a influência da nicotina na cicatrização de anastomoses do intestino delgado de ratos. Utilizou 60 ratos *Wistar*, divididos em três subgrupos nicotina, que receberam a droga por via subcutânea, na dose de 2mg por kg de peso, duas vezes ao dia e três subgrupos controle, que receberam solução fisiológica a 0,9%. As administrações da nicotina e/ou solução fisiológica iniciaram-se 28 dias previamente à realização da anastomose no intestino delgado e continuaram por mais 7, 14 e 28 dias após a cirurgia, de acordo com o subgrupo. De acordo com avaliação tensiométrica e histológica, concluiu-se que a nicotina teve efeito deletério na cicatrização das anastomoses intestinais, provocando diminuição da proliferação dos fibroblastos no 7.º dia pós-operatório, menor quantidade de colágeno imaturo no 28.º dia e menor força de ruptura, também no 28.º dia após a realização dos procedimentos cirúrgicos.

HEESCHEN et al. (2001) realizaram estudo para determinar os efeitos da nicotina na angiogênese estimulada por isquemia. Após a ligadura unilateral da artéria femoral de 30 camundongos, divididos em cinco grupos iguais, que receberam nicotina intramuscular no membro isquêmico por três semanas nas doses de 0,0003, 0,003, 0,3 e 3,0µg/kg, comparados com grupo controle. No estudo histológico entre os grupos, observaram que a nicotina estimulou a angiogênese na concentração de 0,03µg/kg; entretanto, em doses maiores do que 3µg/kg, a droga

não aumentou a angiogênese, sendo observada citotoxicidade com evidência de edema intersticial.

JACOBI et al. (2002) propuseram que a nicotina acelera a angiogênese e a cicatrização em camundongos diabéticos através da via colinérgica endógena para angiogênese mediada por receptores nicotínicos acetilcolinérgicos. Estudaram retalhos cutâneos no dorso de 65 camundongos diabéticos, sendo estes animais divididos em grupos de cinco animais e tratados com nicotina intramuscular (10^{-8} mol/l), solução salina, solução agonista e antagonista dos receptores nicotínicos acetilcolinérgicos e *FGF*. Os autores concluíram que a nicotina acelera a cicatrização de feridas em ratos diabéticos, bem como seus efeitos na neovascularização foram semelhantes ao do *FGF*.

PINTO et al. (2002), em trabalho experimental estudaram os efeitos da nicotina no processo de reparo de alvéolos dentais em 80 ratos *Wistar*, divididos em quatro grupos iguais, sendo a metade controle. Os animais receberam, respectivamente, uma a duas doses subcutâneas diárias de hemissulfato de nicotina, iniciando-se quatro semanas antes da extração dentária e que continuou até a eutanásia dos ratos nos dias 3, 7, 15 e 28 dias após o procedimento, comparados ao grupo controle que receberam solução salina a 0,9%. Foi encontrada menor quantidade de fibroblastos e também de vasos neoformados no grupo que recebeu duas doses diárias de nicotina, em todos os intervalos de avaliação. Concluiu-se que a nicotina inibe a angiogênese na área de ossificação dos alvéolos dentais.

CHIBATA (2003) realizou estudo sobre a influência da nicotina no processo cicatricial da parede abdominal em ratos; utilizou 60 ratos *Wistar*, divididos em seis grupos, metade deles experimental e metade controle. Todos os grupos experimentais receberam nicotina subcutânea na dose de 2mg por kg de peso, duas

vezes ao dia, com início 28 dias antes do procedimento de laparotomia ao qual foram submetidos. A eutanásia dos animais ocorreu no 7.º, 14.º, e 28.º dias após a laparotomia, continuando a administração da droga até então. Concluiu-se que a nicotina provocou redução da força máxima no 14.º dia após a sutura da parede abdominal e redução significativa no número de vasos sanguíneos no 7.º dia após a realização do procedimento cirúrgico.

MEDEIROS et al. (2003) realizaram estudo randomizado para avaliar o efeito da nicotina na cicatrização da parede abdominal de ratos. Consistiu de 16 ratos *Wistar*, separados aleatoriamente em dois grupos iguais. No grupo A foi implantado disco de nicotina no subcutâneo da região dorsal (dose de 5mg/kg de peso ao dia), trocados em dias alternados. O grupo B (controle) foi implantado disco de celulose com o mesmo diâmetro e sem nicotina. A dose foi iniciada cinco dias antes do procedimento cirúrgico, que consistiu de laparotomia mediana de 5cm. Tubo de silicone multiperfurado foi implantado no subcutâneo a 1cm da lesão da parede abdominal. No 10.º dia de pós-operatório foi colhido 1ml de líquido seroso do tubo de silicone por punção percutânea para dosagem da pO_2 , e os animais receberam dose letal de anestésico. Foi estudado o segmento de parede abdominal com a ferida por meio de tensiometria e histopatologia. No grupo A, a pO_2 do líquido tecidual atingiu o valor de $17,75 \pm 3,4$ mmHg e no grupo B (controle) $49,75 \pm 6,4$ mmHg. A resistência à tensão apresentou valor de $728 \pm 161,75$ kgf no grupo A e 1241 ± 232 kgf no grupo B. A densidade média dos elementos histopatológicos foi de $105 \pm 17,1$ no grupo A e de $146,2 \pm 8,8$ no grupo B. Os autores concluíram após avaliação da pO_2 tecidual, tensiometria e histopatologia, que a nicotina subcutânea causa efeito deletério sobre a cicatrização de feridas da parede abdominal de ratos.

SKINOVSKY (2005) realizou estudo sobre a influência da nicotina na cicatrização de anastomoses do intestino delgado de ratos. Utilizou 60 ratos *Wistar*, divididos em três subgrupos nicotina, que receberam a droga por via subcutânea, na dose de 2mg por kg de peso, duas vezes ao dia e três subgrupos controle, que receberam solução fisiológica a 0,9%. As administrações da nicotina e/ou solução fisiológica iniciaram-se 28 dias previamente à realização da anastomose no intestino delgado e continuaram por mais 7, 14 e 28 dias após a cirurgia, conforme o subgrupo. De acordo com avaliação histológica, mediante imunistoquímica, concluiu-se que a nicotina teve efeito deletério na cicatrização das anastomoses intestinais, provocando menor proliferação dos miofibroblastos no 7.º dia de pós-operatório e no 28.º dia menor proliferação de vasos sanguíneos, na área da anastomose, quando comparado ao grupo controle.

3 MATERIAL E MÉTODO

3 MATERIAL E MÉTODO

Aplicaram-se, neste trabalho, as Normas para Apresentação de Documentos Científicos da Universidade Federal do Paraná (2002). Os procedimentos experimentais foram realizados no Centro de Pesquisas Cirúrgicas do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná.

A análise estatística inferencial foi realizada para a comparação do peso das ratas durante a gestação e lactação, e entre os filhotes, levando-se em conta os dados do peso na lactação, tração e anatomopatológico.

3.1 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Para a realização do presente experimento foram utilizados 90 ratos *Wistar* (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia*), adultos, com 90 dias de vida, sendo 45 ratos machos e 45 ratos fêmeas, originários do Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR) em Curitiba e cujos pesos variaram de 244 a 290g, média de 260g. Das 45 ratas selecionadas como possíveis candidatas para o estudo, 25 ratas foram selecionadas, aleatoriamente, para o grupo nicotina e as demais 20 ratas para o grupo controle. Foram acasaladas na proporção de 1:1, e do total de 45 ratas, 77,8% delas (35 ratas) engravidaram. Sendo 19 ratas pertencentes ao grupo nicotina (GN) e 16 ratas pertencentes ao grupo nicotina (GC).

As ratas de ambos os grupos e seus respectivos filhotes foram selecionados baseando-se no critério de pelo menos sete filhotes sobreviventes, por nutriz, ao final do período de lactação.

Foram selecionadas, de modo aleatório, quatro ratas pertencentes ao GN com 43 filhotes no total, e outras quatro ratas do grupo controle (GC), totalizando 44 filhotes. (Tabela 6).

3.2 AMBIENTE DE EXPERIMENTAÇÃO

Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno, com área de superfície de 0,12m² e capacidade para cinco animais, sendo mantidos em ciclo de 12 horas de claridade por 12 horas de escuridão e na temperatura ambiente constante de 24°C, recebendo ração balanceada padrão denominada Nuvilab CR1[®] fornecida pela Nuvital de Curitiba e água *ad libitum*. O período de adaptação foi de 48 horas.

As fêmeas, todas nulíparas, com peso médio de 260g, divididas de maneira aleatória em dois grupos; grupo nicotina (GN) com 25 ratos fêmeas e grupo controle (GC) com 20 animais, foram acasaladas na proporção de 1:1 por período de dois dias. Foram consideradas prenhas após o exame do intróito vaginal e coleta de material com pipeta da marca Biohit[®] com capacidade de 20 a 200µl para a verificação da presença de *plug* vaginal, ou seja, esperma cristalizado ao microscópio, marcando o primeiro dia de gestação.

3.3 PERÍODO DE PRENHEZ

Isoladas em gaiolas individuais, com área de 0,12m², foram identificadas em dois grupos conforme a solução a ser injetada a partir do 2.º dia de prenhez.

Os grupos, GN (grupo nicotina), contendo 19 animais, recebeu aplicação subcutânea de nicotina, e o GC (grupo controle), com 16 animais, recebeu aplicação de solução fisiológica a 0,9%.

3.3.1 Administração de Nicotina ou Solução Fisiológica Pré-Operatórias

Nos animais do GN foi administrada nicotina (*Nicotine di-tartrate salt*, Sigma, Saint Louis, Missouri, EUA), por via subcutânea, na dosagem de 2mg por kg de peso dia, dividida em duas doses de 1mg/kg de peso cada (12/12 horas), diluída em 0,3ml de solução fisiológica a 0,9%, ajustada para pH 7,4, durante todo o período gestacional e até 21 dias da amamentação dos filhotes.

Nos animais do GC foi aplicada solução fisiológica a 0,9%, no volume de 0,3ml, duas vezes ao dia (12/12 horas), por via subcutânea e sendo ajustada para pH 7,4. O período de administração foi o mesmo do grupo da nicotina.

As citadas soluções foram administradas na região dorsal do animal, utilizando-se agulhas 13 x 4,5mm. (Figura 1).

A dose de nicotina ou de solução fisiológica a 0,9% foi ajustada quando necessário até imediatamente após o parto, aos 21 dias e até o final do período de amamentação.

FIGURA 1 – ADMINISTRAÇÃO DA NICOTINA SUBCUTÂNEA NO DORSO DO ANIMAL



As ratas prenhas foram examinadas diariamente, pesadas semanalmente e imediatamente após o parto, aos 21 dias. Os recém-nascidos foram amamentados pelas respectivas mães. Foram registrados todos os dados dos animais de cada grupo relacionados ao peso, dosagem de nicotina ou solução fisiológica a 0,9% injetadas, dia do parto e número de filhotes nascidos vivos.

3.4 PERÍODO DE LACTAÇÃO

Durante a lactação todas as nutrizas foram alimentadas com dieta Nuvilab CR1[®] e água *ad libitum* e tiveram seu peso avaliado semanalmente. Em adição, os filhotes de cada nutriz foram individualmente identificados com abraçadeiras numeradas de nylon, posicionadas na região cervical (Insulok modelo T18R -

Hellermann Tyton, Jundiaí, São Paulo). Dados ocorridos durante a lactação relativos ao peso materno, número de filhotes sobreviventes e específicos de cada filhote foram anotados em protocolo específico.

3.5 PERÍODO DE DESMAME

Os filhotes foram desmamados no 21.º dia de vida. Do total de 87 filhotes selecionados, pertencentes aos dois grupos: grupo controle (GC), com 44 filhotes, produtos de mães submetidas à aplicação subcutânea de solução fisiológica a 0,9% durante a gestação e lactação e grupo nicotina (GN), com 43 filhotes obtidos de mães submetidas à aplicação de solução de nicotina durante a gestação e a lactação para serem submetidos à cirurgia imediatamente após o desmame.

3.6 CIRURGIA

Os animais foram submetidos à anestesia geral inalatória com éter sulfúrico (Éter, Farmácia Magistral, Curitiba, Paraná) puro sob campânula, sem período prévio de jejum. A dose anestésica aplicada foi considerada adequada mediante observação da amplitude e frequência dos movimentos respiratórios do animal.

Após a anestesia, foram anotados na ficha de protocolo o número de identificação da mãe e do filhote, grupo e subgrupo de cada animal e data da cirurgia. Após a tricotomia abdominal, o animal foi colocado em decúbito dorsal com os membros em extensão fixados à mesa cirúrgica, bem como a cauda. Efetuou-se, então, a anti-sepsia tóraco-abdominal ampla com solução de polivinilpirrolidona-iodo a 10% e delimitação do abdômen com campos esterilizados. Demarcação prévia da

pele, com caneta adequada da marca Codman[®], foi realizada a cada dez mm, iniciando-se no bordo direito da incisão a fim de manter a sutura uniforme (figura 2), conforme técnica demonstrada por SEID et al. (1995).

A técnica cirúrgica constou, em todos os grupos, de incisão transversa supra-umbilical envolvendo todos os planos da parede abdominal, com 30mm de extensão, iniciando-se à direita e cruzando a linha média (figura 3).

A diérese dos planos cuticular, aponeurótico, muscular e peritonal iniciou-se com incisão de cinco mm a bisturi, realizada na borda lateral da laparotomia transversa. Procedeu-se, então, à ampliação da incisão com o uso de tesoura de íris no mesmo sentido da incisão da pele, totalizando abertura de 30mm em todos os planos da parede abdominal (figura 3).

Sem o fechamento peritonal, foi realizada sutura contínua não-ancorada, em bloco, interessando a aponeurose e musculatura, utilizando-se fio multifilamentar de poliglactina 4-0 (figura 4). Em pele, sutura subcuticular contínua não-ancorada com fio multifilamentar de poliglactina 7-0. A ferida cirúrgica foi mantida sem curativo (figura 5).

FIGURA 2 – DEMARCAÇÃO DA INCISÃO TRANSVERSA DE PELE (mm)



FIGURA 3 – DIÉRESE DO PLANO MUSCULAR, APONEURÓTICO E PERITONIAL



FIGURA 4 - SUTURA DO PLANO MÚSCULO-APONEURÓTICO DA INCISÃO



FIGURA 5 – FECHAMENTO CUTICULAR DA INCISÃO TRANSVERSA

3.7 PÓS-OPERATÓRIO

No pós-operatório imediato, foi instituído jejum de 30 minutos e manutenção dos animais em gaiolas separadas. Após o período de recuperação anestésica, todos os animais foram mantidos em gaiolas com área de superfície de 0,12m² e capacidade para cinco animais, recebendo água e ração Nuvilab CR1[®] *ad libitum*.

A avaliação diária dos animais constou da observação do aspecto da ferida operatória quanto a sangramento, infecção, deiscência de pele e/ou evisceração.

3.8 MORTE DOS ANIMAIS

Os grupos C e N foram divididos aleatoriamente em 4 subgrupos, contendo 15 animais cada, segundo o procedimento a ser realizado (figura 6):

SUBGRUPO 7 - animais mortos no 7.º dia de pós-operatório, sendo dividido em C7 e N7, segundo a solução aplicada nas mães durante a gestação e amamentação.

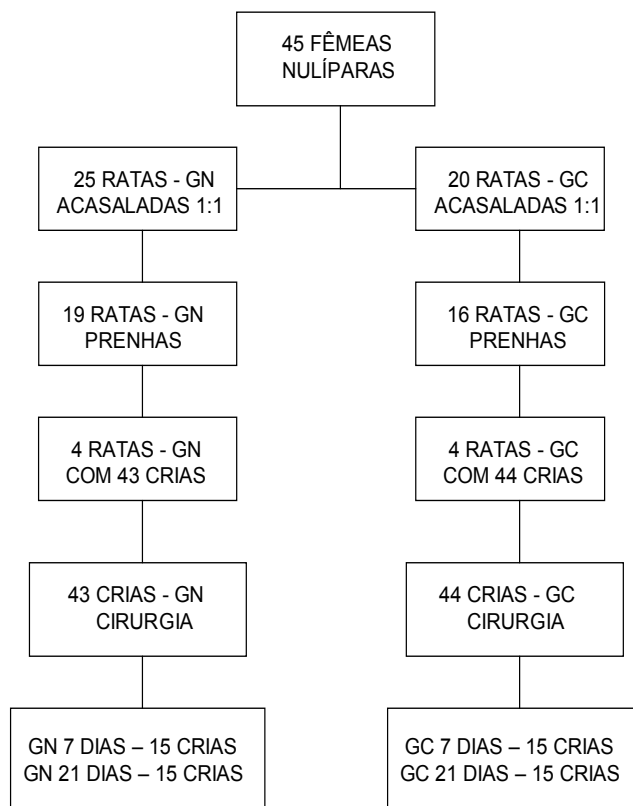
SUBGRUPO 21 - animais mortos no 21.º dia de pós-operatório, sendo dividido em C21 e N21, segundo a solução aplicada nas mães durante a gestação e amamentação.

Após o sacrifício com éter sulfúrico puro sob campânula, os animais foram avaliados quanto à presença de alterações na cicatriz cirúrgica, em particular a presença de infecção e/ou deiscência de sutura.

3.9 PREPARO DOS FRAGMENTOS PARA ESTUDO

Removeu-se a parede abdominal em bloco e a cicatriz cirúrgica foi dividida em dois fragmentos, sendo um maior, contendo 25mm de comprimento da cicatriz e 30mm de largura, do qual se retirou a pele e o tecido celular subcutâneo, mantendo-se o fio de sutura da aponeurose e musculatura, encaminhado para estudo de resistência à tração. Fragmentos menores, contendo a cicatriz com 5mm de comprimento e 30mm de largura foram encaminhados completos para histologia (figura 7).

FIGURA 6 – ORGANOGRAMA DA OBTENÇÃO DA AMOSTRA



3.10 ESTUDO DA RESISTÊNCIA À TRAÇÃO

De cada fragmento maior da parede abdominal foi preparado um corpo de prova músculo-aponeurótico com recortes laterais na região da linha de sutura, segundo técnica descrita por NASH (1961) e KNOLMAYER et al. (1996). A região da linha de sutura foi medida em mm para o cálculo da área de secção.

FIGURA 7 – RETALHO PARA ESTUDO DA TRAÇÃO E ANATOMOPATOLÓGICO



Os corpos de prova foram acondicionados em geladeira térmica e encaminhados de imediato para a análise a fresco, no sentido transverso à linha de sutura, em máquina de tração computadorizada (figuras 8 e 9), marca EMIC (Equipamentos e Sistemas de Ensaio, São José dos Pinhais, Paraná) modelo DL – 500 MF, com garras autotravantes e capacidade para 500kgf, no Centro de Pesquisas Cirúrgicas do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná.

A célula de carga utilizada foi para 10kg e a sensibilidade de 50 gramas. A velocidade da tração utilizada foi de 100.000 mm/min. A temperatura ambiente foi mantida constante em 24°C, com umidade relativa do ar em 50%.

Os parâmetros avaliados foram:

a) Força máxima, definida como a força máxima suportada pelo tecido antes do início de sua ruptura,

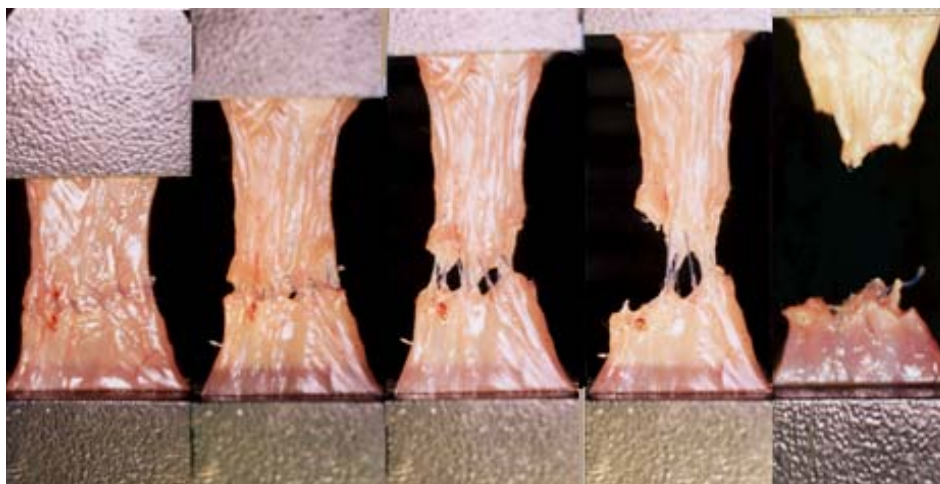
b) Força de ruptura, que é a força requerida para romper completamente um tecido ou parede sem considerar suas dimensões e

c) Tensão, que é medida em termos de quantidade de força suportada por unidade de área de secção. É dependente das dimensões do tecido e permite comparação mais adequada entre corpos de prova retirados de espécimes diferentes. Pode ser dada em libras/polegada², quilogramas/m², quilogramas/mm².

FIGURA 8 – MÁQUINA DE TRAÇÃO UTILIZADA NO EXPERIMENTO

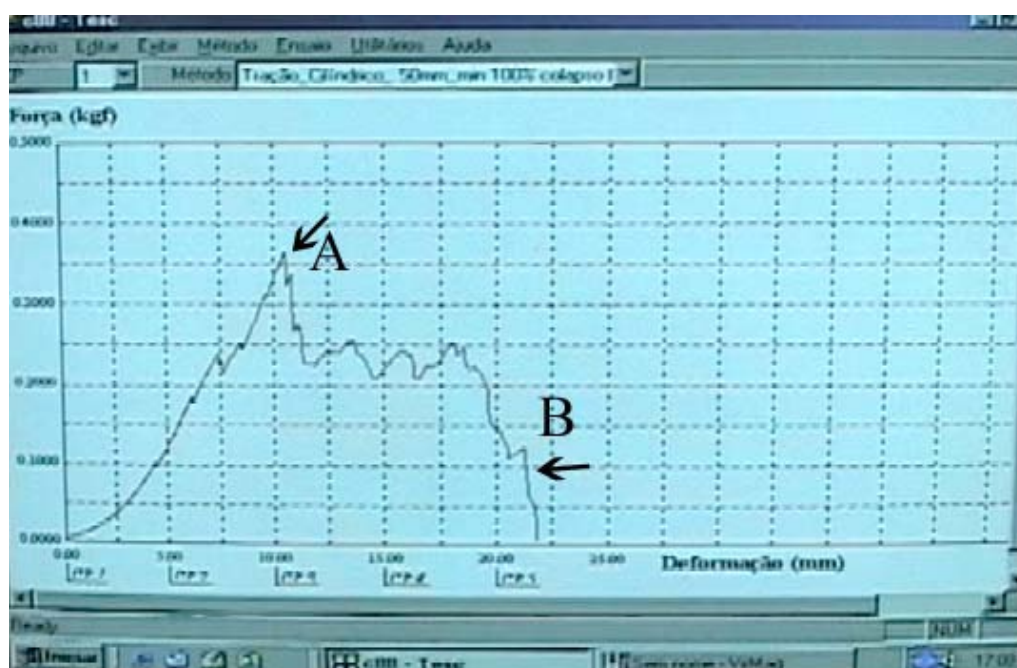


FIGURA 9 - ESTUDO DE TRAÇÃO EM CORPOS DE PROVA DOS GRUPOS C E N



Na figura 10 apresenta-se exemplo de estudo tensiométrico computadorizado do corpo de prova, sendo que a seta A representa: a força máxima suportada antes do início da ruptura e a seta B, representa: a força requerida para romper o corpo de prova por completo.

FIGURA 10 – EXEMPLO DE ESTUDO TENSIMÉTRICO COMPUTADORIZADO DO CORPO DE PROVA, EIXO X – DISTÂNCIA (MM) E EIXO Y – FORÇA (KGF) SETA: (A) FORÇA MÁXIMA E (B) FORÇA DE RUPTURA



Seta A: Força Máxima - força suportada pelo corpo de prova antes do início da ruptura.

Seta B: Força de Ruptura – força requerida para romper o corpo de prova por completo.

3.11 ESTUDO ANATOMOPATOLÓGICO

3.11.1 Processamento Histológico

Os fragmentos menores, contendo a cicatriz com 5mm de comprimento e 30mm de largura, foram imersos em formol tamponado a 10% e preparados em bloco de parafina.

Os cortes de 4 μ m foram preparados com coloração picrossírius (*picrossirius-red F3BA*) para identificação de colágenos maduro e imaturo por técnica de microscopia por luz polarizada e análise morfométrica computadorizada, a qual quantifica a percentagem de deposição de cada tipo específico de colágeno. Nesta técnica analisaram-se os cortes histológicos através de microscópio óptico da marca Zeiss[®], em aumento de 200 vezes, em três campos distintos aleatoriamente, utilizando-se fonte de luz polarizada. As imagens foram captadas por câmera Sony[®] CCD 101 (Sony[®], Tóquio, Japão), transmitidas a um monitor colorido Trinitron Sony[®], congeladas e digitalizadas através de placas Oculus TCX. Finalmente foi realizada a análise das imagens através do aplicativo Optimas 6.0 para Windows em computador da linha Pentium[®]. A calibração do sistema foi baseada na densidade óptica dos pontos de resolução (*pixels*) que formam as imagens, selecionando-se o valor limite de melhor resolução. No sistema *RGB* (*Red, Green, Blue*) foram considerados valores para preto (fundo), para tons de vermelho (colágeno tipo I) e para tons de verde (colágeno tipo III). Nos cortes histológicos analisados,

determinou-se o campo microscópico sobre a linha de sutura, em três campos distintos, obtendo-se então as médias aritméticas. Calculou-se a percentagem da área ocupada pelas fibras que continham colágeno dos tipos I e III em relação à área total examinada, pelo software *Image Pro Plus* (Media Cybernetics, Califórnia, EUA).

A coloração com hematoxilina-eosina foi realizada para avaliação geral e identificação da linha de sutura propriamente dita, a qual orientou a coloração imunoistoquímica. (Figura 11).

3.11.2 Coloração Imunoistoquímica

Para o estudo imunoistoquímico utilizou-se a técnica descrita por HSU (1981). Foram utilizadas lâminas silanizadas para se evitar o descolamento dos cortes histológicos durante a coloração. Os cortes foram submetidos à desparinização e hidratação, sendo então imersos em tampão citrato, pH 6,0, para recuperação antigênica em banho-maria a 98°C; em seguida foram imersos em tampão fosfato e submetidos a bloqueio da peroxidase endógena em metanol com peróxido de hidrogênio a 3%. Na seqüência, aplicaram-se os anticorpos primários antifator VIII na diluição de 1:200 (Policlonal, Código 0082, DakoCytomation – Carpinteria, Califórnia, EUA) e anti- α -actina muscular lisa (Monoclonal, Código M0851, Dako Cytomation, Carpinteria, Califórnia, EUA), em lâminas separadas, incubando-as *overnight* à temperatura de 4°C. Após banho em tampão fosfato, seguiu-se à aplicação de anticorpo biotilado por 30 minutos, à temperatura ambiente. Após novo banho em tampão fosfato, seguiu-se à aplicação do complexo

estreptavidina – peroxidase por 30 minutos, ainda à temperatura ambiente. Foi então realizado mais um banho em tampão fosfato e revelação da reação imune com diaminobenzina, seguido de contracoloração com hematoxilina. Na seqüência, os cortes foram desidratados e montados com bálsamo e lamínulas de vidro.

A positividade da coloração imunoistoquímica foi identificada nas áreas de pigmentação acastanhada. Controles positivos e negativos foram utilizados.

As lâminas foram analisadas, continham apenas um código, sem a identificação dos grupos dos animais.

3.12 AVALIAÇÃO DO COLÁGENO, MIOFIBROBLASTOS E VASOS SANGÜÍNEOS

3.12.1 Morfometria do Colágeno

Os cortes histológicos foram estudados em microscópio da marca Olympus[®] sob fonte de luz polarizada, com aumento de 200 vezes em três campos aleatórios na área de cicatrização e foram captadas por câmara Sony[®] CCD Íris, sendo enviadas ao monitor Sony[®] Trinitron colorido, digitalizadas e analisadas pelo aplicativo *Image Pro Plus* (Media Cybernetics, Califórnia, EUA) em computador do tipo Pentium[®], que calcula a percentagem de deposição do tipo específico de colágeno. A análise foi realizada no Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.

A calibragem do sistema foi baseada na densidade óptica dos pontos de resolução (*pixels*) que formam a imagem. Todas as lâminas foram avaliadas sob as

mesmas condições de regulação, dentro dos parâmetros exigidos pelo referido aplicativo.

A percentagem de área ocupada pelo colágeno tipo I – maduro (fibras espessas e fortemente birrefringentes com coloração avermelhada) e pelo colágeno tipo III – imaturo (fibras finas e dispersas, fracamente birrefringentes com coloração esverdeada) foi calculada para cada animal (figura 12), considerando-se que esta percentagem era proporcional à quantidade de cada tipo de fibra presente nos cortes histológicos (JUNQUEIRA, COSSERMELLI e BRENTANI, 1978).

Com base nas percentagens de colágeno tipo I e tipo III, COELHO (2003) criou o índice da maturação do Colágeno - IMaC definido como a razão entre essas percentagens. Este índice varia entre zero (percentagem de colágeno tipo I=0 e percentagem de colágeno tipo III=100) e mais infinito (percentagem de colágeno tipo I=100 e percentagem de colágeno tipo III=0). Valores maiores do que um indicam que a percentagem de colágeno tipo I é maior do que a percentagem de colágeno tipo III, como pode se verificar na equação 1.

EQUAÇÃO 1 – ÍNDICE DA MATURAÇÃO DO COLÁGENO (IMaC)

$$\text{IMaC} = \frac{\% \text{ de Colágeno Tipo I - Maduro}}{\% \text{ de Colágeno Tipo III - Imaturo}}$$

FIGURA 11 – EXEMPLO DE FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DE PAREDE ABDOMINAL DE RATO CORADO PELO PICROSÍRIUS (200X)

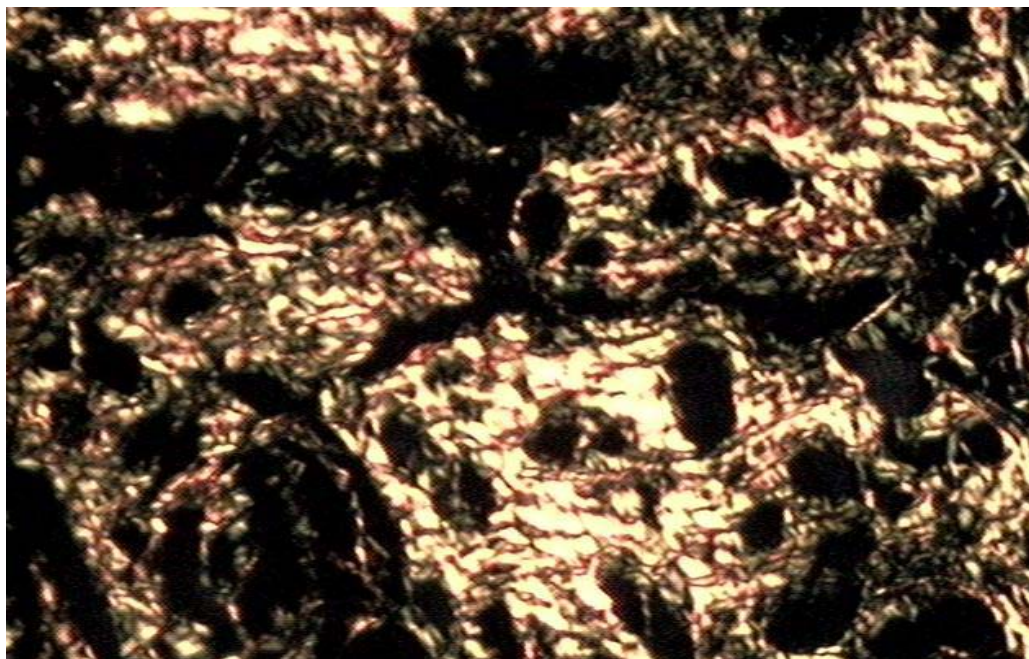


FIGURA 12 – EXEMPLO DE FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DE PAREDE ABDOMINAL DE RATO CORADO PELO PICROSÍRIUS (200X), IDENTIFICANDO COLÁGENO TIPO I NA COLORAÇÃO AVERMELHADA E COLÁGENO TIPO III NA COLORAÇÃO ESVERDEADA

The screenshot displays the Image-Pro Plus software interface. The main window shows a histological image with numerous small objects highlighted in red and green. Two windows are open over the image:

- Count / Size**: A window showing intensity range selection options. The 'Manual' option is selected. It displays a total count of 6315 and an in-range count of 542.
- Range Statistics**: A window displaying a table of object statistics.

Range	Objects	% Objects	% Area
Red	241	44.464943	46.660370
Green	301	55.535057	53.339630

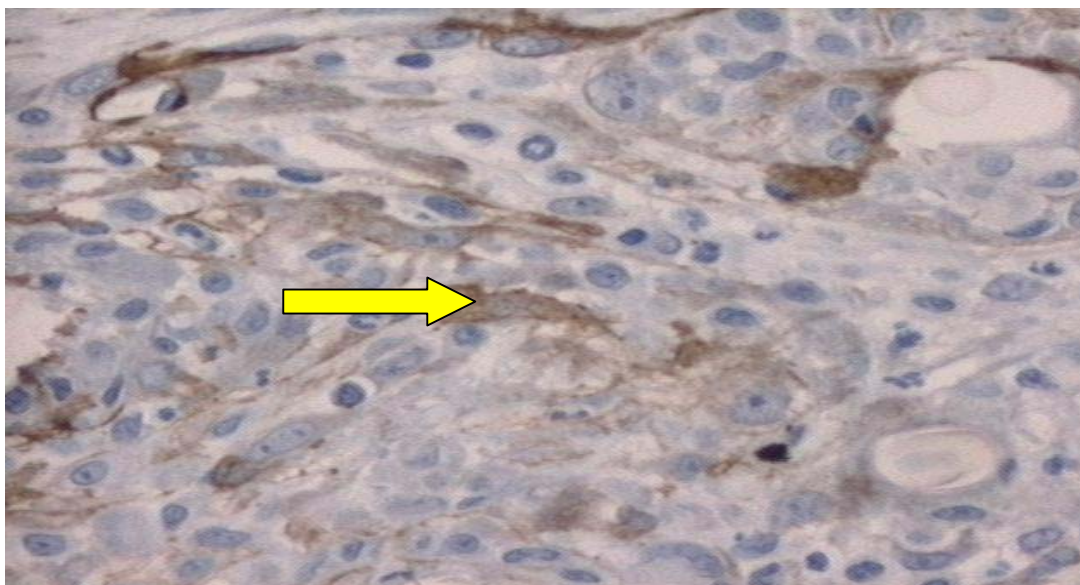
At the bottom of the software interface, there is a 'Pro Series Capture 128' window with 'Preview', 'Snap', 'Setup', 'Config', and 'Options' buttons. It also shows 'Brightness' set to 31 and 'Contrast' set to 45. The status bar at the very bottom indicates 'RGB 24(910,080 bytes), Zoom:100%', '508, 3 | 123 69 58', 'W,H: 632,480', 'µm (objetiva10x)', and '1GB'.

3.12.2 Número de Miofibroblastos

A identificação dos miofibroblastos foi realizada contando-se as células coradas positivamente pela coloração imunohistoquímica com anticorpo monoclonal anti- α -actina muscular lisa em campo de grande aumento (objetiva de 40X), em três campos distintos aleatoriamente na linha de sutura da parede abdominal, correspondendo a uma área de $17.726\mu\text{m}^2$, expressas em médias aritméticas. As imagens digitalizadas foram capturadas e analisadas pelo programa *Image Pro Plus* (Media Cybernetics, Califórnia, EUA), para Windows, por meio da ferramenta *Measures*, calibrada previamente para objetiva de 40 vezes. Utilizou-se um sistema constituído por microscópio óptico Olympus[®] BX50 (Olympus[®], Tóquio, Japão), acoplado com câmera de vídeo Sony[®] DXC-970MD (Sony[®], Tóquio, Japão), conectado a computador da linha Pentium[®] e monitor colorido de alta resolução da marca Samsung[®] (Samsung[®], Coreia do Sul).

A contagem foi realizada analisando-se as imagens individualmente, marcando-se os miofibroblastos por meio da ferramenta *Manual Tag* (figura 13).

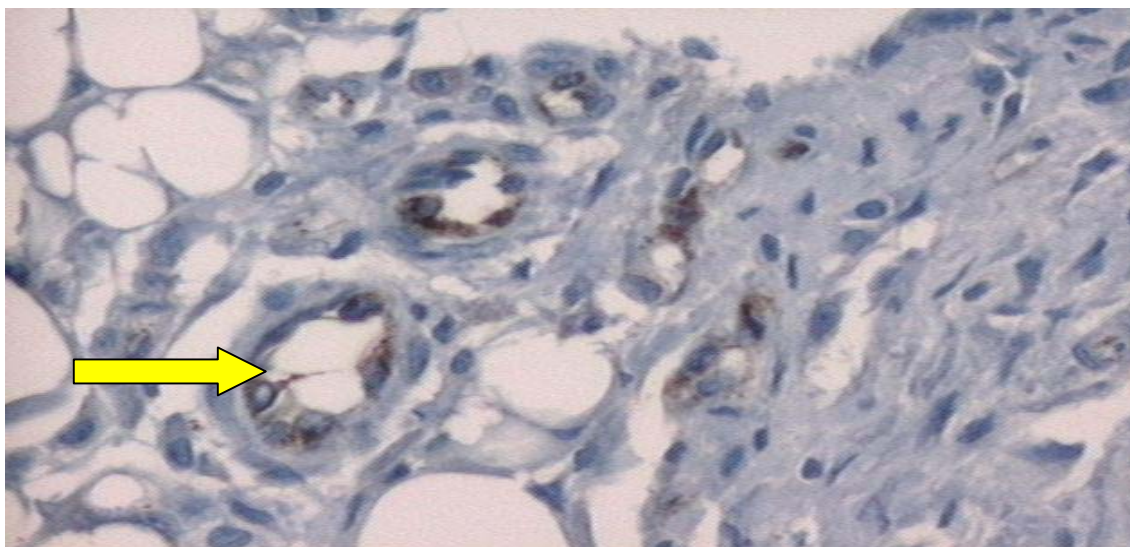
FIGURA 13 – EXEMPLO DE FOTOMICROGRAFIA DOS MIOFIBROBLASTOS CORADOS EM MARROM PELA TÉCNICA AVIDINA-ESTREPTAVIDINA-PEROXIDASE-DIAMINO-BENZIDINA UTILIZANDO-SE ANTICORPO ANTI- α -ACTINA MUSCULAR LISA, OS MIOFIBROBLASTOS APRESENTAM FORMATO POLIGONAL, COM PROJEÇÕES CITOPLASMÁTICAS E NÚCLEOS VESICULOSOS, MAGNIFICAÇÃO ORIGINAL 400X (SETA)



3.12.3 Número de Vasos Sangüíneos

A identificação dos vasos sangüíneos foi efetuada contando-se o número de estruturas circulares coradas positivamente pelo anticorpo policlonal antifator VIII, que revela as células endoteliais da camada íntima dos vasos. A contagem foi feita na área da sutura da parede abdominal em aumento de 40 vezes, em três campos distintos aleatoriamente, em área de $17.726\mu\text{m}^2$, expressas em médias aritméticas. Imagens de toda esta região foram capturadas por sistema acoplado ao microscópio óptico Zeiss[®] Axioscop (Carl Zeiss[®], Alemanha), e constituído por uma câmara de vídeo Sony[®] DXC-970MD (Sony[®], Tóquio, Japão). (Figura 14).

FIGURA 14 – FOTOMICROGRAFIA DOS VASOS SANGÜÍNEOS COM A ÍNTIMA CORADA EM MARROM REVELANDO POSITIVIDADE PARA ANTIFATOR VIII, PELA TÉCNICA DA BIOTINA-ESTREPTAVIDINA-PEROXIDASE-DIABINOBENZIDINA, ANTIFATOR VIII, MAGNIFICAÇÃO ORIGINAL 100X (SETA)



3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O estudo estatístico foi realizado em oito ratas, quatro ratas do grupo controle e outras quatro ratas do grupo nicotina, e em 60 filhotes selecionados aleatoriamente dos grupos controle e nicotina, 30 filhotes pertencentes ao grupo controle (GC), subdivididos em grupos C7 (contendo 15 animais sacrificados no 7.º dia de pós-operatório e grupo C21 contendo 15 animais sacrificados no 21.º dia de pós-operatório).

Outros 30 filhotes pertencentes ao grupo nicotina (GN), subdivididos em grupos N7 (contendo 15 animais mortos no sétimo e N21 com 15 animais mortos no vigésimo primeiro dia de pós-operatório).

A análise de mães foi efetuada através do teste *t de Student* para comparar os desempenhos médios dos dois grupos C e N (Testes de Hipóteses para duas médias $H_0: \mu_N = \mu_C$ X $H_a: \mu_N \neq \mu_C$) com relação às características medidas nas mães nos períodos de gestação e lactação, assim como o número de filhotes nascidos em cada grupo.

Em relação às crias, a análise foi efetuada através do teste de *Fisher-Snedecor*, comparou-se a variação do peso na lactação, e os corpos de prova foram comparados quanto à tensão, força de ruptura e a força máxima. A análise anatomopatológica cotejou os dados de morfometria do colágeno, número de miofibroblastos e número de vasos sanguíneos. Considerando-se a estrutura hierárquica dos dados, seleção de mães e depois seleção de filhotes em cada mãe escolhida, com medidas ao longo do tempo (dados longitudinais) a modelagem mais apropriada foi a de Modelos Lineares Hierárquicos Condicionais (ANOVA), ao nível de significância de 5%.

Nestes modelos, independentemente do número de ratos utilizados, quem determina o número de repetições para o teste de médias é o número de mães (LITTEL et al., 1996).

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISE DAS MÃES

4.1.1 Peso das Mães na Gestação

A tabela 1 apresenta a evolução da média do peso corporal das quatro ratas do grupo controle (GC) e de outras quatro ratas do grupo nicotina (GN) durante a gestação. A média do peso inicial das ratas gestantes do GC foi semelhante à média do peso inicial das ratas do GN ($259,50 \pm 21,46\text{g}$ vs. $265,50 \pm 8,70\text{g}$, $p=0,6228$).

Os grupos completaram o período gestacional com média de peso final similar ($376,50 \pm 20,87\text{g}$ vs. $368,00 \pm 10,42\text{g}$, $p=0,4937$).

A variação média dos pesos das ratas na gestação e lactação está expressa na tabela 1.

TABELA 1 – MÉDIAS DE PESO DAS RATAS DOS GRUPOS C E N NA GESTAÇÃO (g)

VARIAÇÃO DO PESO			MEDIDA (g)	
	GRUPO	N	Média ± EP	Valor de p
Semana 1	C	4	$26,00 \pm 4,29$	0,5094
(Dia 8 – Dia 2)	N	4	$21,75 \pm 4,29$	
Semana 2	C	4	$66,75 \pm 4,35$	0,3668
(Dia 14 – Dia 8)	N	4	$60,75 \pm 4,35$	
Semana 3	C	4	$24,25 \pm 2,51$	0,2757
(Dia 20 – Dia 14)	N	4	$20,00 \pm 2,51$	
Total	C	4	$117,00 \pm 6,46$	0,1638
(Dia 20 – Dia 2)	N	4	$102,50 \pm 6,46$	

NOTA: EP= Erro padrão

C: Grupo Controle, N: Grupo Nicotina

Utilizou-se o teste de *t de Student*.

4.1.2 Peso das Mães na Lactação

Na lactação, as ratas do GN apresentaram média de peso final similar às ratas do GC ($310,50 \pm 18,57\text{g}$ vs. $317,50 \pm 26,74\text{g}$, $p=0,6822$).

Na comparação da média do ganho de peso, também houve semelhança entre os grupos ($33,50 \pm 17,29\text{g}$ vs. $38,50 \pm 15,15\text{g}$, $p=0,6788$). (Tabela 2).

TABELA 2 – MÉDIAS DE GANHO DE PESO DAS RATAS DOS GRUPOS C E N NA LACTAÇÃO (g)

VARIAÇÃO DO PESO		N	MEDIDA (g)	
GRUPO			Média \pm EP	Valor de p
Semana 1	C	4	$16,50 \pm 7,99$	0,4328
(Dia 7 – Dia 0)	N	4	$7,00 \pm 7,99$	
Semana 2	C	4	$17,25 \pm 5,22$	0,7955
(Dia 14 – Dia 7)	N	4	$15,25 \pm 5,22$	
Semana 3	C	4	$4,75 \pm 2,80$	0,1512
(Dia 21 – Dia 14)	N	4	$11,25 \pm 2,80$	
Total	C	4	$38,50 \pm 8,13$	0,6788
(Dia 21 – Dia 0)	N	4	$33,50 \pm 8,13$	

NOTA: EP= Erro padrão

C: Grupo Controle, N: Grupo Nicotina

Utilizou-se o teste de *t de Student*.

4.2 ANÁLISE DOS FILHOTES NA LACTAÇÃO

4.2.1 Peso dos Filhotes na Lactação

Os resultados do peso, no período de lactação, dos 30 filhotes do grupo controle (GC) e de outros 30 filhotes do grupo nicotina (GN), estão resumidos na tabela 3 e os valores individuais apresentados no apêndice.

A comparação da média de peso entre GC e GN foi: ao nascimento ($p=0,4544$), aos 7 dias de vida ($p=0,3447$), aos 14 dias ($p=0,6056$), no desmame ($p=0,4264$) e no ganho de peso do período total da lactação ($0,4475$). (Tabela 3).

TABELA 3 – MÉDIAS DE PESO DOS FILHOTES - GRUPOS C E N NA LACTAÇÃO (g)

VARIAÇÃO DO PESO	GRUPO	N	MEDIDA (g)	
			Média ± EP	Valor de p
Peso ao nascimento	C	30	7,27 ± 0,42	0,4544
	N	30	6,80 ± 0,42	
Peso aos 7 dias	C	30	15,33 ± 0,42	0,3447
	N	30	13,49 ± 0,42	
Peso aos 14 dias	C	30	26,82 ± 1,65	0,6056
	N	30	25,55 ± 1,65	
Peso no desmame	C	30	39,51 ± 3,04	0,4264
	N	30	35,84 ± 3,04	
Ganho de peso (desmame – nascimento)	C	30	32,24 ± 2,78	0,4475
	N	30	29,04 ± 2,78	

NOTA: EP= Erro padrão

C: Grupo Controle, N: Grupo Nicotina

Utilizou-se o teste de *Fisher-Snedecor*.

Nas tabelas e gráficos a seguir estão apresentados os resultados obtidos com a aplicação dos modelos hierárquicos da análise dos filhotes no 7.º e 21.º dias de pós-operatório dos subgrupos C7, N7, C21 e N21.

No presente estudo não houve caso de infecção e/ou deiscência da ferida operatória.

4.3 VARIÁVEIS DE FORÇA E TENSÃO

Os resultados obtidos nos estudos de tração estão sumarizados na tabela 4. Cada variável será apresentada separadamente.

TABELA 4 – MÉDIAS DAS VARIÁVEIS DE FORÇA (Kgf) E TENSÃO (Kgf/mm²) DOS SUBGRUPOS C7,N7, C21 E N21

VARIÁVEL	GRUPO	N	MEDIDA	
			Média ± EP	Valor de p
Força Máxima (Kgf)	C7	15	0,568 ± 0,011	0,0060
	N7	15	0,391 ± 0,011	
	C21	15	1,111 ± 0,015	0,0952
	N21	15	1,051 ± 0,015	
Força de Ruptura (Kgf)	C7	15	0,577 ± 0,009	0,0047
	N7	15	0,393 ± 0,009	
	C21	15	0,581 ± 0,003	0,0007
	N21	15	0,421 ± 0,003	
Tensão (Kgf/mm ²)	C7	15	0,036 ± 0,001	0,0493
	N7	15	0,029 ± 0,001	
	C21	15	0,066 ± 0,007	0,0056
	N21	15	0,053 ± 0,007	

NOTA: EP= Erro padrão

C7 e C21= Controle 7 e 21 dias, N7 e N21= Nicotina 7 e 21 dias

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

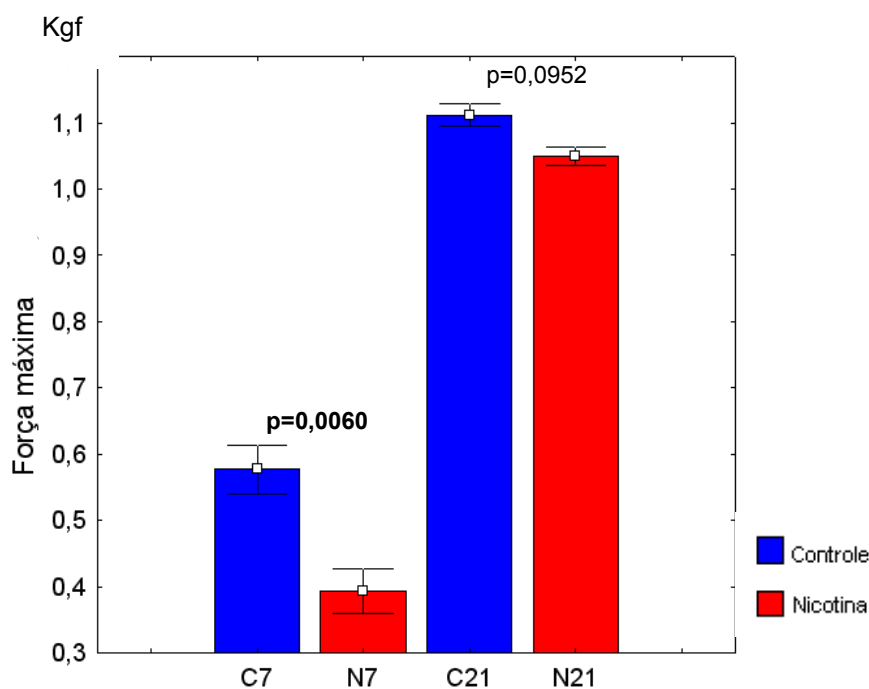
Utilizou-se o teste de *Fisher-Snedecor*.

4.3.1 Força Máxima

Para os animais sacrificados no 7.º dia de pós-operatório, a força máxima média foi menor para o GN comparado com o GC, diferença estatisticamente significativa, (0,391 ± 0,032Kgf vs. 0,586 ± 0,041Kgf, p=0,0060). (Tabela 4 e Gráfico 1).

A média da força máxima dos animais sacrificados no 21.º dia de pós-operatório foi similar para o GN comparado com o GC (1,051 ± 0,013Kgf vs. 1,111 ± 0,022Kgf, p=0,0952). (Tabela 4 e Gráfico 1).

GRÁFICO 1 – MÉDIAS \pm DP DA FORÇA MÁXIMA DOS SUBGRUPOS C7, N7, C21 E N21 (Kgf)



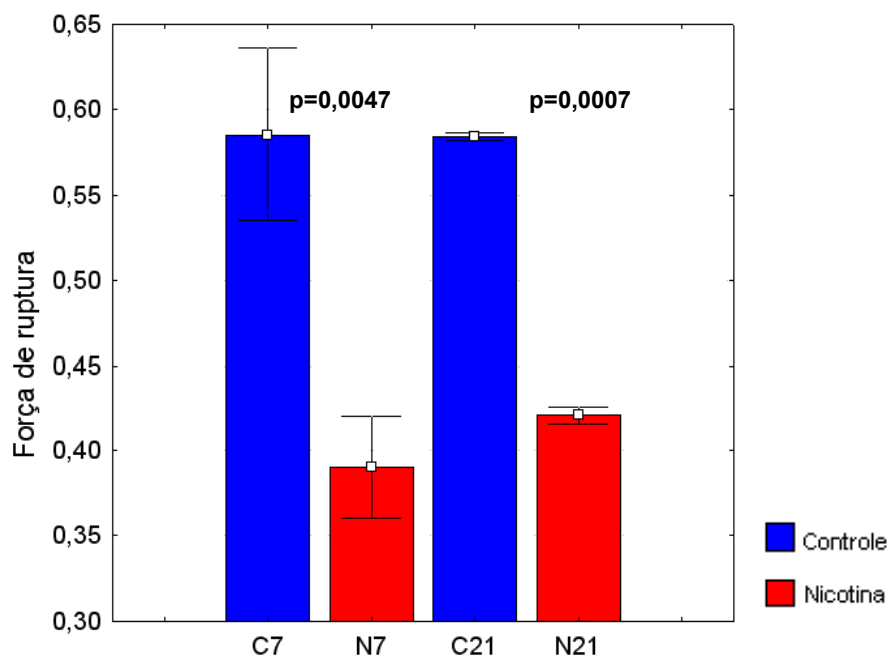
C7 e C21: Grupo Controle 7 e 21 dias
N7 e N21: Grupo Nicotina 7 e 21 dias

4.3.2 Força de Ruptura

Para o subgrupo sacrificado no 7.º dia de pós-operatório, a força de ruptura média foi menor para o GN em relação ao GC, diferença estatisticamente significativa, ($0,393 \pm 0,032\text{kgf}$ vs. $0,577 \pm 0,051\text{kgf}$, $p=0,0047$). (Tabela 4 e Gráfico 2).

Para o subgrupo sacrificado no 21.º dia de pós-operatório, a força de ruptura média foi menor para o GN em relação ao GC, diferença estatisticamente significativa, ($0,421 \pm 0,004\text{kgf}$ vs. $0,581 \pm 0,002\text{kgf}$, $p=0,0007$). (Tabela 4 e Gráfico 2).

GRÁFICO 2 – MÉDIAS \pm DP DA FORÇA DE RUPTURA DOS SUBGRUPOS C7, N7, C21 E N21 (Kgf)



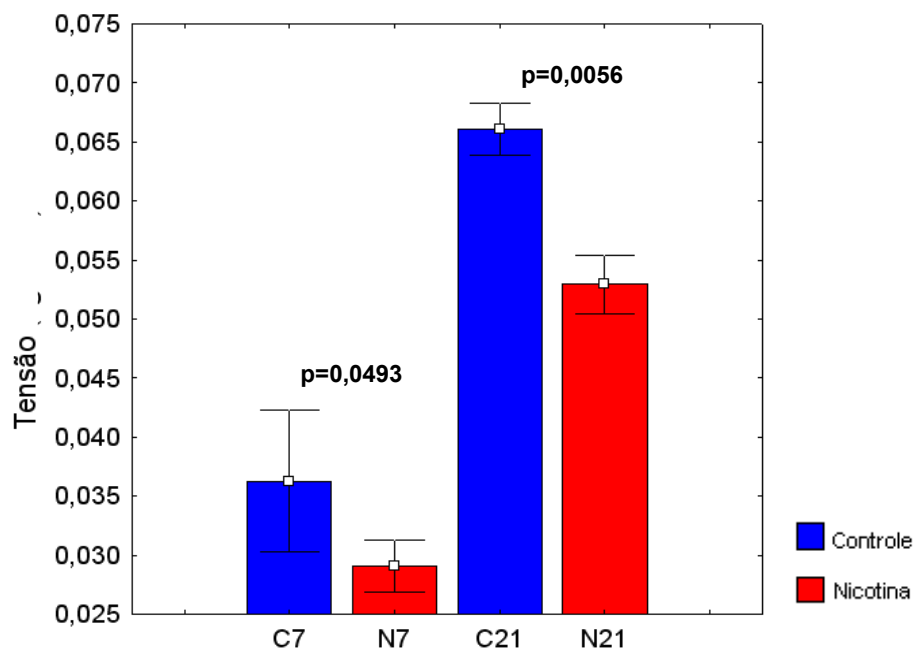
C7 e C21: Grupo Controle 7 e 21 dias
 N7 e N21: Grupo Nicotina 7 e 21 dias

4.3.3 Tensão

A tensão média, para os animais sacrificados no 7.º dia de pós-operatório, foi menor para o GN comparado com o GC, diferença estatisticamente significativa, ($0,029 \pm 0,002 \text{kgf/mm}^2$ vs. $0,036 \pm 0,005 \text{kgf/mm}^2$, $p=0,0493$). (Tabela 4 e Gráfico 3).

Para os animais sacrificados no 21.º dia de pós-operatório, a tensão média foi menor para o GN comparado com o GC, diferença estatisticamente significativa, ($0,053 \pm 0,002 \text{kgf/mm}^2$ vs. $0,066 \pm 0,002 \text{kgf/mm}^2$, $p=0,0056$). (Tabela 4 e Gráfico 3).

GRÁFICO 3 – MÉDIAS \pm DP DA TENSÃO DOS SUBGRUPOS C7, N7, C21 E N21 (Kgf/mm²)



C7 e C21: Grupo Controle 7 e 21 dias
N7 e N21: Grupo Nicotina 7 e 21 dias

4.4 AVALIAÇÃO DO COLÁGENO

Os valores resultantes da análise da deposição do colágeno estão resumidos na tabela 5.

TABELA 5 – PERCENTAGENS MÉDIAS DA DEPOSIÇÃO DO COLÁGENO TIPO I E III DOS SUBGRUPOS C7, N7, C21 E N21

COLÁGENO	GRUPO	N	MEDIDA	
			Média \pm EP	Valor de p
Tipo I (%)	C7	15	46,58 \pm 3,28	0,0079
	N7	15	24,15 \pm 3,28	
	C21	15	72,11 \pm 3,15	0,062
	N21	15	60,43 \pm 3,15	
Tipo III (%)	C7	15	52,75 \pm 3,28	0,0079
	N7	15	75,84 \pm 3,28	
	C21	15	27,88 \pm 3,15	0,062
	N21	15	39,51 \pm 3,15	

NOTA: EP= Erro padrão

C7 e C21= Controle 7 e 21 dias, N7 e N21= Nicotina 7 e 21 dias

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

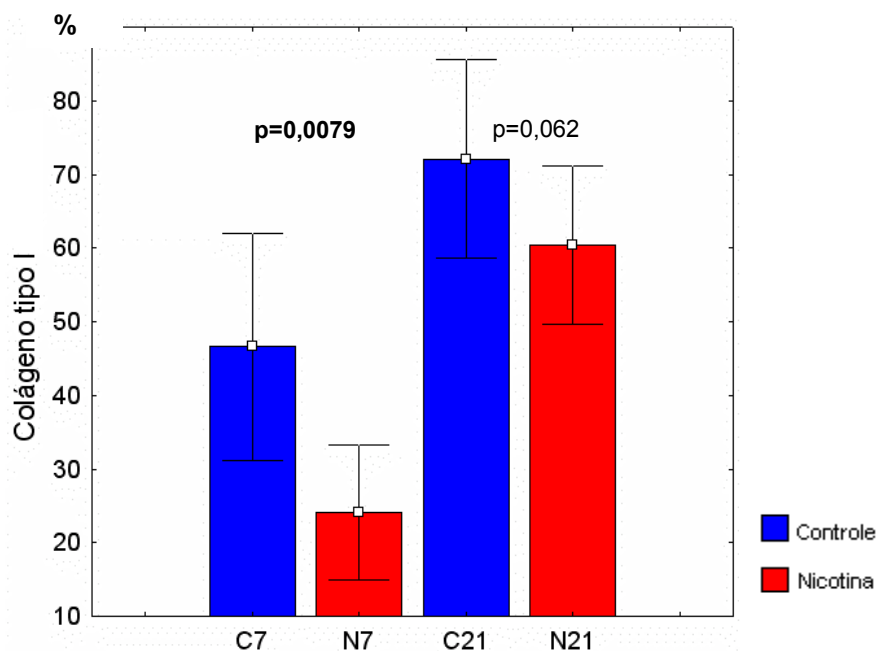
Utilizou-se o teste de *Fisher-Snedecor*.

4.4.1 Deposição do Colágeno Tipo I

Para os animais mortos no 7.º dia de pós-operatório, o depósito médio do colágeno tipo I foi menor para o GN comparado ao GC, diferença estatisticamente significativa, ($24,15 \pm 9,17\%$ vs. $46,58 \pm 15,42\%$, $p=0,0079$). (Tabela 5 e Gráfico 4).

Para os animais mortos no 21.º de pós-operatório, o colágeno tipo I depositou-se em menor quantidade no GN comparado ao GC, com diferença marginalmente significativa, ($60,43 \pm 10,80\%$ vs. $72,11 \pm 13,45\%$, $p=0,062$). (Tabela 5 e Gráfico 4).

GRÁFICO 4 – MÉDIAS \pm DP DA DEPOSIÇÃO DO COLÁGENO TIPO I DOS SUBGRUPOS C7, N7, C21 E N21



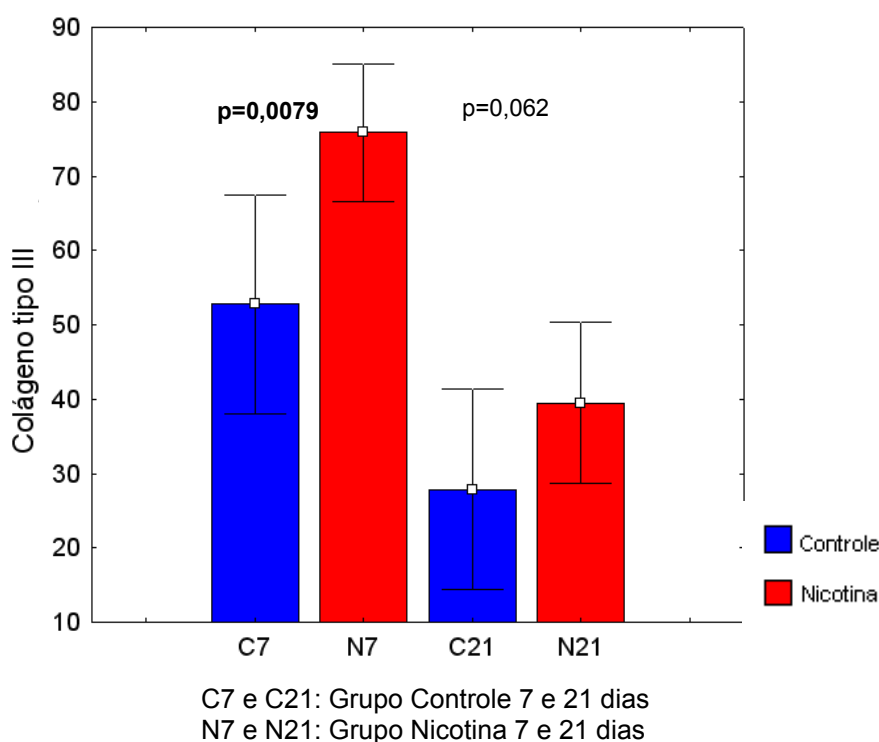
C7 e C21: Grupo Controle 7 e 21 dias
N7 e N21: Grupo Nicotina 7 e 21 dias

4.4.2 Deposição do Colágeno Tipo III

No subgrupo sete dias, o depósito médio do colágeno tipo III foi maior para o grupo GN comparado ao GC, com diferença estatisticamente significativa, ($75,84 \pm 9,17\%$ vs. $52,75 \pm 14,66\%$, $p=0,0079$). (Tabela 5 e Gráfico 5).

Para o subgrupo 21 dias, a deposição média do colágeno tipo III foi maior no GN comparado ao GC, com diferença marginalmente significativa, ($39,51 \pm 10,77\%$ vs. $27,88 \pm 13,48\%$, $p=0,062$). (Tabela 5 e Gráfico 5).

GRÁFICO 5 – MÉDIAS \pm DP DA DEPOSIÇÃO DO COLÁGENO TIPO III DOS SUBGRUPOS C7, N7, C21 E N21

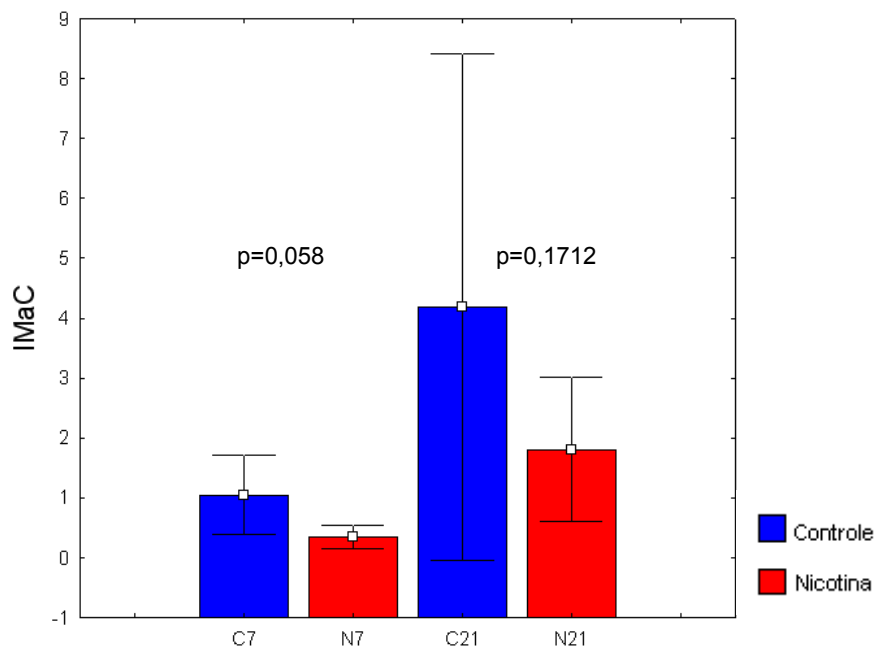


4.4.3 Índice da Maturação do Colágeno (IMaC)

A média do índice da maturação do colágeno (IMaC) na cicatriz cirúrgica, aos sete dias, foi menor para o GN em relação ao GC, com diferença marginalmente significativa, ($0,34 \pm 1,20$ vs. $1,05 \pm 0,67$, $p=0,058$). (Gráfico 6).

Aos 21 dias, a média do índice da maturação do colágeno (IMaC) foi semelhante entre GN e GC ($1,81 \pm 0,30$ vs. $4,18 \pm 4,23$, $p= 0,1712$). (Gráfico 6).

GRÁFICO 6 – MÉDIAS \pm DP DO ÍNDICE DA MATURAÇÃO DO COLÁGENO (IMaC) DOS SUBGRUPOS C7, N7, C21 E N21



C7 e C21: Grupo Controle 7 e 21 dias
N7 e N21: Grupo Nicotina 7 e 21 dias

4.5 AVALIAÇÃO DOS MIOFIBROBLASTOS E DOS VASOS SANGÜÍNEOS

Os resultados obtidos na avaliação imunoistoquímica estão sumarizados na tabela 6. Cada variável será discutida separadamente.

TABELA 6 – MÉDIAS DO NÚMERO DE MIOFIBROBLASTOS E DE VASOS SANGÜÍNEOS DOS SUBGRUPOS C7, N7, C21 E N21

VARIÁVEL	GRUPO	N	MEDIDA	
			Média ± EP	Valor de p
Número de miofibroblastos	C7	15	21,87 ± 1,75	0,007
	N7	15	9,93 ± 1,75	
	C21	15	12,00 ± 1,50	0,121
	N21	15	7,47 ± 1,50	
Número de vasos sangüíneos	C7	15	13,4 ± 1,27	0,031
	N7	15	8,33 ± 1,27	
	C21	15	12,93 ± 0,91	0,090
	N21	15	9,47 ± 0,91	

NOTA: EP= Erro padrão

C7 e C21= Controle 7 e 21 dias, N7 e N21= Nicotina 7 e 21 dias

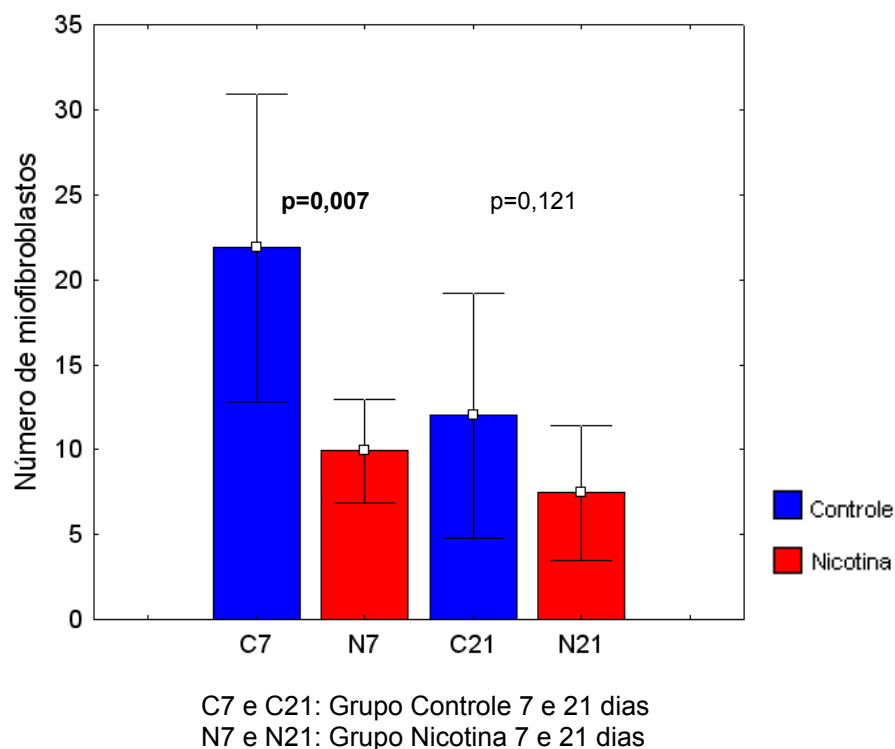
O valor p em negrito indica a rejeição da hipótese nula no nível de significância de 5%.

Utilizou-se o teste de *Fisher-Snedecor*.

4.5.1 Número de Miofibroblastos

Para o grupo de animais sacrificados no 7.º dia de pós-operatório, observou-se que no GN a média do número de miofibroblastos foi menor em relação ao GC, diferença estatisticamente significativa, ($9,93 \pm 3,06$ vs. $21,87 \pm 9,07$, $p=0,007$). (Tabela 6 e Gráfico 7). Para o grupo de animais sacrificados no 21.º dia de pós-operatório, o número de miofibroblastos no GN foi similar em relação ao GC ($7,47 \pm 3,96$ vs. $12,00 \pm 7,21$, $p=0,121$). (Tabela 6 e Gráfico 7).

GRÁFICO 7 – MÉDIAS \pm DP DO NÚMERO DE MIOFIBROBLASTOS DOS SUBGRUPOS C7, N7, C21 E N21

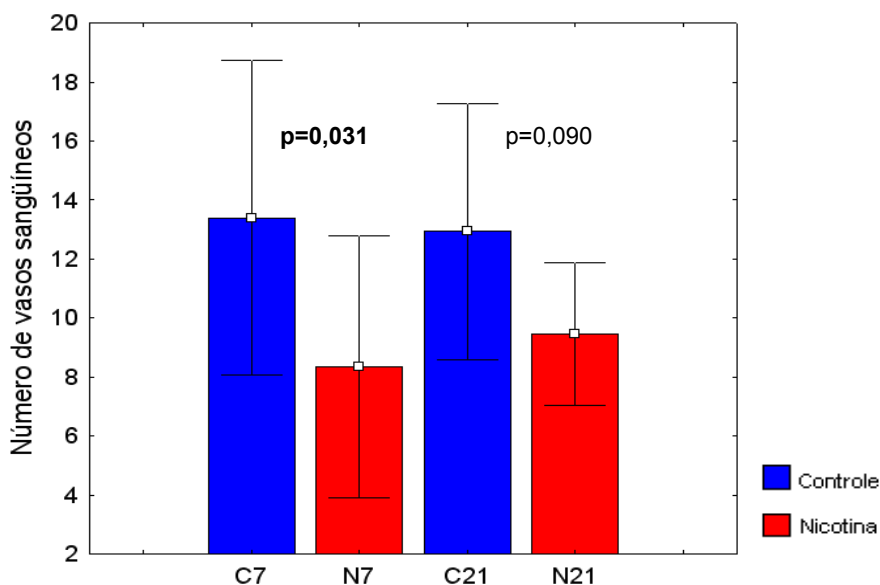


4.5.2 Número de Vasos Sangüíneos

Para os animais sacrificados no 7.º dia de pós-operatório, o GN apresentou média do número de vasos sangüíneos menor em comparação ao GC, diferença estatisticamente significativa, ($8,33 \pm 4,43$ vs. $13,4 \pm 5,33$, $p=0,031$). (Tabela 6 e Gráfico 8).

Nos animais sacrificados no 21.º dia de pós-operatório, o GN apresentou média do número de vasos sangüíneos similar em comparação ao GC ($9,47 \pm 2,42$ vs. $12,93 \pm 4,35$, $p=0,090$). (Tabela 6 e Gráfico 8).

GRÁFICO 8 – MÉDIAS \pm DP DO NÚMERO DE VASOS SANGÜÍNEOS DOS SUBGRUPOS C7, N7, C21 E N21



C7 e C21: Grupo Controle 7 e 21 dias
N7 e N21: Grupo Nicotina 7 e 21 dias

4.6 ANÁLISE DOS GRUPOS C E N NO INTERVALO 7 E 21 DIAS

A seguir estão apresentados os resultados obtidos na comparação entre os animais do grupo controle (GC), sacrificados no 7.º dia de pós-operatório (C7) e no 21.º dia de pós-operatório (C21). Também a comparação entre os animais do grupo nicotina (GN), sacrificados no 7.º dia de pós-operatório (N7) e no 21.º dia de pós-operatório (N21). (Tabela 7).

4.6.1 Força Máxima

Houve aumento da média da força máxima do C7 para C21 (0,586 \pm 0,041Kgf vs. 1,111 \pm 0,022Kgf, $p < 0,0001$).

A média da força máxima aumentou do N7 para N21 ($0,391 \pm 0,032\text{Kgf}$ vs. $1,051 \pm 0,013\text{Kgf}$, $p=0,039$).

4.6.2 Força de Ruptura

Os valores da média de força de ruptura aumentaram do C7 para C21 ($0,577 \pm 0,051\text{Kgf}$ vs. $0,581 \pm 0,002\text{Kgf}$, $p<0,0001$).

Houve aumento do N7 para N21 na média da força de ruptura ($0,393 \pm 0,032\text{Kgf}$ vs. $0,421 \pm 0,004\text{Kgf}$, $p=0,0484$).

4.6.3 Tensão

A média da tensão aumentou do C7 para C21 ($0,036 \pm 0,005\text{Kgf/mm}^2$ vs. $0,066 \pm 0,002 \text{Kgf/mm}^2$, $p<0,0001$). Houve aumento da média da tensão do N7 para N21 ($0,029 \pm 0,002\text{Kgf/mm}^2$ vs. $0,053 \pm 0,002\text{Kgf/mm}^2$, $p<0,0001$).

4.6.4 Deposição do Colágeno Tipo I

Houve aumento na média da deposição do colágeno tipo I do C7 para C21 ($46,58 \pm 15,42\%$ vs $72,11 \pm 13,45\%$, $p=0,0049$).

A média da deposição do colágeno tipo I aumentou do N7 para N21 ($24,15 \pm 9,17\%$ vs. $60,43 \pm 10,80\%$, $p=0,0013$).

4.6.5 Deposição do Colágeno Tipo III

Houve diminuição na média da deposição do colágeno tipo III do C7 para C21 ($52,75 \pm 14,66\%$ vs. $27,88 \pm 13,48\%$, $p=0,0049$).

A média da deposição do colágeno tipo III decresceu do N7 para N21 ($75,84 \pm 9,17\%$ vs. $39,51 \pm 10,77\%$, $p=0,0013$).

4.6.6 Índice de Maturação do Colágeno (IMaC)

Houve semelhança na média do IMaC do C7 para C21 ($1,05 \pm 0,78$ vs. $4,19 \pm 0,78$, $p=0,1051$).

A média do IMaC foi similar do N7 para N21 ($0,34 \pm 0,25$ vs. $1,81 \pm 0,25$, $p=0,526$).

4.6.7 Número de Miofibroblastos

Houve diminuição na média do número de miofibroblastos do C7 para C21 ($21,87 \pm 9,07$ vs. $12,00 \pm 7,21$, $p=0,013$).

A média do número de miofibroblastos foi semelhante do N7 para N21 ($9,93 \pm 3,06$ vs. $7,47 \pm 3,96$, $p=0,345$).

4.6.8 Número de Vasos Sangüíneos

Houve semelhança na média do número de vasos sangüíneos do C7 para C21 ($13,4 \pm 5,33$ vs. $12,93 \pm 4,35$, $p=0,780$).

A média do número de vasos sangüíneos foi similar do N7 para N21 ($8,33 \pm 4,43$ vs. $9,47 \pm 2,42$, $p=0,507$).

TABELA 7 – COMPORTAMENTO DAS VARIÁVEIS NO INTERVALO 7 A 21 DIAS DOS GRUPOS C E N

VARIÁVEL	INTERVALO 7 – 21 DIAS	
	GC	GN
Força Máxima	↑	↑
Força de Ruptura	↑	↑
Tensão	↑	↑
Colágeno Tipo I	↑	↑
Colágeno Tipo III	↓	↓
IMaC	≈	≈
Miofibroblastos	↓	≈
Vasos Sangüíneos	≈	≈

↑: aumento, ↓: redução, ≈: semelhança

GC: Grupo Controle

GN: Grupo Nicotina

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

5.1 MÉTODO

5.1.1 Escolha do Animal de Experimentação

A escolha do rato como animal para a realização do experimento foi feita pelo fato de ser de pequeno porte, apresentar boa resistência ao meio ambiente, ser de fácil aquisição e manuseio, não requerer alojamento individual, e permitir a padronização de variáveis como raça, idade e sexo.

Alguns autores observaram semelhanças anatômicas e fisiológicas entre ratos e humanos. Em particular o estudo da parede abdominal dos ratos apresenta semelhanças anatômicas com a parede abdominal humana (NISHIHARA e PRUDDEN, 1958).

A utilização de animais de ambos os sexos no estudo, pelo tempo máximo de 42 dias de vida, foi embasada no estudo de HUGHES e TANNER (1970), que compararam as variáveis antropométricas desde o nascimento até a vida adulta, e concluíram não haver diferenças relacionadas ao sexo antes dos 50 dias de vida para a variável peso.

5.1.2 Escolha da Parede Abdominal

A utilização da parede abdominal para o estudo foi escolhida pela importância do fechamento deste segmento nas laparotomias, em especial as

transversas por serem o tipo de incisão mais utilizado em recém-nascidos e crianças. É um tipo de incisão anatômica que segue as linhas de força da pele.

Com relação à técnica utilizada no fechamento, contínua ou interrompida, optou-se neste estudo pela sutura contínua baseado no trabalho de SEID et al. (1995), os quais afirmaram que a sutura contínua apresenta maior força necessária para a ruptura da aponeurose devido à distribuição homogênea da força ao longo de toda a área suturada. O tipo de sutura contínua também foi adotado nos estudos de TRIMBOS et al. (1992), que compararam os tipos contínua e interrompida para o fechamento da aponeurose em humanos. Esses autores não encontraram diferença significativa em relação à deiscência, concluindo que a sutura contínua é melhor por ser realizada com mais rapidez e produz menor reação de corpo estranho.

No presente estudo manteve-se o fio de sutura durante o estudo tensiométrico. Segundo ADAMSONS e ENQUIST (1963), em estudo realizado em porcos no qual a sutura não foi removida para a avaliação da tensão, a permanência do fio de sutura promove maior resistência à tração. Esta afirmação foi justificada por TERA e ABERG (1976), que justificaram o achado pelo fato de haver sustentação da sutura nos tecidos próximos à incisão, onde os pontos foram ancorados. Por outro lado, a retirada do fio antes do estudo tensiométrico implicaria em destruição tecidual, com aumento da fragilidade da linha de sutura.

Outro fator de importância é o tipo de fio a ser utilizado. A aplicação de fios de sutura interfere no processo de cicatrização. O fio de sutura ideal é aquele que produz a menor reatividade biológica possível. Há evidências de que os fios monofilamentares inabsorvíveis provocam menor reação tecidual e, como consequência, menor interferência no processo cicatricial (CHAIB, LING e VASCONCELOS, 1972; HASTINGS et al., 1975). No presente estudo optou-se pelo

fio multifilamentar de poliglatina por ser o tipo de material com o qual habitualmente é feito o fechamento das laparotomias no plano músculo-aponeurótico em humanos.

A verificação quanto ao estado da ferida cirúrgica foi descrita em experimento realizado por SMITH e ENQUIST (1967), realizado em ratos, com a finalidade de determinar a importância das infecções na cicatrização de laparotomias, pois aqueles autores observaram menor resistência à ruptura nas feridas infectadas.

5.1.3 Uso da Nicotina

A utilização da nicotina em animais de experimentação pode ser realizada de vários modos: oral, intraperitoneal, endovenosa, minibolsas implantadas no subcutâneo, via inalatória e por meio de injeções subcutâneas.

Nos estudos de BALFOUR (1980); LAU, SPEAR e FALK (1994), a via oral foi a escolhida, porém FORREST, PANG e LINDSAY (1991) relataram que esta via traz o inconveniente de que os animais podem diminuir a ingestão de água contendo a nicotina, pelo sabor desagradável e também pelo aparecimento de ulcerações hemorrágicas na mucosa gástrica.

O uso intraperitoneal foi utilizado no estudo de RAO, MORRISON e O'BRIEN (1983), no entanto oferece o risco de contaminação da parede abdominal pela ação direta da nicotina na ferida operatória, interferindo na análise dos resultados.

A via endovenosa foi utilizada nos trabalhos de MARKS, STITZEL e COLLINS (1987) e VALENTINE et al. (1997). Entretanto, de acordo com FORREST, PANG e LINDSAY (1991), a utilização desta via por período prolongado de tempo

requer o implante de cateter na veia jugular dos animais, aumentando a morbimortalidade dos mesmos durante o experimento.

Outra opção apresentada por MEDEIROS et al. (1997), é o implante subcutâneo de disco de nicotina. Apresenta a vantagem da acurácia no montante de droga aplicada, porém seu tempo útil é pequeno e necessita de trocas periódicas, além do custo elevado.

A via inalatória é outra opção. Foi utilizada por HAAG, LARSON e WEATHERBY (1960); CRAIG e REES (1985), porém o uso desta via expõe os animais a todos os produtos da fumaça, e com frequência os níveis plasmáticos de nicotina não são similares àqueles encontrados nos humanos tabagistas.

A via subcutânea de injeções diárias de nicotina demonstrou ser bem tolerada pelos animais e com rápida absorção da droga, com níveis plasmáticos detectados em cinco minutos (FORREST, PANG e LINDSAY, 1985). Esta forma de aplicação subcutânea de nicotina é descrita por vários autores (FORREST, PANG e LINDSAY, 1985; FORREST, PANG e LINDSAY, 1987; FORREST PANG E LINDSAY, 1991; BOZARTH, PUDIACK e KUOLLE, 1998; SKINOVSKY, 2000; CHIBATA, 2003; SKINOVSKY, 2005).

A dose utilizada neste estudo (2mg por kg de peso em duas administrações diárias) foi baseada em amostras plasmáticas de humanos tabagistas crônicos. Segundo RICHARDSON et al. (1977), é equivalente ao consumo de 60 cigarros ao dia.

FORREST, PANG e LINDSAY (1991) concluíram que o tabagismo influencia na cicatrização, quando o mesmo não cessa por pelo menos duas semanas antes da cirurgia.

BARBOSA et al. (1995) avaliaram o efeito da nicotina subcutânea em ratas desnutridas, durante a gestação, e observaram diminuição no peso tanto das ratas gestantes, quanto de seus recém-nascidos.

O efeito da exposição materna à nicotina, por via subcutânea durante o período gestacional e de lactação, foi avaliado quanto ao desenvolvimento pulmonar no período neonatal, e concluiu-se que nos filhotes cujas mães foram expostas à nicotina, houve diminuição do número de capilares dos septos alveolares (MARITZ e DENNIS, 1998).

Quanto ao tempo de exposição à droga, para se mensurar com total segurança, utilizou-se o tempo de gestação médio dos ratos, a partir da constatação da prenhez e durante todo o período de lactação (21 dias), de tal modo que os filhotes estiveram expostos via placentária e pela lactação com doses similares e contínuas de nicotina.

5.1.4 Variáveis Estudadas e Tempo de Aferição

A cicatrização ideal de uma ferida está relacionada com a proliferação fibroblástica e deposição de colágeno e outros elementos do tecido conectivo. A fibroplasia e a síntese do colágeno iniciam-se nas primeiras 24 horas do ferimento, seguindo-se em 48 a 72 horas pela migração endotelial. Ao redor do 4.º dia há a produção de fatores de crescimento que estimulam tanto a fibroplasia como a neovascularização (ORGILL e DEMLING, 1988).

A força tênsil está relacionada com a multiplicação e maturação dos fibroblastos. Segundo HARVEY (1929), é necessário período de aproximadamente quatro dias para a maturação dos fibroblastos. No presente estudo, os intervalos

utilizados para avaliar a angiogênese, formação dos miofibroblastos, deposição do colágeno e tensiometria foram 7 e 21 dias após o procedimento operatório. Dados da literatura relatam que a boa cicatrização de uma ferida, com desenvolvimento de força tênsil adequada, está intimamente relacionada à proliferação e deposição do colágeno e outros elementos do tecido conectivo. A maioria dos dados disponíveis na literatura sugere que a síntese de colágeno atinge seu nível máximo nos primeiros 7 a 14 dias após a lesão, ocorrendo o pico de deposição dessa proteína no sítio de cicatrização do 21.º ao 28.º dia de evolução (PEACOCK, 1962; MADDEN e PEACOCK, 1968; DIEGELMANN, ROTHKOPF e COHEN, 1975; ORGILL e DEMLING, 1988). Os miofibroblastos são encontrados no tecido de cicatrização entre o quarto e sexto dias após a injúria, com maior proliferação entre o 8.º e 30.º dia do processo de cicatrização (CORNELISSEN, STOOP e HOOF, 2000).

5.1.5 Avaliação Microscópica

Os cortes histológicos corados pelo picrossírius permitiram detectar o tipo de colágeno, bem como a sua quantificação nas amostras estudadas. Comparando-se diversos métodos de coloração para análise do colágeno, concluiu-se que o corante picrossírius é mais seletivo, de fácil execução e interpretação, sendo específico para o estudo do colágeno tecidual, pois a quantidade de corante aderido é proporcional à quantidade da proteína presente, possibilitando o seu uso para a quantificação da mesma (SWEAT, PUTCHLER e ROSENTHAL, 1964; JUNQUEIRA, COSSERMELLI e BRENTANI, 1978).

Nas preparações coradas pelo picrossírius, ao microscópio de luz polarizada, as fibras colágenas mais espessas, fortemente birrefringentes e que apresentam

coloração em tons de amarelo a vermelho, representam o colágeno tipo I; as fibras mais finas e dispersas, fracamente birrefringentes e que apresentam coloração esverdeada representam o colágeno tipo III. Tais propriedades conferem ao picrosírius características de excelência para a diferenciação histológica do colágeno (JUNQUEIRA, COSSERMELLI e BRENTANI, 1978). A análise computadorizada, com o desenvolvimento de *softwares* específicos para a determinação do percentual de área ocupada, pelo tipo específico de colágeno, permite quantificar a deposição de cada um destes, de maneira objetiva e precisa.

Em estudo sobre a angiogênese na cicatrização de feridas, RUITER et al. (1993) utilizaram como antígeno a técnica imunoistoquímica de *PAL-E*, que é altamente específica para endotélio de vaso sanguíneo, porém o fator VIII e o *CD 34* apresentam maior sensibilidade e são expressos também em arteríolas. No presente estudo, a contagem dos vasos sanguíneos foi feita pela técnica imunoistoquímica através do antígeno do fator VIII.

Para o estudo dos miofibroblastos igualmente foi realizado estudo de imunoistoquímica, utilizando-se para tal anticorpo anti- α -actina muscular lisa (anti- α -sm), estudado pela primeira vez por SKALLI et al. (1986), que demonstraram positividade para a identificação dessas células.

5.2 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

5.2.1 Peso dos animais

No presente estudo, o peso das ratas foi avaliado semanalmente no período gestacional e de lactação. Os grupos nicotina (GN) e controle mantiveram médias de ganho de peso semelhantes.

BARBOSA et al. (1995) ao avaliarem o efeito da nicotina, em ratas desnutridas no período gestacional, concluíram que a nicotina diminui a ingestão alimentar. A avaliação do peso, semanalmente dos animais, permitiu o controle do estado nutricional, uma vez que KOBAK et al. (1974) e COELHO (2003) estudaram a relação entre a deficiência de proteínas e a tensão das cicatrizes abdominais em ratos e concluíram que os animais desnutridos necessitavam de menor força para ruptura da parede abdominal.

O peso dos filhotes, no presente estudo, avaliado no período de lactação, demonstrou valores similares desde o nascimento até 21 dias para os grupos nicotina (GN) e controle (GC). Esses resultados demonstram que, uma vez que o ganho de peso foi similar entre os grupos, provavelmente as alterações tensiométricas e histológicas observadas no presente estudo não foram relacionadas a modificações do estado nutricional. Esses dados reforçam a influência da nicotina nos resultados obtidos.

5.2.2 Tensiometria

LINDSTEDT e SANDBLOM (1975) avaliaram a tensão das cicatrizes em humanos e a compararam com a de outros animais. Concluíram que em porcos e coelhos a tensão é maior do que a dos humanos, sendo equivalente nos ratos, o que

permite que estes sejam utilizados para estudos experimentais e seus resultados transferidos para o uso prático em humanos.

No presente estudo, para os animais mortos no 7.º dia de pós-operatório, os valores da força máxima, força de ruptura e tensão se mostraram menores para os animais do grupo nicotina (GN), diferença estatisticamente significativa respectivamente, para força máxima ($p=0,0060$), força de ruptura ($p=0,0047$) e tensão ($p=0,0493$).

Para os animais sacrificados no 21.º dia de pós-operatório, os valores de força de ruptura e tensão foram menores para os animais do grupo nicotina (GN), com valores estatisticamente significantes, para força de ruptura ($p=0,0007$) e para tensão ($p=0,0056$). A variável força máxima no 21.º de pós-operatório foi semelhante entre os grupos controle e nicotina.

Esses resultados demonstram que o uso crônico da nicotina, durante a gestação e lactação em ratos, associa-se à redução da força tênsil de laparotomias transversas nos filhotes.

Quando foram comparados os momentos 7 e 21 dias, observou-se aumento de todas as variáveis tensiométricas (força máxima, força de ruptura e tensão) nos grupos controle e nicotina, porém as variáveis do grupo nicotina mantiveram-se com valores inferiores ao controle, valores estatisticamente significantes. Outros autores observaram resultados similares, SKINOVSKY (2000) em estudo sobre o efeito da nicotina na anastomose intestinal de ratos adultos, observou que no 28.º dia de pós-operatório houve diminuição da força de ruptura. CHIBATA (2003) ao estudar o efeito da nicotina na cicatrização da parede abdominal em ratos adultos, ao avaliar a tensiometria, concluiu que no 14.º dia de pós-operatório há diminuição da força máxima. MEDEIROS et al. (2003) concluíram em sua pesquisa que a nicotina exerce

efeito deletério sobre a parede abdominal. Há diminuição da resistência à tensão no 10.º dia de pós-operatório, assim como decréscimo da pO_2 do líquido tecidual próximo à área da ferida.

No presente estudo, a diminuição dos valores da tensiometria para os animais do grupo nicotina foi relacionada ao efeito deletério da nicotina, onde a agregação plaquetária, diminuição da angiogênese, diminuição na proliferação de miofibroblastos, influenciaram na formação do colágeno e nos resultados obtidos (REUS et al., 1984; SHERWIN e GASTWIRTH, 1990, PINTO et al., 2002; CHIBATA, 2003; SKINOVSKY, 2005).

5.2.3 Deposição do Colágeno

A derme intacta é composta por 85% de colágeno do tipo I e 15% do colágeno do tipo III. No tecido de granulação, há aumento progressivo do colágeno do tipo III, em até 30% na fase inflamatória, o qual, em conjunto com a fibronectina, constitui a matriz inicial. A partir do 4.º dia de pós-operatório há decréscimo rápido do colágeno tipo III, sem exercer influência importante na resistência da ferida (KRUMMEL, 1986; EHRLICH, 1996).

O colágeno do tipo I está presente na ferida em 24 horas no pós-operatório e aumenta progressivamente, proporcionalmente ao ganho de força de ruptura da cicatriz, até a sua maturação. De acordo com WITTE e BARBUL (1997), a síntese do colágeno mantém-se por período mínimo de quatro semanas após o ferimento. GRECA et al. (2002) estudaram retalhos de submucosa de intestino delgado para ampliação vesical e observaram que no 30.º dia de pós-operatório havia deposição

predominante de colágeno tipo I na proporção média de 70% do total de colágeno da cicatriz.

No presente estudo houve diminuição da deposição do colágeno tipo I (maduro) na cicatriz dos animais do grupo nicotina (GN), no 7.º dia de pós-operatório ($p=0,0079$) valor estatisticamente significativo. No 21.º dia de pós-operatório houve diminuição marginal da deposição do colágeno tipo I (maduro), ($p=0,062$). Houve aumento na deposição do colágeno tipo I (maduro) no intervalo entre 7 e 21 dias, para ambos os grupos, com aumento mais pronunciado para o grupo nicotina ($p=0,0013$). Pode-se inferir, baseado nesses resultados, que a redução da deposição do colágeno tipo I associou-se à redução da resistência tênsil na ferida.

O colágeno tipo III (imaturo), no presente estudo, apresentou maior deposição no grupo nicotina (GN) para os animais sacrificados no 7.º dia de pós-operatório ($p=0,0079$). Nos animais estudados no 21.º dia de pós-operatório, o GN apresentou valores maiores de colágeno tipo III (imaturo), ($p=0,062$), porém marginalmente significativos. O colágeno tipo III decresceu no intervalo entre 7 e 21 dias de pós-operatório, para ambos os grupos, de modo menos pronunciado no GN ($p=0,0013$).

SKINOVSKY (2000) relatou que a nicotina diminui o depósito do colágeno tipo III no 28.º dia de pós-operatório da cicatrização de feridas.

O índice da maturação do colágeno (IMaC), criado por COELHO (2003) é obtido pela razão da quantidade do colágeno maduro (tipo I) pelo colágeno imaturo (tipo III). Valores maiores do que um indicam que a percentagem de colágeno tipo I é maior do que a percentagem de colágeno tipo III.

No presente estudo o IMaC foi menor para o grupo nicotina (GN) no 7.º dia de pós-operatório, no entanto a comparação entre as médias foi apenas

marginalmente significativa ($p=0,058$), provavelmente pelo aumento do colágeno tipo III neste grupo.

Para os animais sacrificados no 21.º dia de pós-operatório o IMaC foi semelhante entre o grupo nicotina (GN) e o grupo controle (GC).

Na avaliação do IMaC no intervalo entre 7 e 21 dias, no presente estudo, houve similaridade da maturação do colágeno entre os animais do grupo nicotina (GN) e controle (GC).

A diminuição dos valores de IMaC foi descrita por COELHO (2003) ao avaliar a desnutrição intra-útero em filhotes, como fator causal da diminuição deste índice, ou seja, maior proporção da deposição do colágeno imaturo na cicatrização de ratos lactentes desnutridos na gestação e lactação.

5.2.4 Número de Miofibroblastos

CHAMSON et al. (1980) em estudo *in vitro*, concluíram que, à microscopia eletrônica, a ultraestrutura dos fibroblastos é modificada pelo tabaco, caracterizando toxicidade celular e inibição do crescimento destas células.

No presente estudo observou-se que a nicotina utilizada no período gestacional e de lactação influenciou na proliferação do número de miofibroblastos e na cicatrização dos filhotes sacrificados no 7.º dia de pós-operatório. Houve menor formação de miofibroblastos nos animais do grupo nicotina (GN), diferença estatisticamente significativa ($p=0,007$). Para os animais sacrificados no 21.º dia de pós-operatório, houve semelhança entre os grupos controle e nicotina no número de miofibroblastos.

No intervalo entre 7 e 21 dias de pós-operatório, do presente estudo, o grupo nicotina (GN) apresentou similaridade no número de miofibroblastos na cicatriz. Enquanto o grupo controle (GC) apresentou diminuição, diferença estatisticamente significativa ($p=0,013$).

Vários estudos relacionam a nicotina como inibidora da proliferação dos fibroblastos, os quais quando estimulados sofrem modificação de seu fenótipo. Esta modificação pode ser ocasionada pela ação da nicotina em outras células e/ou mediadores químicos envolvidos na multiplicação dos fibroblastos, como linfócitos e eventualmente macrófagos (GABBIANI et al., 1972; NEHER, 1974; MOSELY, FINSETH e GOODY, 1978; CHAMSON, FREY e HIVERT, 1982; TIPTON e DABBOUS, 1995; GIANNOPOULOU, GEINOZE e CIMASONI, 1999; FANG e SVOBODA, 2005; SKINOVSKY, 2005)

Segundo CHAMSON, FREY e HIVERT (1982) e TIPTON e DABBOUS (1995), os miofibroblastos são células produtoras de colágeno, predominantemente do tipo I, e a sua diminuição poderia estar relacionada à menor síntese desta proteína.

Portanto, a nicotina causa a diminuição da proliferação de miofibroblastos, a diminuição da deposição do colágeno tipo I e diminuição na resistência tênsil da cicatriz.

5.2.5 Número de Vasos Sangüíneos

Angiogênese é a formação de novos vasos sangüíneos por meio de um processo em que são formados brotos capilares em resposta a estímulos químicos externos. Isso ocorre durante a embriogênese, no crescimento de tumores sólidos e

na cicatrização de feridas. O desenvolvimento de neovasos é essencial na cicatrização e está relacionado a fatores locais, mediadores químicos, matriz extracelular, gradientes metabólicos e forças físicas e desse modo esta variável foi incluída no estudo (ARNOLD e WEST, 1991; PETTET, BYRNE, MCELWAIN e NORBURY, 1996).

A angiogênese está relacionada com a liberação de fatores de crescimento produzidos por diversas células envolvidas no processo de cicatrização. A fibroplasia e a síntese do colágeno iniciam-se nas primeiras 24 horas após o ferimento, enquanto nas seguintes 48 a 72 horas ocorre a migração endotelial. A partir do quarto dia, os macrófagos produzem fatores de crescimento que estimulam tanto a proliferação fibroblástica como a neovascularização (ORGILL e DEMLING, 1988).

Referente à influência da nicotina utilizada no período gestacional e de lactação sobre a cicatrização da parede abdominal dos filhotes, no presente estudo, verificou-se que houve diminuição na formação de vasos sanguíneos nos animais sacrificados no 7.º dia de pós-operatório, valor estatisticamente significativo ($p=0,031$). Para os animais sacrificados no 21.º dia de pós-operatório a neoformação vascular, entre os grupos foi similar, sob o efeito da nicotina.

No intervalo entre o 7.º e o 21.º dias de pós-operatório, no presente estudo, houve semelhança na angiogênese para os animais do grupo nicotina (GN) e para os animais do grupo controle (GC).

De acordo com os trabalhos de ZIMMERMAN e MC GEACHE (1987), realizados por microscopia eletrônica, a nicotina causa alterações da luz de vasos sanguíneos, causando vacuolização citoplasmática, edema mitocondrial e edema subendotelial. RIEBEL et al. (1995) concluíram que a nicotina causa diminuição do crescimento vascular em enxertos ósseos da ordem de 50%. Entretanto,

dependendo da dosagem pode causar o estímulo na angiogênese e em doses superiores a 0,03 µg/kg não aumenta a angiogênese.

PINTO et al. (2002) observaram que a nicotina diminui a formação de fibroblastos e de neovasos na ossificação de alvéolos dentais, e concluíram que a nicotina inibe a angiogênese. CHIBATA (2003) observou que a nicotina reduz a angiogênese na sutura da parede abdominal no 7.º dia pós-operatório e SKINOVSKY (2005) observou menor proliferação de vasos sanguíneos em anastomoses intestinais de ratos, sob o efeito da nicotina, no 28.º dia de pós-operatório.

Há relação importante entre o fluxo sanguíneo da microcirculação, a taxa de oxigênio e a cicatrização da ferida. O uso da nicotina cria estado de anóxia cutânea principalmente de extremidades (SHERWIN e GASTWIRTH, 1990; MEDEIROS et al., 2003).

Contraditoriamente VILLABLANCA (1998) foi o primeiro a relatar que em estudo experimental, *in vitro*, a nicotina estimula a síntese de DNA e a multiplicação de células endoteliais, quando comparada a outras substâncias testadas. Outro trabalho de HEESCHEN et al. (2001) também demonstrou que a nicotina induz à angiogênese estimulada por isquemia tanto, *in vitro* como *in vivo*, porém causa citotoxicidade em doses maiores. JACOBI et al. (2002) em estudo de retalhos de camundongos diabéticos, concluíram que a nicotina acelerou a angiogênese.

Diante dos vários resultados, novos estudos serão necessários para que o efeito da nicotina sobre a angiogênese seja claramente compreendido.

5.3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

5.3.1 Nicotina e Cicatrização

A nicotina exerce ação prejudicial à cicatrização, comprometendo a circulação sangüínea no sítio da injúria, levando à conseqüente diminuição do aporte de oxigênio no local, seja pelo estímulo à liberação de catecolaminas ocasionando vasoconstrição, ou seja pela inibição da liberação de prostaglandinas, as quais têm ação antiagregante plaquetária, com a conseqüente formação de microtrombos (WATTS, 1960; NADLER, VELASCO e HORTON, 1983; FRICK e SEALS, 1994). No presente estudo foi demonstrada importante inibição da angiogênese.

A própria inibição do número de miofibroblastos encontrada no presente estudo pode ter sido ocasionada pela influência da nicotina na proliferação fibroblástica e na produção de colágeno através da inibição na proliferação de linfócitos e macrófagos, células moduladoras da atividade fibroblástica (NEHER, 1974; WAHL, WAHL e MC CARTHY, 1978).

Os resultados do presente estudo também podem ter sido obtidos pela ação intracelular direta da nicotina sobre os miofibroblastos, inibindo sua proliferação e/ou a produção de colágeno (TIPTON e DALBOUS, 1995; GIANNOPOULOU, GEINOZ e CIMASONI, 1999).

Diante do exposto, infere-se que diversos podem ser os mecanismos em que a nicotina prejudica o processo de cicatrização. Estes mecanismos merecem ser esclarecidos por estudos futuros que avaliem outros momentos, doses diferentes e métodos de investigação mais aprimorados, como a influência dos fatores de crescimento celular no processo de cicatrização.

6 CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

A nicotina utilizada em ratas na dose de 2 mg/kg de peso ao dia, durante a gestação e lactação, influencia na cicatrização da parede abdominal de seus respectivos filhotes, quando o procedimento cirúrgico é realizado logo após o desmame, porque:

1. reduz a força máxima, a força de ruptura e a tensão na fase de cicatrização no 7.º dia de pós-operatório, e no 21.º dia de pós-operatório reduz a força de ruptura e a tensão;
2. diminui a deposição de colágeno tipo I (maduro) na fase de cicatrização no 7.º dia de pós-operatório e aumenta a deposição de colágeno tipo III (imaturo) nesta mesma fase;
3. diminui a proliferação do número de miofibroblastos na fase de cicatrização no 7.º dia de pós-operatório;
4. diminui a angiogênese na fase de cicatrização no 7.º dia de pós-operatório.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ADAMSONS, R. J.; ENQUIST, I.F. The relative importance of sutures to the strength of healing wounds under normal and abnormal conditions. **Surg. Gynecol. Obstet.**, v. 117, p. 396-401, 1963.
- ADZICK, N. S.; HARRISON, M. R.; GLICK, P. L. et al. Comparison of fetal, newborn, and adult wound healing by histologic, enzyme histochemical, and hydroxyproline determination. **J. Pediatr. Surg.**, v. 20, p. 315-319, 1985.
- ANDERSON, N. A.; RONN, B.; TJONNELAND, A.; DJURSING, H.; SCHIOLER, V. Low maternal but normal fetal prolactin levels in cigarette smoking pregnant woman. **Acta Obstet. Gynecol. Scand.** v. 63, p. 237-239, 1984.
- ARNOLD, F.; WEST, D. C. Angiogenesis in wound healing. **Pharmacol. Ther.**, Oxford, v. 52, p. 407-422, 1991.
- BARBOSA, A. D. M.; KOPELMAN, B. I.; AMANCIO, O.M.S. et al. Alterações de peso tecidual e histológicas em ratas gestantes submetidas à desnutrição e ao estresse crônico de nicotina, e em seus recém-nascidos. **J. Pediatr.**, v. 71, p. 145-150, 1995.
- BARBUL, A.; REGAN, M. C. Biology of Wound Healing. In: FISCHER, J.E. **Surgical Basic Science**. St. Louis: Mosby-Yearbook, 1993, p. 67-89.
- BAKER, R. R. The effect of ventilation on cigarette combustion mechanisms. **Recent Adv. Tobacco Sci.** v. 10, p. 88-150, 1984.
- BALFOUR, D. J. F. Studies on the biochemical effects of oral nicotine. **Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.**, Paris, v. 245, n. 1, p. 95-103, 1980.
- BATTEGAY, E. J. Angiogenesis: mechanistic insights, neovascular diseases and therapeutic prospects. **J. Mol. Med.**, Berlin, v. 73, p. 333-346, 1995.
- BENOWITZ, N. Clinical pharmacology of nicotine. **Ann. Ver. Med.**, Palo Alto, v. 37, p. 21-33, 1986.
- BOZARTH, M. A.; PUDIACK, C. M.; KUOLEE, R. Effect of chronic nicotine on brain stimulation reward. Effect of daily injections. **Behav. Brain Res.**, Amsterdam, v. 96, n. 1-2, p. 185-188, 1998.
- BYRD, J. C. Environmental tobacco smoke. Medical and legal issues. **Med. Clin. North Am.**, v. 76, n. 2, p. 377-398, 1992.
- CABAR, F. R.; CARVALHO, F. R. C.; CARVALHO, J. P. Efeitos do tabagismo na saúde da mulher. **Femina**, v. 31, n. 4, p. 373-375, 2003.
- CARREL, A.; HARTMANN, A. The relation between the size of a wound and the rate of its cicatrization. **J. Exp. Med.**, New York, v. 24, p. 429-450, 1916.
- CHAMSON, A.; FREY, J.; HIVERT, M. Effects of tobacco smoke extracts on collagen biosynthesis by fibroblast cell culture. **J. Toxicol. Environ. Health**, Washington D.C., v. 9, n. 5-6, p. 921-932, 1982.

CHAMSON, A.; GARRONE, R.; AVGER, C.; FREY, J. Effects of tobacco smoke extraction on the ultrastructure of fibroblasts in culture. **J. Submicrosc. Cytol.** Bologna, v. 12, n. 3, p. 401-406, 1980.

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

CHAN, L. K.; WITHEY, S.; BUTLER, P. E. Smoking and wound healing problems in reduction mammoplasty. Is the introduction of urine nicotine testing justified ? **Ann. Plast. Surg.**, v. 56, n. 2, p. 111-115, 2006.

CHIBATA, M. **Nicotina subcutânea e cicatrização da parede abdominal em ratos; estudo histológico e tensiométrico.** Curitiba, 2003. Dissertação (Mestrado em Clínica Cirúrgica) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

CHURG, D. F.; PRIOR, W. A. Free radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. **Environ. Health Perspect.**, v. 64, p. 111-126, 1985.

CLARK, R. A.; STONE, R. D.; LEUND, D. Y. K.; SILVER, I.; HOHN, D. C.; HUNT, T. K. Role of macrophages in wound repair. **Surg. Forum**, Chicago, v. 27, n. 16, p. 17-18, 1976.

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

COELHO, I. C. M. L. **Influência da desnutrição intra-uterina na cicatrização da parede abdominal de ratos lactentes avaliada mediante estudo tensiométrico e da morfometria do colágeno.** Curitiba, 2003. Tese (Doutorado em Clínica Cirúrgica). Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

COOKE, J. P.; BITTERMAN, H. Nicotine and angiogenesis: a new paradigm for tobacco-related diseases. **Ann. Med.**, Oxford, v. 36, p. 33-40, 2004.

CORNELISSEN, A. M.; STOOP, R.; HOOF, H. W. V. Myofibroblasts and matrix components in healing palatal wounds in the rat. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 29, p. 1-7, 2000.

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

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

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

DAFTARI, T. K.; WHITESIDES, T. E.; HELLER, J. G.; GOODRICH, A. C.; MCCAREY, B. E.; HUTTON, W. C. Nicotine on the revascularization of bone graft. An experimental study in rabbits. **Spine**, Hagerstown, v. 19, n. 8, p. 904-911, 1994.

DANG, C.; TING, K.; SOO, C.; et al. Fetal wound healing current perspectives. **Clin. Plast. Surg.**, v. 30, n. 1, p. 13-23, 2003.

DAVIS, J. W.; DAVIS, R. F. Acute effect of tobacco cigarette smoking on the platelet aggregate ratio. **Am. J. Med. Sci.**, Philadelphia, v. 278, n. 2, p. 139-143, 1979.

DIEGELMANN, R. F.; COHEN, I. K.; KAPLAN, A. M. The role of macrophages in wound repair: a review. **Plast. Reconstr. Surg.**, Baltimore, v. 68, n. 1, p. 107-113, 1981.

DIEGELMANN, R. F.; ROTHKOPF, L. C.; COHEN, I. K. Measurement of collagen biosynthesis during wound healing. **J. Surg. Res.**, v. 19, p. 239-243, 1975.

DUBE, M.; GREEN, C. R. Methods of collections of smoke for analytical purposes. **Recent Adv. Tobacco**. v. 8, p. 42-102, 1982.

ECKERSLEY, J. R.; DUDLEY, J. R. Wounds and wound healing. **Br. Med. Bull.**, London, v. 44, n. 2, p. 423-436, 1988.

EHRlich H. P.; KRUMMEL, T. M. Regulation of wound healing from a connective tissue perspective. **Wound Repair Regen.**, v. 4, p. 203-206, 1996.

FANG, Y.; SVOBODA, K. K. H. Nicotine inhibits myofibroblast differentiation in human gingival fibroblasts. **J. Cell. Bioch.**, v. 95, n. 6, p. 1108-1119, 2005.

FERNANDEZ, P. M. **Estudo comparativo da resistência à tração das cicatrizes nas laparotomias longitudinais e transversas em ratos**. São Paulo, 1993. Dissertação (Mestrado em Técnica Operatória e Cirurgia Experimental). Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal do Estado de São Paulo.

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

FOLKMAN, J. Angiogenesis: initiation and control. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, New York, v. 401, p. 212-227, 1982.

FORREST, L. Current concepts in soft connective tissue wound healing [review]. **Br. J. Surg.**, Guildford, v. 70, p. 133-142, 1983.

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

_____. Dose and time effects of nicotine treatment on the capillary blood flow and viability of random skin flaps in the rats. **Br. J. Plast. Surg.**, Edinburgh, v. 40, n. 3, p. 295-299, 1987.

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

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

GABBIANI, G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. **J. Pathol.**, Chichester, v. 200, p. 500-503, 2003.

GABBIANI, G.; HIRSCHL, B. J.; RYAN, G. B.; STALTKOV, P. R.; MAJNO, G. Granulation tissue as a contractile organ. **J. Exp. Med.**, New York, v. 135, p. 719-733, 1972.

GABBIANI, G.; RYAN, G. B.; MAJNO, G. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. **Experientia.**, Basel, v. 15, n. 5, p. 549-550, 1971.

GAFFNEY, E. A.; PUGH, K.; MAINI, P. K.; ARNOLD, F. Investigating a simple model of cutaneous wound healing. **J. Math. Biol.**, Berlin, v. 45, p. 337-374, 2002.

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

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A.; CIMASONI, G. **As bases farmacológicas da terapêutica.** 7 ed., Rio de Janeiro: Guanabara, 1987. p. 142-143.

GOODSON, W. H.; HUNT, T. K. Development of a new miniature method for the study of wound healing in human subjects. **J. Surg. Res.**, v. 33, p. 394-401, 1982.

GRECA, F. H.; BIONDO-SIMÕES, M. L. P.; SANTOS, E. A. A. et al. Retalho de submucosa de intestino delgado autólogo para aumento da capacidade da bexiga: estudo experimental em cães. **Rev. Col. Bras. Cir.**, v. 29, p. 294-299, 2002.

GRINNEL, F. Fibroblasts, myofibroblasts and wound contraction. **J. Cell. Biol.**, New York, v. 124, n. 4, p. 401-404, 1994.

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

HASS, L. F. Jean Nicot 1530-1600. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry**, London, v. 35, p. 430, 1992.

HARVEY, S. C.; The velocity of the growth of fibroblasts in the healing wound. **Arch. Surg.**, Chicago, v. 18, n. 4, p. 1227-1240, 1929.

HAUG, K.; IRGENS, L. M.; BASTE, V.; MARKESTAD, T.; SKJAERVEN, R.; SCHEREUDER, P. Secular trends in breastfeeding and parental smoking. **Acta Paediatr.** v. 87, p. 1023-1027, 1998.

HEESCHEN, C.; JANG, J. J.; WEIS, M.; PATHAK, A. KAY, S.; HU, R. S.; TSAO, P. J.; JOHSON, F. L.; COOKE, J. P. Nicotine stimulates angiogenesis and promotes tumor growth and atherosclerosis. **Nat. Med.**, v. 7, n. 7, p. 833-839, 2001.

HERTIG, A. T. Angiogenesis in the early human chorion and in primary placenta of the macaque monkey. **Contr. Embryol.**, v. 146, p. 37-82, 1935.

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

HINZ, B.; MASTRANGELO, D.; ISELIN, C. E.; CHAPONNIER, C.; GABBIANI, G. Mechanical tension controls granulation tissue contractile activity and myofibroblast differentiation. **Am. J. Pathol.**, Bethesda, v. 159, n. 3, p. 1009-1020, 2001.

HOLLINGER, J. O.; SCHMITT, J. M.; HWANG, K.; BUCK, D. Impact of nicotine on bone healing. **J. Biomed. Mater. Res.**, New York, v. 45, p. 294-301, 1999.

HOLM-PEDERSEN, P.; VIIDIK, A. Tensile properties and morphology of healing wounds in young and old rats. **Scand. J. Plast. Reconstr. Surg.**, v. 6, p. 24-35, 1972.

HOPKINSON, J. M.; SCHANIER, R. J.; FRALEY, J. K.; GARZA, C. Milk production by mothers of premature infant: influence of cigarette smoking. **Pediatrics**, v. 90, p. 934-938, 1992.

HORTA, B. L.; VICTORIA, C. G.; BARROS, F. C.; SANTOS, I. S.; MENEZES, A. M. B. Tabagismo em gestantes de área urbana da região sul do Brasil, 1982 e 1993. **Rev. Saúde Pública.**, v. 31, p. 247-253, 1993.

HORTA, B. L.; VICTORIA, C. G.; MENEZES, A. M.; BARROS, F. C. Environmental tobacco smoke and breastfeeding duration. **Am. J. Epidemiol.**, v. 146, p.128-133, 1997.

HOWES, E. L.; SOOY, J. W.; HARVEY, S. C. The healing of wounds as determined by their tensile strength. **J.A.M.A.**, v. 92, p. 42-48, 1929.

_____. A clinical and laboratory study of abdominal wound closure and dehiscence. **Arch. Surg.**, v. 98, p. 421-427, 1969.

HSU, S. M. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled anti-body (PAP) procedures. **J. Histochem. Cytochem.**, New York, v. 29, p. 577, 1981.

HUGHES, P. C. R.; TANNER, J. M. A longitudinal study of the growth of the black-hooded rat: methods of measurement and rates of growth for skull, limbs, pelvis, nose-rump and tail. **J. Anat.**, v. 166, p. 349-370, 1970.

HULIHAN-GIBLIN, B. A.; LUMPKIN, M. D.; KELLAR, K. J. Effects of chronic administration of nicotine on prolactin release in the rat: inactivation of prolactin response by repeated injections of nicotine. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 252, p. 21-25, 1990.

JACOBI, J.; JANG, J. J.; SUDRAM, U.; DAYOUB, A., FAJARDO, L. F.; COOKE, J. P. Nicotine accelerates angiogenesis and wound healing in genetically diabetic mice. **Am. J. Pathol.**, v. 161, n. 1, p. 97-104, 2002.

JERDAN, J. A.; MICHELS, R. G.; GLASER, B. M. Extracellular matrix of newly forming vessels – an immunohistochemical study. **Microvasc. Res.**, New York, v. 42, p. 255-265, 1991.

JHA, P.; CHALOUKKA, F. J. The economics of global tobacco control. **B.M.J.**, London, v. 116, p. 490-492, 2000.

JONES, J. K.; TRIPLETT, R. G. The relationship of cigarette smoking to impaired intraoral wound healing: a review of evidence and implications for patient care. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, Philadelphia, v. 50, p. 237-239, 1992.

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

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

JUNQUEIRA, L. C. U.; COSSERMELLI, W.; BRENTANI, R. R. Differential staining of collagen type I, II and III by sirius red and polarization microscopy. **Arch. Histol. JPN.**, v. 41, p. 267-274, 1978.

JULIA, M. V.; ALBERT, A.; MORALES, L. et al. Wound healing in the fetal period: the resistance of the scar to rupture. **J. Pediatr. Surg.**, v. 28, p. 1458-1462, 1993.

KIRKLAND, S. A.; DODDS, L. A.; BROSKY, G. The natural history of smoking during pregnancy among women in Nova Scotia. **C.M.A.J.**, v. 163, p. 281-282, 2000.

KNIGHTON, D. R.; HUNT, T. K.; SCHEUENSTUHL, H.; HALLIDAY, B. J.; WERB, Z.; BANDA, M. Oxygen tension regulates the expression of angiogenesis factor by macrophages. **Science**, Washington D.C., v. 221, p. 1283-1285, 1983.

KNIGHTON, D. R.; HUNT, T. K.; THAKRAL, K. K.; GOODSON, W. H. Role of platelets and fibrin in the healing sequence. **Ann. Surg.**, Philadelphia, v. 196, n. 4, p. 379-388, 1982.

KNOLMAYER, T. J.; CORNELL, K. M.; BOWYER, M. W. et al. Imbrication versus excision for fascial healing. **Am. J. Surg.**, v. 172, p. 506-511, 1996.

KOBAK, M. W.; BENDITT, E. P.; WISSLER, R. W. et al. The relation of protein deficiency to experimental wound healing. **Surg. Gynecol. Obstet.**, v. 85, p. 751-756, 1974.

KRUMMEL, T. M.; NELSON, J. M.; DIEGELMANN, R. F. et al. Wound healing in the fetal and neonatal rabbit. **Surg. Forum**, v. 37, p. 595-596, 1986.

LAMPSON, R. S. Quantitative study of the vasoconstriction induced by smoking. **J.A.M.A.**, Chicago, v. 104, n. 22, p. 1963-1966, 1935.

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

LAW, R. L.; HACKSHAW, A. K. Environmental tobacco smoke. **Br. Med. Bull.**, v. 52, p. 22-34, 1996.

LAWRENCE, R. A. **Breastfeeding: a guide for the medical professional**. 5th ed. New York: Mosby, p. 71, 1999.

LEHTOVIRTA, P.; FORSJ, M. The acute effect of smoking on intervillous blood flow of the placenta. **Br. J. Obstet. Gynecol.**, v. 85, p. 729-731, 1978.

LEVENSON, S. M.; GEEVER, E. V.; CROWLEY, L. V. et al. The healing of rat skin wounds. **Ann. Surg.**, v. 161, p. 293-298, 1965.

LINDSTEDT, E.; SANDBLOM, P. Wound healing in man: tensile strength of healing wounds in some patients groups. **Ann. Surg.**, v. 181, p. 842-846, 1975.

LINGEN, M. W. Role of leukocytes and endothelial cells in the development of angiogenesis in inflammation and wound healing. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, Northbrook, v. 125, n. 1, p. 67-71, 2001.

LITTEL, R. C.; MILIKEN, G. A.; STROUP, W. W.; WOLFINGER, R. D. SAS System for mixed models. North Carolina: SAS Institute Inc., SAS Campus Drive, Cary, 1996.

LONGAKER, M. T.; WHITBY, D. J.; ADZICK, N. S. et al. Studies in fetal wound healing, VI. Second and early third trimester fetal wounds demonstrate rapid collagen deposition without scar formation. **J. Pediatr. Surg.**, v. 25, p. 63-69, 1990.

LONGAKER, M. T.; WHITBY, D. J.; FERGUNSON, M. W. J. et al. Studies in fetal wound healing :III Early deposition of fibronectin distinguishes fetal from adult wound healing. **J. Pediatr. Surg.**, v. 24, p. 799-805, 1989.

LONGO, L. D.; HILL, E. P. Carbon monoxide and elimination in fetal and maternal sheep. **Am. J. Physiol.**, v. 232, p. 324-330, 1977.

LORENA, D.; UCHIO, K.; COSTA, A. M.; DESMOLIERE, A. Normal scarring: importance of myofibroblasts. **Wound Repair Regen.**, Maiden, v. 10, n. 2, p. 86-92, 2002.

LYMPEROPOULOU, A.; HAINAUT, F.; CRIMAL, P. H.; DURANA, J. L.; LOCATELLI, C.; MAISON, C. Tabac et grossesse: recherché d'une corrélation cotininémie et Doppler. **J. Gynecol. Obstet Biol Reprod.**, v. 25, p. 824-827, 1996.

MACKOOL, R. J.; GITTES, G. K.; LONGAKER, M. T.: Scarless healing. The fetal wound. **Clin. Plast. Surg.**, v. 25, n. 3, p. 357-365, 1998.

MADDEN, J. W.; PEACOCK, E. E. Studies on the biology of collagen during wound healing. **Surgery**, St. Louis, v. 64, n. 1, p. 288-294, 1968.

MAINOUS, A. G.; HEUSTON, W. T. The effect of smoking cessation during pregnancy on preterm delivery and low birth weight. **J. Farm. Pract.**, v. 38, p. 262-266, 1994.

MAJNO, G.; GABBIANI, G.; HIRSCHL, B. J.; RYAN, G. B.; STATKOV, P. R. Contraction of granulation tissue in vitro: similarity to smooth muscle. **Science**, Washington, D.C., v. 173, p. 548-550, 1972.

MANDI, J. M.; COELHO, C. P. LUNARDI, P. O uso do fumo durante o ciclo gravídico: considerações fisiopatológicas e correlação preliminar com população de 1.559 pacientes. **J.B.M.**, v. 46, p. 42-45, 1984.

MARITZ, G. S.; DENNIS, H. Maternal nicotine exposure during gestation and lactation interferes with alveolar development in the neonatal lung. **Reprod. Fertil. Dev.**, v. 10, p. 225-261, 1998.

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

MASCOLA, M. A.; VUNAKIS, H. V.; TAGER, I. B.; SPEIZER, J. P. Exposure of young infants to environmental tobacco smoke: breastfeeding among smoking mothers. **Am J. Publ. Health.**, v. 88, p. 893-896, 1998.

MAST, B. A. Healing in other tissues. **Surg. Clin. N. Am.**, v. 77, p. 529-548, 1997.

MEDEIROS, A. C.; CARVALHO, M. G. F.; OLIVEIRA MEDEIROS, M. H.; TEIXEIRA, I. C. D.; FARIA, E. D. B.; FRANÇA, M. L. F.; RAMOS, C. C. O.; DANTAS FILHO, A.M. A nicotina como fator deletério na reparação da parede abdominal. Estudo em ratos. **Rev. Ass. Med. RN**, v. 3, p. 25-28, 1997.

MEDEIROS, A. C.; LIMA, F. P.; DANTAS FILHO, A. M.; MELO, N. M. C.; AZEVEDO, I. M. A nicotina atua como fator deletério na reparação da parede abdominal. **Acta Cir. Bras.**, v. 18, n. 1. p. 19-23, 2003.

MOLLER, A. M.; VILLEBRO, N.; PEDERSEN, T.; TONNENSEN, H. Effect of preoperative smoking intervention on postoperative complications: a randomized clinical trial. **Lancet**, London, v. 359, p. 114-117, 2002.

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

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

MULLEN, P. D.; QUINN, V. P.; ERSHOFF, D. H. Maintenance of nonsmoking postpartum by women who stopped smoking during pregnancy. **A.J.P.H.**, p. 992-994, 1990.

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

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

NASH, W. A. Tração e compressão. In: _____. **Resistência dos Materiais**. São Paulo: Ed. Mc Grant Hill do Brasil, 1972, p. 11-20.

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

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

NISHIHARA, G.; PRUDDEN, J. F. A quantitative relationship of wound tensile strength to length. **Surg. Gynecol. Obstet.**, v. 107, p. 305-310, 1958.

NOLAN, J.; JEMKINS, R. A.; KURIHARA, K.; SCHULTZ, R. C. The acute effects of cigarette smoke exposure on experimental skin flaps. **Plast. Reconstruct. Surg.** Baltimore, v. 75, n. 4, p. 544-549, 1985.

OLIVEIRA NETTO, I. C. **Avaliação do tabagismo passivo pela determinação de cotinina na urina de lactentes em aleitamento materno**. (Tese) Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1991.

ORGILL, D.; DEMLING, R. H. Current concepts and approaches to wound healing. **Crit. Care Med.**, Baltimore, v. 16, n. 9, p. 899-907, 1988.

PEACOCK, E. E. Effects of dietary prolin and hidroxiprolina on tensile strength of healing wounds. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 105, p. 380, 1960.

PEACOCK, E. E. Some aspects of fibrinogenesis during the healing of primary and secondary wounds. **Surg. Gynecol. Obstet.**, New York, v.115, n.4, p.408-414, 1962.

PETTET, G. J.; BYRNE, H. M.; MCELWAIN, D. L.; NORBURY, J. A. Model of wound healing angiogenesis in soft tissue. **Math. Biosc.**, v. 136, n. 1, p. 35-63, 1996.

PINTO, J. R.; BOSCO, A. F.; OKAMOTO, T.; GUERRA, J. B.; PIZA, J. G. Effects of nicotine on the healing of extraction sockets in rats. A histological study. **Braz. Dent. J.**, v. 13, n. 1, p. 3-9, 2002.

PIRANI, B. B. K. Smoking during pregnancy. **Obstet. Gynecol Surv.** v. 33, p. 1-13, 1978.

POWELL, D. W.; MIFLIN, R. C.; VALENTICH, J. D.; CROWE, S. E.; SAADA, J. I.; WEST, A. B. Myofibroblasts. Intestinal sub-epithelial myofibroblasts. **Am. J. Physiol.**, Bethesda, v. 14, p. 183-201, 1999.

PROCKOP, D. J.; KIVIRIKKO, K. I.; TUDERMAN, L.; GUZMAN, N. A. The biosynthesis of collagen and its disorders. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 301, n. 1, p. 313-323, 1979.

QUINGLEY, M. E.; SHEEHAN, K. L.; WILKERS, M. M.; YEN, S. S. C. Effects of maternal smoking on circulating catecholamine levels and fetal heart rates. **Am J. Obstet Gynecol.**, v. 133, p. 685-690, 1979.

RAMA SASTRY, B. V.; HEMONTOLOR, M. E.; OLENICK, M. Prostaglandin E2 in human placenta: its vascular effects and activation of prostaglandin E2 formation by nicotine and cotinine. **Pharmacology**, v. 59, p. 70-86, 1999.

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

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

RENAUD, S.; BLANCHE, D.; DUMONT, E.; THEVENON, C.; WISSENDANGER, T. Platelet function of the cigarette smoking in the relation to nicotine and carbon monoxide. **Clin. Pharmacol. Ther.**, St. Louis, v. 36, n. 3, p. 389-395, 1984.

REUS, W. F.; COLEN, L. B.; STRAKER, D. J. Tobacco smoking and complications in elective microsurgery. **Plast. Reconstr. Surg.**, Baltimore, v. 89, n. 3, p. 490-494, 1992.

REUS, W. F.; ROBSON, L.; ZACHARY, L.; HEGGERS, J. P. Acute effects of tobacco smoking on blood flow in the cutaneous micro-circulation. **Br. J. Plast. Surg.**, Edinburgh, v. 37, n. 2, p. 213-215, 1984.

RICHARSON, D. R.; COATS, F. Early effects of tobacco smoke exposure on vascular dynamics in the microcirculation. **J. Appl. Physiol.**, v. 39, n. 1, p. 119-123, 1975.

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

RIEBEL, G. D.; BODEN, S. D.; WHITESIDES, T. E.; HUTTON, W. C. The effect of nicotine on incorporation of cancellous bone graft in the animal model. **Spine**, Hagerstown, v. 20, n. 20, p. 2198-2202, 1995.

RISAU, W. Mechanisms of angiogenesis. **Nature**, London, v. 386, p. 671-674, 1997.

RODRIGUES-PINTO, G.; BOTELHO, C. Influência do tabagismo no sistema vascular materno-fetal: estudo com doppler velocimetria. **R.B.G.O.**, v. 22, p. 641-646, 2000.

RUITER, D. J.; SCHLINGEMANN, R. O.; WESTPHAL, J. R.; DENIJN, M.; RIETVELD, F. J.; DE WAAL, R. M. Angiogenesis in wound healing and tumor metastasis. **Behring Inst. Mitt.**, v. 92, p. 258-272, 1993.

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

SAID, G.; PATOIS, E.; LELLOUCH, J. Infantile colic and parenteral smoking. **Br. Med. J.**, v. 289, p. 660, 1984.

SALAZAR, G.; GARCIA, C.; BERLANGA, R.; AHUMADA, M.; SERÓN-FERRÉ, M.; VIO, F. Effect of maternal smoking on offspring growth. **Rev. Med. Chile.**, v. 126, p. 1059-1064, 1998.

SARIN, C. L.; AUSTINE, J. C.; NICKEL, W. O. Effects of smoking on digital blood-flow velocity. **J.A.M.A.**, v. 229, n. 10, p. 1327-1328, 1974.

SEID, M. H.; OWENS, M. M.; POOLE, G. V.; MEEKS, G. M. A randomized trial of abdominal incision suture technique and wound strength in rats. **Arch. Surg.**, v. 130, p. 394-397, 1995.

SERINI, G.; GABBIANI, G. Mechanisms of myofibroblast activity and phenotypic modulation. **Exp. Cell. Res.**, Orlando, v. 250, p. 273-283, 1999.

SCHERER, G.; CONZEC, C.; MEYRINCK, L. V. Importance of exposure to gaseous and particulate phase components of tobacco smoke in active and passive smokers. **Arch. Occup. Environ. Health.**, v. 62, p. 459-466, 1990.

SCHURCH, W.; SEEMAYER, T.; GABBIANI, G. The myofibroblast. A quarter century after its discovery. **Am. J. Surg. Pathol.**, New York, v. 22, n. 2, p. 141-147, 1998.

SHAFÉY, O.; OKKINIDES, V.; CAVALCANTE, T. M.; TEIXEIRA, M.; THUN, M. Case studies in international tobacco surveillance: cigarette smuggling in Brazil. **Tab. Control.**, Atlanta, v. 11, n. 3, p. 215-219, 2002.

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

SHULTE-HOBEIN, B.; SCHWARTZ-BICKENBACH, D.; ABT, S.; PLUM, C.; NAU, H. Cigarette smoke exposure and development of infants throughout the first year of life: influence of passive smoking and nursing on cotinine levels in breast milk and infant's urine. **Acta Paediatr.**, v. 81, p. 550-571, 1992.

SINGER, A. J.; CLARK, R. A. Cutaneous wound healing. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 341, p. 738-746, 1999.

SKALLI, O.; ROPRAZ, P.; TRZECIAK, A.; BENZONANA, G.; GILLESSEN, D.; GABBIANI, G. A monoclonal antibody against α -smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. **J. Cell. Biol.**, New York, v. 103, n. 6, p. 2787-2796, 1986.

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

_____. **A influência da nicotina na cicatrização de anastomoses do intestino delgado em ratos: angiogênese e miofibroblastos.** Curitiba, 2005. Tese (Doutorado em Clínica Cirúrgica) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

SMITH, M.; ENQUIST, I. F. A quantitative study of impaired healing resulting from infection. **Surg. Gynecol. Obstet.**, v. 125, p. 965-975, 1967.

SOMASUNDARAM, K.; PRATHAP, K. Intra-uterine healing of skin wounds in rabbit fetuses. **J. Pathol.**, v. 100, p. 81-86, 1970.

SORENSEN, L. T.; KARLSMARK, T.; GOTTRUP, F. Abstinence from smoking reduces incisional wound infection: a randomized controlled trial. **Ann. Surg.**, v. 238, n. 1, p. 1-5, 2003.

SUZUKI, K.; MINEI, L. J.; JOHNSON, E. E. Effect of nicotine upon uterine flow in the pregnant rhesus monkey. **Am. J. Obst. Gynecol.**, v. 87, p. 780-785, 1980.

SWEAT, F.; PUTCHLER, H.; ROSENTHAL, S. I. Sirius red F3BA as a stain for connective tissue. **Arch. Pathol.**, Chicago, v. 78, n. 1, p. 69-72, 1964.

TERA, H.; ABERG, C. Tissue strength of structures involved in musculo-aponeurotic layer in laparotomy incisions. **Acta Chir. Scand.**, v. 142, p. 349-355, 1976.

TERKEL, J.; BLAKE, C. A.; HOOVER, V.; SAWYER, C. H. Pups survival and prolactin levels in nicotine treated lactating rats. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 143, p. 1131-1135, 1973.

TIPTON, D. A.; DABBOUS, M. K. Effects of nicotina on proliferation and extracellular matrix production of human gingival fibroblasts in Vitro. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 66, n. 12, p. 1056-1064, 1995.

TOMASEK, J. J.; GABBIANI, G.; HINZ, B.; CHAPONNIER, C.; BROWN, R. A. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodeling. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.**, London, v. 3, p. 349-363, 2002.

TONNESEN, M. G.; FENG, X.; CLARK, R. A. F. Angiogenesis in wound healing. **J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.**, Maiden, v. 5, n. 1, p. 40-46, 2000.

TORRES, L. F. B.; SLUMINSKY, B. G.; TIRONI, F. A.; NORONHA, L.; GIRON, R. L.; TELLES, J. E. Q. Contribuição da imunohistoquímica em patologia cirúrgica: experiência de 10 anos. **Rev. Med. Paraná**, Curitiba, v. 56, n. 2/2, p. 31-38, 1998.

TRIMBOS, J. B.; SMITH, I. B.; HOLM, J. P. et al. A randomized clinical trial comparing two methods of fascia closure following midline laparotomy. **Arch. Surg.**, v. 127, p. 1232-1234, 1992.

TYRONE, J. W.; MARCUS, J. R.; BONOMO, S. R. et al. Transforming growth factor β_3 promotes fascial wound healing in a new animal model. **Arch. Surg.**, v. 135, p. 1154-1159, 2000.

VALENTINE, J. D.; HOKANSON, J. S.; MATTA, S. G.; SHARP, B. M. Self-administration in rats allowed unlimited access to nicotine. **Psychopharmacology**, Berlin, v. 133, n. 3, p. 300-304, 1997.

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

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

VIGGIANO, M. G. C.; CAIXETA, A. M.; BARBACENA, M. L. CAIXETA, A. M. Fumo e gravidez: repercussões sobre o conceito e placenta. **J. Bras. Ginec.**, v. 100, p. 147-152, 1990.

VILLABLANCA, A. C.; Nicotine stimulates DNA sintesis and proliferation in vascular endothelial cells in vitro. **J. Appl. Physiol.**, Bethesda, v. 84, n. 6, p. 2089-2098, 1998.

VIO, F.; SALAZAR, G.; INFANTE, C. Smoking during pregnancy and lactation and its effects on breast milk volume. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 54, p. 1011-1016, 1993.

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

WALDHAUSEN, J. H. T.; DAVIES, L. Pediatric abdominal wound dehiscence: transverse versus vertical incisions. **J. Am. Coll. Surg.**, v. 190, p. 688-691, 2000.

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

WEINBERGER, S. E.; WEISS, S. T. **Doenças pulmonares**. In: Burrow, G.N.; Ferris, T. F.; editors. *Complicações clínicas durante a gravidez*. 4 ed. São Paulo: Roca; 1996, p.431-474.

WEISS, S. T.; TAGER, I. B.; SCHENCKER, M.; SPEIZER, F. E. The health effects of involuntary smoking. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 128, p. 933-942, 1983.

WERNER, B. **Indicações e contribuição diagnóstica da imuno-histoquímica em patologia cirúrgica**. Curitiba, 2002. Dissertação (Mestrado em Clínica Cirúrgica) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

WESTFALL, T. C. **Bloqueadores nicotínicos**. In: Craig, C.R.; Stizel, R.E. *Farmacologia Aplicada*. São Paulo: Roca; 1986, p. 185-193.

WICHELOW, M. J.; KING, B. E. Breastfeeding and smoking. **Arch. Dis. Child.**, v. 54, p. 240-241, 1979.

WILCOX, A. J.; BAIRD, D. D.; WEINBERG, C. R. Do women with childhood exposure to cigarette smoking have increased fecundability ? **Am. J. Epidemiol.**, v. 129, p. 1079-1083, 1989.

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

WOODWARD, A.; HAND, K. Smoking and reduced duration of breastfeeding. **Med. J. Aust.**, v. 148, p. 477-478, 1988.

ZIMMERMAN, M. C.; MC GEACHE, J. The effect of nicotine on aortic endothelium. A quantitative ultrastructural study. **Atherosclerosis**, Limeriek, v. 63, p. 33-41, 1987.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 - SELEÇÃO DOS FILHOTES SEGUNDO O GRUPO DA MÃE E DATA DO SACRIFÍCIO

NÚMERO DE FILHOTES				
Grupo	Mãe	7 dias	21 dias	Total
C	GC8	7		7
C	GC12	8		8
C	GC9		8	8
C	GC10		7	7
N	GN9	7		7
N	GN15	8		8
N	GN3		7	7
N	GN7		8	8
Total		30	30	60

GC: Grupo Controle
GN: Grupo Nicotina

APÊNDICE 2 - PESO DAS RATAS NA GESTAÇÃO E LACTAÇÃO DOS GRUPOS C E N

GRUPO	PESO NA GESTAÇÃO (g)				PESO NA LACTAÇÃO (g)				
	Rata n.º	Dia 2	Dia 8	Dia 14	Dia 20	Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 21
C8		290	311	385	405	296	314	332	347
C9		259	284	349	375	286	294	317	328
C10		245	274	349	371	281	292	304	311
C12		244	273	326	355	273	264	272	284
N3		270	278	335	354	270	268	280	289
N7		254	289	360	379	274	286	323	325
N9		264	282	340	368	267	279	289	301
N15		274	300	357	371	277	321	331	327

APÊNDICE 3 – VARIÁVEIS DOS FILHOTES DOS GRUPOS C E N SACRIFICADOS NO 7.º DIA DE PÓS-OPERATÓRIO

ANIMAIS SACRIFICADOS NO 7.º DIA DE PÓS-OPERATÓRIO - GRUPOS CONTROLE E NICOTINA											
GRUPO	PESO NA LACTAÇÃO (g)				MDC (%)		IMUNO-ISTOQUÍMICA		TENSIOMETRIA		
	Rato n.º	Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 21	Tipo I	Tipo III	MNM	MNVS	T	FM
C8-1	7,42	16,5	24,53	45,25	50,52	49,47	15	16	0,032	0,56	0,579
C8-2	7,54	17,73	27,04	40,63	40,72	59,27	15	12	0,042	0,59	0,6
C8-3	7,89	18,78	27,73	33,05	30,44	69,55	35	8	0,044	0,57	0,589
C8-4	8,87	17,04	33,76	44,18	48,24	51,75	28	9	0,028	0,55	0,55
C8-6	8,18	17,69	28,74	42,41	67,53	32,46	15	14	0,04	0,58	0,59
C8-7	7,53	16,74	25,59	53,67	36,11	63,88	17	15	0,046	0,68	0,68
C8-8	6,73	16,74	23,1	40,59	60,24	39,75	22	9	0,032	0,53	0,54
C12-2	7,16	20,22	33,12	44,65	43,63	56,63	33	10	0,032	0,579	0,69
C12-3	8,34	19,58	31,38	49,58	29,04	70,95	36	7	0,042	0,587	0,59
C12-4	8,15	20	32,01	48,62	25,74	64,37	30	25	0,039	0,578	0,59
C12-6	7,43	17,54	30,11	45,46	26,07	73,92	13	19	0,028	0,556	0,591
C12-7	8,58	20,07	32,84	50,12	45,18	54,81	10	20	0,038	0,6	0,589
C12-8	9,28	17,36	30	52	66,12	33,87	22	11	0,032	0,59	0,584
C12-9	8,41	19,64	31,69	50	59,03	40,96	27	8	0,03	0,521	0,53
C12-10	8,16	19,34	31,01	47,46	70,43	29,56	10	18	0,039	0,581	0,49
N9-1	8,08	12,15	28,44	42,18	25,28	74,71	10	6	0,031	0,422	0,42
N9-2	7,86	14,2	30,26	40,63	16,86	83,13	10	12	0,03	0,408	0,4
N9-3	7,11	14,75	31,61	39,77	26,04	73,95	10	11	0,029	0,382	0,38
N9-7	7,72	19,91	29,99	40,33	47,58	52,41	15	3	0,032	0,426	0,42
N9-8	6,95	16,35	30,19	37,44	20,48	79,51	10	6	0,029	0,4	0,39
N9-9	8,16	13,73	29,44	45,9	10,67	89,32	16	5	0,027	0,342	0,34
N9-10	6,98	11,59	29,27	38,21	13,74	86,25	7	19	0,03	0,4	0,395
N15-2	5,99	12,27	21,39	29,47	23,51	76,48	15	7	0,031	0,42	0,39
N15-3	6,64	12,53	21,69	31,53	26,72	73,27	10	9	0,027	0,4	0,397
N15-4	9,04	14,74	23,77	37,57	28,98	71,01	7	8	0,027	0,4	0,377
N15-5	8,29	13,07	22,25	33,9	15,77	84,22	8	4	0,032	0,42	0,41
N15-7	6,21	11,38	20,61	30,63	18,98	81,01	8	5	0,028	0,39	0,379
N15-8	8,51	15,63	24,29	34,38	23,47	76,52	7	15	0,03	0,39	0,4
N15-9	8,84	16,32	24,52	35,67	29,39	70,6	9	5	0,03	0,4	0,439
N15-11	6,27	12,6	21,23	29,17	34,76	65,23	7	10	0,024	0,3	0,32

MDC: Média da Deposição do Colágeno
 MNM: Média do Número de Miofibroblastos
 MNVS: Média do Número de Vasos Sangüíneos
 T: Tensão
 FM: Força Máxima
 FR: Força de Ruptura

APÊNDICE 4 – VARIÁVEIS DOS FILHOTES DOS GRUPOS C E N SACRIFICADOS NO 21.º DIA DE PÓS-OPERATÓRIO

ANIMAIS SACRIFICADOS NO 21.º DIA DE PÓS-OPERATÓRIO - GRUPOS CONTROLE E NICOTINA											
GRUPO	PESO NA LACTAÇÃO (g)				MDC (%)		IMUNO-ISTOQUÍMICA		TENSIOMETRIA		
	Rato n.º	Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 21	Tipo I	Tipo III	MNM	MNVS	T	FM
C9-1	6,55	11,29	22,93	29,89	86,35	13,64	9	18	0,065	1,124	0,583
C9-4	7,78	14,44	27,96	32,71	87,91	12,08	7	10	0,064	1,126	0,584
C9-5	6,73	11,99	24,34	30,58	45,33	54,66	5	10	0,067	1,128	0,586
C9-6	5,84	10,82	21,71	31,62	70,79	29,2	13	20	0,067	1,127	0,589
C9-7	7,11	12,7	25,51	30,34	66,42	33,57	9	6	0,063	1,126	0,587
C9-8	7,76	14,41	27,36	29,37	65,83	34,16	15	19	0,066	1,127	0,586
C9-9	6,67	11,71	24,05	28,92	94,25	5,74	21	8	0,069	1,129	0,584
C9-10	6,09	10,98	21,95	32,17	67,94	32,05	13	11	0,071	1,129	0,586
C10-1	6,42	11,85	21,29	34,43	59,48	40,51	12	15	0,065	1,095	0,584
C10-2	5,39	11,2	22,61	39,94	90,79	9,2	5	10	0,066	1,091	0,583
C10-4	6,06	14,44	27,96	36,92	71,99	28	5	9	0,067	1,09	0,581
C10-5	7,01	11,99	24,34	37,45	64,29	35,7	5	18	0,064	1,099	0,585
C10-6	6,32	10,86	19,42	33,1	73,59	26,4	12	15	0,067	1,096	0,584
C10-8	7,46	12,7	25,51	35,77	58,5	41,49	18	12	0,067	1,093	0,581
C10-9	5,67	14,41	27,36	34,44	78,18	21,81	31	13	0,063	1,095	0,582
N3-1	6,57	13,34	26,43	35,45	51,73	48,26	10	13	0,056	1,035	0,419
N3-3	5,22	13,03	25,28	32,34	61,14	38,85	5	9	0,054	1,036	0,414
N3-4	6,09	10,83	21,83	30,07	60,07	39,92	10	10	0,049	1,032	0,416
N3-5	4,87	12,85	24	32,39	51,95	48,04	2	6	0,048	1,031	0,415
N3-7	6,59	14,96	26,92	35,13	66,88	33,11	4	13	0,052	1,036	0,418
N3-8	6,35	10,82	21,84	34,44	84,84	15,15	10	12	0,052	1,041	0,417
N3-9	6,16	12,34	23,86	32,61	70,96	29,03	6	10	0,053	1,043	0,415
N7-1	7,13	14,53	27,6	37,61	53,29	46,07	10	8	0,05	1,061	0,422
N7-2	6,22	11,65	24,05	34,66	47,37	52,62	2	10	0,053	1,058	0,425
N7-6	6,25	14,26	26,59	39,32	55,11	44,88	10	12	0,056	1,057	0,426
N7-7	3,45	13,06	25,14	35,22	66,78	33,21	7	6	0,055	1,056	0,424
N7-8	6,92	13,04	24,97	35,8	45,56	54,43	2	8	0,052	1,062	0,425
N7-9	7,15	14,46	27,56	37,84	54,51	45,48	7	7	0,054	1,064	0,428
N7-10	7,37	13,96	25,9	38,77	74,09	25,9	15	7	0,054	1,063	0,425
N7-11	4,99	10,07	22,82	34,56	62,23	37,76	12	11	0,056	1,068	0,422

MDC: Média da Deposição do Colágeno

MNM: Média do Número de Miofibroblastos

MNVS: Média do Número de Vasos Sangüíneos

T: Tensão

FM: Força Máxima

FR: Força de Ruptura

APÊNDICE 5 - PROTOCOLO DE ESTUDO DAS MÃES

MÃE GRUPO:
 N.º
 DATA NASCIMENTO:
 N.º FILHOTES:
 EVOLUÇÃO GESTAÇÃO:
 EVOLUÇÃO LACTAÇÃO:

PESO NA GESTAÇÃO(g)				PESO NA LACTAÇÃO(g)			
Dia 2	Dia 8	Dia 14	Dia 20	Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 21
DOSE(ml)				DOSE(ml)			

APÊNDICE 6 - PROTOCOLO DE ESTUDO DOS FILHOTES

GRUPO: ANIMAL N.º : DATA CIRURGIA: SACRIFÍCIO DIA: PO

EVOLUÇÃO:

PESO NA LACTAÇÃO (g)				MDC (%)		IMUNO-ISTOQUÍMICA		TENSIOMETRIA		
Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 21	Tipo I	Tipo III	MNM	MNVS	T	FM	FR

MDC: Média da Deposição do Colágeno

MNM: Média do Número de Miofibroblastos

MNVS: Média do Número de Vasos Sangüíneos

T: Tensão

FM: Força Máxima

FR: Força de Ruptura