

**SILVANA MARQUES E SILVA**

**ESTUDO DA CICATRIZAÇÃO DE ANASTOMOSES NO CÓLON ESQUERDO DE  
RATOS COM SEPSE ABDOMINAL INDUZIDA E TRATADOS COM DROGAS  
PROCINÉTICAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor.

Área de concentração: Medicina

Orientador: Prof. Dr. João Batista de Sousa

**BRASÍLIA – DF  
2011**

**SILVANA MARQUES E SILVA**

**ESTUDO DA CICATRIZAÇÃO DE ANASTOMOSES NO CÓLON ESQUERDO DE  
RATOS COM SEPSE ABDOMINAL INDUZIDA E TRATADOS COM DROGAS  
PROCINÉTICAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor.

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. João Batista de Sousa

---

Prof. Dr. Antônio Carlos Ribeiro Garrido Iglesias

---

Prof. Dr. José Eduardo de Aguiar Siqueira do Nascimento

---

Prof. Dr. Ronaldo Mafia Cuenca

---

Prof. Dr. Paulo Gonçalves de Oliveira

Suplente:

---

Prof. Dr. Leopoldo Luiz dos Santos Neto

Aos meus pais, pelo amor, carinho e dedicação.

Às minhas irmãs, pelo apoio durante esta e outras caminhadas.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. João Batista de Sousa, o primeiro a me despertar para a pós-graduação, que com sua experiência e dedicação proporcionou momentos de muito aprendizado e crescimento profissional e pessoal.

Ao Prof. Dr. Paulo Gonçalves de Oliveira, pelos ensinamentos e incentivo ao pensamento crítico.

Ao Prof. Romulo Medeiros de Almeida, pela confiança, apoio e disponibilidade a todo momento.

Ao Dr. Antônio Carlos Nóbrega dos Santos e Dr. José Guilherme Filho, pela grande contribuição em minha formação profissional.

Aos companheiros de trabalho Dra. Isabel Ferreira Saenger, Dr. Marcelo de Melo Andrade Coura e Dra. Valéria Cardoso Pinto, pelo estímulo.

Aos acadêmicos de medicina Alexandre Malta Brandão, Marcos Vinícius Melo de Oliveira, Pedro Henrique Alves de Moraes e Naiara Galvão da Silva, pela amizade, dedicação e companheirismo, em especial nas dificuldades do início desta jornada.

Aos veterinários e funcionários do laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, em especial à veterinária Gabriela Mariângela Farias de Oliveira, pelas lições no manejo dos animais, ajuda nos procedimentos operatórios e apoio emocional nos momentos de tribulação; e ao Sr. José Tavares dos Santos, o Seu Dedé, pela ajuda imprescindível no transporte dos animais.

À Sra. Tercia Lousa de Castro, pelas várias horas dedicadas à confecção das lâminas utilizadas neste trabalho.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Fabiana Pirani Carneiro, pela avaliação histopatológica, imuno-histoquímica, análise do colágeno e fotografias das lâminas apresentadas nesta tese.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Anamélia Lorenzetti Bocca e ao colega de pós-graduação Márcio Sousa Gerônimo, pela realização das análises de RNA.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Vânia Maria Morais Ferreira pelas orientações quanto às drogas utilizadas.

Ao Prof. Dr. Omar Feres e a todos os membros do Laboratório de Bioquímica e Transplante Hepático da Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, pela realização das dosagens de hidroxiprolina.

Ao Prof. Dr. Ruy de Souza Lino Júnior, pelas orientações quanto à análise do colágeno.

Aos professores de pós-graduação, pelos ensinamentos.

Aos colegas de pós-graduação Maria Lucia Campos Gonçalves, Samantha Figueiredo Frota Fernandes e Leonardo de Castro Durães, por dividirem comigo momentos de tensão e alegria.

Aos queridos amigos Alexandre Khodr Furtado, Bianca Andrade Bastos, Luciana Azor Dib, Raquel Mara Teixeira e Soraia Barroso de Almeida, pelo apoio em todos os momentos.

À Universidade de Brasília, por ter tornado possível a realização desta pesquisa.

“A sabedoria não nos é dada. É preciso descobri-la por nós mesmos, depois de uma viagem que ninguém nos pode poupar ou fazer por nós.”

Marcel Proust

## RESUMO

**Objetivo:** Avaliar os efeitos da metoclopramida e da bromoprida na cicatrização de anastomoses no cólon esquerdo de ratos na presença ou ausência de sepse abdominal. **Método:** 120 ratos distribuídos em dois grupos contendo 60 animais cada, para eutanásia no 3° ou no 7° dia de pós-operatório (DPO). Cada grupo foi dividido em 2 subgrupos com trinta animais cada, para operações na ausência ou presença de sepse abdominal induzida (ligadura e punção do ceco). Cada subgrupo foi dividido em três subgrupos contendo dez animais cada, para administração de metoclopramida, bromoprida ou solução de NaCl a 0,9%. Os ratos foram submetidos à ressecção de um segmento do cólon esquerdo e anastomose término-terminal. No dia da re-laparotomia foi avaliada a quantidade total de aderências e foi removido um segmento colônico para análise. **Resultados:** Não houve mortes relacionadas a complicações anastomóticas. A administração de drogas procinéticas na ausência de sepse abdominal provocou menor porcentagem de cobertura da anastomose por aderências no 3° DPO ( $p=0,02$ ). Houve diminuição da força de ruptura das anastomoses nos animais tratados com bromoprida ( $p=0,01$ ) no 3° DPO. No 7° DPO, os animais tratados com drogas procinéticas tiveram menor redução da concentração de hidroxiprolina que os animais controle ( $p=0,05$ ). Houve aumento da expressão dos genes para metaloproteinase (MMP) 1a, 8 e 13 e interleucina (IL) 6 no 3° DPO, com retorno dos valores à linha de base no 7° DPO. A administração de drogas procinéticas na presença de sepse abdominal não alterou a formação de aderências. As anastomoses dos animais tratados com bromoprida tiveram menores valores de força de ruptura ( $p=0,01$ ) e maior redução na concentração de hidroxiprolina ( $p=0,03$ ) no 3° DPO, sendo estas alterações associadas à maior expressão dos genes para MMP. Os dois subgrupos de animais tratados apresentaram aumento da expressão do gene de fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) no 3° DPO. Apresentaram ainda maior porcentagem de colágeno no 7° DPO ( $p=0,05$ ). Não houve diferença em relação aos achados histopatológicos e imuno-histoquímica para fator de crescimento derivado do endotélio (VEGF) em todos os subgrupos. **Conclusão:** A droga procinética bromoprida prejudicou a cicatrização das anastomoses no cólon esquerdo de ratos no 3° DPO, tanto na presença quanto na ausência de sepse abdominal induzida. A metoclopramida não apresentou efeito deletério sobre a cicatrização.

**Descritores:** Anastomose intestinal. Cólon. Metoclopramida. Bromoprida. Motilidade intestinal. Aderências tissulares. Ratos.

## ABSTRACT

**Purpose:** To evaluate the effects of metoclopramide and bromopride on healing of left colonic anastomoses in rats with or without abdominal sepsis. **Methods:** 120 rats underwent resectioning of the left colon and end-to-end anastomosis and were divided into two groups of 60 animals each to be killed on the third (3<sup>rd</sup>) or seventh (7<sup>th</sup>) postoperative day (PO). Each group were divided in two subgroups of 30 animals for operation in the presence or absence of sepsis induced by cecal ligation and puncture, and then for the administration of metoclopramide, bromopride or saline. The amount of adhesions was evaluated and a segment of the colon was removed for analysis. **Results:** There were no deaths related to dehiscence. Treated group in absence of induced sepsis had lower adhesions to the anastomoses on the 3<sup>rd</sup> PO (p= 0,02). Animals that received bromoprida had lower breaking strength (p=0,01) on the 3<sup>rd</sup> PO. On the 7<sup>th</sup> PO, they had lower reduction of hydroxyproline concentration (p=0,05). There were a rise of metalloproteinase (MMP) 1a, 8 e 13 and IL6 gene expression on the 3<sup>rd</sup> PO. Treatment on the presence of abdominal sepsis do not enlarge intra-cavity adhesion. Animals that received bromopride had lower breaking strength (p=0,01) and hydroxyproline concentration (p=0,03) on 3<sup>rd</sup> PO and had higher MMP gene expression. Animals treated by prokinetic drugs had enhancement of tumor necrosis factor (TNF)  $\alpha$  gene expression on the 3<sup>rd</sup> PO. No significant differences between groups were found in histopathology and immunohistochemistry for vascular endothelial growth factor (VEGF). **Conclusion:** The prokinetic drug bromoprida impaired anastomotic healing of the left colon of rats on the 3<sup>rd</sup> PO, both in the presence or absence of abdominal sepsis. Metoclopramida did not have harmful effect.

**Key words:** Anastomosis. Colon. Metoclopramide. Bromopride. Gastrointestinal Motility. Tissue Adhesions. Rats.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Alocação dos animais em grupos e subgrupos de acordo com o dia de eutanásia, indução de sepse abdominal e droga procinética administrada .	30
Figura 2-	Alojamento dos animais no Laboratório de Cirurgia Experimental .....	31
Figura 3-	Laparotomia mediana com 4 cm de extensão .....	32
Figura 4-	Posicionamento de afastador auto-estático e exposição do cólon distal ....	33
Figura 5-	Ressecção do cólon esquerdo entre 2,5 e 3,0 cm acima da reflexão peritoneal.....	34
Figura 6 -	Justaposição das extremidades da alça do cólon .....	34
Figura 7 -	Anastomose colo-colônica término-terminal .....	35
Figura 8 -	A: Ligadura parcial do ceco, B: Perfuração do ceco e C: Expressão do conteúdo fecal.....	36
Figura 9 -	Processo de reabertura da cavidade abdominal .....	38
Figura 10 -	A: Segmento anastomótico com estruturas aderidas, B: Segmento anastomótico após liberação das aderências .....	39
Figura 11 -	Divisão do segmento colônico contendo a anastomose em três porções ....	40
Figura 12 -	Aparelho de ensaio digital para determinação da força de ruptura da anastomose .....	41
Figura 13 -	Corte histológico: histomorfometria do colágeno das lâminas à microscopia por luz polarizada (picro-sirius, 10X) .....	58
Figura 14 -	Corte histológico: neovasos e edema em área de tecido de granulação (HE,200X) .....	59
Figura 15 -	Corte histológico: úlcera (1) e crosta fibrinoleucocitária (2) (HE,100X) ...	59
Figura 16 -	Corte histológico: infiltrado de polimorfonucleares(1), colônias bacterianas(2) e necrose (3) em área de abscesso HE,400X) .....	60
Figura 17 -	Corte histológico: granuloma do tipo corpo estranho com fio de sutura (seta) e infiltrado de mononucleares em área de fibrose (HE,200X) .....	61
Figura 18 -	Corte histológico: fibroblastos, colágeno, neovasos e infiltrado de mononucleares em área de fibrose (HE,200X) .....	61
Figura 19 -	Expressão imuno-histoquímica (coloração marrom) de VEGF em vasos, fibroblastos e leucócitos na área da anastomose, 400X .....	62
Figura 20 -	Peritonite fecal à reabertura da cavidade abdominal em animal do subgrupo SS3 .....	66

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Mediana e valores intervalares da força de ruptura das anastomoses avaliadas no 3º dia de pós-operatório na ausência de sepse abdominal .....	53
Gráfico 2 -	Mediana e valores intervalares da força de ruptura das anastomoses avaliadas no 7º dia de pós-operatório na ausência de sepse abdominal .....	54
Gráfico 3 -	Mediana e valores intervalares da variação do conteúdo de hidroxiprolina das anastomoses avaliadas no 3º dia de pós-operatório na ausência de sepse abdominal .....	56
Gráfico 4 -	Mediana e valores intervalares da variação do conteúdo de hidroxiprolina das anastomoses avaliadas no 7º dia de pós-operatório na ausência de sepse abdominal .....	57
Gráfico 5 -	Mediana e valores intervalares da força de ruptura das anastomoses avaliadas no 3º dia de pós-operatório .....	69
Gráfico 6 -	Mediana e valores intervalares da força de ruptura das anastomoses avaliadas no 7º dia de pós-operatório .....	70
Gráfico 7 -	Mediana e valores intervalares da força de ruptura das anastomoses avaliadas no 3º dia de pós-operatório na presença de sepse abdominal .....	78
Gráfico 8 -	Mediana e valores intervalares da força de ruptura das anastomoses avaliadas no 7º dia de pós-operatório na presença de sepse abdominal .....	79
Gráfico 9 -	Mediana e valores intervalares da variação do conteúdo de hidroxiprolina das anastomoses avaliadas no 3º dia de pós-operatório na presença de sepse abdominal .....	81
Gráfico 10 -	Mediana e valores intervalares da variação do conteúdo de hidroxiprolina das anastomoses avaliadas no 7º dia de pós-operatório na presença de sepse abdominal .....	82

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Genes e oligonucleotídeos utilizados na qRT-PCR .....	46
Tabela 2-	Mortes ocorridas durante o período pós-operatório .....	48
Tabela 3 -	Número de animais com achados intra-operatórios positivos à re-abordagem realizada no 3º dia de pós-operatório na ausência de sepse abdominal .....	50
Tabela 4 -	Número de animais com achados intra-operatórios positivos à re-abordagem realizada no 7º dia de pós-operatório na ausência de sepse abdominal .....	50
Tabela 5 -	Número de animais com cada um dos escores de Nair à re-abordagem realizada no 3º dia de pós-operatório na ausência de sepse abdominal .....	51
Tabela 6 -	Número de animais com cada um dos escores de Nair à re-abordagem realizada no 7º dia de pós-operatório na ausência de sepse abdominal .....	51
Tabela 7 -	Número de animais com cada uma das porcentagens da anastomose cobertas por aderências à re-abordagem realizada no 3º dia de pós-operatório na ausência de sepse abdominal .....	51
Tabela 8 -	Número de animais com cada uma das porcentagens da anastomose cobertas por aderências à re-abordagem realizada no 7º dia de pós-operatório na ausência de sepse abdominal .....	52
Tabela 9 -	Número de animais com cada estrutura aderida à anastomose à re-abordagem realizada no 3º dia de pós-operatório na ausência de sepse abdominal .....	52
Tabela 10 -	Número de animais com cada estrutura aderida à anastomose à re-abordagem realizada no 7º dia de pós-operatório ausência de sepse abdominal .....	52
Tabela 11 -	Força de ruptura das anastomoses avaliadas no 3º dia de pós-operatório na ausência de sepse abdominal .....	53
Tabela 12 -	Força de ruptura das anastomoses avaliadas no 7º dia de pós-operatório na ausência de sepse abdominal .....	54
Tabela 13 -	Variação da concentração de hidroxiprolina das anastomoses avaliadas no 3º dia de pós-operatório na ausência de sepse abdominal .....	55
Tabela 14 -	Variação da concentração de hidroxiprolina das anastomoses avaliadas no 7º dia de pós-operatório na ausência de sepse abdominal .....	55
Tabela 15 -	Fração da área coberta por colágeno das anastomoses avaliadas no 7º dia de pós-operatório na ausência de sepse abdominal .....	57
Tabela 16 -	Fold das anastomoses avaliadas no 3º dia de pós-operatório na ausência de sepse abdominal .....	63

Tabela 17 -	Fold das anastomoses avaliadas no 7° dia de pós-operatório na ausência de sepse abdominal .....	63
Tabela 18 -	Fold das anastomoses avaliadas no 3° dia de pós-operatório na ausência de sepse abdominal .....	63
Tabela 19 -	Fold das anastomoses avaliadas no 7° dia de pós-operatório na ausência de sepse abdominal .....	64
Tabela 20 -	Número de animais com achados intra-operatórios positivos à re-abordagem realizada no 3° dia de pós-operatório .....	65
Tabela 21 -	Número de animais com achados intra-operatórios positivos à re-abordagem realizada no 7° dia de pós-operatório .....	65
Tabela 22 -	Número de animais com cada um dos escores de Nair à re-abordagem realizada no 3° dia de pós-operatório .....	67
Tabela 23 -	Número de animais com cada um dos escores de Nair à re-abordagem realizada no 7° dia de pós-operatório .....	67
Tabela 24 -	Número de animais com cada uma das porcentagens da anastomose cobertas por aderências à re-abordagem realizada no 3° dia de pós-operatório .....	67
Tabela 25 -	Número de animais com cada uma das porcentagens da anastomose cobertas por aderências à re-abordagem realizada no 7° dia de pós-operatório .....	67
Tabela 26 -	Número de animais com cada estrutura aderida à anastomose à re-abordagem realizada no 3° dia de pós-operatório .....	68
Tabela 27 -	Número de animais com cada estrutura aderida à anastomose à re-abordagem realizada no 7° dia de pós-operatório .....	68
Tabela 28 -	Força de ruptura das anastomoses avaliadas no 3° dia de pós-operatório .....	69
Tabela 29 -	Força de ruptura das anastomoses avaliadas no 7° dia de pós-operatório .....	70
Tabela 30 -	Variação da concentração de hidroxiprolina das anastomoses avaliadas no 3° dia de pós-operatório .....	71
Tabela 31 -	Variação da concentração de hidroxiprolina das anastomoses avaliadas no 7° dia de pós-operatório .....	71
Tabela 32 -	Fração da área coberta por colágeno das anastomoses avaliadas no 7° dia de pós-operatório .....	72
Tabela 33 -	Fold das anastomoses avaliadas no 3° e 7° dia de pós-operatório .....	73
Tabela 34 -	Fold das anastomoses avaliadas no 3° e 7° dia de pós-operatório .....	73

Tabela 35 -	Número de animais com achados intra-operatórios positivos à re-abordagem realizada no 3º dia de pós-operatório na presença de sepse abdominal .....	75
Tabela 36 -	Número de animais com achados intra-operatórios positivos à re-abordagem realizada no 7º dia de pós-operatório na presença de sepse abdominal .....	75
Tabela 37 -	Número de animais com cada um dos escores de Nair à re-abordagem realizada no 3º dia de pós-operatório na presença de sepse abdominal .....	76
Tabela 38 -	Número de animais com cada um dos escores de Nair à re-abordagem realizada no 7º dia de pós-operatório na presença de sepse abdominal .....	76
Tabela 39 -	Número de animais com cada uma das porcentagens da anastomose cobertas por aderências à re-abordagem realizada no 3º dia de pós-operatório na presença de sepse abdominal .....	76
Tabela 40 -	Número de animais com cada uma das porcentagens da anastomose cobertas por aderências à re-abordagem realizada no 7º dia de pós-operatório na presença de sepse abdominal .....	77
Tabela 41 -	Número de animais com cada estrutura aderida à anastomose à re-abordagem realizada no 3º dia de pós-operatório na presença de sepse abdominal .....	77
Tabela 42 -	Número de animais com cada estrutura aderida à anastomose à re-abordagem realizada no 7º dia de pós-operatório na presença de sepse abdominal .....	77
Tabela 43 -	Força de ruptura das anastomoses avaliadas no 3º dia de pós-operatório na presença de sepse abdominal .....	78
Tabela 44 -	Força de ruptura das anastomoses avaliadas no 7º dia de pós-operatório na presença de sepse abdominal .....	79
Tabela 45 -	Variação da concentração de hidroxiprolina das anastomoses avaliadas no 3º dia de pós-operatório na presença de sepse abdominal .....	80
Tabela 46 -	Variação da concentração de hidroxiprolina das anastomoses avaliadas no 7º dia de pós-operatório na presença de sepse abdominal .....	80
Tabela 47 -	Fração da área coberta por colágeno das anastomoses avaliadas no 7º dia de pós-operatório na presença de sepse abdominal .....	82
Tabela 48 -	Fold das anastomoses avaliadas no 3º dia de pós-operatório na presença de sepse abdominal .....	84
Tabela 49 -	Fold das anastomoses avaliadas no 7º dia de pós-operatório na presença de sepse abdominal .....	84
Tabela 50 -	Fold das anastomoses avaliadas no 3º dia de pós-operatório na presença de sepse abdominal .....	84

Tabela 51 -	Fold das anastomoses avaliadas no 7º dia de pós-operatório na presença de sepse abdominal .....	85
-------------	---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

A	- Ausente
ABNT	- Associação Brasileira de Normas Técnicas
CE	- Corpo estranho
CEUA	- Comitê de Ética no Uso Animal
cDNA	- Ácido desoxirribolucleico complementar
CLP	- Ligadura e punção do ceco
cm	- Centímetro
COBEA	- Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CT	- Ciclo limiar
D2	- Receptor da dopamina 2
DNA	- Ácido desoxirribolucleico
DPO	- Dia pós-operatório
g	- Grama
°C	- Grau Celcius
HCL	- Ácido Clorídrico
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	- Água oxigenada
HE	- Hematoxilina-eosina
HP	- Hidroxiprolina
IL	- Interleucina
Kg	- Kilograma
LPS	- Lipopolissacarídeo
min	- Minuto
ml	- Mililitro
mm	- Milímetro
MMP	- Matrix metaloproteinase
mg	- Miligrama
µg	- Micrograma
µl	- Microlitro
N	- Newton
NaCl	- Cloreto de sódio
NB3	- Subgrupo de animais operados em condições de normalidade e tratados com bromoprida, mortos no 3° DPO

NB7	- Subgrupo de animais operados em condições de normalidade e tratados com bromoprida, mortos no 7° DPO
nm	- Nanomolar
NM3	- Subgrupo de animais operados em condições de normalidade e tratados com metoclopramida, mortos no 3° DPO
NM7	- Subgrupo de animais operados em condições de normalidade e tratados com metoclopramida, mortos no 7° DPO
NS3	- Subgrupo de animais operados em condições de normalidade e tratados com solução de NaCl 0,9%, mortos no 3° DPO
NS7	- Subgrupo de animais operados em condições de normalidade e tratados com solução de NaCl 0,9%, mortos no 7° DPO
P	- Presente
PBS	- Phosphate buffered saline
qRT-PCR	- Reação de polimerase em cadeia com transcriptase reversa em tempo real
RNA	- Ácido ribonucléico
RNAm	- Ácido ribonucléico mensageiro
RT-PCR	- Reação de polimerase em cadeia com transcriptase reversa
SB3	- Subgrupo de animais submetidos à indução de sepse abdominal e tratados com bromoprida, mortos no 3° DPO
SB7	- Subgrupo de animais submetidos à indução de sepse abdominal e tratados com bromoprida, mortos no 7° DPO
SM3	- Subgrupo de animais submetidos à indução de sepse abdominal e tratados com metoclopramida, mortos no 3° DPO
SM7	- Subgrupo de animais submetidos à indução de sepse abdominal e tratados com metoclopramida, mortos no 7° DPO
SPSS	- Special Package for Social Sciences
SS3	- Subgrupo de animais submetidos à indução de sepse abdominal e tratados com solução de NaCl 0,9%, mortos no 3° DPO
SS7	- Subgrupo de animais submetidos à indução de sepse abdominal e tratados com solução de NaCl 0,9%, mortos no 7° DPO
TGI	- Trato gastrointestinal
Tm	- Temperatura de dissociação
TNF $\alpha$	- Fator de necrose tumoral alfa
UnB	- Universidade de Brasília

USP - Universidade de São Paulo  
VEGF - Fator de crescimento derivado do endotélio

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>20</b>
<b>2 OBJETIVO .....</b>	<b>28</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODO .....</b>	<b>29</b>
3.1 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO .....	29
3.2 DISTRIBUIÇÃO E ALOCAÇÃO DOS ANIMAIS EM GRUPOS E SUBGRUPOS ..	29
3.3 PRÉ-OPERATÓRIO .....	31
3.4 ANESTESIA E TÉCNICA OPERATÓRIA .....	31
3.5 ADMINISTRAÇÃO DAS DROGAS .....	36
3.6 PÓS-OPERATÓRIO .....	37
3.7 RE-OPERAÇÃO E ANÁLISE OPERATÓRIA .....	37
3.8 ESTUDO DA FORÇA DE RUPTURA DA ANASTOMOSE .....	40
3.9 ESTUDO HISTOPATOLÓGICO .....	41
3.10 ESTUDO DO COLÁGENO TECIDUAL .....	42
3.11 ESTUDO BIOQUÍMICO .....	42
3.11.1 Método de extração de hidroxiprolina .....	42
3.11.2 Método de dosagem da hidroxiprolina .....	43
3.12 IMUNOHISTOQUÍMICA PARA FATOR DE CRESCIMENTO DERIVADO DO ENDOTÉLIO .....	44
3.13 REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE EM TEMPO REAL (qRT-PCR) .....	44
3.14 AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	46
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>48</b>
4.1 MORTES .....	48
4.2 VARIAÇÕES DO PESO DOS ANIMAIS .....	48
4.3 AVALIAÇÃO DOS ANIMAIS TRATADOS COM DROGAS PROCINÉTICAS NA AUSÊNCIA DE SEPSE ABDOMINAL .....	49
4.3.1 Evolução clínica .....	49
4.3.2 Achados intra-operatórios .....	49
4.3.3 Quantidade de aderências .....	50
4.3.4 Força de ruptura .....	53
4.3.5 Concentração de hidroxiprolina .....	55
4.3.6 Colágeno tecidual .....	57

4.3.7 Achados histopatológicos e imuno-histoquímico para fator de crescimento derivado do endotélio .....	58
4.3.8 Expressão de metaloproteinases e interleucinas .....	62
4.4 EFEITOS DA SEPSE ABDOMINAL SOBRE A CICATRIZAÇÃO DE ANASTOMOSES .....	64
4.4.1 Evolução clínica .....	64
4.4.2 Achados intra-operatórios .....	64
4.4.3 Quantidade de aderências .....	66
4.4.4 Força de ruptura .....	68
4.4.5 Concentração de hidroxiprolina .....	71
4.4.6 Colágeno tecidual .....	71
4.4.7 Achados histopatológicos e imuno-histoquímico para fator de crescimento derivado do endotélio .....	72
4.4.8 Expressão de metaloproteinases e interleucinas .....	72
4.5 AVALIAÇÃO DOS ANIMAIS TRATADOS COM DROGAS PROCINÉTICAS NA PRESENÇA DE SEPSE ABDOMINAL INDUZIDA .....	73
4.5.1 Evolução clínica .....	73
4.5.2 Achados intra-operatórios .....	74
4.5.3 Quantidade de aderências .....	75
4.5.4 Força de ruptura .....	78
4.5.5 Concentração de hidroxiprolina .....	80
4.5.6 Colágeno tecidual .....	82
4.5.7 Achados histopatológicos e imuno-histoquímico para fator de crescimento derivado do endotélio .....	83
4.5.8 Expressão de metaloproteinases e interleucinas .....	83
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>86</b>
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>106</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>107</b>
<b>8 APÊNDICE .....</b>	<b>129</b>
<b>9 ANEXOS .....</b>	<b>151</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A deiscência de anastomose é uma complicação potencial da cirurgia colorretal e tem incidência variável. Ocorre em 2,4 a 3,8% dos casos (PLATELL et al., 2007; BUCHS et al., 2008) mas já foi descrita uma incidência de até 35% (FIELDING et al., 1980; HENDRIKS; MASTBOOM, 1990). É a complicação mais grave deste tipo de operação. Está associada ao aumento da morbimortalidade, da estada hospitalar e dos custos totais do tratamento (GOLIGHER et al., 1970; WANINGER et al., 1992; GOLUB et al., 1997; SARABEYOGLU et al., 2003; NURSAL et al., 2004).

Vários fatores podem afetar a cicatrização das anastomoses intestinais. Dentre eles, pode-se destacar o suprimento sanguíneo e a oxigenação, a tensão na linha da anastomose, a técnica e o material cirúrgico utilizados, a magnitude do processo inflamatório, a presença de contaminação fecal, a idade e o estado nutricional do paciente, além da utilização de drogas (DE SOUSA et al., 1991; DE OLIVEIRA et al., 1994; THORNTON; BARBUL, 1997; BUCKMIRE et al., 1998; KUZU et al., 1998; TURKCAPAR et al., 1998; SAKALLIOGLU et al., 2004; DE HANN et al., 1974). Muitos esforços têm sido empregados com o objetivo de melhorar a cicatrização de anastomoses colônicas, como o refinamento da técnica cirúrgica, o preparo de cólon e as intervenções nutricionais e farmacológicas (KORUDA; ROLANDELLI, 1990).

O processo de cicatrização tem início com a hemostasia. Seguem-se a resposta inflamatória, a formação de tecido conjuntivo e a remodelação da ferida (SOUSA; OLIVEIRA, 1999; TOGNINI et al., 2000). A submucosa é a camada intestinal mais importante na cicatrização das anastomoses intestinais por ser a camada com maior teor de colágeno. Provê a maior parte da sustentação da parede intestinal e da sua resistência tênsil (BRASKEN et al., 1989).

Quando uma anastomose é realizada no trato gastrointestinal, ocorre uma resposta inflamatória à injúria traumática e ao material utilizado (THORNTON; BARBUL, 1997; KOLOGLU et al., 2000). Se ela for exagerada, pode ser responsável pelo retardo do processo de cicatrização.

A inflamação da região anastomótica e a ativação do endotélio na área peri-anastomótica ocorrem já na fase inicial da cicatrização (THORNTON; BARBUL, 1997). Durante este estágio, polimorfonucleares e macrófagos migram da circulação para o sítio da ferida em resposta ao aumento dos níveis de citocinas (MARTIN; MUIR, 1990; CATS, 2003). Esta fase é seguida pela proliferação de fibroblastos, síntese do colágeno,

remodelamento do tecido conectivo e do seu componente parenquimatoso e aquisição da resistência da ferida (GOLDMAN, 2004).

A resistência anastomótica inicial depende da sutura, pois até o quarto dia, a anastomose está preenchida por fibras de colágeno frouxas e desorganizadas. Dessa forma, a deiscência anastomótica precoce não pode ser associada ao metabolismo insuficiente de colágeno. Está relacionada à falha mecânica, isquemia intestinal ou falha na obtenção de um vedamento satisfatório (COHEN; DIMARINO, 1976; DE HINGH et al., 2002).

A degradação do colágeno maduro inicia-se nas primeiras vinte e quatro horas após a confecção da anastomose intestinal e predomina nos primeiros quatro dias de pós-operatório (HO; ASHOUR, 2010). Como a resistência mecânica da anastomose atinge os níveis mínimos entre o terceiro e o quarto dia de pós-operatório (DPO), a deiscência é mais comum neste período (THORNTON; BARBUL, 1997). Entre o quinto e o sétimo dias ocorre o pico da síntese de colágeno pelos fibroblastos e a resistência anastomótica passa a depender principalmente de suas novas fibras organizadas (FRANZEN et al., 1993; HACIYANLI et al., 2001).

O progresso da síntese de colágeno tem, portanto, papel central no processo de cicatrização: distúrbios na sua regulação afetam a resistência da anastomose e podem aumentar o risco de deiscência (MATERNIS; HENDRIKS, 1992). A quantidade de colágeno presente na região anastomótica resulta de um balanço entre a síntese e a lise do mesmo (WALKER et al., 2004).

São vários os parâmetros de avaliação da cicatrização de anastomoses intestinais. A medida da resistência tênsil é realizada por meio da aplicação de uma força mecânica em direção longitudinal à anastomose. Atinge cinquenta por cento do valor daquela do cólon livre de injúria após dez dias de pós-operatório (JIBORN et al., 1978) e não é sensível para a determinação de alterações precoces da cicatrização (BRASKEN, 1991).

A hidroxiprolina é um produto da hidroxilação da prolina pela enzima prolina-hidroxilase (REDDY; ENWEMEKA, 1996). É encontrada nos tecidos dos vertebrados quase que exclusivamente no colágeno, constituindo 14% do peso deste. Não está presente de forma significativa em outras proteínas animais (NEUMAN; LOGAN, 1950). Por esta distribuição, a hidroxiprolina é um marcador importante do metabolismo do colágeno e tem sido usada como parâmetro bioquímico de avaliação da cicatrização (JIBORN et al., 1978). Já foi descrita uma relação direta entre o baixo conteúdo de hidroxiprolina e a incidência de deiscência anastomótica (HENDRIKS; MASTBOOM, 1990).

As metaloproteinases (MMP) constituem uma família de pelo menos vinte e cinco endopeptidases dependentes de zinco, capazes de degradar o colágeno e outros componentes da matriz extracelular como laminina, proteoglicanos e glicosaminoglicanos (STAMENKOVIS, 2003). Na cicatrização, atuam em vários aspectos como na angiogênese, remoção do tecido desvitalizado, remodelamento do tecido conectivo e migração de células epiteliais e fibroblastos (PAKS, 1999). A expressão e a atividade das MMP aumentam após a injúria tecidual, porém o padrão temporal e espacial varia entre elas durante o processo de reparo anastomótico (SAVAGE et al., 1997).

As MMP 1, 8 e 13 são denominadas colagenases e são as principais enzimas que clivam o colágeno fibrilar tipo I e III (BINNEBOSEL et al., 2009). As MMP 2 e 9 (gelatinases) degradam as fibrilas anteriormente clivadas (BINNEBOSEL et al., 2009). O aumento da degradação do colágeno pelas MMP pode ser responsável pela diminuição da resistência tênsil de anastomoses colônicas e, conseqüentemente, pela deiscência anastomótica (DE HINGH et al., 2002).

O fator de crescimento derivado do endotélio (VEGF) é um fator angiogênico potente secretado principalmente por macrófagos e fibroblastos. Está envolvido diretamente nos processos de restauração tecidual, incluindo a resposta inflamatória inicial e o remodelamento do tecido conectivo (HOWDIESHELL et al., 2001). Sua função central é a de facilitar a deposição da matriz rica em fibrina necessária para a posterior migração e proliferação celular (BROWN et al., 1988). Apesar da expressão do VEGF ser estimulada por vários fatores, a hipóxia é o seu maior indutor (LI et al., 2003).

Os receptores para VEGF estão localizados predominantemente nas células endoteliais, o que leva a crer que ele seja necessário para a cicatrização e formação do tecido de granulação (WERTHER et al., 2000). Existe clara associação entre a angiogênese e a cicatrização, pois o estabelecimento do suporte sanguíneo é vital para a demanda metabólica nos diversos estágios do processo de reparação (WU et al., 2004).

Antígenos provenientes do tecido destruído ativam o sistema imunológico inato por meio de macrófagos, neutrófilos, células natural killer e células endoteliais. Estas células ativadas produzem citocinas e quimiocinas que interagem na determinação da amplitude da resposta inflamatória e na extensão da subsequente formação de aderências (LIN et al., 2000). Estas interações são complexas, com a existência de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), a interleucina 1 beta (IL1  $\beta$ ), a interleucina 6 (IL6) e a interleucina 8 (IL8); e citocinas antiinflamatórias como a interleucina 4 (IL4) e a interleucina 10 (IL10) (BAKER et al., 2006; BALBINO et al., 2005).

A liberação de citocinas pró-inflamatórias pelos mastócitos pode determinar a extensão da resposta neutrofílica à injúria (MALAVIYA; ABRAHAM, 2000) e influenciar a cicatrização e a formação das aderências. A IL1 e o TNF  $\alpha$  são importantes na fase inicial da cicatrização. O TNF  $\alpha$  pode ter ação sinérgica ao VEGF na indução do aumento da permeabilidade e na promoção do influxo de neutrófilos (CLAUSS et al., 2001).

As aderências são consequência do processo normal de cicatrização (HICKEY, 1990; MENZIES; ELLIS, 1990; GOMEL et al., 1996; LIAKAKOS et al., 2001). Quase todos os pacientes desenvolvem aderências após uma operação com penetração da cavidade peritoneal. Elas podem ser formadas entre quaisquer órgãos, porém as aderências entre o omento e a ferida operatória são as mais comuns (BECKER et al., 1996; LEVRANT et al., 1997).

A formação de aderências é um processo dinâmico. Após qualquer trauma à superfície peritoneal, células mesoteliais cobrem o tecido conectivo contendo vasos sanguíneos, colágeno, linfócitos, fibroblastos, macrófagos, células plasmáticas e mastócitos (HICKEY, 1990; LIAKAKOS et al., 2001). O acúmulo de exsudado inflamatório é seguido pela deposição de fibrina (THOMPSON; WHAWELL, 1995). O destino das aderências passa então a depender da atividade fibrinolítica (VIPOND et al., 1990): se a injúria for pequena e as células mesoteliais estiverem intactas, é alcançado um equilíbrio entre a gênese e a lise e a cicatrização ocorre sem o desenvolvimento de aderências permanentes. Entretanto, se a injúria for grave, o tecido conectivo é exposto e a atividade fibrinolítica desaparece (RYAN et al., 1973). A lesão de células mesoteliais induz à diminuição da atividade fibrinolítica funcional e permite o desenvolvimento de aderências firmes (VIPOND et al., 1990; BEDIRLI et al., 2003).

A presença de peritonite pode, por si só, ser responsável pela formação de aderências, mesmo na ausência de injúria cirúrgica (CAHILL et al., 2007). Microorganismos do trato gastrointestinal e seus antígenos, em particular os lipopolissacarídeos (LPS), podem induzir diretamente a reação inflamatória peritoneal pela ativação das células peritoneais locais (IUVONE et al., 1999). A diminuição da atividade fibrinolítica após a peritonite bacteriana também contribui para a formação de aderências.

Mastócitos peritoneais iniciam e regulam a resposta inflamatória intra-abdominal à infecção bacteriana (ECHTENACHER et al., 1996) e já foram implicados na formação de aderências (LIEBMAN et al., 1993). Na peritonite bacteriana, a fibrina é formada na cavidade peritoneal pela ativação da cascata de coagulação e tem papel chave na resposta local do hospedeiro à invasão bacteriana ao prevenir a bacteremia precoce e a sepse.

A presença de infecção na cavidade abdominal prejudica a cicatrização das anastomoses intestinais ao diminuir o conteúdo do colágeno (AHRENDT et al., 1996) por meio da redução da sua síntese (alteração na expressão de genes do colágeno) e aumento da sua lise. Enzimas colagenolíticas derivadas de bactérias participam da degradação do colágeno e contribuem para rápida perda de estrutura do mesmo (HOGSTROM et al., 1988). Esta reação é potencializada pelas proteases dos neutrófilos e pelos radicais livres derivados de oxigênio (SHANDALL et al., 1986; WHITTE; BARBUL, 2003).

Considerando as semelhanças fisiológicas entre o processo de cicatrização de anastomoses intestinais e a formação de aderências, infere-se que agentes que afetem a formação de aderências devam também modular o processo de cicatrização (DINC et al., 2006).

As aderências podem alterar a reparação tecidual na linha de sutura. Dentre os seus possíveis efeitos benéficos, podemos citar a neovascularização, a melhora da drenagem linfática, a capacitação fagocitária e o benefício mecânico pela oclusão das falhas anastomóticas (SOARES JUNIOR; SOUZA, 2010).

A formação de aderências mostrou-se benéfica durante o período crítico de cicatrização das anastomoses. Este efeito talvez seja explicado pela capacidade destas aderências, principalmente as do omento, em suprir oxigênio e nutrientes para a área sob reparação (GARCIA-ÓLMO et al., 1996) por embebidamento ou como resultado do desenvolvimento de conexões vasculares microscópicas (ADAMS et al., 1992; SAGAR et al., 1993).

FENG et al. (2003) demonstraram que os valores de resistência tênsil de anastomoses intestinais submetidas à remoção das aderências foram menores que as de anastomoses com aderências intactas, devido à perda da proteção biológica e mecânica. BECK et al. (2003) descreveram um aumento do risco de deiscência de anastomose com a prevenção de formação de aderências por derivados do ácido hialurônico.

Segundo alguns autores, o estímulo da motilidade gastrointestinal por meio da administração de procinéticos promove a redução do número e a modificação do tipo de aderências (CONE, 1959; SPARNON; SPITZ, 1989; SPRINGALL; SPITZ, 1989; BOTHIN, 1991; SNOJ et al., 1992). Estes agentes são frequentemente utilizados no período pós-operatório recente para auxiliar o esvaziamento gástrico e acelerar a resolução do íleo paralítico (JIAN et al., 1985; VERLINDEN et al., 1987) e fazem parte de protocolos de *fast track* (MATTEI; ROMBEAU, 2006).

Dentre os vários agentes procinéticos estão as benzamidas substituídas como a metoclopramida (metoxy-2-cloro-5-procainamida) e a bromoprida (4-amino-5-bromo-N-[2-(dietilamino)-etil]-2-metoxo benzamida). Estas drogas apresentam ação anti-emética e estimulante à motilidade do trato gastrointestinal (LONGO; VERNAVA, 1993).

A metoclopramida foi descrita por JUSTIN-BESANÇON et al. (1964). Foi formada a partir de alterações realizadas na molécula da procainamida com o objetivo de atingir propriedades anti-eméticas semelhantes às das fenotiazinas (JUSTIN-BESANÇON et al., 1964; PINDER et al., 1976).

É uma droga altamente solúvel em água e seu efeito *in vitro* é pouco influenciado pelas variações do pH extra-celular (BURY; MASHFORD, 1976). Rapidamente absorvida no trato gastrointestinal humano, atinge níveis sanguíneos máximos após cerca de uma a duas horas da ingestão via oral (TENG et al., 1977; BATEMAN, 1983). Sua meia vida plasmática é de sessenta a noventa minutos em ratos (ALBIBI; MCCALLUM, 1983) e de quatro horas nos humanos. Cerca de 80% da droga é excretada inalterada na urina dentro de 24 horas após a administração via oral (BAKKE; SEGURA, 1976; TENG ET AL., 1977).

No rato, a metoclopramida concentra-se principalmente na mucosa intestinal, fígado, trato biliar e glândulas salivares, e em menor proporção no cérebro, coração, timo, glândulas supra-renais, tecido adiposo e ossos. No cérebro, concentra-se na área postrema, que contém os quimiorreceptores da zona de gatilho do vômito (PINDER et al., 1976).

São vários os mecanismos de ação deste agente procinético. Seu efeito colinérgico sobre a musculatura lisa do trato gastrointestinal promove o aumento do tônus de repouso e da atividade contrátil fásica (EISNER, 1968; OKWUASABA; HAMILTON, 1976) e parece ser responsável pela maior parte do seu efeito excitatório. Esta ação é reduzida ou abolida pela atropina e acredita-se que decorra da sensibilização de receptores muscarínicos na musculatura lisa (EISNER, 1968; BIRTLEY; BAINES, 1973; OKWUASABA; HAMILTON, 1976). A ação pós-sináptica resulta ainda da capacidade da metoclopramida de estimular a liberação de acetilcolina nas terminações nervosas colinérgicas (BEANI et al., 1970; HAY; MAN, 1979).

A densidade da inervação colinérgica é maior na musculatura do trato digestivo proximal que no trato distal. Por isso, o efeito da droga é maior neste primeiro segmento. Variações locais no controle colinérgico podem explicar o efeito paradoxal de que nos seres vivos a droga é mais ativa no estômago enquanto no tecido humano *in vitro*, é mais ativa no cólon (EISNER, 1968; BEANI et al., 1970; EISNER, 1971). Nesta última situação, a metoclopramida aumenta a magnitude e o número de contrações da musculatura longitudinal

das tênias e da musculatura circular do cólon, tanto em de humanos quanto em modelos animais experimentais (EISNER, 1971; OKWUASABA; HAMILTON, 1976). Não foram demonstrados efeitos consistentes sobre a motilidade colônica in vivo, porém não está claro se ela é realmente ineficiente ou se as técnicas de observação são inadequadas (SCHULZE-DELRIEU, 1979). Não há efeito sobre a secreção gastrointestinal (SCHULZE-DELRIEU, 1981).

Um estudo descreveu o efeito direto da metoclopramida sobre a musculatura lisa do esfíncter esofágico de marsupiais (COHEN; DIMARINO, 1976). Na concentração utilizada neste estudo, a droga causou inibição da atividade mecânica intestinal na maior parte dos outros relatos (BIRTLEY; BAINES, 1973; HAY; MAN, 1977).

A metoclopramida inibe ainda neurotransmissores dopaminérgicos (BIRTLEY, 1973; OKWUASABA; HAMILTON, 1976). Quase todas as suas ações demonstráveis no sistema cardiovascular e no sistema nervoso central envolvem este mecanismo (DOUGAN et al., 1974; PERINGER et al., 1975). Agonistas dopaminérgicos caracteristicamente estimulam os quimiorreceptores da zona de gatilho do vômito, enquanto antagonistas, como a metoclopramida, diminuem a atividade do centro do vômito e a ativação de nervos viscerais (PINDER et al., 1976; ALBIBI; MCCALLUM, 1983). O antagonismo da dopamina no sistema nervoso central é responsável pelos efeitos colaterais extra-piramidais (CASTEELS-VEM DAELE et al., 1970).

Receptores dopaminérgicos específicos também foram descritos no trato gastrointestinal, particularmente no estômago e pâncreas exócrino, e na vasculatura renal, mesentérica, coronariana e cerebral (THORNER, 1975). Entretanto, sua existência não foi bem estabelecida em humanos.

No trato digestivo, a dopamina tem efeito periférico inibitório. A metoclopramida, por sua vez, acelera o esvaziamento gástrico ao aumentar a amplitude das contrações do antro e relaxar o piloro e o bulbo duodenal, além de aumentar a peristalse do duodeno e jejuno e acelerar o tempo de trânsito intestinal do duodeno à válvula íleo-cecal (JOHNSON, 1971; PEARSON et al., 1973; MALAGELADA et al., 1980). Apesar disto, o controle periférico da motilidade intestinal pela dopamina parece ser mínimo e a atividade da metoclopramida neste local deve-se principalmente à sua ação colinérgica (SCHULZE-DELRIEU, 1979).

Por seus vários mecanismos de ação, a metoclopramida é utilizada em diversas situações clínicas: no tratamento do refluxo gastro-esofágico, gastroparesia diabética e pseudo-obstrução, em exames diagnósticos (para acelerar o tempo de trânsito em enemas baritados e para facilitar a intubação do duodeno em exames endoscópicos), em

procedimentos anestésicos de urgência (para diminuir o risco de bronco-aspiração ao acelerar o esvaziamento gástrico), dentre outros. De maior relevância para o presente estudo encontra-se a sua utilização frequente no tratamento do íleo paralítico e no controle dos vômitos no período pós-operatório.

GARCÍA-OLMO et al. (1997) realizaram um estudo com o objetivo de determinar os efeitos farmacológicos da manipulação da motilidade gastrointestinal sobre a resistência de anastomoses colônicas. Setenta e dois ratos foram submetidos a anastomoses e randomizados em três grupos que receberam 1 ml, por via subcutânea, de solução salina, metoclopramida (1,2 mg/100g de peso corporal) ou hioscina (2 mg/100 g de peso corporal). Os animais foram mortos no quarto DPO. Os autores concluíram que o uso da metoclopramida no pós-operatório recente esteve associado ao aumento significativo do número de deiscências de anastomoses colônicas, e, nos animais sobreviventes, a uma diminuição significativa na resistência das anastomoses.

São poucos os relatos sobre o efeito da metoclopramida sobre a cicatrização das anastomoses colônicas. A determinação de fatores deletérios à cicatrização assume grande relevância clínica, uma vez que pode contribuir para a diminuição dos riscos de deiscências de anastomoses e, por conseqüência, da morbi-mortalidade associada a estas operações.

A bromoprida é outro agente procinético antidopaminérgico. Sua principal ação está relacionada ao bloqueio dos receptores da dopamina-2 (D2) no sistema nervoso central, no centro do vômito ao nível do encéfalo, e no trato gastrointestinal. De forma semelhante a outros derivados benzamídicos, a estimulação do trato gastrointestinal pela bromoprida parece mediada, pelo menos em parte, por sua atividade colinérgica indireta, parcialmente dependente de suas propriedades anticolinesterásicas. Apresenta baixa ligação às proteínas plasmáticas (cerca de 40%) e é metabolizada no fígado. Cerca de 10% a 14% da dose administrada é excretada inalterada na urina (BROMOPRIDA, BULA).

Na literatura a que tivemos acesso, não encontramos relatos sobre a influência da bromoprida sobre a cicatrização das anastomoses intestinais na ausência ou presença de sepse abdominal. Além disso, também não encontramos estudos sobre a ação da metoclopramida em animais sob sepse abdominal induzida. Por serem drogas com mecanismos de ação semelhantes, sua avaliação conjunta pode auxiliar na determinação do mecanismo da sua influência sobre a formação de aderências e a cicatrização. Caso o estímulo à motilidade gastrointestinal e, conseqüente a diminuição da formação de aderências, seja o responsável por esta interferência sobre o processo cicatricial, efeitos semelhantes devem ser esperados após a administração das duas drogas.

## **2 OBJETIVO**

Avaliar os efeitos das drogas procinéticas metoclopramida e bromoprida na cicatrização de anastomoses no cólon esquerdo de ratos na presença ou ausência de sepse abdominal induzida.

### 3 MATERIAL E MÉTODO

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Cirurgia Experimental da Área de Clínica Cirúrgica da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (UnB) com colaboração do Laboratório de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (UnB), Laboratório de Imunologia Aplicada da Universidade de Brasília (UnB) e Laboratório de Bioquímica e Transplante Hepático da Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP).

O projeto de pesquisa foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (UnB), número de protocolo UnBDOC 67336/2009 (Anexo 1). Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as diretrizes do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). A declaração de conflito de interesses está apresentada no anexo 2.

Para a redação do trabalho, foram utilizadas as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 14724:2011).

#### 3.1 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

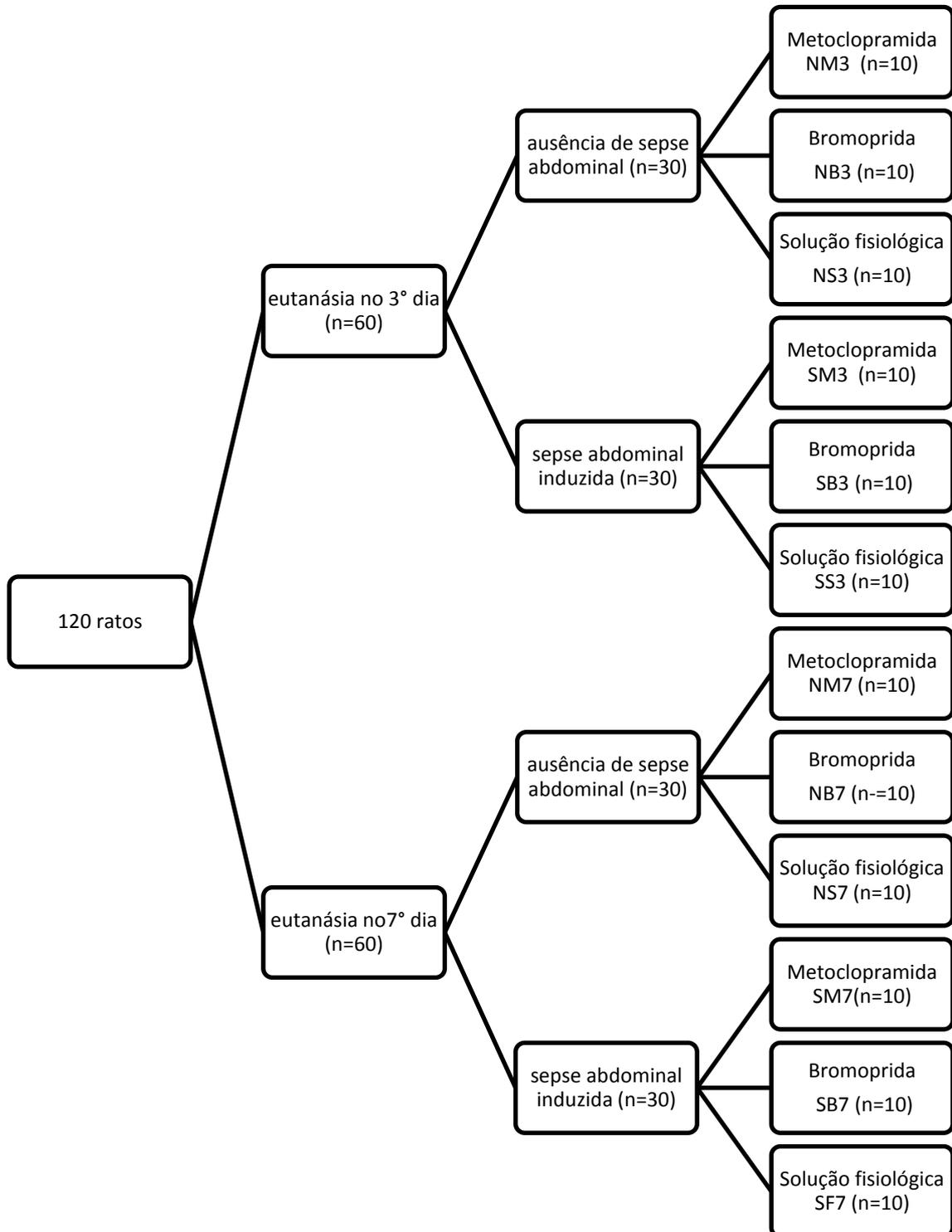
Foram incluídos no estudo 120 ratos, *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, machos e saudáveis, com idade entre 90 e 120 dias de vida e peso corporal inicial entre 350 e 592 g.

Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP) e transportados por via terrestre até o alojamento de animais do Laboratório de Cirurgia Experimental da Universidade de Brasília (UnB).

#### 3.2 DISTRIBUIÇÃO E ALOCAÇÃO DOS ANIMAIS EM GRUPOS E SUBGRUPOS

Os animais foram distribuídos, por meio de randomização em blocos, em dois grupos de 60 animais cada, para eutanásia no terceiro ou no sétimo DPO. Posteriormente, foi realizada nova randomização em blocos para a alocação em subgrupos para indução ou não indução de sepse abdominal e, por fim, para os subgrupos que seriam submetidos à administração de metoclopramida, bromoprida ou solução fisiológica (figura 1).

Figura 1 - Alocação dos animais em grupos e subgrupos de acordo com o dia de eutanásia, indução de sepse abdominal e droga procinética administrada



### 3.3 PRÉ-OPERATÓRIO

Durante o período pré-operatório, os animais foram mantidos por duas semanas confinados em gaiolas com cinco animais cada, em regime de 12 horas de luz artificial e 12 horas de escuridão (figura 2). Receberam dieta padrão e água à vontade. Não houve jejum pré-operatório. Todos os animais foram pesados em balança eletrônica imediatamente antes de cada procedimento operatório.

Figura 2- Alojamento dos animais no Laboratório de Cirurgia Experimental



### 3.4 ANESTESIA E TÉCNICA OPERATÓRIA

A anestesia geral foi realizada com cloridrato de xilasina na dose de 10 mg/Kg e cloridrato de cetamina na dose de 75 mg/Kg por via intramuscular. No período trans-operatório, foram administradas doses adicionais dos anestésicos quando necessário. Os

animais foram então imobilizados sobre placas de madeira com fixação dos membros e submetidos à tricotomia da parede abdominal anterior e antissepsia com solução de polivinilpirrolidona iodo alcoólica.

Foi utilizado material cirúrgico limpo não estéril. Todos os procedimentos operatórios foram realizados pelo mesmo cirurgião, e consistiram de:

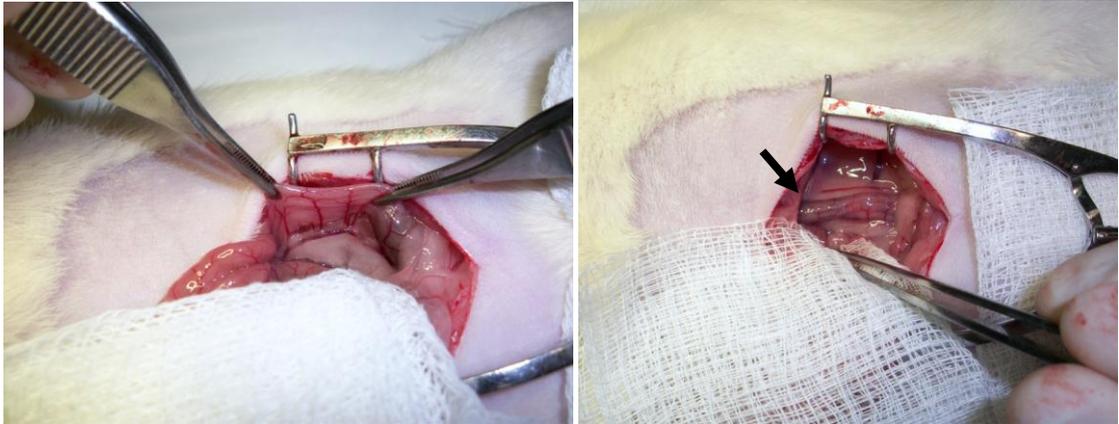
- a) Laparotomia mediana com 4 cm de extensão, iniciada a 1 cm acima da genitália externa dos animais (Figura 3);

Figura 3 - Laparotomia mediana com 4 cm de extensão



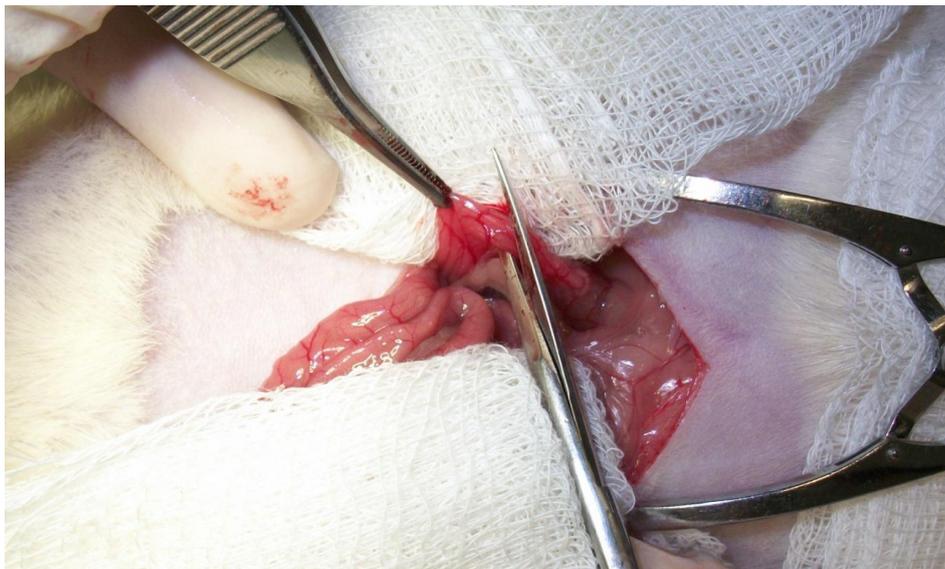
- b) Posicionamento de afastador auto-estático e exposição do cólon distal (figura 4);

Figura 4 - Posicionamento de afastador auto-estático e exposição do cólon distal (seta)



- c) Malaxação divergente caso o segmento intestinal a ser operado apresentasse conteúdo fecal;
- d) Ressecção de um segmento de 0,5 cm do cólon esquerdo, entre 2,5 e 3,0 cm acima da reflexão peritoneal, sem causar lesão dos ramos arteriais terminais (figura 5). Este segmento foi aberto pela borda mesentérica e dividido em três porções: a da direita (em relação ao animal) foi conservada em formol tamponado 10%; a central e a da esquerda foram conservadas em solução fisiológica e mantidas a uma temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ , em frascos identificados;

Figura 5 - Ressecção do cólon esquerdo entre 2,5 e 3,0 cm acima da reflexão peritoneal



- e) Justaposição das extremidades da alça do cólon (figura 6) e anastomose colocolica término-terminal, em plano único transmural, com pontos contínuos de fio de polipropileno 6.0 (Shalon ®) com agulha cilíndrica (figura 7);

Figura 6 - Justaposição das extremidades da alça do cólon

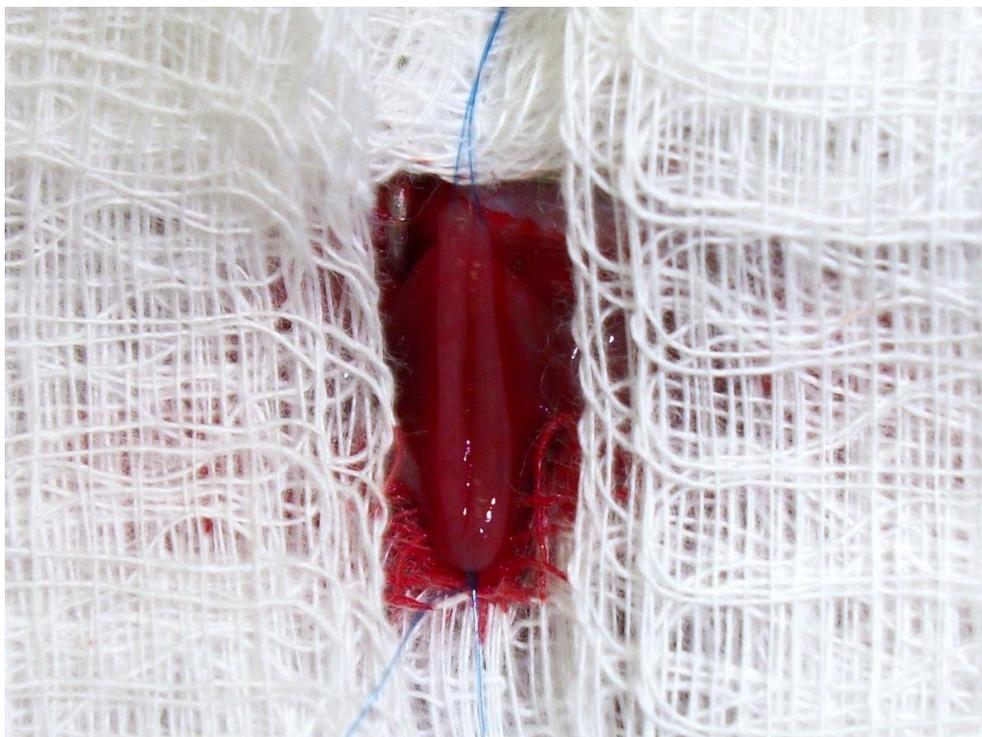
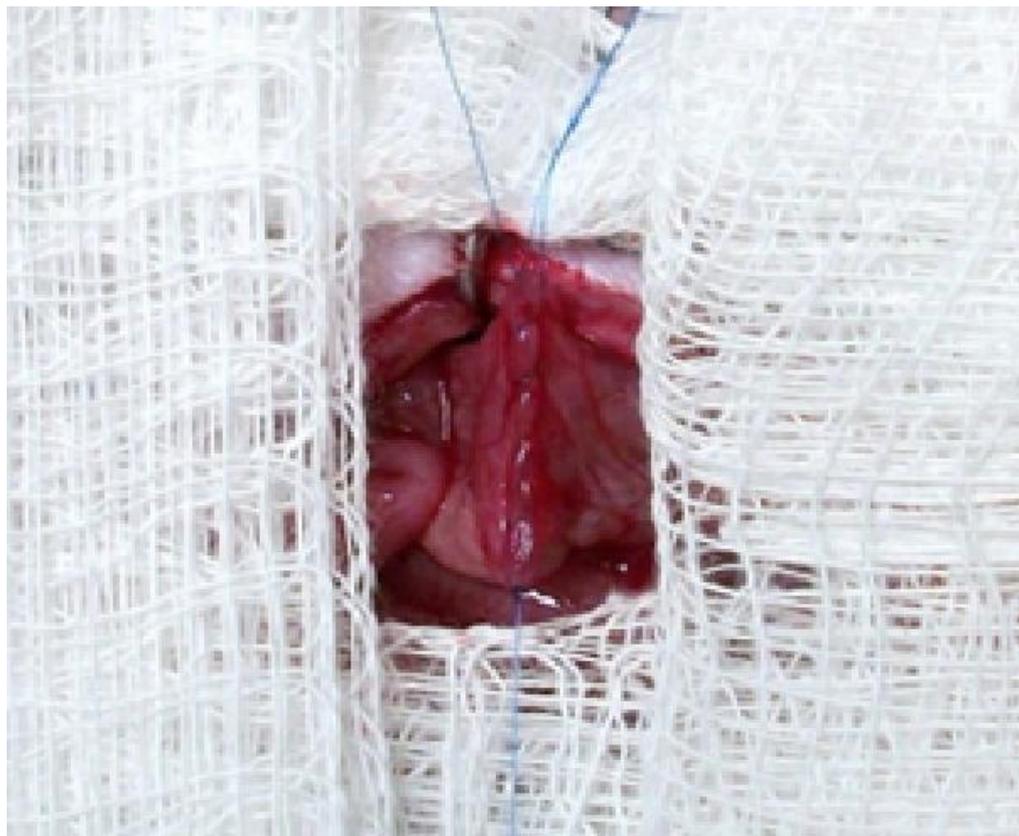
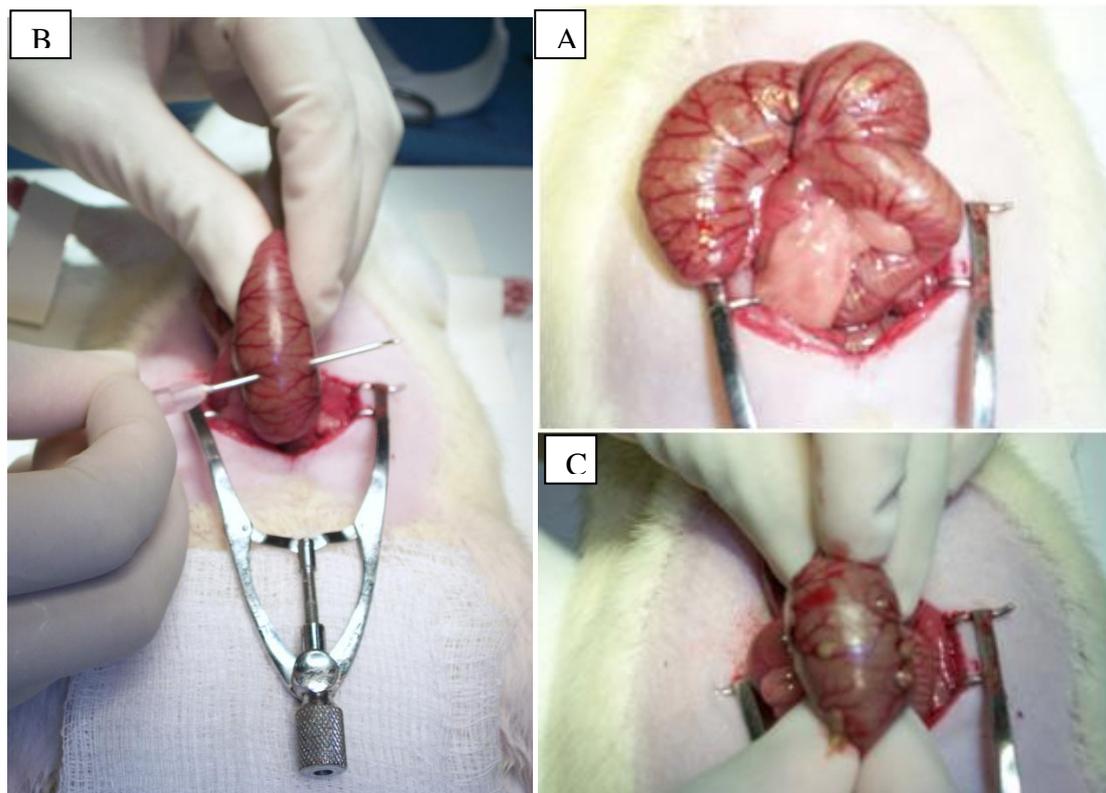


Figura 7 - Anastomose colo-colônica término-terminal



f) A indução de sepse abdominal foi realizada nos subgrupos correspondentes, pelo método de ligadura e punção do ceco (CLP) conforme descrito por Rittirsch e colaboradores (RITTIRSCH et al., 2009). Nestes animais, após a confecção da anastomose, foi realizada ligadura de 50% do ceco com fio de seda 3.0 (Shalon ®). O objetivo deste procedimento foi o de aumentar a pressão dentro deste segmento do intestino, sem provocar isquemia e permitindo o livre trânsito do conteúdo do intestino delgado para o cólon. Em seguida, foram realizadas perfurações na extremidade do ceco distal à ligadura em 10 pontos aleatórios, com agulha de punção venosa 40 x 13 mm, e expressão de parte do conteúdo fecal (figura 8);

Figura 8 – A: Ligadura parcial do ceco, B: Perfuração do ceco e C: Expressão do conteúdo fecal



- g) Síntese da parede abdominal com sutura em dois planos contínuos com fio de seda 3.0 (Shalon ®). O primeiro plano era constituído de peritônio, musculatura e aponeurose e o segundo, do tecido subcutâneo e pele.

### 3.5 ADMINISTRAÇÃO DAS DROGAS

A metoclopramida ou a bromoprida foram administradas aos subgrupos correspondentes na dose de 1 mg/100g de peso, por via subcutânea, de 12 em 12 horas, até o dia da eutanásia. A administração das drogas foi iniciada na primeira noite após a operação. Os animais do grupo solução fisiológica receberam volumes idênticos de solução de NaCl 0,9%, também de 12 em 12 horas, pela mesma via de aplicação.

### 3.6 PÓS-OPERATÓRIO

Os animais foram devolvidos às gaiolas, em grupos com três animais cada, e receberam água e dieta padrão à vontade. A analgesia foi realizada pela adição de novalgina à água fornecida aos animais.

Foram avaliados padrões clínicos de apatia, eriçamento de pêlos, diarreia e distensão abdominal. Estes indicadores foram graduados pela seguinte escala:

- 0- ausente;
- 1 - presença leve;
- 2- presença moderada;
- 3 - presença marcante;
- 4 - presença intensa.

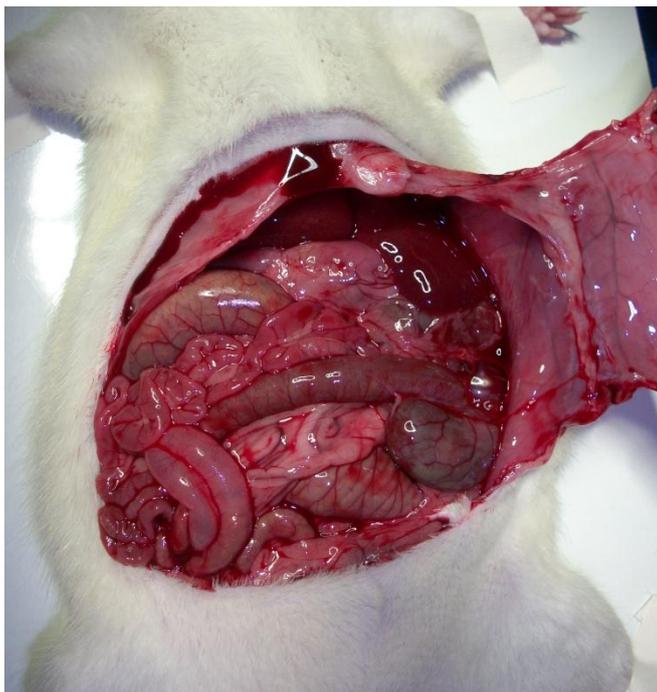
Os animais que morreram após 24 horas de DPO foram submetidos à necropsia para identificação da causa do óbito. Os animais que não sobreviveram às primeiras 24 horas de pós-operatório foram excluídos do estudo e substituídos.

### 3.7 RE-OPERAÇÃO E ANÁLISE OPERATÓRIA

A re-operação foi realizada no dia determinado para cada subgrupo. Os animais foram novamente pesados e submetidos à anestesia geral e antissepsia conforme descrito. Foi então ressecada uma área retangular de 4 cm por 6 cm da parede abdominal contendo a cicatriz mediana na sua porção central (figura 9).

Após a exposição da cavidade abdominal, foi pesquisada a presença de sinais de peritonite, abscesso ou deiscência de anastomose. Foi considerado íleo paralítico a presença de distensão de alças do cólon proximal e distal à anastomose; e obstrução intestinal, a presença de distensão de alças de cólon somente no segmento proximal à anastomose. Foram considerados sinais de peritonite a presença de secreção purulenta ou escurecida livre na cavidade, eritema e edema de alças de cólon de delgado e cólon.

Figura 9 – Processo de reabertura da cavidade abdominal



A quantidade total de aderências intra-abdominais foi avaliada pelo Escore de Nair (NAIR et al.,1974):

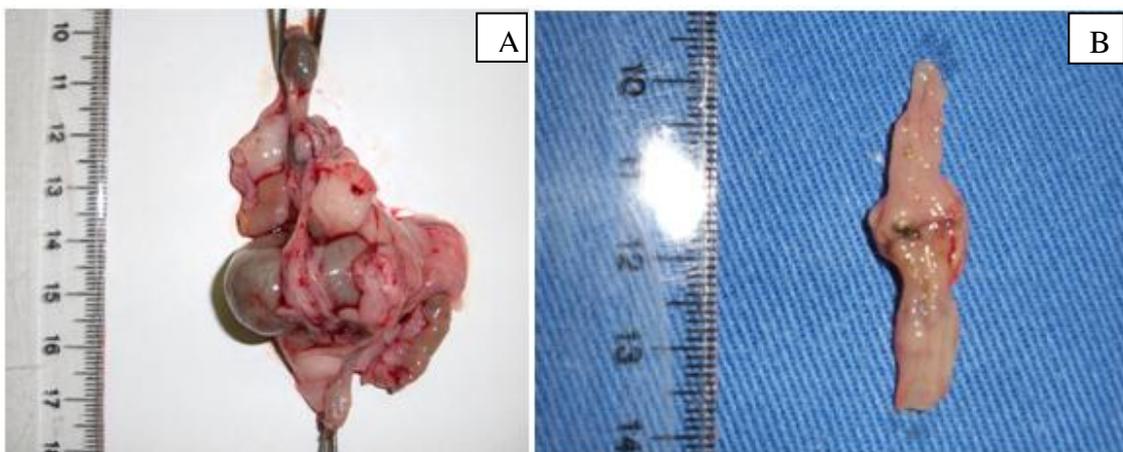
- 0 - ausência de aderências;
- 1 - presença de uma única banda entre vísceras ou entre uma víscera e a parede abdominal;
- 2 - presença de duas bandas entre vísceras ou entre vísceras e a parede abdominal;
- 3 - presença de mais de duas bandas entre vísceras ou entre vísceras e a parede abdominal, ou todo o intestino formando uma massa não aderida à parede abdominal;
- 4 - presença de víscera diretamente aderida à parede abdominal, não importando o número ou extensão das bandas.

Um segmento colônico de 4 cm de comprimento, contendo a anastomose na sua porção central, foi removido em conjunto com as estruturas a ele aderidas (figura 10). Após sua remoção, foi avaliado o tipo de estrutura aderente à anastomose e a quantidade

destas aderências foi graduada de acordo com a proporção da anastomose coberta pelas aderências em:

- 0 - até menos de 25%;
- 1 - entre 25% e menos de 50%;
- 2 - entre 50% e menos de 75%;
- 3 - entre 75% e menos de 100%;
- 4- 100% da anastomose coberta por aderências.

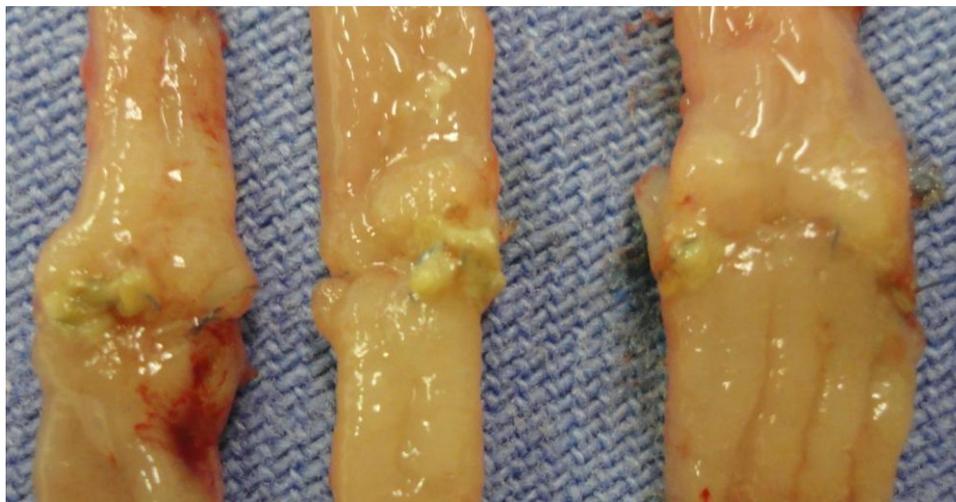
Figura 10 – A: Segmento anastomótico com estruturas aderidas, B: Segmento anastomótico após liberação das aderências



A peça foi aberta pela borda anti-mesentérica e dividida em três segmentos longitudinais (figura 11). O da direita foi fixado em cartolina, ficando exposta a superfície mucosa, e conservado em formol tamponado a 10%, para posterior análise histopatológica e imuno-histoquímica. A porção central foi encaminhada para análise da força de ruptura da anastomose. O segmento da esquerda foi subdividido em dois fragmentos: o lateral foi conservado em solução de TRI Reagente (Applied Biosystem®) e encaminhado para avaliação de interleucinas e metaloproteinasas por reação de polimerase em cadeia com transcriptase reversa (RT-PCR); o medial foi conservado em solução fisiológica 0,9% e congelado a  $-20^{\circ}$  C para dosagem da concentração de hidroxiprolina.

A eutanásia foi realizada com superdose de tiobarbiturato etil sódico aplicado na veia cava inferior.

Figura 11 - Divisão do segmento colônico contendo a anastomose em três porções



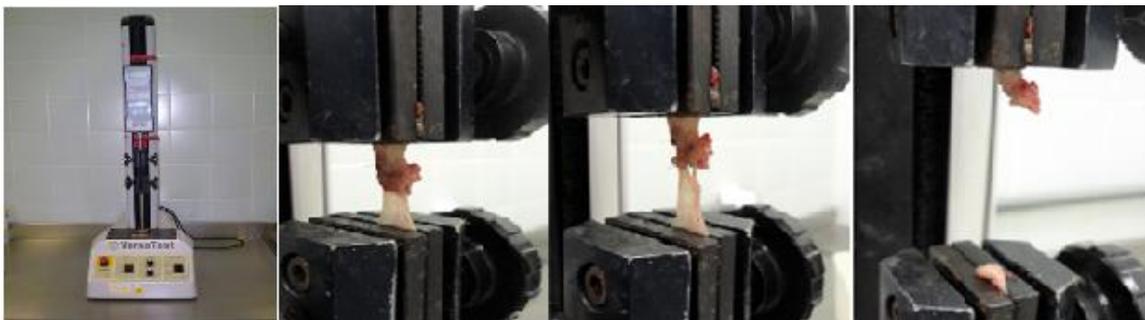
### 3.8 ESTUDO DA FORÇA DE RUPTURA DA ANASTOMOSE

O estudo da força de ruptura da anastomose foi realizado por aparelho de ensaio digital denominado Versa Test (Mecmesin Versa Test, United Kingdom) acoplado a um dinamômetro digital AGF (Mecmesin Versa Test, United Kingdom - figura 12).

O fragmento retangular de tecido foi fixado nas suas duas extremidades pela pinça superior do dinamômetro e a pinça inferior do Versa Test, com a região anastomótica equidistante e paralela às pinças.

A velocidade utilizada durante o teste foi de 30 mm/min (TOGNINI et al., 2000). O valor de ruptura foi expresso em newton (N).

Figura 12 - Aparelho de ensaio digital para determinação da força de ruptura da anastomose



### 3.9 ESTUDO HISTOPATOLÓGICO

As peças foram fixadas em formol 10%, incluídas em parafina, processadas conforme a rotina do Laboratório de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília e coradas pelo método hematoxilina-eosina (HE).

Uma patologista experiente, que desconhecia de que grupo de animais provinha o material, procedeu à análise por microscopia ótica. Foram avaliados os seguintes indicadores:

1. Fibroblastos;
2. Mononucleares;
3. Polimorfonucleares;
4. Neovasos;
5. Edema;
6. Úlcera;
7. Necrose;
8. Abscesso;
9. Colônias bacterianas;
10. Corpo estranho;
11. Crosta fibrino-leucocitária.

Os indicadores de 1 a 5 foram quantificados em: leve (+); moderado (++); intenso (+++). Os indicadores 6 a 11 foram classificados em ausente (A) ou presente (P).

### 3.10 ESTUDO DO COLÁGENO TECIDUAL

A análise quantitativa do colágeno foi realizada somente nos animais submetidos à eutanásia no 7º DPO. Foram selecionadas as lâminas que representavam de forma mais significativa o subgrupo em estudo. As regiões perianastomóticas das lâminas coradas pelo método picro-sirius foram avaliadas por microscopia de luz polarizada (JUNQUEIRA et al., 1979; MONTES; JUNQUEIRA, 1991). Observou-se a área total dos campos com objetiva de 10X e a análise foi realizada por um observador que desconhecia de que grupo de animais provinha o material.

A captura de imagens foi obtida por meio de uma Câmera de Vídeo Digital Moticam 2500 com 5,0 megapixels acoplada ao microscópio de luz CX41 da Olympus. Todas as imagens foram analisadas por meio do *software Image J* (Wayne Rasband, Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA), um sistema digital de análise de imagens.

### 3.11 ESTUDO BIOQUÍMICO

Foram determinadas as concentrações de hidroxiprolina nos dois segmentos intestinais obtidos de cada animal, o primeiro ressecado na operação inicial (amostra pré-teste) e o segundo, contendo a anastomose, coletado na re-operação (amostra pós-teste).

A análise da hidroxiprolina foi realizada observando-se a variação da amostra no dia da eutanásia em relação à amostra retirada na primeira operação, para que as diferenças constitucionais entre cada animal não apresentassem interferência no resultado obtido.

#### 3.11.1 Método de extração de hidroxiprolina

A extração de hidroxiprolina foi realizada segundo a técnica proposta por STEGEMANN e STALDER (1967) modificada por MEDUGORAC (1980). Foram seguidas as seguintes etapas:

- a) Pesagem de aproximadamente 100 mg de tecido e posicionamento em placas de Petri, para secar em estufa a 100°C por 4 horas;
- b) Nova pesagem (peso seco) de cada tecido, transferência para uma ampola de vidro e adição de HCL 6N na proporção de 1 ml para cada 10 mg de tecido;
- c) Fechamento do material em ampolas sob chama e colocação para hidrólise em estufa, entre 107 e 110°C, por 18 horas;
- d) Abertura das ampolas e transferência do conteúdo para balões volumétricos de 50 ml, lavando-se as ampolas com 1 ou 2 ml de água Milli-Q;
- e) Adição de cerca de 100 mg de carvão ativado (Merck®);
- f) Adição simultânea de 20 ml de tampão Citrato/Acetato pH 6,0 e complementação do balão para 50 ml com água Milli-Q;
- g) Filtração da solução em proveta, utilizando-se papel filtro;
- h) Separação de parte da solução para dosagem de hidroxiprolina e congelamento do resto do material.

### 3.11.2 Método de dosagem da hidroxiprolina

A dosagem da concentração de hidroxiprolina foi realizada segundo a técnica proposta por STEGEMANN e STALDER (1967). O extrato foi submetido às seguintes etapas:

- a) Adição de 100 µl de cada amostra (em duplicata), 100 µl de água (branco) e 100 µl dos respectivos padrões em placa leitora de ELISA de 96 poços;
- b) Adição de 50 µl de cloramina T e submissão à temperatura ambiente por 20 minutos;
- c) Adição de 50 µl da solução Erlich (dimetilaminobenzaldeído);
- d) Colocação em estufas a 65° C por 15 minutos;
- e) Leitura em espectrofotômetro Versamax a 550 nm;
- f) Comparação dos resultados com curva padrão OH-Prolina (Sigma H – 7279) nas concentrações de 2, 4, 6, 8, 10, 15 e 20 µg/ml.

### 3.12 IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA FATOR DE CRESCIMENTO DERIVADO DO ENDOTÉLIO

Lâminas silanizadas com cortes histológicos desparafinizados, re-hidratados e apresentando espessura de quatro micrômetros foram confeccionadas a partir de blocos de parafina contendo material de biópsia fixado em formol.

- a) Para a recuperação antigênica, as lâminas foram incubadas por 45 minutos em panela de pressão a 95-99°C com tampão citrato numa solução de pH 6.0. Logo após, as lâminas foram resfriadas em temperatura ambiente por 20 minutos;
- b) Para a inativação da peroxidase tecidual endógena, as lâminas foram imersas em uma solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 3% em temperatura ambiente por 30 minutos;
- c) Após lavagem das lâminas com PBS (phosphate buffered saline), estas foram incubadas com o anticorpo primário (VEGF, clone VG1, diluição 1:50, DAKO) durante a noite, à 4°C;
- d) Após lavagem as lâminas com PBS, estas foram incubadas com o anticorpo secundário por 30 minutos em temperatura ambiente e subsequentemente com o complexo estreptavidina-biotina-peroxidase por 30 minutos em temperatura ambiente;
- e) Todas as reações foram reveladas utilizando-se a solução cromogênica diaminobenzidina. A contra-coloração foi feita com hematoxilina de Harris. As lâminas foram então desidratadas, diafanizadas e montadas.

Foram consideradas positivas as células coradas em marrom.

### 3.13 REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE EM TEMPO REAL (qRT-PCR)

Um segmento anastomótico foi coletado e macerado em solução de TRI Reagent (Applied Biosystems®). Foi realizada a extração do RNA com fenol/clorofórmio e seguiu-se o tratamento do material com DNase da Promega® na presença de um inibidor de RNase (Promega, cat#M6101; Lote#262753) a fim de se eliminar qualquer traço residual de contaminação de DNA genômico, conforme o protocolo.

Quantidades iguais de RNA (0,4µg) foram submetidas à transcrição reversa (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits, Applied Biosystem).

A RT-PCR em tempo real (qRT-PCR) foi realizada empregando o equipamento 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystem). As amplificações das seqüências de cDNA foram realizadas utilizando o kit PCR Master Mix (Applied Biosystem) contendo o agente intercalante SYBR Green, uma molécula fluorescente que se intercala à dupla fita de DNA, após a desnaturação inicial a 95 ° C por 15 segundos, seguidos por 60 ° C por 1 minuto. A fim de se confirmar a especificidade da amplificação, os produtos de PCR foram submetidos à análise da curva de desnaturação ou *melting curve*. Nessa curva analisa-se a fluorescência das amostras em relação ao aumento contínuo da temperatura, o que possibilita determinar a temperatura de dissociação ou *melting temperature* ( $T_m$ ) de cada fragmento de DNA presente na reação de amplificação. Cada fragmento de DNA amplificado possui um  $T_m$  específico, o que permite a diferenciação dos produtos resultantes.

O método de comparação do ciclo limiar (CT) ou *crossing threshold* (LIVAK et al., 2001) utilizando o gene constitutivo do macrófago Rps9 para normalização, foi empregado para a avaliação da variação de expressão do *fold-change* de cada gene de interesse. O CT é o número de ciclos no qual a quantidade de alvo é amplificado e atinge o limiar da fluorescência emitida ou *threshold* definido pelo pesquisador. O limiar deve estar obrigatoriamente na faixa onde a quantidade de fluorescência gerada pela amplificação das amostras é significativamente maior que a fluorescência de base ou *background*.

O método de comparação do CT tem como base o cálculo da equação  $2^{-\Delta\Delta CT}$  onde  $\Delta\Delta CT = (\Delta CT \text{ experimento} - \Delta CT \text{ controle})$ , sendo que  $\Delta CT \text{ do experimento} = CT \text{ do gene de interesse no experimento} - CT \text{ do gene constitutivo no controle}$ . A equação  $2^{-\Delta\Delta CT}$  é baseada na amplificação exponencial da PCR e sua derivação e validação foram anteriormente descritas no Boletim do usuário Applied Biosystem N° 2 P/N 4303859 e por LIVRAK e SCHMITTGER (2001). Para a análise de expressão gênica foram considerados modulados positivamente valores acima de 2,0 e modulados negativamente valores abaixo de 0,5. Entre esses valores, considerou-se que não houve alteração. As reações foram feitas em triplicata, para todos os genes analisados. Todos os pares de oligonucleotídeos foram desenhados utilizando-se o primer Express software (Applied Biosystem) e estão listados na tabela 1.

Tabela 1: Genes e oligonucleotídeos utilizados na qRT-PCR

<b>Genes</b>	<b>Oligos</b>
<b>Ciclofilina</b>	5' - TAT CTG CAC TGC CAA GAC TGA GTG - 3' F 5' - CTT CTT GCT GGT CTT GCC ATT CC - 3' R
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	5' - AAA TGG GCT CCC TCT CAT CAG TCC - 3' F 5' - TCT GCT TGG TGG TTT GCT ACG AC - 3' R
<b>IL6</b>	5' - TCC TAC CCC AAC TCC CAA TGC TC - 3' F 5' - TTG GAT GGT CTT GGT CCY YAG CC - 3' R
<b>IL1<math>\beta</math></b>	5' - CAC CTC TCA AGC AGA GCA CAG - 3' F 5' - GGG TTG CAT GGT GAA GTC AAC - 3' R
<b>IL10</b>	5' - CAG ACC CAC ATG CTC CGA GA - 3' F 5' - CAA GGC TTG GCA ACC CAA GTA - 3' R
<b>INF <math>\gamma</math></b>	5' - GAT CCA GCA CAA AGC TGT CA - 3' F 5' - GAC TCC TTT TCC GCT TCC TT- 3' R
<b>MMP 1a</b>	5' - AGG AGC ACT AAT GTT CCC CAG CT - 3' F 5' - TGG GAT TTG GGG AAG GCC CAT A - 3' R
<b>MMP 8</b>	5' - GGA GTG TGC CAT CAA CCC TGA CC - 3' F 5' - TGT CAC CAT GGT CTC TTG AGA CGA - 3' R
<b>MMP 13</b>	5' - ACC CAG CCC TAT CCC TTG ATG CC - 3' F 5' - GGT GCA GAC GCC AGA AGA ATC TGT - 3' R

### 3.14 AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

A avaliação dos resultados foi realizada em três etapas. Inicialmente foi realizada a comparação dos subgrupos de animais operados na ausência de sepse abdominal sob a ação das drogas procinéticas (subgrupos NM3, NB3, NS3 e NM7, NB7, NS7). Posteriormente, foi realizada a análise dos efeitos da infecção sobre a cicatrização das anastomoses por meio da comparação dos subgrupos controles, ou seja, dos animais submetidos à administração de solução fisiológica (subgrupos NS3, SS3 e NS7, SS7). Na terceira fase, foi avaliada a cicatrização das anastomoses sob o uso das drogas procinéticas na presença de sepse abdominal induzida (subgrupos SM3, SB3, SS3 e SM7, SB7 e SS7).

Para a análise estatística foi utilizado o programa SPSS® (Special Package for Social Sciences) versão 17.0. Foram utilizados os seguintes testes estatísticos:

- a) Análise dos dados clínicos (apatia, eriçamento de pêlos, diarreia e distensão abdominal) e achados intra-operatórios (peritonite, abscesso ou deiscência de anastomose, íleo paralítico, obstrução intestinal): teste exato de Fisher;
- b) Avaliação da força de ruptura, conteúdo de colágeno e concentração de hidroxiprolina: teste de Mann Whitney e teste de Kruskal-Wallis;
- c) Comparação dos dados histopatológicos e quantidade de aderências: teste exato de Fisher;

Todas as probabilidades menores ou iguais a 5% ( $p \leq 0,05$ ) foram consideradas significantes.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 MORTES

Não houve mortes entre os animais submetidos à eutanásia no 3° DPO. Houve três óbitos no grupo de animais submetidos à eutanásia no 7° DPO. Em nenhum deles foram evidenciadas complicações relacionadas à anastomose (tabela 2).

Tabela 2 - Mortes ocorridas durante o período pós-operatório

Subgrupo	Dia do óbito	Achados de necropsia
NM7	6°DPO	Ausência de distensão de alças ou sangramento intracavitário. Anastomose íntegra, sem aderências. Presença de fezes endurecidas no cólon.
SB7	2° DPO	Ausência de distensão de alças ou sangramento intracavitário. Anastomose íntegra, sem aderências. Ceco bloqueado por epíplon.
SS7	4° DPO	Ausência de distensão de alças ou sangramento intracavitário. Anastomose íntegra, sem aderências. Ceco bloqueado por epíplon.

### 4.2 VARIAÇÕES DO PESO DOS ANIMAIS

Os pesos pré-operatórios e no dia da eutanásia estão descritos nos apêndices M e N. De modo geral, houve ganho de peso nos subgrupos NM3, NB3 e SB3 e perda de peso nos animais dos subgrupos NS3, SM3 e SS3. Houve perda de peso em todos os subgrupos de animais submetidos à eutanásia no 7° DPO.

### 4.3 AVALIAÇÃO DOS ANIMAIS TRATADOS COM DROGAS PROCINÉTICAS NA AUSÊNCIA DE SEPSE ABDOMINAL

#### 4.3.1 Evolução clínica

Os parâmetros clínicos dos animais em cada DPO estão descritos nos apêndices de A a L. Não houve diferença estatística entre os subgrupos na avaliação diária dos parâmetros clínicos de apatia, eriçamento, perda de pêlos, diarreia e distensão abdominal, tanto nos animais submetidos à eutanásia no 3º DPO quanto naqueles mortos no 7º DPO.

#### 4.3.2 Achados intra-operatórios

Não houve diferença estatística entre os grupos em relação à deiscência de anastomose, tanto no 3º quanto no 7º DPO (tabelas 3 e 4). Não houve casos de deiscência de anastomose livre, com presença de fezes na cavidade abdominal à re- operação. No grupo de animais mortos no 3º DPO foi evidenciada uma deiscência de anastomose bloqueada por epíplon, vista apenas após a liberação de todas as estruturas aderidas à anastomose e abertura da peça. Este animal pertencia ao subgrupo tratado com bromoprida (NB3). No 7º DPO ocorreram duas deiscências de anastomose bloqueadas por epíplon. Estes animais pertenciam aos subgrupos tratados com metoclopramida (NM7) e bromoprida (NB7). Não houve casos de deiscência nos animais controles (subgrupo NS7).

A avaliação da cavidade abdominal realizada à re- operação foi semelhante entre os subgrupos em relação à presença de peritonite, íleo paralítico, obstrução intestinal e abscesso intracavitário, tanto no 3º quanto no 7º DPO (tabelas 3 e 4).

Tabela 3 - Número de animais com achados intra-operatórios positivos à re-abordagem realizada no 3º dia de pós-operatório na ausência de sepse abdominal

Parâmetro	Subgrupo			p
	NM3	NB3	NS3	
Íleo paralítico	2	1	0	0,75
Obstrução	1	1	0	1,00
Abscesso intracavitário	0	1	0	1,00
Peritonite	0	0	0	-
Deiscência	Livre	0	0	1,00
	Bloqueada por epíplon	0	1	0

Tabela 4 - Número de animais com achados intra-operatórios positivos à re-abordagem realizada no 7º dia de pós-operatório na ausência de sepse abdominal

Parâmetro	Subgrupo			p
	NM7	NB7	NS7	
Íleo	0	1	1	1,00
Obstrução	1	1	0	0,75
Abscesso intracavitário	0	0	0	-
Peritonite	0	0	0	-
Deiscência	Livre	0	0	0,75
	Bloqueada por epíplon	1	1	0

#### 4.3.3 Quantidade de aderências

Os valores de Escore de Nair podem ser vistos nas tabelas 5 e 6. Não houve diferença significativa entre os subgrupos tanto no 3º ( $p= 0,66$ ) quanto no 7º DPO ( $p=0,08$ ).

Tabela 5 - Número de animais com cada um dos escores de Nair à re-abordagem realizada no 3° dia de pós-operatório na ausência de sepse abdominal

Subgrupo	Ausência	Uma banda	Duas bandas	Três ou mais bandas	Direta à parede
NM3	8	2	0	0	0
NB3	6	4	0	0	0
NS3	8	2	0	0	0

p= 0,66

Tabela 6 - Número de animais com cada um dos escores de Nair à re-abordagem realizada no 7° dia de pós-operatório na ausência de sepse abdominal

Subgrupo	Ausência	Uma banda	Duas bandas	Três ou mais bandas	Direta à parede
NM7	7	2	0	0	0
NB7	2	7	1	0	0
NS7	6	3	1	0	0

p=0,08

Houve diferença significativa entre os subgrupos na porcentagem da anastomose coberta por aderências nos animais submetidos à eutanásia no 3° DPO (p=0,02): os animais que receberam metoclopramida (subgrupo NM3) foram os que tiveram menor porcentagem de cobertura da anastomose por aderências e os animais do grupo controle (NS3) foram os que tiveram a maior porcentagem de cobertura (tabela 7).

Tabela 7 - Número de animais com cada uma das porcentagens da anastomose cobertas por aderências à re-abordagem realizada no 3° dia de pós-operatório na ausência de sepse abdominal

Subgrupo	Até < 25%	25% a < 50%	50% a < 75%	75% a < 100%	100%
NM3	0	3	1	0	6
NB3	0	0	1	5	4
NS3	0	0	1	1	8

p=0,02

Não houve diferença ( $p=0,74$ ) entre os subgrupos de animais mortos no 7° DPO em relação à porcentagem da anastomose coberta por aderências (tabela 8).

Tabela 8 - Número de animais com cada uma das porcentagens da anastomose cobertas por aderências à re-abordagem realizada no 7° dia de pós-operatório na ausência de sepse abdominal

Subgrupo	Até < 25%	25% a < 50%	50% a < 75%	75% a < 100%	100%
NM7	1	0	1	1	6
NB7	0	0	1	1	8
NS7	2	1	0	2	5

$p=0,74$

Não houve diferença entre os grupos quanto às estruturas aderidas à anastomose, tanto no 3° ( $p=0,92$ ) quanto no 7° DPO ( $p=0,34$  - tabelas 9 e 10).

Tabela 9 - Número de animais com cada estrutura aderida à anastomose à re-abordagem realizada no 3° dia de pós-operatório na ausência de sepse abdominal

Subgrupo	Epíplon	Delgado	Epíplon + delgado	Epíplon + delgado + ceco
NM3	3	1	5	1
NB3	4	0	6	0
NS3	3	0	7	0

$p=0,92$

Tabela 10- Número de animais com cada estrutura aderida à anastomose à re-abordagem realizada no 7° dia de pós-operatório ausência de sepse abdominal

Sub grupo	Epíplon	Delgado	Epíplon + delgado	Epíplon + ceco	Epíplon + seminais	Epíplon + delgado + ceco	Epíplon + delgado + ceco + bexiga
NM7	5	0	1	0	1	2	0
NB7	4	0	3	1	2	0	0
NS7	3	1	5	0	0	1	0

$p=0,34$

#### 4.3.4 Força de ruptura

Os valores de força de ruptura das anastomoses dos animais submetidos à eutanásia no 3° e no 7° DPO estão descritos nos apêndices O e P.

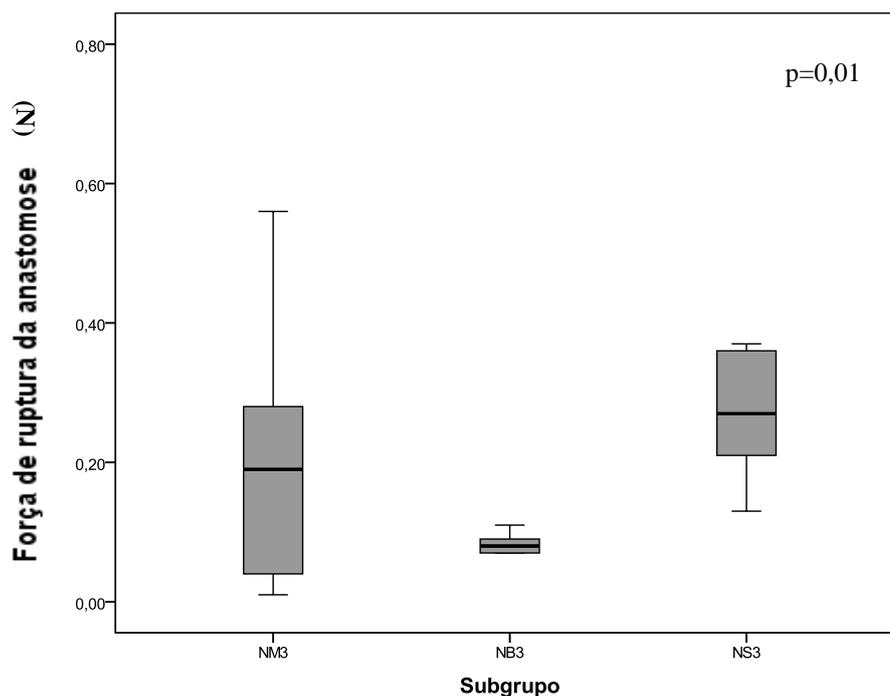
Houve diferença estatística ( $p=0,01$ ) entre os subgrupos de animais mortos no 3° DPO (tabela 11): a força de ruptura foi maior nos animais controle (subgrupo NS3) e menor nos animais tratados com bromoprida (subgrupo NB3 - gráfico 1).

Tabela 11 - Força de ruptura das anastomoses avaliadas no 3° dia de pós-operatório na ausência de sepse abdominal

Subgrupo	Valor mínimo (N)	Valor máximo (N)	Média (N)	Mediana (N)	Desvio padrão
NM3	0,01	0,56	0,20	0,19	0,19
NB3	0,01	0,11	0,07	0,07	0,03
NS3	0,13	0,80	0,33	0,27	0,22

$p=0,01$

Gráfico1- Mediana e valores intervalares da força de ruptura das anastomoses avaliadas no 3° dia de pós-operatório na ausência de sepse abdominal



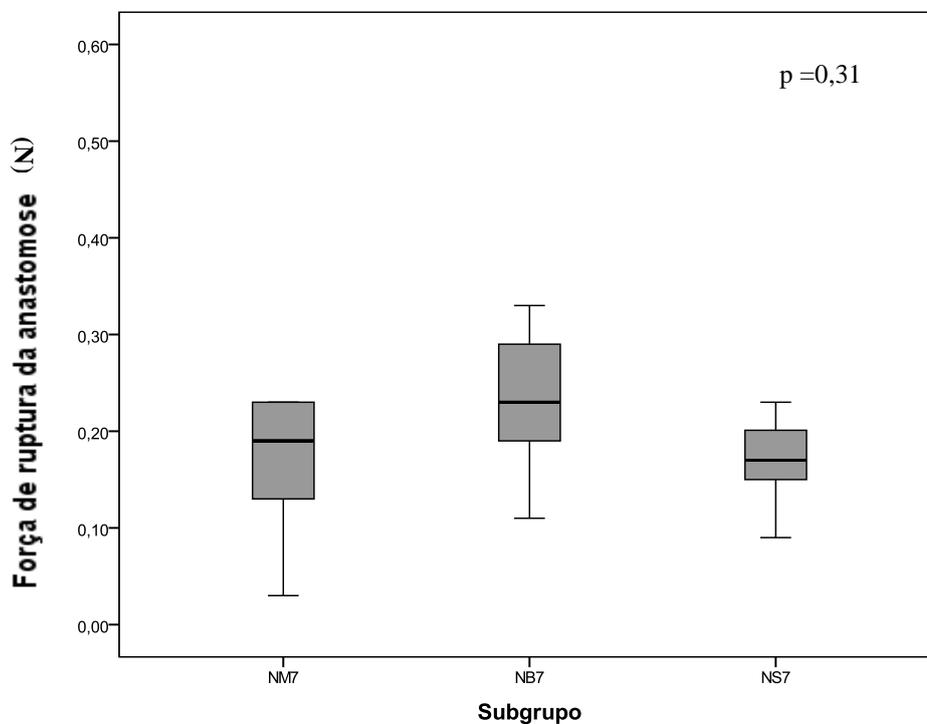
Não houve diferença entre os grupos ( $p = 0,31$ ) em relação ao valor da força de ruptura da anastomose dos animais submetidos à eutanásia no 7º DPO (tabela 12, gráfico 2).

Tabela 12 - Força de ruptura das anastomoses avaliadas no 7º dia de pós-operatório na ausência de sepse abdominal

Subgrupo	Valor mínimo (N)	Valor máximo (N)	Média (N)	Mediana (N)	Desvio padrão
NM7	0,03	0,52	0,21	0,19	0,16
NB7	0,11	0,33	0,22	0,21	0,07
NS7	0,09	0,23	0,17	0,17	0,04

$p = 0,31$

Gráfico2 - Mediana e valores intervalares da força de ruptura das anastomoses avaliadas no 7º dia de pós-operatório na ausência de sepse abdominal



Todas as anastomoses romperam na linha de sutura durante a realização do teste de força de ruptura no 3° DPO. Entre os animais mortos no 7° DPO, somente uma anastomose do subgrupo NB7 rompeu no intestino íntegro. As demais romperam na linha da anastomose. Não houve diferença estatística no local de rompimento de anastomose tanto no 3° quanto no 7° DPO ( $p=1,00$ ).

#### 4.3.5 Concentração de hidroxiprolina

As concentrações de hidroxiprolina dos segmentos intestinais retirados na operação inicial (amostra pré-teste) e dos segmentos intestinais contendo as anastomoses (amostra pós-teste) de cada um dos animais submetidos à eutanásia no 3° e no 7° DPO estão descritas nos apêndices Q e R.

Houve diminuição da concentração de hidroxiprolina no dia da eutanásia quando comparado à concentração pré-operatória em todos os animais, tanto no 3° quanto no 7° DPO (tabelas 13 e 14).

Tabela 13 - Variação da concentração de hidroxiprolina das anastomoses avaliadas no 3° dia de pós-operatório na ausência de sepse abdominal

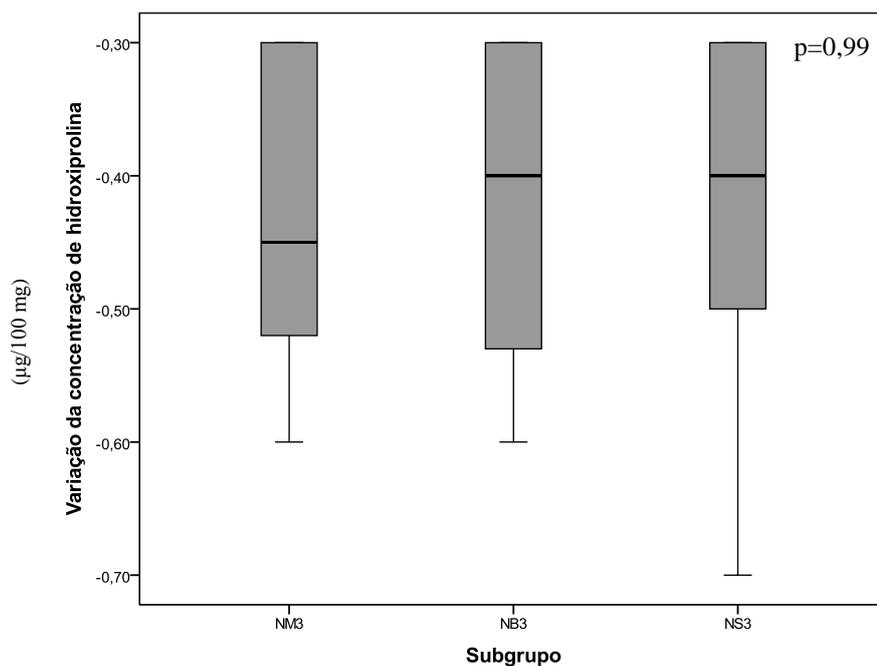
Subgrupo	Mediana ( $\mu\text{g}/100\text{ mg}$ )	Média ( $\mu\text{g}/100\text{ mg}$ )	Desvio padrão
NM3	-0,45	-0,43	0,12
NB3	-0,40	-0,42	0,12
NS3	-0,40	-0,43	0,15

Tabela 14 - Variação da concentração de hidroxiprolina das anastomoses avaliadas no 7° dia de pós-operatório na ausência de sepse abdominal

Subgrupo	Mediana ( $\mu\text{g}/100\text{ mg}$ )	Média ( $\mu\text{g}/100\text{ mg}$ )	Desvio padrão
NM7	-0,10	-0,18	0,13
NB7	-0,30	-0,34	0,16
NS7	-0,50	-0,42	0,20

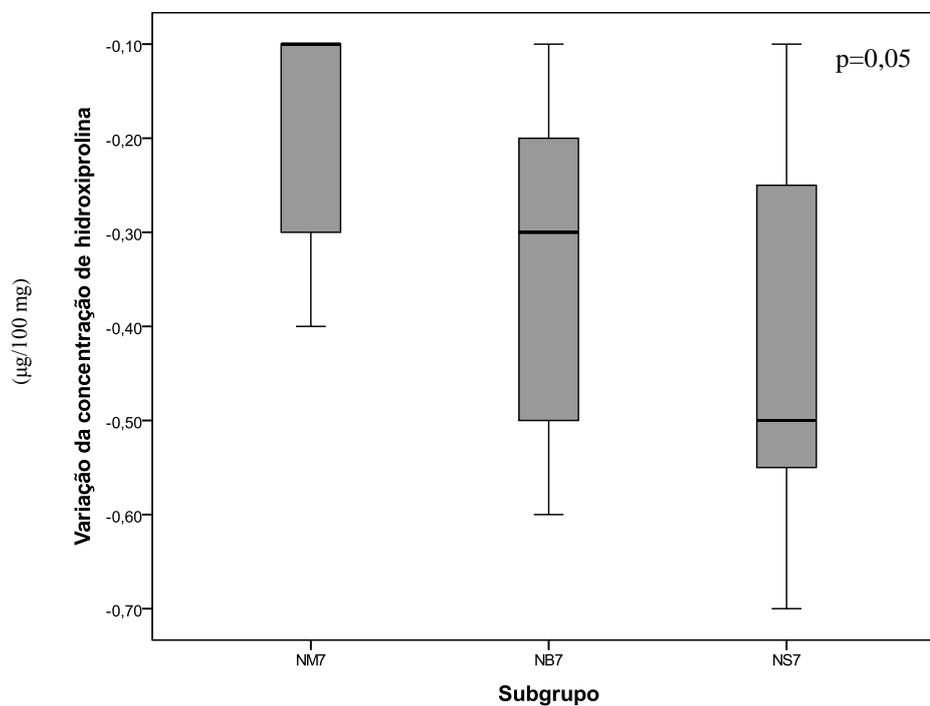
A variação da concentração de hidroxiprolina das anastomoses avaliadas no 3º dia de pós-operatório foi semelhante entre os subgrupos ( $p=0,99$  - gráfico 3).

Gráfico 3 - Mediana e valores intervalares da variação do conteúdo de hidroxiprolina das anastomoses avaliadas no 3º dia de pós-operatório na ausência de sepse abdominal



Houve diferença estatisticamente significativa na variação da concentração de hidroxiprolina nos animais submetidos à eutanásia no 7º DPO ( $p=0,05$ ): os animais tratados com metoclopramida (NM7) tiveram a menor redução da concentração de hidroxiprolina. Os animais do grupo controle (NS7) tiveram a maior redução (gráfico 4).

Gráfico 4 - Mediana e valores intervalares da variação do conteúdo de hidroxiprolina das anastomoses avaliadas no 7º dia de pós-operatório na ausência de sepse abdominal



#### 4.3.6 Colágeno tecidual

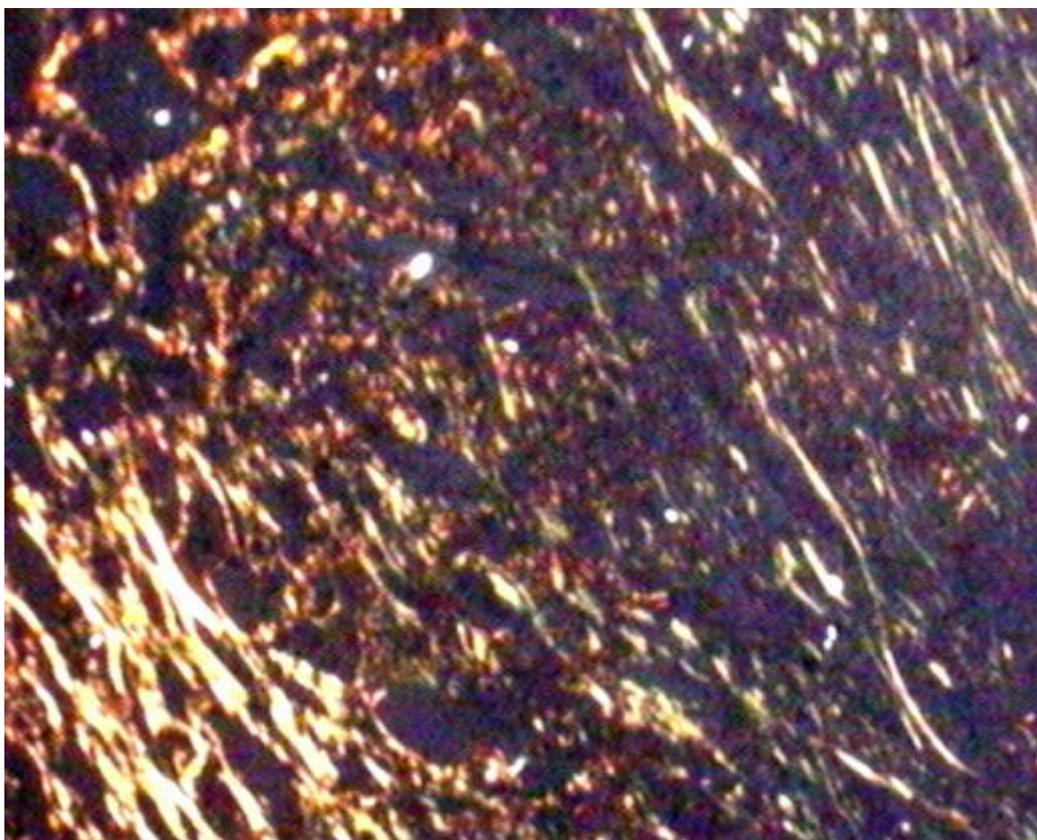
O conteúdo de colágeno foi semelhante entre os subgrupos nas anastomoses avaliadas no 7º DPO (tabela 15). A figura 13 demonstra a imagem da histomorfometria do colágeno de uma das lâminas à microscopia por luz polarizada.

Tabela 15 - Fração da área coberta por colágeno das anastomoses avaliadas no 7º dia de pós-operatório na ausência de sepse abdominal

Subgrupo	Média da fração da área coberta por colágeno
NM7	6,4
NB7	9,8
NS7	7,8

p=0,48

Figura 13 - Corte histológico: histomorfometria do colágeno das lâminas à microscopia por luz polarizada (picro-sirius, 10X)



#### 4.3.7 Achados histopatológicos e imuno-histoquímico para fator de crescimento derivado do endotélio

Os achados histopatológicos peri-anastomóticos estão listados nos apêndices S a V e foram semelhantes entre os subgrupos, tanto no 3° e 7° DPO.

No 3° DPO, houve predomínio dos seguintes achados: presença intensa de polimorfonucleares ( $p=1,00$ ) e presença moderada de mononucleares ( $p=0,75$ ), fibroblastos ( $p=1,00$ ) e neovasos ( $p=1,00$ ). Também predominaram a presença de crosta fibrino-leucocitária ( $p=1,00$ ), necrose ( $p=0,75$ ), abscesso ( $p=1,00$ ) e colônias ( $p=0,57$ ), sem diferença estatística entre os subgrupos. Todos os animais avaliados apresentaram presença moderada de edema, presença de úlcera e ausência de corpo estranho. As alterações histopatológicas estão exemplificadas nas figuras 14 a 18.

Figura 14 - Corte histológico: neovasos e edema em área de tecido de granulação (HE,200X)

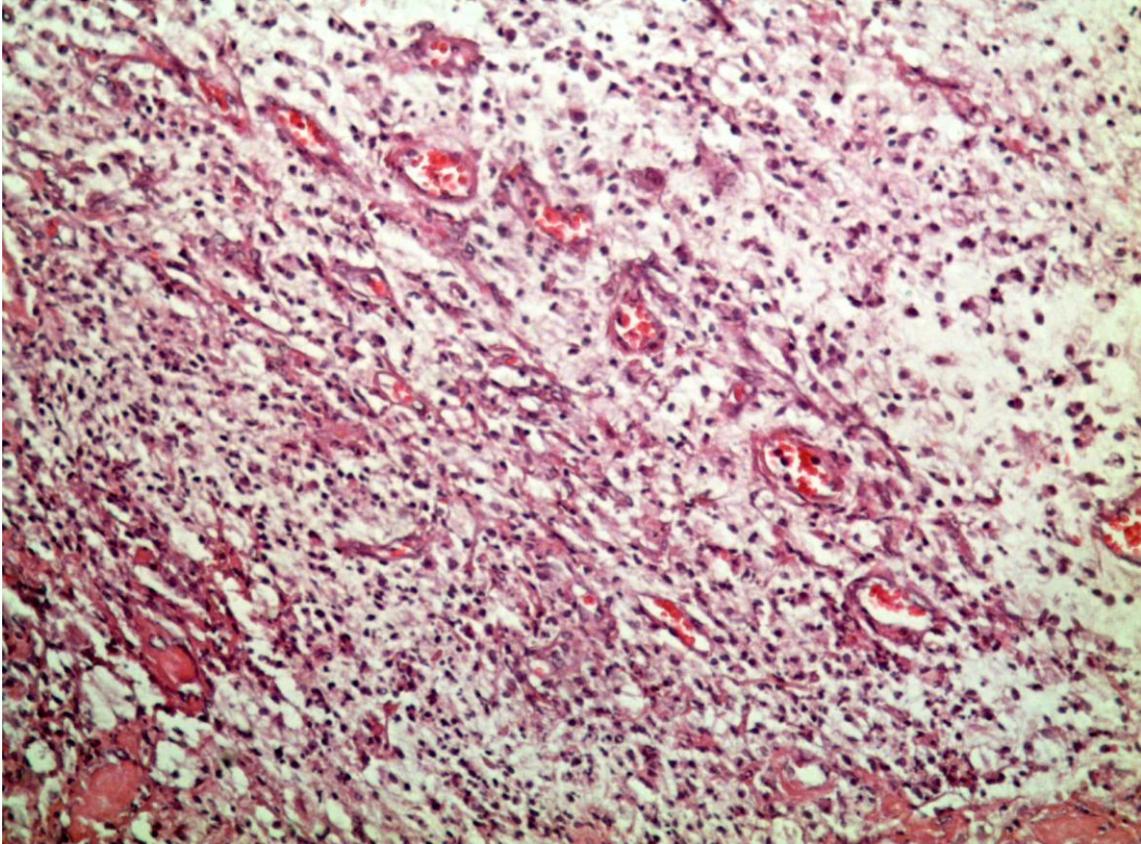
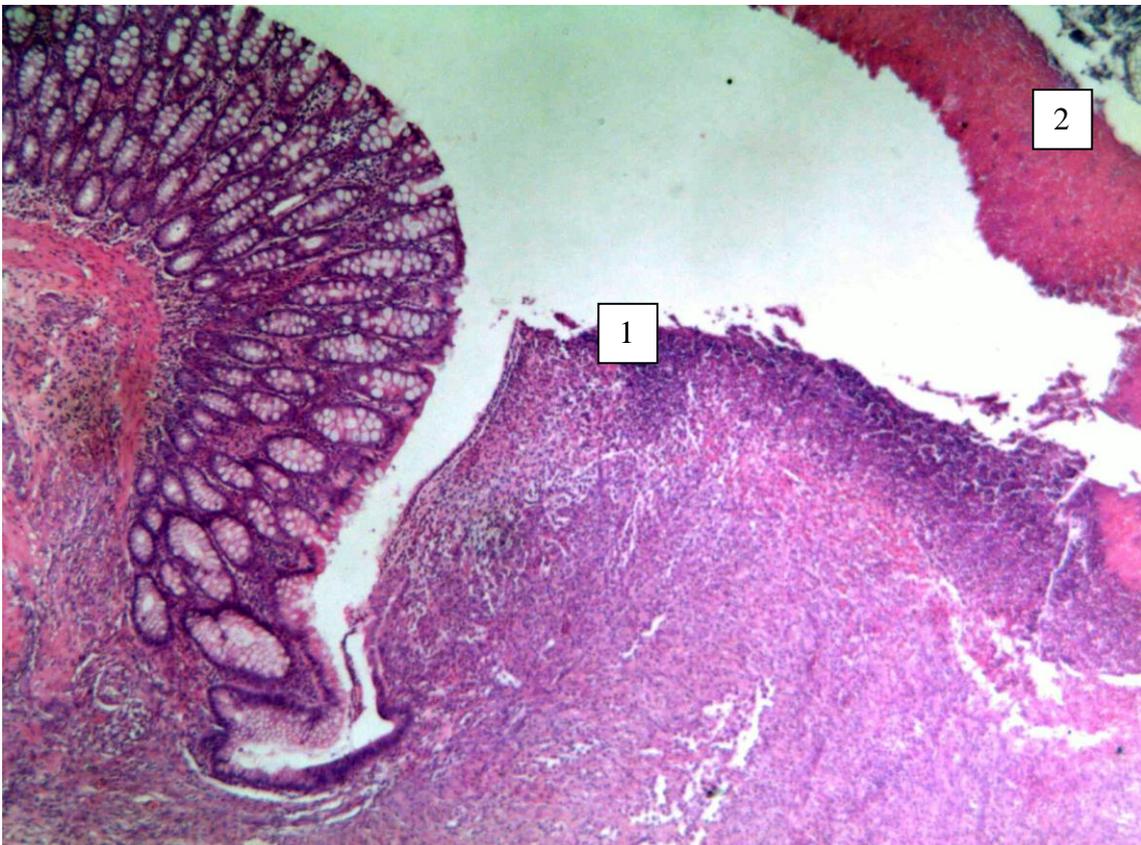


Figura 15 - Corte histológico: úlcera (1) e crosta fibrinoleucocitária (2) (HE,100X)



No 7º DPO, houve predomínio dos seguintes achados: presença de crosta fibrino-leucocitária ( $p=0,61$ ), colônias ( $p=0,61$ ) e corpo estranho ( $p=0,09$ ); e ausência de necrose ( $p=0,14$ ), sem diferença estatística entre os subgrupos. Todos os animais apresentaram intensa quantidade de fibroblastos, moderada quantidade de mononucleares, intensa quantidade de polimorfonucleares, moderada quantidade de neovasos, moderada quantidade de edema e presença de úlcera.

Houve diferença estatística entre os subgrupos apenas em relação à presença de abscesso ( $p = 0,04$ ): os animais tratados com bromoprida (subgrupo NB7) tiveram maior presença de abscesso que os animais que tratados com metoclopramida (subgrupo NM7) e animais controles (subgrupo NS7).

Figura 16 - Corte histológico: infiltrado de polimorfonucleares (1), colônias bacterianas (2) e necrose (3) em área de abscesso (HE,400X)

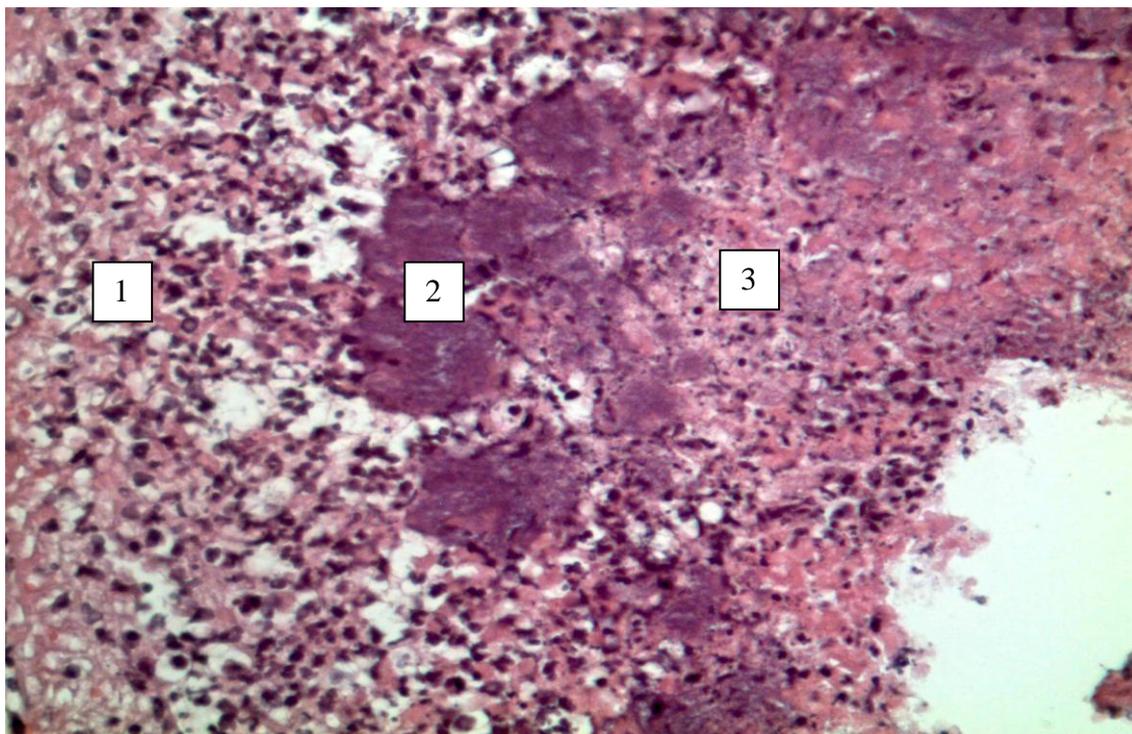


Figura 17 - Corte histológico: granuloma do tipo corpo estranho com fio de sutura (seta) e infiltrado de mononucleares em área de fibrose (HE,200X)

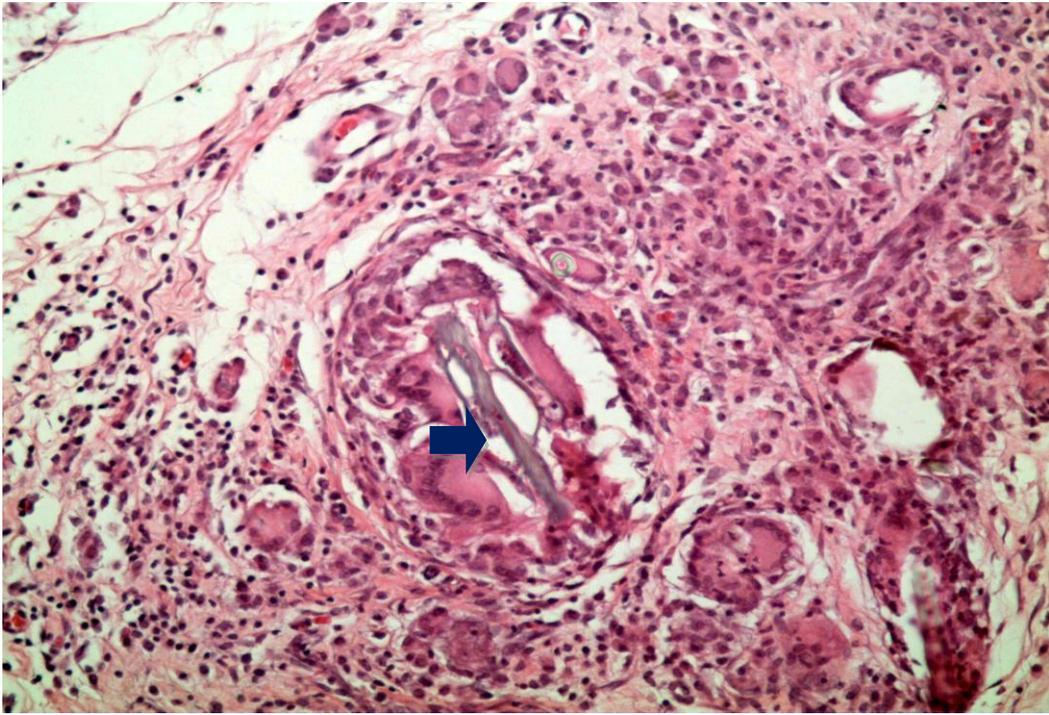
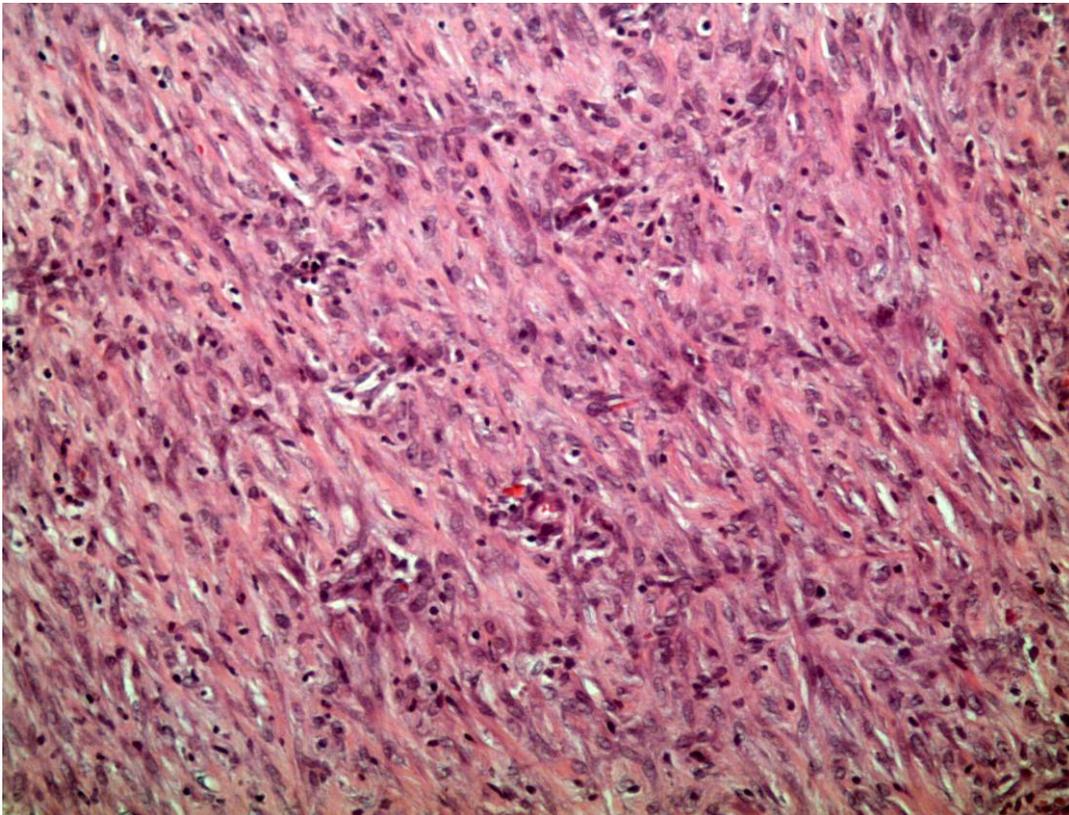
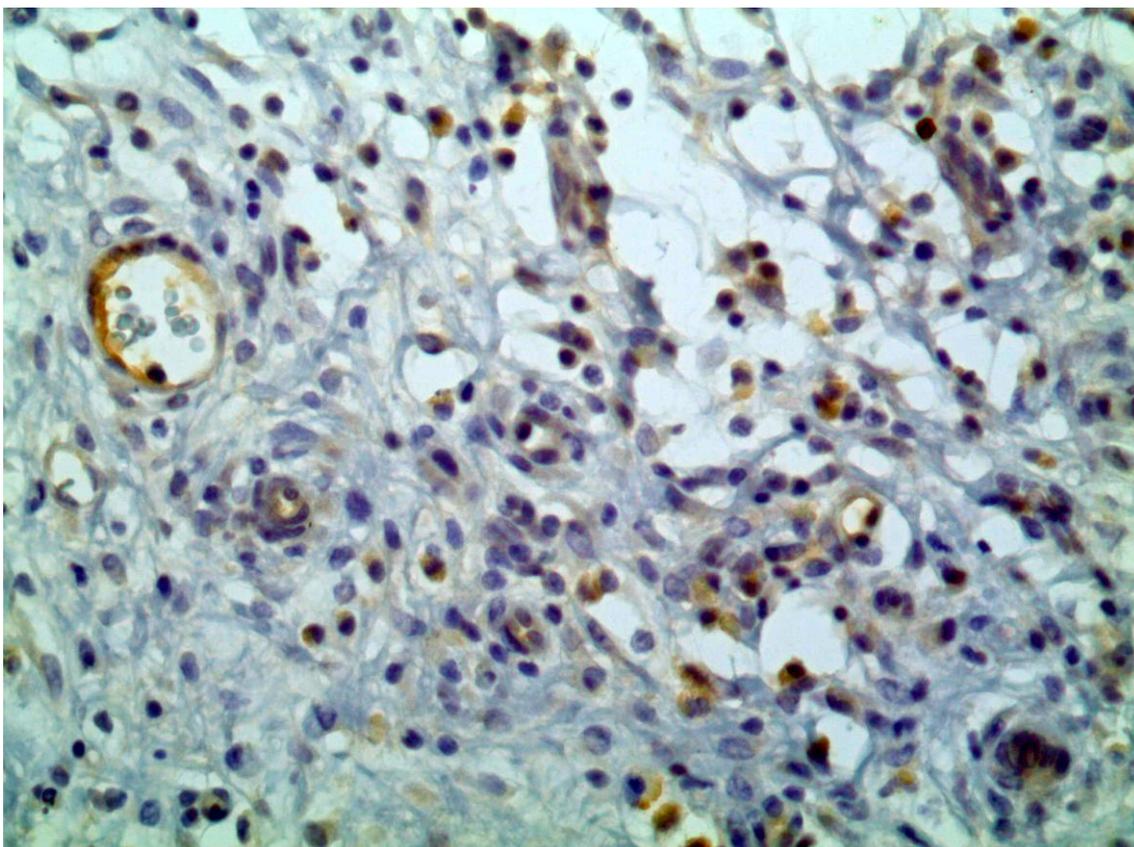


Figura 18- Corte histológico: fibroblastos, colágeno, neovasos e infiltrado de mononucleares em área de fibrose (HE,200X)



Não houve diferença entre os subgrupos em relação à imuno-histoquímica para VEGF. Ela foi positiva nos fibroblastos, leucócitos, plasmócitos e vasos da região da anastomose, tanto no 3<sup>o</sup> quanto no 7<sup>o</sup> DPO (figura 19).

Figura 19 - Expressão imuno-histoquímica (coloração marrom) de VEGF em vasos, fibroblastos e leucócitos na área da anastomose, 400X.



#### 4.3.8 Expressão de metaloproteinases e interleucinas

No 3<sup>o</sup> DPO, observou-se que a administração de drogas procinéticas (subgrupos NM3 e NB3) causou aumento importante da expressão do gene para MMP1a, sendo este maior no subgrupo tratado com bromoprida. Ocorreu ainda aumento da expressão do gene para MMP8 e MMP13, porém em menor intensidade (tabela 16).

Tabela 16- Fold das anastomoses avaliadas no 3° dia de pós-operatório na ausência de sepse abdominal

Subgrupo	Gene		
	MMP1a	MMP8	MMP13
NM3	270,50	2,12	4,47
NB3	353,01	4,57	29,02

No 7° DPO, os animais tratados com metoclopramida não apresentaram alteração na expressão do gene para MMP1a e MMP8 e tiveram discreto aumento da expressão do gene para MMP13. As animais tratados com bromoprida tiveram aumento da expressão dos genes para as três MMP estudadas, com maior efeito para a MMP 13. (tabela 17).

Tabela 17 - Fold das anastomoses avaliadas no 7° dia de pós-operatório na ausência de sepse abdominal

Subgrupo	Gene		
	MMP1a	MMP8	MMP13
NM7	2,00	2,00	2,19
NB7	2,10	2,03	7,76

No 3° DPO, a administração de metoclopramida não alterou a expressão dos genes para TNF  $\alpha$  e IL1  $\beta$ . Houve aumento a expressão dos genes para IL6, INF $\gamma$  e IL10. Os animais tratados com bromoprida tiveram aumento da expressão para os genes de todas as interleucinas avaliadas, com aumento muito expressivo para INF  $\gamma$  e IL 10 (tabela 18).

Tabela 18 - Fold das anastomoses avaliadas no 3° dia de pós-operatório na ausência de sepse abdominal

Subgrupo	Gene				
	TNF $\alpha$	IL6	IL1 $\beta$	INF $\gamma$	IL10
NM3	2,00	8,12	2,00	3,00	2,10
NB3	2,22	44,72	2,31	101655,33	187091,66

No 7° DPO, os animais tratados com metoclopramida não tiveram alteração na expressão dos genes para IL1  $\beta$ , INF  $\gamma$  e IL10. Houve aumento da expressão dos genes para TNF $\alpha$  e IL6. A administração de bromoprida não alterou a expressão apenas do

gene para IL1  $\beta$ . Houve aumento da expressão dos demais genes, com efeito mais importante para a IL 10 (tabela 19).

Tabela 19 - Fold das anastomoses avaliadas no 7º dia de pós-operatório na ausência de sepse abdominal

Subgrupo	Gene				
	TNF $\alpha$	IL6	IL1 $\beta$	INF $\gamma$	IL10
NM7	2,12	3,71	2,00	2,00	2,00
NB7	2,06	2,22	2,00	2,21	30,90

#### 4.4 EFEITOS DA SEPSE ABDOMINAL NA CICATRIZAÇÃO DE ANASTOMOSES

##### 4.4.1 Evolução clínica

Os parâmetros clínicos dos animais em cada DPO estão descritos nos apêndices A a L. Não houve diferença estatística entre os subgrupos de animais submetidos à sepse abdominal induzida (SS3 e SS7) e os animais controles (NS3 e NS7) na avaliação diária dos parâmetros clínicos de apatia, eriçamento, perda de pêlos, diarreia e distensão abdominal tanto nos animais submetidos à eutanásia no 3º DPO quanto naqueles mortos no 7º DPO.

##### 4.4.2 Achados intra-operatórios

Não houve diferença estatística entre os subgrupos em relação à deiscência de anastomose, tanto no 3º quanto no 7º DPO (tabelas 20 e 21). Entre os animais mortos no 3º DPO, houve um caso de deiscência de anastomose livre, com presença de fezes na cavidade abdominal à re-operação. Este animal pertencia ao subgrupo SS3 (figura 19). Não houve casos de deiscências de anastomose bloqueadas no 3º DPO.

Apenas um animal submetido à eutanásia no 7º DPO apresentou deiscência de anastomose bloqueada por epíplon. Este animal pertencia ao subgrupo submetido à

indução de sepse abdominal (SS7). Não houve casos de deiscência nos animais operados na ausência de sepse abdominal induzida (subgrupo NS7).

Tabela 20- Número de animais com achados intra-operatórios positivos à re-abordagem realizada no 3º dia de pós-operatório

Parâmetro		Subgrupo		p
		NS3	SS3	
Íleo paralítico		0	4	0,08
Obstrução		0	0	-
Abscesso intracavitário		0	3	0,21
Peritonite	Sim	0	7	0,00
	Ceco bloqueado	0	3	
Deiscência	Livre	0	1	1,00
	Bloqueada por epíplon	0	0	

Tabela 21- Número de animais com achados intra-operatórios positivos à re-abordagem realizada no 7º dia de pós-operatório

Parâmetro		Subgrupo		p
		NS7	SS7	
Íleo paralítico		1	0	1,00
Obstrução		0	0	-
Abscesso intracavitário		0	0	-
Peritonite	Sim	0	0	0,00
	Ceco bloqueado	0	9	
Deiscência	Livre	0	1	0,47
	Bloqueada por epíplon	0	0	

Figura 20- Peritonite fecal à reabertura da cavidade abdominal em animal do subgrupo SS3



A avaliação da cavidade abdominal realizada na re-operação demonstrou diferença significativa entre os subgrupos em relação à presença de peritonite tanto no 3° (p=0,00) quanto no 7° DPO (p=0,00), com predomínio deste achado nos animais submetidos à indução de sepse abdominal (subgrupos SS3 e SS7). Não houve diferença entre os subgrupos em relação à presença de íleo paralítico, obstrução intestinal ou abscesso intracavitário tanto no 3° quanto no 7° DPO (tabelas 20 e 21).

#### 4.4.3 Quantidade de aderências

Os valores de Escore de Nair podem ser vistos nas tabelas 22 e 23. Houve diferença significativa entre os subgrupos tanto no 3° (p=0,00) quanto no 7° DPO (p=0,00), com presença de maiores escores nos animais submetidos à indução de sepse abdominal.

Tabela 22- Número de animais com cada um dos escores de Nair à re-abordagem realizada no 3° dia de pós-operatório

Subgrupo	Ausência	Uma banda	Duas bandas	Três ou mais bandas	Direta à parede
NS3	8	2	0	0	0
SS3	0	0	1	8	1

p=0,00

Tabela 23- Número de animais com cada um dos escores de Nair à re-abordagem realizada no 7° dia de pós-operatório

Subgrupo	Ausência	Uma banda	Duas bandas	Três ou mais bandas	Direta à parede
NS7	6	3	1	0	0
SS7	0	0	0	8	1

p=0,00

Não houve diferença significativa entre os subgrupos na porcentagem da anastomose coberta por aderências tanto nos animais submetidos à eutanásia no 3° (p=0,31) quanto naqueles mortos no 7° DPO (p=0,65 - tabelas 24 e 25).

Tabela 24 - Número de animais com cada uma das porcentagens da anastomose cobertas por aderências à re-abordagem realizada no 3° dia de pós-operatório

Subgrupo	Até < 25%	25% a < 50%	50% a < 75%	75% a < 100%	100%
NS3	0	0	1	1	8
SS3	0	2	1	3	4

p=0,31

Tabela 25 - Número de animais com cada uma das porcentagens da anastomose cobertas por aderências à re-abordagem realizada no 7° dia de pós-operatório

Subgrupo	Até < 25%	25% a < 50%	50% a < 75%	75% a < 100%	100%
NS7	2	1	0	2	5
SS7	0	0	1	3	5

p=0,65

Não houve diferença entre os subgrupos quanto às estruturas aderidas à anastomose, tanto no 3° (p=0,15) quanto no 7° DPO (p=0,86 - tabelas 26 e 27).

Tabela 26- Número de animais com cada estrutura aderida à anastomose à re-abordagem realizada no 3° dia de pós-operatório

Subgrupo	Epíplon	Delgado	Epíplon + delgado	Epíplon + delgado + ceco	Epíplon + delgado + ceco + seminais
NS3	3	0	7	0	0
SS3	3	0	3	3	1

p=0,15

Tabela 27 - Número de animais com cada estrutura aderida à anastomose à re-abordagem realizada no 7° dia de pós-operatório

Sub grupo	Epíplon	Delgado	Epíplon + delgado	Epíplon + ceco	Epíplon + seminais	Epíplon + delgado + ceco	Epíplon + delgado + ceco + bexiga
NS7	3	1	5	0	0	1	0
SS7	3	0	3	0	0	2	1

p=0,86

#### 4.4.4 Força de ruptura

Os valores de força de ruptura das anastomoses dos animais submetidos à eutanásia no 3° e no 7° DPO estão descritos nos apêndices O e P.

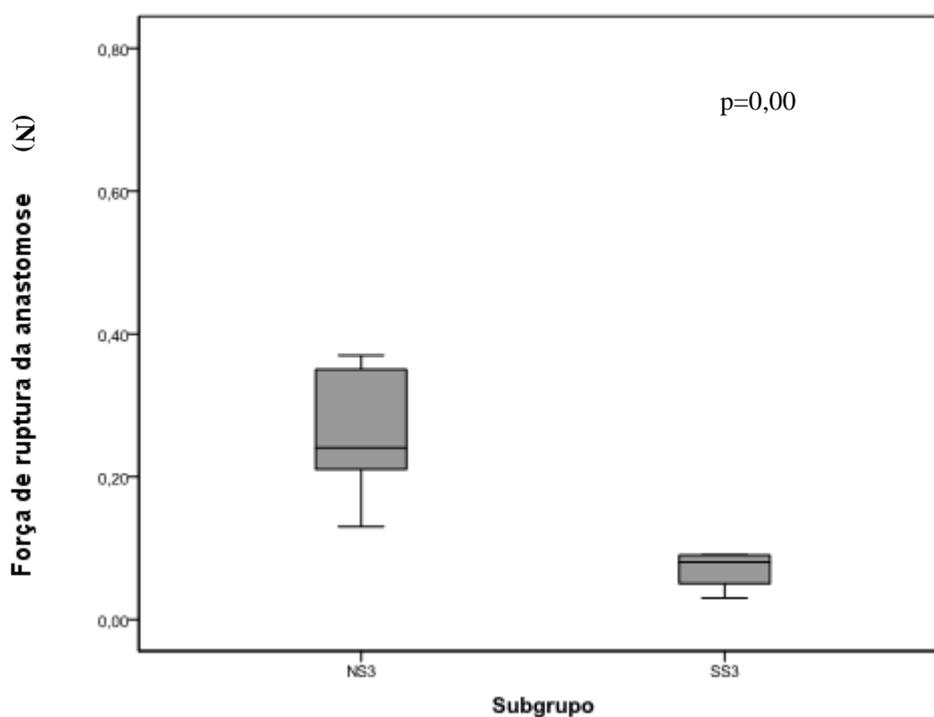
Houve diferença estatística entre os subgrupos de animais mortos no 3° DPO (p=0,00): os animais submetidos à indução de sepse abdominal (subgrupo SS3) tiveram menores valores de força de ruptura que os animais operados na ausência de sepse (subgrupo NS3 - tabela 28, gráfico 5).

Tabela 28 - Força de ruptura das anastomoses avaliadas no 3º dia de pós-operatório

Subgrupo	Valor mínimo (N)	Valor máximo (N)	Média (N)	Mediana (N)	Desvio padrão (N)
NS3	0,13	0,80	0,33	0,27	0,22
SS3	0,03	0,09	0,07	0,08	0,02

p=0,00

Gráfico 5 - Mediana e valores intervalares da força de ruptura das anastomoses avaliadas no 3º dia de pós-operatório



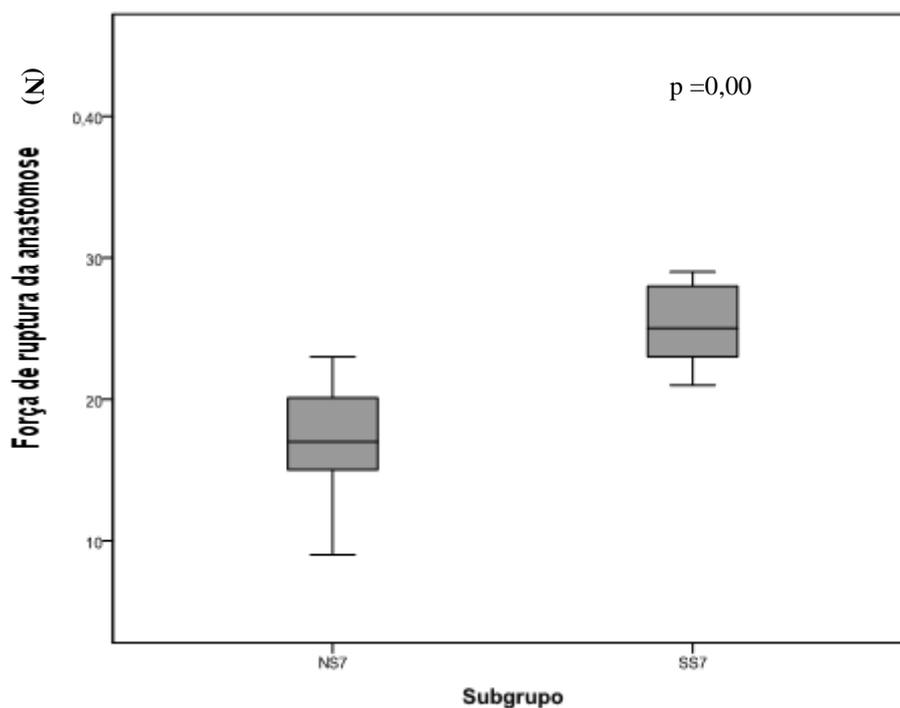
Ao contrário do ocorrido no 3º DPO, no 7º DPO os animais submetidos à indução de sepse abdominal (subgrupo SS7) tiveram maiores valores de força de ruptura que os animais operados na ausência de sepse (NS7), também com diferença estatística significativa (p=0,00 - tabela 29, gráfico 6).

Tabela 29 - Força de ruptura das anastomoses avaliadas no 7º dia de pós-operatório

Subgrupo	Valor mínimo (N)	Valor máximo (N)	Média (N)	Mediana (N)	Desvio padrão (N)
NS7	0,09	0,23	0,17	0,18	0,07
SS7	0,21	0,41	0,27	0,25	0,07

p =0,00

Gráfico 6 - Mediana e valores intervalares da força de ruptura das anastomoses avaliadas no 7º dia de pós-operatório



Todas as anastomoses romperam na linha de sutura durante a realização do teste de força de ruptura no 3º DPO. Entre os animais mortos no 7º DPO, três anastomoses do subgrupo SS7 romperam no intestino íntegro. Todas as anastomoses do subgrupo NS7 romperam na linha de sutura. Não houve diferença estatística no local de rompimento de anastomose tanto no 3º quanto no 7º DPO (p=0,08).

#### 4.4.5 Concentração de hidroxiprolina

As concentrações de hidroxiprolina dos segmentos intestinais retirados na operação inicial e dos segmentos intestinais contendo as anastomoses de cada um dos animais submetidos à eutanásia no 3° e no 7° DPO estão descritas nos apêndices Q e R.

Houve redução da concentração de hidroxiprolina no dia da eutanásia quando comparado à concentração pré-operatória em todos os animais, tanto no 3° quanto no 7° DPO (tabelas 30 e 31). Não houve diferença estatisticamente significativa na variação da concentração de hidroxiprolina das anastomoses avaliadas no 3° ( $p=0,27$ ) e 7° DPO ( $p=0,51$ ).

Tabela 30 - Variação da concentração de hidroxiprolina das anastomoses avaliadas no 3° dia de pós-operatório

Subgrupo	Mediana ( $\mu\text{g}/100\text{ mg}$ )	Média ( $\mu\text{g}/100\text{ mg}$ )	Desvio padrão
NS3	-0,40	-0,43	0,15
SS3	-0,25	-0,27	0,18

$p=0,27$

Tabela 31 - Variação da concentração de hidroxiprolina das anastomoses avaliadas no 7° dia de pós-operatório

Subgrupo	Mediana ( $\mu\text{g}/100\text{ mg}$ )	Média ( $\mu\text{g}/100\text{ mg}$ )	Desvio padrão
NS7	-0,50	-0,42	0,20
SS7	-0,55	-0,53	0,25

$p=0,51$

#### 4.4.6 Colágeno tecidual

O conteúdo de colágeno foi semelhante entre os subgrupos nas anastomoses avaliadas no 7° DPO (tabela 32).

Tabela 32 - Fração da área coberta por colágeno das anastomoses avaliadas no 7° dia de pós-operatório

Subgrupo	Média da fração da área coberta por colágeno
NS7	6,2
SS7	4,8

p=0,45

#### 4.4.7 Achados histopatológicos e imuno-histoquímico para fator de crescimento derivado do endotélio

Os achados histopatológicos peri-anastomóticos estão listados nos apêndices S a V e foram semelhantes entre os subgrupos, tanto no 3° e 7° DPO.

No 3° DPO, houve predomínio dos seguintes achados: presença intensa de polimorfonucleares (p=1,00), e presença moderada de mononucleares (p=1,00), fibroblastos (p=1,00) e neovasos (p=1,00). Também predominaram a presença de necrose (p=0,47) e colônias (p=1,00), sem diferença estatística entre os subgrupos. Todos os animais avaliados apresentaram presença crosta fibrino-leucocitária, moderada quantidade de edema, presença de úlcera e abscesso e ausência de corpo estranho.

No 7° DPO, todos os animais apresentaram intensa quantidade de fibroblastos, moderada quantidade de mononucleares, intensa quantidade de polimorfonucleares, moderada quantidade de neovasos, moderada quantidade de edema, presença de crosta fibrino-leucocitária e de úlcera. Houve predomínio da presença de colônias (p=0,58), corpo estranho (p=0,07) e abscesso (p=1,00); e ausência de necrose (p=1,00), sem diferença estatística entre os subgrupos.

Não houve diferença entre os subgrupos em relação à imuno-histoquímica para VEGF. Ela foi positiva nos fibroblastos, leucócitos, plasmócitos e vasos da região da anastomose, tanto no 3° quanto no 7° DPO.

#### 4.4.8 Expressão de metaloproteinases e interleucinas

A indução da sepse abdominal esteve associada ao aumento da expressão do gene para MMP1a (principalmente) e MMP13 (em menor proporção) tanto no 3°

quanto no 7° DPO, com diminuição da intensidade com o passar do tempo. Não houve alteração da expressão do gene para MMP 8 (tabela 33).

Tabela 33 - Fold das anastomoses avaliadas no 3° e 7° dia de pós-operatório

Subgrupo	Gene		
	MMP1a	MMP8	MMP13
SS3	277,55	2,00	2,55
SS7	32,21	2,00	2,23

Os animais submetido à CLP não apresentaram alteração na expressão dos genes para IL1 $\beta$  e INF $\gamma$  tanto no 3° quanto no 7° DPO. Houve aumento da expressão do gene para TNF $\alpha$  apenas no 7° DPO. A expressão do gene para IL6 aumentou ao longo do tempo e a expressão do gene para IL10 teve comportamento inverso (tabela 34).

Tabela 34 - Fold das anastomoses avaliadas no 3° e 7° dia de pós-operatório

Subgrupo	Gene				
	TNF $\alpha$	IL6	IL1 $\beta$	INF $\gamma$	IL10
SS3	2,00	2,19	2,00	2,00	3,00
SS7	3,03	4,13	2,00	2,00	2,23

## 4.5 AVALIAÇÃO DOS ANIMAIS TRATADOS COM DROGAS PROCINÉTICAS NA PRESENÇA DE SEPSE ABDOMINAL INDUZIDA

### 4.5.1 Evolução clínica

Os parâmetros clínicos dos animais em cada dia de DPO estão descritos nos apêndices A a L. Não houve diferença estatística entre os grupos na avaliação diária dos

parâmetros clínicos de apatia, eriçamento, perda de pêlos, diarreia e distensão abdominal nos animais submetidos à eutanásia no 3° DPO.

Entre os animais mortos no 7° DPO, houve diferença estatística somente na presença de eriçamento de pêlos no 7° DPO ( $p=0,00$ ). Não houve diferença entre os grupos no demais parâmetros clínicos avaliados dos animais submetidos à eutanásia no 7° DPO.

#### 4.5.2 Achados intra-operatórios

Não houve diferença estatística entre os grupos em relação à deiscência de anastomose, tanto no 3° ( $p=1,00$ ) quanto no 7° DPO ( $p=1,00$  - tabelas 35 e 36). Houve um caso de deiscência de anastomose livre, com presença de fezes na cavidade abdominal à re-operação no grupo de animais mortos no 3° DPO. Este animal pertencia ao subgrupo controle (SS3). Ocorreu ainda uma deiscência de anastomose bloqueada por epíplon, vista apenas após a liberação de todas as estruturas aderidas à anastomose e abertura da peça. Este animal pertencia ao subgrupo submetido à administração de bromoprida (SB3).

No 7° DPO ocorreram duas deiscências de anastomose bloqueadas por epíplon. Estes animais pertenciam aos subgrupos tratados com metoclopramida (SM7) e controle (SS7). Não houve casos de deiscência livre nos animais submetidos à eutanásia no 7° DPO.

A avaliação da cavidade abdominal realizada à re-operação não demonstrou diferença significativa entre os subgrupos em relação à presença de peritonite, íleo paralítico, obstrução intestinal ou abscesso intracavitário, tanto no grupo de animais submetidos à eutanásia no 3° quanto no 7° DPO (tabelas 35 e 36).

Tabela 35 - Número de animais com achados intra-operatórios positivos à re-abordagem realizada no 3º dia de pós-operatório na presença de sepse abdominal

Parâmetro		Subgrupo			p
		SM3	SB3	SS3	
Íleo paralítico		1	3	4	0,45
Obstrução		0	0	0	-
Abscesso intracavitário		1	2	3	0,84
Peritonite	Sim	4	4	7	0,41
	Ceco bloqueado	6	5	3	
Deiscência	Livre	0	0	1	1,00
	Bloqueada por epíplon	0	1	0	

Tabela 36 - Número de animais com achados intra-operatórios positivos à re-abordagem realizada no 7º dia de pós-operatório na presença de sepse abdominal

Parâmetro		Subgrupo			p
		SM7	SB7	SS7	
Íleo paralítico		2	0	0	0,31
Obstrução		1	1	0	1,00
Abscesso intracavitário		0	0	0	-
Peritonite	Sim	0	0	0	-
	Ceco bloqueado	10	9	9	
Deiscência	Livre	0	0	0	1,00
	Bloqueada por epíplon	1	0	1	

#### 4.5.3 Quantidade de aderências

Os valores de Escore de Nair podem ser vistos nas tabelas 37 e 38. Não houve diferença significativa entre os grupos tanto no 3º (p=0,31) quanto no 7º DPO (p=1,00).

Tabela 37 - Número de animais com cada um dos escores de Nair à re-abordagem realizada no 3° dia de pós-operatório na presença de sepse abdominal

Subgrupo	Ausência	Uma banda	Duas bandas	Três ou mais bandas	Direta à parede
SM3	0	1	0	9	0
SB3	0	0	3	6	1
SS3	0	0	1	8	1

p=0,31

Tabela 38 - Número de animais com cada um dos escores de Nair à re-abordagem realizada no 7° dia de pós-operatório na presença de sepse abdominal

Subgrupo	Ausência	Uma banda	Duas bandas	Três ou mais bandas	Direta à parede
SM7	0	0	0	8	2
SB7	0	0	0	8	1
SS7	0	0	0	8	1

p=1,00

Não houve diferença significativa entre os subgrupos na porcentagem da anastomose coberta por aderências nos animais submetidos à eutanásia tanto no 3° (p=0,26) quanto no 7° DPO (p=0,90 - tabelas 39 e 40).

Tabela 39 - Número de animais com cada uma das porcentagens da anastomose cobertas por aderências à re-abordagem realizada no 3° dia de pós-operatório na presença de sepse abdominal

Subgrupo	Até < 25%	25% a < 50%	50% a < 75%	75% a < 100%	100%
SM3	0	0	0	2	8
SB3	2	0	1	3	4
SS3	0	2	1	3	4

p=0,26

Tabela 40- Número de animais com cada uma das porcentagens da anastomose cobertas por aderências à re-abordagem realizada no 7° dia de pós-operatório na presença de sepse abdominal

Subgrupo	Até < 25%	25% a < 50%	50% a <75%	75% a <100%	100%
SM7	0	0	1	2	7
SB7	0	0	1	1	7
SS7	0	0	7	7	5

p=0,90

Não houve diferença entre os grupos quanto às estruturas aderidas à anastomose, tanto no 3° (p=0,74) quanto no 7° DPO (p=0,92 - tabelas 41 e 42).

Tabela 41 - Número de animais com cada estrutura aderida à anastomose à re-abordagem realizada no 3° dia de pós-operatório na presença de sepse abdominal

Sub Grupo	Epíplon	Delgado	Epíplon + delgado	Epíplon + delgado + ceco	Epíplon + delgado + seminais	Epíplon + delgado +ceco + seminais
SM3	1	0	6	2	0	1
SB3	3	1	4	2	0	0
SS3	3	0	3	3	1	0

p=0,74

Tabela 42- Número de animais com cada estrutura aderida à anastomose à re-abordagem realizada no 7° dia de pós-operatório na presença de sepse abdominal

Sub grupo	Epíplon	Delgado	Epíplon + delgado	Epíplon + ceco	Epíplon + seminais	Epíplon + delgado +ceco	Epíplon + delgado + ceco + bexiga
SM7	4	0	2	0	1	3	0
SB7	2	0	2	0	0	4	1
SS7	3	0	3	0	0	2	1

p=0,92

#### 4.5.4 Força de ruptura

Os valores de força de ruptura das anastomoses dos animais submetidos à eutanásia no 3° e no 7° DPO estão descritos nos apêndices O e P.

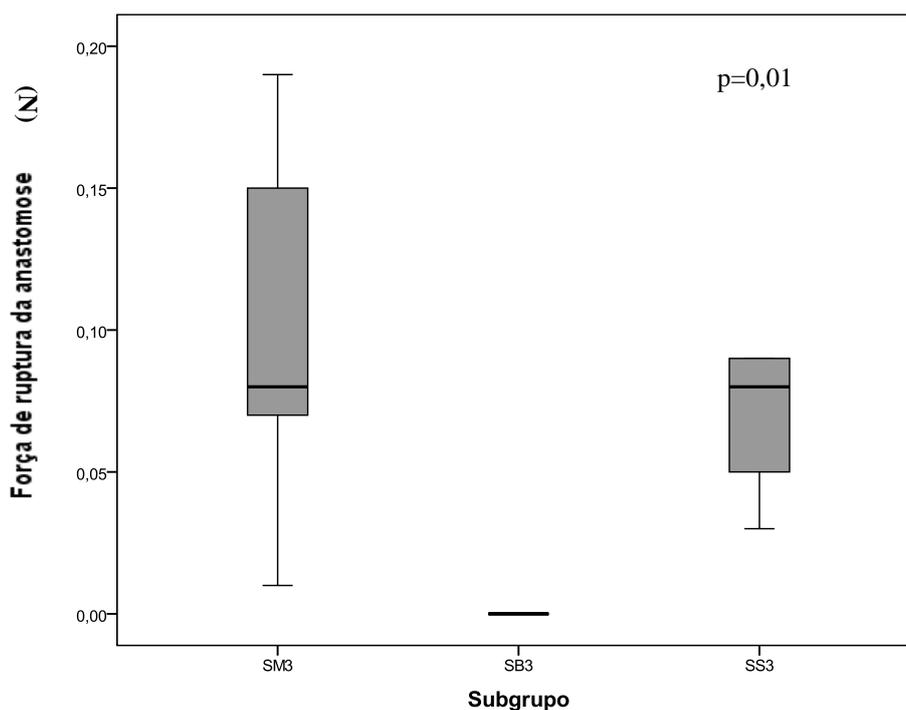
No 3° DPO, os animais tratados com bromoprida (subgrupo SB3) tiveram menores valores de força de ruptura ( $p=0,01$ ) que os animais tratados com metoclopramida (subgrupo SM3) e animais controles (subgrupo SS3 - tabela 43, gráfico 7).

Tabela 43 - Força de ruptura das anastomoses avaliadas no 3° dia de pós-operatório na presença de sepse abdominal

Subgrupo	Valor mínimo (N)	Valor máximo (N)	Média (N)	Mediana (N)	Desvio padrão (N)
SM3	0,01	0,19	0,10	0,08	0,05
SB3	0,00	0,15	0,02	0,00	0,05
SS3	0,03	0,09	0,07	0,08	0,02

$p=0,01$

Gráfico 7 - Mediana e valores intervalares da força de ruptura das anastomoses avaliadas no 3° dia de pós-operatório na presença de sepse abdominal



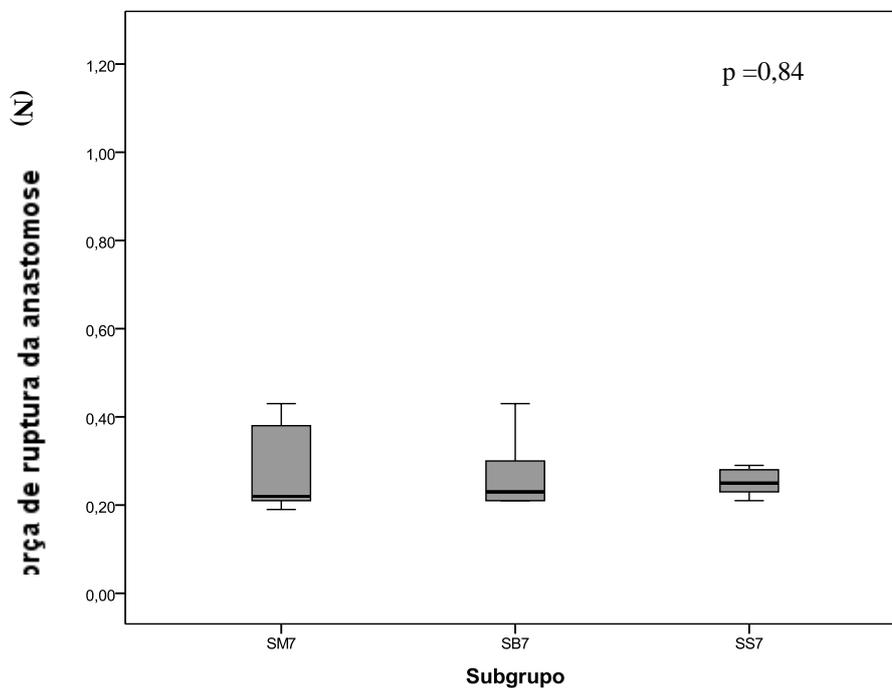
Não houve diferença entre os grupos ( $p = 0,84$ ) em relação ao valor da força de ruptura da anastomose dos animais submetidos à eutanásia no 7º DPO (tabela 44, gráfico 8).

Tabela 44 - Força de ruptura das anastomoses avaliadas no 7º dia de pós-operatório na presença de sepse abdominal

Subgrupo	Valor mínimo (N)	Valor máximo (N)	Média (N)	Mediana (N)	Desvio padrão (N)
SM7	0,19	1,21	0,37	0,22	0,34
SB7	0,21	0,43	0,27	0,23	0,08
SS7	0,21	0,41	0,27	0,25	0,06

$p = 0,84$

Gráfico 8 - Mediana e valores intervalares da força de ruptura das anastomoses avaliadas no 7º dia de pós-operatório na presença de sepse abdominal



Todas as anastomoses romperam na linha de sutura durante a realização do teste de força de ruptura no 3º DPO. Entre os animais mortos no 7º DPO, a maior parte

rompeu também rompeu na linha de anastomose, sem diferença entre os grupos ( $p=0,76$ ).

#### 4.5.5 Concentração de hidroxiprolina

As concentrações de hidroxiprolina dos segmentos intestinais retirados na operação inicial e dos segmentos intestinais contendo as anastomoses de cada um dos animais submetidos à eutanásia no 3° e no 7° DPO estão descritas nos apêndices Q e R.

Houve redução da concentração de hidroxiprolina no dia da eutanásia quando comparado à concentração pré-operatória em todos os animais, tanto no 3° quanto no 7° DPO (tabelas 45 e 46).

Tabela 45 - Variação da concentração de hidroxiprolina das anastomoses avaliadas no 3° dia de pós-operatório na presença de sepse abdominal

Subgrupo	Mediana ( $\mu\text{g}/100\text{ mg}$ )	Média ( $\mu\text{g}/100\text{ mg}$ )	Desvio padrão
SM3	- 0,55	- 0,64	0,13
SB3	- 0,80	- 0,75	0,47
SS3	- 0,24	- 0,44	0,16

$p=0,03$

Tabela 46 - Variação da concentração de hidroxiprolina das anastomoses avaliadas no 7° dia de pós-operatório na presença de sepse abdominal

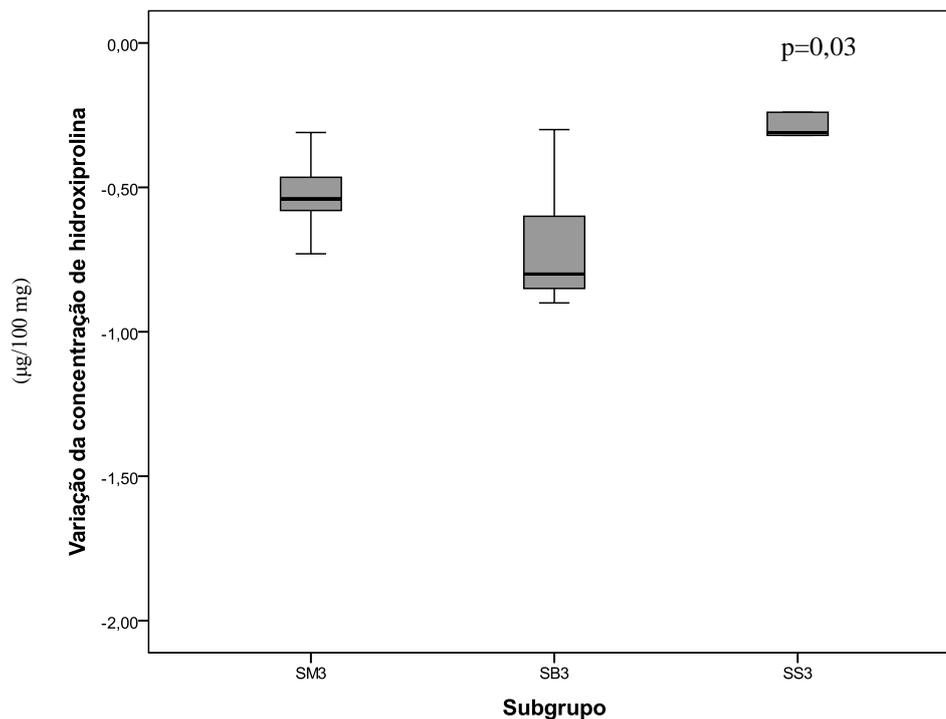
Subgrupo	Mediana ( $\mu\text{g}/100\text{ mg}$ )	Média ( $\mu\text{g}/100\text{ mg}$ )	Desvio padrão
SM7	- 0,45	- 0,47	0,17
SB7	- 0,50	- 0,45	0,10
SS7	- 0,55	- 0,53	0,25

$p=0,72$

Houve diferença estatisticamente significante na variação da concentração de hidroxiprolina das anastomoses dos animais submetidos à eutanásia no 3° DPO ( $p=0,03$ ): as anastomoses dos animais tratados com bromoprida (subgrupo SB3) foram

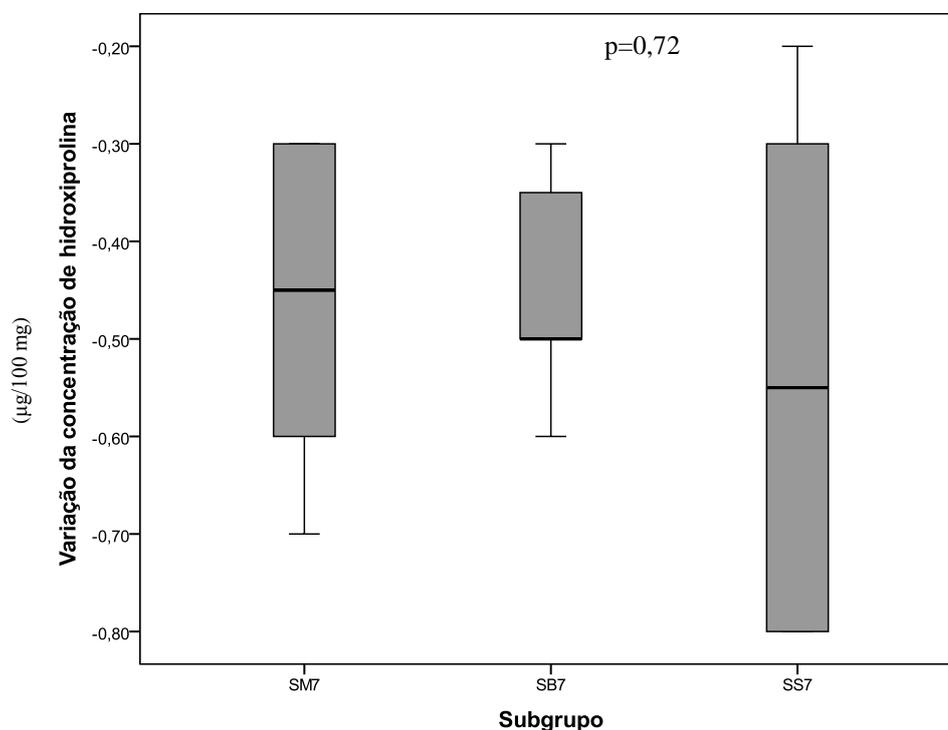
as que tiveram maior redução na concentração de hidroxiprolina e as dos animais controles (subgrupo SS3) foram as que tiveram menor redução (gráfico 9).

Gráfico 9 - Mediana e valores intervalares da variação do conteúdo de hidroxiprolina das anastomoses avaliadas no 3º dia de pós-operatório na presença de sepse abdominal



Não houve diferença estatisticamente significativa ( $p=0,72$ ) na variação da concentração de hidroxiprolina das anastomoses dos animais submetidos à eutanásia no 7º DPO (gráfico 10).

Gráfico 10 - Mediana e valores intervalares da variação do conteúdo de hidroxiprolina das anastomoses avaliadas no 7º dia de pós-operatório na presença de sepse abdominal



#### 4.5.6 Colágeno tecidual

As anastomoses dos animais controles (subgrupo SS7) tiveram menor porcentagem de colágeno ( $p=0,05$ ) que as dos animais tratados com metoclopramida (subgrupo SM7) ou bromoprida (subgrupo SB7), com diferença estatisticamente significativa (tabela 47).

Tabela 47 - Fração da área coberta por colágeno das anastomoses avaliadas no 7º dia de pós-operatório na presença de sepse abdominal

Subgrupo	Média da fração da área coberta por colágeno
SM7	9,5
SB7	8,5
SS7	3,8

$p=0,05$

#### 4.5.7 Achados histopatológicos e imuno-histoquímico para fator de crescimento derivado do endotélio

Os achados histopatológicos peri-anastomóticos estão listados nos apêndices S a V e foram semelhantes entre os subgrupos, tanto no 3° e 7° DPO.

No 3° DPO, houve predomínio dos seguintes achados: presença intensa de polimorfonucleares ( $p=1,00$ ), moderada quantidade de mononucleares ( $p=1,00$ ), fibroblastos ( $p=1,00$ ) e neovasos ( $p=1,00$ ). Também predominaram a presença de crosta fibrino-leucocitária ( $p=1,00$ ), necrose ( $p=0,75$ ) e abscesso ( $p=1,00$ ), sem diferença estatística entre os subgrupos. Todos os animais avaliados apresentaram presença moderada de edema, presença de úlcera e ausência de corpo estranho. Houve diferença estatística apenas em relação à presença de colônias ( $p=0,02$ ), que foi maior no subgrupo controle (SS3).

No 7° DPO, houve predomínio dos seguintes achados: intensa quantidade de fibroblastos ( $p=0,64$ ), moderada quantidade de mononucleares ( $p=0,64$ ), intensa quantidade de polimorfonucleares ( $p=0,64$ ), presença de crosta fibrino-leucocitária ( $p=0,31$ ), úlcera ( $p=0,32$ ), necrose ( $p=1,00$ ), abscesso ( $p=0,16$ ), colônias ( $p=0,71$ ) e corpo estranho ( $p=0,39$ ), sem diferença estatística entre os subgrupos. Todos os animais apresentaram moderada quantidade de neovasos e edema.

Não houve diferença entre os subgrupos em relação à imuno-histoquímica para VEGF. Ela foi positiva nos fibroblastos, leucócitos, plasmócitos e vasos da região da anastomose, tanto no 3° quanto no 7° DPO.

#### 4.5.8 Expressão de metaloproteinases e interleucinas

No 3° DPO, houve aumento da expressão do gene para MMP1a nos animais submetidos à sepse abdominal e tratados com metoclopramida (subgrupos SM3), sem efeito sobre a expressão dos genes para MMP 8 e MMP 13. Já nos animais tratados com bromoprida (subgrupo SB3), houve aumento da expressão do gene para as três MMP avaliadas, com maior efeito para MMP 8 (tabela 48).

Tabela 48 - Fold das anastomoses avaliadas no 3º dia de pós-operatório na presença de sepse abdominal

Subgrupo	Gene		
	MMP1a	MMP8	MMP13
SM3	2,73	2,00	2,00
SB3	3,48	7,46	2,22

No 7º DPO, ocorreu aumento da expressão dos genes para MMP1a , MMP 8 e MMP 13 nos animais submetidos à administração de drogas procinéticas (subgrupos SM7 e SB7), com maior efeito para MMP 1a e MMP 8 nos animais tratados com metoclopramida e para MMP 13 nos animais tratados com bromprida (tabela 49).

Tabela 49 – Fold das anastomoses avaliadas no 7º dia de pós-operatório na presença de sepse abdominal

Subgrupo	Gene		
	MMP1a	MMP8	MMP13
SM7	9,87	5,50	2,27
SB7	7,06	2,26	435,03

No 3º DPO, houve aumento da expressão dos genes para TNF $\alpha$ , IL6 e IL1 $\beta$  tanto nos animais tratados com metoclopramida quanto nos tratados com bromprida. Somente os animais do subgrupo SB3 evidenciaram aumento da expressão do gene para INF $\gamma$ . Não houve alteração na expressão do gene para IL10 nos dois subgrupos de animais (tabela 50).

Tabela 50 - Fold das anastomoses avaliadas no 3º dia de pós-operatório na presença de sepse abdominal

Subgrupo	Gene				
	TNF $\alpha$	IL6	IL1 $\beta$	INF $\gamma$	IL10
SM3	69041,04	28,32	2,19	2,00	2,00
SB3	478,91	82,29	2,78	60,56	2,00

No 7° DPO, houve aumento da expressão dos genes para todas as citocinas avaliadas tanto nos animais tratados com metoclopramida quanto nos animais tratados com bromoprida. Este aumento foi maior pronunciado para IL10 (tabela 51).

Tabela 51 - Fold das anastomoses avaliadas no 7° dia de pós-operatório na presença de sepse abdominal

Subgrupo	Gene				
	TNF $\alpha$	IL6	IL1 $\beta$	INF $\gamma$	IL10
SM7	2,09	3,58	2,58	82,41	96,71
SB7	2,66	2,17	2,63	2,55	71,92

## 5 DISCUSSÃO

O cólon é a região do trato gastrointestinal (TGI) mais vulnerável à deiscência de anastomoses (YARIMKAYA et al., 2003). A alta mortalidade e a morbidade grave associadas à deiscência justificam a necessidade de avaliação adicional de métodos que diminuíssem a sua incidência (HOEPPNER et al., 2010) e dos efeitos deletérios de drogas sobre a cicatrização.

A ocorrência de deiscência é particularmente alta quando a anastomose é realizada no cólon distal, com elevada morbi-mortalidade quando comparada a anastomoses realizadas em outras porções do TGI (JIBORN et al., 1980). A anastomose colorretal baixa está associada a uma maior incidência de complicações pela carga fecal e dificuldade técnica associadas (CAKMAK et al., 2009).

Pesquisas experimentais sobre a cicatrização de anastomoses têm sido realizadas no rato pois acredita-se que o modelo básico de reparo tecidual e a composição da microflora fecal deste animal sejam similares ao humano (SIEMONSMA et al., 2003; CAKMAK et al., 2009; HERRMANN et al., 1964). O rato apresenta praticidade para experimentos com grande número de animais com similaridade genética e fisiológica (HERRMANN et al., 1964). Outras vantagens na sua utilização consistem na fácil padronização quanto à raça, sexo e peso; na resistência à infecções, o que dispensa a utilização de técnica asséptica; no baixo custo e na sua fácil manutenção em biotério (SIRIMARCO et al., 2001). Entretanto, no modelo animal, a taxa de falência espontânea da anastomose é muito baixa quando comparada ao humano, onde pode ser de mais de 23%. Por isso, é importante que sejam estudados outros parâmetros além da avaliação macroscópica (HOEPPNER et al., 2010).

Os animais foram submetidos à eutanásia no 3º e 7º DPO para a avaliação das alterações precoces na cicatrização de anastomoses decorrentes da sepse e do uso de drogas procinéticas. Isso porque a maior parte das complicações anastomóticas ocorrem até o 7º DPO e, após este tempo, a força de ruptura passa a ser semelhante à do tecido intacto, o que limita a avaliação da presença de aderências sobre a cicatrização intestinal (SOARES JUNIOR; SOUZA, 2010).

Na primeira fase deste estudo, foi avaliada a influência das drogas procinéticas sobre a cicatrização das anastomoses na ausência de sepse abdominal. Não houve diferença estatística entre os subgrupos em relação aos parâmetros clínicos, incidência de

deiscência de anastomose e achados intra-operatórios de peritonite, abscesso, obstrução ou íleo paralítico, tanto no 3º quanto no 7º DPO.

O uso das drogas procinéticas esteve associado a uma menor cobertura da anastomose por aderências no 3º DPO. O subgrupo que recebeu metoclopramida foi o de menor cobertura, seguido pelo subgrupo que recebeu bromoprida. Os animais controles tiveram a maior taxa de cobertura da anastomose por aderências. Entretanto, em relação à quantidade total de aderências avaliada pelo escore de Nair e às estruturas aderidas à anastomose, não houve diferença estatística entre os grupos.

As anastomoses dos animais que receberam procinéticos tiveram menores valores de força de ruptura que as dos animais controle no 3º DPO. Este fato ocorreu principalmente após a administração de bromoprida. No 7º DPO, não houve diferença entre os subgrupos em relação à quantidade de aderência e aos valores de força de ruptura.

Após a realização de qualquer intervenção cirúrgica na cavidade abdominal, a ativação da cascata de coagulação promove a conversão do fibrinogênio em fibrina com consequente formação da matriz de fibrina que conecta a superfície peritoneal desnuda por meio de bandas. A injúria tecidual causa perfusão inadequada e isquemia local, o que reduz a atividade fibrinolítica e favorece a persistência das bandas de fibrina e a formação de aderências (AYTEN et al., 2008).

As aderências podem ter ação biológica benéfica para a cicatrização de anastomoses por facilitar a neovascularização, melhorar a drenagem linfática e a capacitação fagocitária e pelo efeito mecânico direto, ao selar pequenas falhas, atuando assim como uma cola fisiológica (SOARES JUNIOR; SOUZA, 2010).

Os achados do presente estudo podem corroborar com o argumento de que as aderências à anastomose são de maior importância na cicatrização de anastomoses que o total de aderências presentes na cavidade abdominal, uma vez que são elas que realmente podem proteger a anastomoses de vazamentos. Este efeito benéfico pode ser ainda maior nos primeiros dias de pós-operatório, época em que a resistência da anastomose atinge os seus valores mínimos.

SPINGALL e SPITZ (1989) estudaram a ação da cisaprida, outro agente procinético, sobre a cicatrização de anastomoses de ratos no 7º DPO. A administração da droga esteve associada a uma menor quantidade de aderências, porém sem efeito sobre a resistência anastomótica.

GARCIA-OLMO et al. (1997), em seu estudo sobre os efeitos farmacológicos da manipulação da motilidade gastrointestinal sobre a resistência de anastomoses colônicas, notaram que, no 4º DPO, havia menor quantidade de aderências à anastomose nos animais que receberam metoclopramida quando comparados aos animais controle, porém sem diferença significativa. À regressão múltipla, a presença de aderências à anastomose foi o fator de maior influência sobre a pressão de ruptura. Os autores concluíram que o uso da metoclopramida no pós-operatório recente esteve associado ao aumento significativo do número de deiscências de anastomoses colônicas, e, nos animais sobreviventes, a uma diminuição significativa na resistência das anastomoses.

O uso de azul de metileno preveniu a formação de aderências e prejudicou a fase inicial da cicatrização de anastomoses do cólon esquerdo de ratos no 3º DPO, ao diminuir a pressão de ruptura. Este efeito não ocorreu no 7º DPO (DINC et al., 2006). Outro estudo demonstrou que no 5º DPO, a resistência de anastomoses com aderências intactas foi maior que a de anastomoses submetidas ao teste após a remoção de aderências (WU et al., 2003).

Em um estudo multicêntrico randomizado com a presença de 1791 pacientes submetidos a operações abdomino-pélvicas, o uso do agente anti formação de aderências Seprafilm® não aumentou a incidência de fístulas. Entretanto, foi sugerido que este agente pode alterar as conseqüências da deiscência de anastomoses, uma vez que as aderências podem prevenir a propagação do conteúdo e, em alguns casos, selar a anastomose, evitando sintomas clínicos (BECK et al., 2003).

Outros estudos correlacionaram a presença de aderências com a resistência anastomótica e tiveram achados opostos, demonstrando que outros fatores podem ser de maior importância sobre a cicatrização. A avaliação de anastomose íleo-cólicas de animais submetido à injeção intra-peritoneal de polipeptídeos bioativos revelou que estes agentes estavam associados a uma diminuição da quantidade de aderências e, ao contrário do nosso estudo, ao aumento da segurança da anastomose por aumentar a pressão de rompimento no 3º DPO (TINGSTEDT et al., 2006).

O uso de cianoacrilato provocou maior formação de aderências porém menor resistência tênsil em anastomoses do cólon direito de ratos mortos no 7º DPO (SOARES JÚNIOR; SOUZA, 2010). BLOUHOS et al. (2010), ao estudarem anastomoses realizadas no cólon transversal de ratos, constataram que, no 10º DPO, o uso do antineoplásico oxaliplatina esteve associado a um maior número de aderências à

anastomose porém menor resistência tênsil, menor número de células inflamatórias e menor deposição de colágeno.

Segundo TRUBIAN (2004), anastomoses colônicas perdem 72 a 95% da força de ruptura nos primeiros três dias de pós-operatório. Após duas semanas, a resistência é semelhante aos controles não operados. HERRMANN et al. (1964) estudaram a evolução normal da cicatrização de anastomoses do cólon esquerdo de ratos, desde 3 horas até 1 ano de pós-operatório. Eles determinaram que a resistência tênsil não se altera desde 3 horas até 4 a 5 dias. Após este período ocorre um ganho rápido na resistência e, por volta do sétimo dia, o seu valor iguala-se ao do intestino não operado. A resistência máxima é atingida entre o 8° e 10° DPO, época na qual o rompimento ocorre proximal ou distal à anastomose.

No nosso estudo, quase todas as anastomoses romperam na linha de sutura durante a realização do teste de força de ruptura. HENDRIKS e MASTBOOM (1990) acreditam que a pressão de ruptura seja um bom método para estudo da cicatrização de anastomoses somente quando a ruptura se dá no local da anastomose e o teste for realizado nos primeiros dias após a cirurgia, quando a resistência anastomótica é baixa e as chances para deiscências são relativamente altas. Os mesmos autores destacam não ter havido correlação entre concentração de colágeno e parâmetros mecânicos na cicatrização de anastomoses intestinais.

Não encontramos diferença entre os subgrupos em relação ao conteúdo de colágeno tecidual. O colágeno é a principal proteína da matriz extracelular e o constituinte predominante da cicatriz final (INAN et al., 2006). No TGI, está localizado principalmente na camada submucosa (LORD et al., 1977). Ele é importante em todas as fases da cicatrização e é crítico para a força e integridade tecidual. Entretanto, a força anastomótica final nem sempre está relacionada à concentração absoluta de colágeno: a estrutura e o arranjo da matriz de colágeno podem ser mais importantes (AYDIN et al., 2006). É provável que o ganho da resistência mecânica esteja diretamente relacionada à qualidade do colágeno (LEITE et al., 1993).

A anastomose é mais fraca no 3° e 4° DPO pelo baixo conteúdo de colágeno decorrente da alta atividade da colagenase induzida pela injúria tecidual na fase inicial da cicatrização (JIBORN et al., 1980). Tanto granulócitos quanto monócitos que estão presentes na área anastomótica após 3 e 24 horas de pós-operatório, respectivamente, têm grande atividade colagenolítica (MASTBOOM et al., 1991). Já foi demonstrado uma perda substancial da capacidade tecidual de segurar a sutura nos primeiros dias de

pós-operatório em todos os segmentos do TGI, provavelmente pela degradação do colágeno tecidual. Este fator pode ser importante no desenvolvimento da deiscência de anastomose (HOGSTROM; HAGLUND, 1985).

No nosso estudo, a quantificação do colágeno tecidual foi realizada somente no 7° DPO porque entre o 4° e o 7° DPO, a síntese de colágeno começa a compensar a sua lise e a concentração de colágeno aumenta (JIBORN et al., 1978). Além disso, no 7° DPO a atividade colagenolítica retorna ao normal (HOEPPNER et al., 2010). Após este período, a anastomose adquire sua força mecânica total (AYDIN et al., 2006).

Houve redução da concentração de hidroxiprolina em todos os subgrupos avaliados. IRVIN e HUNT (1974) demonstraram a diminuição da concentração de hidroxiprolina no segmento anastomótico no 3° DPO. JIBORN et al. (1978) também estudaram esta diminuição e constataram que a concentração de hidroxiprolina retorna ao normal somente após 10 a 14 dias da operação.

Não houve diferença quanto à redução da concentração de hidroxiprolina entre os subgrupos de animais mortos no 3° DPO. No 7° DPO, os animais que receberam metoclopramida tiveram melhor evolução (menor perda de hidroxiprolina) que os animais controles.

Não foram encontrados outros estudos que analisassem o efeito de procinéticos sobre a concentração de hidroxiprolina. Sabe-se, entretanto, que a avaliação da hidroxiprolina nem sempre está em paralelo com os demais parâmetros da cicatrização (KARATAS et al., 2010; AGALAR et al., 2000). A ausência de relação direta entre os testes mecânicos e a dosagem de hidroxiprolina não significa necessariamente que a perda da resistência intestinal não seja causada por alterações na matriz de colágeno. Indica somente que não é a quantidade absoluta de colágeno, mas principalmente a sua estrutura e o tipo de colágeno os fatores decisivos na estabilidade da integridade tecidual (FRIED et al., 1984).

A presença das MMP nas anastomoses intestinais foi reconhecida pela primeira vez por HAWLEY et al (1970). Sua produção é induzida ao nível transcricional por citocinas pró-inflamatórias, fatores de crescimento, hormônios, radiação ultravioleta, estresse físico e contato célula à célula ou célula à matriz extracelular, via integrinas (NAGASE; WOESSNER, 1999). Após produzidas, elas são armazenadas como zimogêneos ou pró MMP, no meio extracelular ou em grânulos de neutrófilos e macrófagos (ÅGREN et al., 2004).

As MMP atuam em vários aspectos da cicatrização como na angiogênese, remoção de tecido desvitalizado e remodelamento do tecido conectivo; sinalização intracelular, secreção, bioativação e estabilidade de citocinas e fatores de crescimento; migração, proliferação e diferenciação celular e apoptose (ÅGREN et al., 2004; PIIRKS, 1999).

Sob condições normais, a expressão de MMP é limitada a poucos tecidos que têm remodelamento intenso, como o endométrio durante o ciclo menstrual, feridas em cicatrização e tecidos sob reação inflamatória (PAKS, 1999; SALAMONSEN, 1996; BORDEN; HELLER, 1997). Desta forma, elas estão ausentes ou presentes em pequenas quantidades no cólon normal (CHOWCAT et al., 1988; SAVAGE et al., 1998) mas após a confecção de anastomose, passam a ser vistas na linha de sutura.

A atividade das MMP é intensa nos primeiros DPO. Esta atividade interfere com a síntese do colágeno e permite que macrófagos, neutrófilos e fibroblastos cheguem à região de reparo tecidual. AGREN et al. (2004) demonstraram que a degradação de colágeno por MMP ativadas em anastomoses do cólon esquerdo de ratos avaliadas no 3º DPO foi substancialmente aumentada (pelo menos dez vezes maior) na área adjacente à sutura quando comparada à área não suturada. Com o prosseguir de cicatrização, esta ação diminui progressivamente, permitindo então a produção de matriz extracelular e o aumento da resistência anastomótica.

O aumento da atividade de MMP pode mediar a perda de força anastomótica nos primeiros três dias de pós operatório, ao causar degradação local do colágeno e de outras proteínas da matriz extracelular na submucosa do tecido vizinho à sutura (HENDRIKS; MASTBOOM, 1990; THORNTON; BARBUL, 1997; SAVAGE et al., 1998; VAN DER STAPPEN et al., 1987). Foi demonstrado que a expressão de MMP está aumentada na parede intestinal de pacientes com deiscência anastomótica (STUMPF et al., 2005) e que a cicatrização de anastomoses de ratos foi melhorada pela inibição de MMP, com aumento da pressão de ruptura, melhor preservação da estrutura das camadas intestinais e aumento do colágeno no sítio anastomótico (KIYAMA et al., 2001).

Portanto, o controle da atividade das MMP é essencial para não haver quebra excessiva da matriz, que pode resultar em deiscência e aumento da morbimortalidade (STUMPF et al., 2005; ONODERA et al., 2004; DE HINGH et al., 2002; SAVAGE et al., 1997; SAVAGE et al., 1998; SYK et al., 2003). Além disso, o controle anormal da

matriz extracelular pode ser responsável pela formação de aderências após injúria peritoneal (CHEONG et al., 2002).

Pacientes com aumento de MMP 1, 2 e 9 em biópsias peri-operatórias de cólon apresentaram aumento das taxas de deiscência anastomótica (STUMPF et al., 2005; PASTERNAK et al., 2010). STUMPF et al. (2002) demonstraram maiores quantidades de MMP13 em amostras intestinais de pacientes que evoluíram com deiscência anastomótica quando comparados a pacientes não complicados, sem diferença entre os grupos quanto à MMP 1. PASTERNAK et al. (2010) quantificaram, pelo método de citometria de fluxo, as MMP 1, 2, 3, 7, 8, 9 e 13 presentes no fluido intra-peritoneal no dreno de pacientes após 4h de ressecção anterior do reto. Houve aumento de MMP 8 e 9 nos pacientes que evoluíram com deiscência.

Avaliações por imuno-histoquímica e de análise zimográfica demonstraram que as MMP 2, 3, 8 e 9 estão aumentadas em anastomoses colônicas de ratos (ÅGREN et al., 2006; SEIFERT et al., 1996; SHAPER et al., 2001) enquanto as MMP10 e 13 não estiveram associadas à cicatrização de anastomoses intestinais (VAALAMO et al., 1998). A expressão de MMP 1 em anastomoses de coelhos demonstrou um aumento da atividade colagenolítica após 48 a 72 horas de pós-operatório quando comparado a 24 horas após a operação. Este aumento coincidiu com a diminuição da concentração de colágeno na parede intestinal (CHOWCAT et al., 1990).

No nosso estudo, no 3° DPO, houve aumento importante da expressão dos genes para MMP1a, MMP 8 e MMP 13 nos animais submetidos à administração de drogas procinéticas em relação aos controles. Talvez este seja mais um fator somado ao estímulo da motilidade gastro-intestinal para a diminuição da porcentagem de anastomose coberta por aderências e para os menores valores de resistência tênsil encontrados nestes subgrupos de animais.

No 7° DPO, a expressão dos genes para MMP1a e MMP 8 voltou a ser semelhante aos animais controles e a expressão dos genes para MMP 13 diminuiu. Talvez por isso a porcentagem da anastomose coberta por aderências e os valores de resistência tênsil da anastomose passaram a ser semelhantes aos animais controles.

Entretanto, é importante ressaltar que o estudo da atividade das MMP por imuno-histoquímica ou análise de RNAm não significa necessariamente que ocorrerá degradação da matriz, uma vez que existe ainda o rígido controle da atividade das MMP ao serem secretadas como pró-enzimas inativas e pela presença de inibidores (BREW et al., 2000).

THOMPSON et al. (2006) publicaram um artigo de revisão sobre a cicatrização de anastomoses e descreveram as fases clássicas da cicatrização. A fase inflamatória é caracterizada inicialmente pela hemostasia realizada pelas plaquetas. Ocorre aumento da permeabilidade vascular e influxo de células inflamatórias. Os neutrófilos são inicialmente o tipo celular predominante, com ação de limpeza da ferida dos microorganismos invasores. A infiltração neutrofílica dura apenas alguns dias mas a contaminação prolonga a presença deste tipo celular, o que pode contribuir para o retardo da cicatrização (LI et al., 2007).

Entre o 2° e o 3° DPO, monócitos e macrófagos teciduais passam a predominar e iniciam a síntese e liberação de citocinas. Os macrófagos são considerados a célula regulatória mais importante da reação inflamatória. Eles liberam fatores angiogênicos e quimio-atraentes para fibroblastos e, dessa forma, parecem ter papel crucial na transição entre a fase inflamatória e a fase de reparo tecidual (LI et al., 2007).

A fase proliferativa inicia-se a partir do 4° DPO com a chegada dos fibroblastos. Eles substituem a matriz provisória com tecido de granulação rico em colágeno (THOMPSON et al., 2006). Após a sua migração, os fibroblastos alteram seu fenótipo pró fibrótico e assumem a síntese protéica. Miofibroblastos contribuem para a contração da ferida (LI et al., 2007). A angiogênese também ocorre nesta fase e permite a melhor oxigenação local e suprimento de nutrientes.

A fase de remodelação é caracterizada pela proliferação de células musculares lisas e redução da quantidade de macrófagos e fibroblastos (THOMPSON et al., 2006). Ocorre alteração na composição da matriz extracelular. Durante esta fase, o colágeno tipo III é o tipo predominante. Ele aparece após 48 a 72 horas de pós-operatório e tem seu pico entre 5 e 7 dias. Com a evolução da cicatrização, ocorre a degradação do colágeno tipo III e o aumento da síntese do colágeno tipo I. Este processo ocorre pela ação das MMP. A quantidade total de colágeno atinge valores máximos entre 2 e 3 semanas após a injúria (LI et al., 2007).

A alteração da micro-circulação ao nível da anastomose é um dos principais fatores que podem contribuir para a deiscência anastomótica. A redução da perfusão tecidual inicia-se no intra-operatório e pode ter como consequência a necrose e formação de fístulas no período pós-operatório inicial (ENESTVEDT et al., 2006).

No nosso estudo, foi observada moderada quantidade de neovasos tanto no 3° quanto no 7° DPO. De modo contrário, um estudo experimental sobre angiogênese demonstrou aumento significativo dos vasos sanguíneos na anastomose colônica entre o

3° e 7° DPO, em maior quantidade na periferia da anastomose quando comparada ao centro, e de modo mais pronunciado na mucosa submetida à injúria. Estes autores concluíram que a angiogênese está aumentada no período crítico da cicatrização de anastomoses (SEIFERT et al., 1997).

HOUDART et al. (1955) avaliaram a evolução da neovascularização após a realização de anastomoses colônicas por meio da injeção de bário e estudo radiológico dos espécimes cirúrgicos. Não foram observados neovasos no 2° DPO. No 4° DPO, os primeiros vasos neoformados apareceram em pequeno número e calibre. Já no 7° DPO, o sítio anastomótico mostrou-se hipervascularizado. A quantidade de aderências peritoneais foi máxima nesta época e a contribuição de vascularização de origem extra-intestinal foi confirmada.

O VEGF é um fator de crescimento endotelial potente e tem papel bem estabelecido na angiogênese e crescimento tumoral (KLEESPIES et al., 2004). Aumenta a permeabilidade vascular e promove vasodilatação, crescimento, proliferação e migração de células endoteliais. (HENRY, 1999). Além disso, age inibindo a expressão de óxido nítrico sintetase e regula negativamente a liberação de citocinas pró-inflamatórias. Pode ainda aumentar a expressão de MMP em células musculares lisas de vasos sanguíneos (WANG; KEISER, 1998). Exerce sua ação biológica predominantemente sobre as células endoteliais, induzindo sua proliferação e migração (LI et al., 2007).

A administração de VEGF na muscular própria melhorou a cicatrização de anastomoses colônicas em coelhos, ao aumentar a pressão de ruptura e a concentração de hidroxiprolina no 4° DPO (ISHII et al., 2009). Entretanto, em um estudo realizado em ratos, o uso de bevacizumab (Avastin®), um anticorpo monoclonal recombinante que inibe o VEGF (e, portanto, inibidor da angiogênese) não causou alterações no conteúdo de hidroxiprolina e na força anastomótica no 7° e 14° DPO (PAVLIDIS et al., 2010).

Como já citado, no nosso estudo não houve diferença entre os subgrupos nos achados histopatológicos. Isso pode explicar porque a imuno-histoquímica para este fator de crescimento foi semelhante entre os subgrupos, uma vez que vários tipos celulares como fibroblastos e células endoteliais são capazes de produzir VEGF (LI et al., 2007).

CAHILL et al. (2006) estudaram a relação entre mastócitos, liberação de VEGF e a formação de aderências. Camundongos com e sem deficiência de mastócitos foram

submetidos ao desnudamento do ceco e realização de pontos de sutura com o objetivo de desencadear aderências. Os animais com deficiência de mastócitos tiveram menor quantidade de aderências no 14º DPO que os animais controles. A deficiência de mastócitos esteve associada a uma menor concentração de VEGF peritoneal nas primeiras 24 horas de pós-operatório. Os autores concluíram que os mastócitos e o VEGF parecem ter papel importante na formação de aderências.

No nosso experimento, o uso de drogas procinéticas esteve associado a uma menor quantidade de aderências à anastomose porém o mesmo não ocorreu em relação à expressão de VEGF à imuno-histoquímica.

Citocinas e quimiocinas interagem na determinação do vigor da resposta inflamatória e na extensão da subsequente formação de aderências (LIN et al., 2000; MARGETTS et al., 2002). Estas interações são complexas, com a existência de citocinas pró-inflamatórias, como  $TNF\alpha$ ,  $IL1\beta$ ,  $IL6$  e  $IL8$ ; e citocinas anti-inflamatórias, como  $IL4$  e  $IL10$ . A cascata inflamatória é iniciada pela produção de  $IL1$  e  $TNF\alpha$ , seguidas da  $IL6$  e  $IL8$  (CAVAILLON et al., 1999).

Nas primeiras horas após a cirurgia abdominal, as citocinas são primariamente sintetizadas e liberadas no sítio de injúria, antes mesmo da liberação sistêmica. (BAKER et al., 2006). O nível sistêmico pode ser considerado secundário, um reflexo menor de eventos locais (WIIK et al., 2001; MOLLOY et al., 1993). Aparentemente, os níveis locais de citocinas refletem o processo de cicatrização e os níveis sistêmicos refletem parâmetros clínicos como patologia tumoral e complicações pós-operatórias (BAKER et al., 2006).

A  $IL1\beta$  beta é produzida primariamente por macrófagos. É o primeiro sinal de alerta às células adjacentes após o dano tecidual (FREEDBERG et al., 2001), sendo importante também na atração de neutrófilos para remoção das bactérias contaminantes (HANTASH et al., 2008). Esta citocina induz a secreção de  $IFN\gamma$  por células natural killer, ativa macrófagos e induz a expressão de MMP, levando à degradação da matriz extracelular e migração de monócitos. (ITO et al., 1996). Em conjunto com o  $TNF\alpha$ , é uma importante citocina pró-inflamatória na fase inicial da cicatrização e promove regulação positiva de  $IL6$  (HIRANO, 1998). As concentrações de  $IL1\beta$  aumentam significativamente no fluido peritoneal no período pós-operatório (TSUKADA et al., 1993), sugerindo a ação local da citocina. Seu pico ocorre no 4º DPO (RONG et al., 1997), época crucial no reparo tecidual.

O TNF $\alpha$  é produzido predominantemente por neutrófilos, células endoteliais vasculares e macrófagos (BAKER et al., 2006). É um mediador inflamatório ativo na síntese de colágeno e também provê substrato metabólico para a cicatrização de feridas na fase inflamatória (LOPES et al., 2008). Produzido precocemente no local da anastomose, diminui rapidamente e quase desaparece 24 horas após a operação no processo cicatricial normal (ISHIMURA et al., 2002). Níveis aumentados após este período correlacionam-se com o retardo da cicatrização (ISHIMURA et al., 2002; BUCK et al., 1996; KANELLOS et al., 2008; ZACHARAKIS et al., 2008). O tratamento com TNF $\alpha$  inibe a cicatrização durante a fase inflamatória por diminuir a produção de tecido de granulação (RAPALA et al., 1991). Estudos prévios demonstraram que o TNF  $\alpha$  inibe a expressão gênica do colágeno e aumenta a atividade colagenolítica, levando a um prejuízo à cicatrização (BUCK et al., 1996; AHRENDT et al., 1996).

Em culturas de fibroblastos da pele humana, o TNF $\alpha$  causou inibição da produção de colágeno de modo dose dependente e diminuição do RNAm do colágeno. Além disso, aumentou a degradação do colágeno por aumentar a produção de colagenase pelos fibroblastos da pele (MAUVIEL et al., 1988). AGREN et al. (2011) não encontraram impacto importante do bloqueio da sinalização do TNF  $\alpha$  sobre a resistência tênsil de anastomoses do cólon esquerdo de ratos. Outros autores demonstraram relação entre o aumento do TNF $\alpha$  e o prejuízo na cicatrização de anastomoses no 7<sup>o</sup> DPO em camundongos na presença de sepse (ISHIMURA et al., 2002).

A IL6 é considerada mediador fundamental em diversas etapas da inflamação. Atua na modulação, proliferação, diferenciação e maturação de diversos tipos celulares (BIFFL et al. 1996; MATEO et al., 1994.; AKIRA et al., 1993). Seu aumento foi descrito em resposta ao trauma, queimaduras e operação eletiva (BIFFL et al. 1996) e é proporcional ao dano tecidual. Tem ainda relação com a mortalidade hospitalar e APACHE II (AKIRA et al., 1993). Alguns estudos demonstraram aumento de IL6 e TNF $\alpha$  em pacientes com complicações pós-operatórias, enquanto outros não demonstraram efeito semelhante (DECHERNEY; DIZEREGA, 1997; HOLMDAHL et al., 1997).

O INF $\gamma$  é uma citocina secretada por linfócitos e que participa da resposta inflamatória que envolve vias imunes. Estudos demonstraram aumento de INF $\gamma$  no

fluido peritoneal no período pós-operatório, com pico no 4º DPO e retorno posterior à linha de base em uma semana (RONG et al., 1997).

A IL10 é um dos mais conhecidos sinalizadores negativos da inflamação. Acredita-se que seja o mais importante mediador com papel limitador e finalizador da resposta inflamatória (BALBINO et al., 2005; RONGIONE et al., 1997). O efeito regulador da IL10 sobre o crescimento e diferenciação de células do sistema imune, queratinócitos e células endoteliais indica que sua participação no reparo tecidual não se restringe à regulação negativa da inflamação. É possível que exerça funções mais diretas também sobre a cicatrização e reepitelização (BALBINO et al., 2005). Ela aumenta após 24h de pós-operatório e promove a diminuição de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF $\alpha$  e IL6, e da atividade de macrófagos (ISHIMURA et al., 2002; MARCHANT et al., 1995; VAN DER POLL et al., 1995). Pode ainda participar da supressão da infiltração de células inflamatórias no segmento anastomótico (ISHIMURA et al., 1998). Níveis persistentemente altos de IL 10 podem gerar imunossupressão prolongada com maior suscetibilidade a infecções (WIJK et al., 2001).

Diversos estudos avaliaram as variações dos níveis de citocinas no período pós-operatório e sua relação com a ocorrência de complicações. BAKER et al. (2006) realizaram dosagens de citocinas no fluido do dreno abdominal de pacientes submetidos a operações colorretais eletivas e demonstraram que os níveis de IL6 tiveram pico no 1º DPO, com posterior decréscimo até o 7º DPO. Os valores de TNF $\alpha$  foram baixos no 1º e 3º DPO, com aumento gradativo até o 7º DPO. A IL1  $\beta$  teve pico no 1º DPO, com posterior queda até o 5º DPO e leve recuperação posterior até o 7º DPO.

HERWING et al. (2002) evidenciaram que aumentos significativos de IL6 e TNF  $\alpha$  no 1º DPO precede sintomas clínicos de peritonite e deiscência de anastomose colorretal em vários dias, e que os níveis de IL1 aumentaram significativamente no 3º DPO em pacientes que desenvolveram deiscência.

BERTRAM et al. (2003) também encontraram aumento dos níveis de TNF $\alpha$  um dia antes do diagnóstico cirúrgico de deiscência, mas não houve diferença significativa em relação ao grupo controle. Estes autores concluíram que após a operação colorretal eletiva, a quantificação de TNF $\alpha$  e de IL6 no dreno peritoneal não tem utilidade no diagnóstico de deiscência anastomótica. Já foi descrita uma correlação positiva entre os níveis de IL1 $\beta$ , IL6 e TNF $\alpha$  e tempo operatório prolongado, maior perda sanguínea e contaminação bacteriana do fluido do dreno peritoneal (TSUKADA et al., 1993).

No nosso estudo, o aumento da expressão do gene para IL6 no 3° DPO não associou-se ao aumento do número de deiscências mas correlacionou-se com menores valores de resistência tênsil nos animais tratados com as drogas procinéticas.

A importância da ação das citocinas sobre a formação de aderências também foi estudada. A IL1, a IL6 e o TNF  $\alpha$  estão associados à formação de aderências. A quantidade de aderências foi reduzida de modo significativo em ratos submetidos à administração de anticorpos anti IL1 ou anti TNF $\alpha$ , com diminuição ainda maior após a administração associada das duas drogas (KAIDI et al., 1995a). Em outro estudo, os mesmos autores concluíram que o TNF  $\alpha$  pode ser um bom marcador da formação de aderência pós-operatórias (KAIDI et al., 1995b). A administração de IL6 também pode aumentar a formação de aderências, enquanto a administração de neutralizantes da IL6 levam à uma diminuição na sua formação (SABA et al., 1999). Outros autores, por sua vez, não evidenciaram diferença na formação de aderências entre o grupo de animais tratados com IL6 e animais controles (GRECA et al., 2007). A administração de IL 10 limitou a formação de aderências em um estudo realizado em camundongos (MONTZ et al., 1994).

No nosso estudo, o aumento da expressão dos genes para IL 6 no 3° e 7° DPO nos animais tratados com drogas procinéticas não foi acompanhado do aumento da formação de aderências. Este fato talvez decorra da falta da ação sinérgica do TNF $\alpha$  e da IL1 $\beta$  (já que não houve aumento da expressão para estes genes) ou ainda do aumento concomitante da expressão de IL10, o qual ocorreu principalmente no 3° DPO.

É necessário salientar que a detecção da expressão dos genes para citocinas ou mesmo dos níveis de citocinas em tecidos ou secreções nem sempre correlaciona-se com sua atividade biológica. Elas podem não estar sendo produzidas, ter sido secretadas na forma inativa ou ainda já podem ter sido degradadas (WHITTE; BARBUL, 1997).

A segunda fase do nosso estudo objetivou a avaliação dos efeitos da sepse abdominal sobre a cicatrização de anastomoses. Foram comparados animais submetidos à indução de sepse abdominal e animais controle, na ausência de administração de drogas procinéticas.

O método CLP foi descrito em 1978 está associado à sepse polimicrobiana e bacteremia. Desencadeia uma fase precoce hiperdinâmica e uma fase tardia hipodinâmica. É um dos modelos de sepse mais usados em estudos de fisiopatologia da sepse abdominal e das suas conseqüências sistêmicas. Tem como vantagem o fato de

combinar a injúria tecidual com a capacidade de modular o grau de contaminação bacteriana e a mortalidade (OZEN et al., 2007).

O modelo CLP pode ter diferentes resultados. A mortalidade varia de acordo com o tamanho da agulha e o número de perfurações. Depende ainda da quantidade de fezes na cavidade e aumenta com a proporção do ceco ligada e a quantidade do inóculo. Além disso, quanto maior a contaminação, maior a expressão de interleucinas como o TNF $\alpha$  e a IL6 (SINGLETON; WISCHMEYER, 2003).

Um estudo avaliou a ligadura do ceco a um centímetro da sua base e uma perfuração transfixante com diferentes tamanhos de agulhas. Cento e vinte e cinco animais foram divididos em 5 grupos. Todos tiveram hemocultura positiva após 5 horas do procedimento, com crescimento principalmente de bacteróides e aeróbios gram negativos. Ocorreu peritonite localizada em todos os animais. Foi constatado que a mortalidade aumentou com o aumento do diâmetro da perfuração e ocorreu principalmente nas primeiras 24 horas (OTERO-ANTÓN et al., 2001).

O modelo de CLP utilizado no nosso estudo foi determinado em estudo piloto. O objetivo foi o de provocar um grau de contaminação que pudesse ser evidenciada por alterações inflamatório-infecciosas ao inventário da cavidade abdominal à reoperação, porém com mínima mortalidade, na ausência da utilização de antibióticos.

Não houve diferença entre os grupos em termos de evolução clínica, deiscência de anastomose e outros achados intra-operatório exceto a presença de peritonite. Conforme esperado, esta foi maior no subgrupo submetido à CLP. Os animais submetidos à sepse apresentaram ainda maior quantidade de aderências em relação ao escore de Nair tanto no 3º quanto no 7º DPO, mas não houve diferença entre os grupos em relação à porcentagem da anastomose coberta por aderências.

A infecção intra abdominal pode aumentar a formação de aderências. O modelo CLP parece ser um dos maiores fatores na promoção de aderências (AYDIN et al., 2006). A flora bacteriana do TGI tem papel importante na formação de aderências principalmente ao redor da anastomose (BEDIRLI et al., 2003). Anastomoses de ratos livres de germes, tiveram menor quantidade de aderências que anastomoses de animais monocontaminados com *Escherichia coli* ou *Lactobacillus* e animais controles. Os autores não puderam concluir como os microorganismos exercem efeito sobre as aderências e sugeriram que a translocação bacteriana ou o vazamento em pequenas falhas poderiam estimular a formação de aderências ou ainda que este efeito poderia ser

desencadeado pela influência sobre o sistema imune ou modificação da resposta do sistema fibrinolítico ao trauma (BOTHIN et al., 2001).

Na maioria os estudos, os autores comprovaram o efeito deletério da infecção peritoneal sobre as anastomoses intestinais nos primeiros dias de pós-operatório. Por volta do 7° DPO, os resultados são conflitantes. Há descrições de que a força de ruptura possa permanecer inalterada ou possa diminuir em comparação com animais operados na ausência de infecção.

No nosso estudo, a força de ruptura no 3° DPO foi menor nas anastomoses dos animais submetidos à indução de sepse abdominal. Entretanto, foi notado um aumento destes valores no 7° DPO. Este achado é de difícil explicação mas poderia decorrer do fato de que no 7°DPO, todos os animais submetidos à CLP já apresentavam bloqueio do foco infeccioso (ceco bloqueado). Dessa forma, no 7° DPO, o processo infeccioso já teria menor repercussão sobre a cicatrização e esta poderia então evoluir de modo mais intenso, diferentemente do 3° DPO, época na qual vigorava ainda a fase aguda da infecção.

ROCHA et al. (2010) demonstraram que a peritonite diminuiu significativamente os valores de energia total de ruptura no 4° DPO após a realização de anastomoses no cólon distal de ratos. DE HING et al. (2003) evidenciaram que a peritonite diminuiu a resistência mecânica de anastomoses no 3° DPO, voltando ao normal no 5° DPO. TEKE et al. (2008) demonstraram que a peritonite secundária desencadeada por CLP prejudicou o processo de cicatrização de anastomoses do cólon esquerdo de ratos ao diminuir a resistência tênsil no 7° DPO. WANG et al. (2010) encontraram diminuição dos valores de pressão de ruptura no 5° DPO em animais submetidos a anastomose 24 horas após CLP.

Ao contrário destes autores, BIONDO-SIMÕES et al. (1996) avaliaram a cicatrização de anastomoses do cólon esquerdo de ratos realizadas após 24 de peritonite desencadeada por lesão do cólon e animais controles. No 3° DPO, houve maior quantidade de aderências no grupo de estudo. Não houve diferença entre os grupos em relação à pressão de ruptura tanto no 3° quanto no 7° DPO. Os autores concluíram que a peritonite fecal induzida por um método que simula a perfuração bloqueada de divertículo de cólon não modificou o processo de cicatrização de anastomoses do cólon distal em ratos. Em 1997 o mesmo grupo não encontrou diferença em relação a quantidade de aderências, resistência tênsil e avaliação microscópica tanto no 3° quanto

no 7° DPO de anastomoses realizadas 24 horas após CLP quando comparados a animais controles (BIONDO-SIMÕES et al., 1997).

A infecção peritoneal está associada ao aumento da colagenólise e prejuízo da capacidade de síntese de colágeno. Esta resposta sintética sub-ótima está expressa em nível molecular durante a regulação desordenada da sequência temporal normal da expressão genética do colágeno. Além disso, enzimas colagenolíticas derivadas de bactérias podem participar da degradação do colágeno e poderiam contribuir para a perda estrutural precoce do mesmo. Radicais de oxigênio são produzidos durante a sepse por processos que incluem o metabolismo eicosanóide e a degranulação de polimorfonucleares. Junto com as enzimas proteolíticas, os radicais livres e a xantina oxidase circulante podem aumentar a colagenólise na área perianastomótica, retardando a cicatrização (TEKE et al., 2008).

NARESSE et al. (1993) avaliaram o efeito da infecção peritoneal na cicatrização do cólon distal por meio da injeção intra-peritoneal de uma suspensão de fezes humanas em ratos Wistar. Os animais foram submetidos à eutanásia no 4°, 7°, 10°, 14° e 21° DPO. Os casos de deiscência de anastomose ocorreram durante a fase inflamatória da cicatrização. No 4° DPO, os valores de força de ruptura não diferiu entre os grupos. Por outro lado, a concentração de colágeno estava diminuída no grupo peritonite, o que pressupõe o predomínio da lise sobre a síntese. Não houve diferença entre os grupos quanto à força de ruptura no 7° DPO. Também foi verificado o predomínio da lise sobre a síntese de colágeno neste período. Os autores concluíram que a infecção peritoneal exerce efeito deletério sobre a cicatrização, prolongando a fase latente do processo cicatricial e favorecendo a deiscência anastomótica.

A sepse abdominal induzida por CLP pode diminuir a síntese de colágeno tanto ao nível transcricional quanto protéico, com prejuízo da cicatrização. Altera a expressão de genes do colágeno I e III e prejudica a síntese reparativa do colágeno na cicatrização do cólon (THORNTON et al., 1997). Em um estudo de sepse sistêmica induzida por injeção de LPS de *E coli* foi constatado que a sepse sistêmica prejudica a síntese de novo do colágeno no tecido anastomótico com 24 horas de pós-operatório quando comparado a animais controles. Não houve diferença com 96 horas de pós-operatório. Ocorreu diminuição da pressão de ruptura nos animais sépticos com 120 horas de pós-operatório (THORNTON et al., 1997).

No nosso estudo, não houve diferença entre os subgrupos em relação ao conteúdo do colágeno avaliado por histomorfometria. Alguns autores analisaram o 1° e

4° DPO de anastomoses realizadas 24 horas após indução de sepse por CLP. Houve menor síntese de colágeno nos dois períodos nos animais submetidos à sepse. A alteração na expressão de colágeno I e III esteve associada ao prejuízo da síntese e diminuição da força anastomótica. A avaliação do intestino intacto após CLP demonstrou redução de 30% do conteúdo de colágeno I após 24 h. Anastomoses realizadas na ausência de CLP tiveram diminuição do colágeno I no 1° DPO, com aumento dos níveis acima da linha de base no 4° DPO (AHRENDT et al., 1996).

Anastomoses realizadas após CLP tiveram aumento precoce do colágeno I, sem aumento posterior até o 4° DPO. Os autores concluíram que a infecção intra-abdominal prejudica a reparação do colágeno e a síntese protéica, além de alterar a regulação de genes do colágeno tipo I e III; e que estas alterações contribuem para a diminuição da força mecânica do cólon (AHRENDT et al., 1996).

BIONDO-SIMÕES et al. (2000) realizaram em um estudo no qual 40 ratos subdivididos em grupo controle e peritonite foram submetidos à anastomoses no cólon transversal e eutanásia no 3° e 7° DPO. A concentração de colágeno foi menor nos animais submetidos à peritonite tanto no 3° quanto no 7° DPO. Percentuais de colágeno I e III foram semelhantes no 3° DPO. No 7° DPO, o grupo peritonite apresentou maior quantidade de colágeno imaturo (tipo III). A resistência tênsil foi semelhante entre os grupos nos dois períodos estudados e aumentou com o tempo. Os autores concluíram que existe diminuição da concentração e da maturação do colágeno nas anastomoses colo-cólicas realizadas quando existe peritonite, porém esta alteração não interfere na capacidade da anastomose suportar pressão.

No nosso estudo, não houve diferença entre os grupos em relação à concentração de hidroxiprolina. Este resultado está de acordo com o estudo de BIONDO-SIMÕES et al (1996). Entretanto, outros estudos demonstraram diminuição dos níveis de hidroxiprolina em animais submetidos à CLP quando comparados a animais controles (TEKE et al., 2008; WANG et al., 2010).

Conforme já referido, a hidroxiprolina nem sempre está em paralelo com outros parâmetros da cicatrização (AGALAR et al., 2000). Estudo prévio já havia demonstrado redução da resistência tênsil sem diferenças no conteúdo de hidroxiprolina em animais submetidos a inflamação asséptica, infecção bacteriana em sítio distante, infecção local e sistêmica (DE HAAN et al., 1974). Este fato também ocorreu nos nossos animais avaliados no 3° DPO.

No presente estudo, não foram encontradas diferenças entre os subgrupos em relação aos achados histopatológicos. Estes achados estão de acordo com estudos anteriores (BIONDO-SIMÕES et al., 1996; BIONDO-SIMÕES et al., 1997).

A atividade das MMP é maior na presença de peritonite bacteriana (DE HINGH et al., 2003). Nestas condições, a degradação da matriz pelas MMP pode aumentar ainda mais e resultar em redução mais acentuada da força anastomótica (AHRENDT et al., 1994; THORNTON; BARBUL, 1997). A causa do aumento dos níveis de MMP nas anastomoses sob sepse permanece sob especulação, mas pode ser decorrente do aumento do número de células inflamatórias nas proximidades da anastomose sob infecção, como polimorfonucleares, macrófagos e monócitos (DE HINGH et al., 2003). É possível que o impacto da peritonite bacteriana na força anastomótica possa mudar de acordo com a fase do processo de cicatrização (DE HINGH et al., 2003).

No nosso estudo, os animais submetidos à CLP tiveram aumento da expressão de MMP 1a (e, em menor escala, de MMP 13) em relação ao grupo controle no 3º DPO, e este pode ter sido o mecanismo de ação da sepse na diminuição da resistência tênsil das anastomoses destes animais.

A sepse envolve a liberação de mediadores inflamatórios incluindo  $TNF\alpha$ ,  $IL1\beta$ ,  $IL6$ ,  $IL8$ ,  $IL10$  e  $INF\gamma$  (VICENT, 2000). Numerosos autores descreveram o aumento dos níveis de  $TNF\alpha$  e  $IL6$  peritoneais e circulantes associado à peritonite e sugeriram seu uso como marcadores diagnósticos da presença de bacteremia (HOLZHEIMER et al., 1995; SCHEINGRABER et al., 2001). Outros autores, entretanto, encontraram alteração mínima ou ausente das citocinas plasmáticas pró e anti-inflamatórias após infusão bacteriana (HOLZHEIMER et al., 1995). O mesmo resultado foi encontrado no nosso estudo.

O  $TNF\alpha$ , a  $IL6$  podem ser fatores inibitórios do processo de cicatrização de anastomoses intestinais na presença de sepse (MARTINEAU; SHEK, 2000; ISHUMURA et al., 2002). ISHIMURA et al. (1998), em um estudo experimental em camundongos, demonstraram, por imuno-histoquímica, que a expressão de  $IL6$  no segmento anastomótico é suprimida após a indução da sepse por injeção intra-peritoneal de LPS, sugerindo que a cicatrização está prejudicada por supressão local da reação. Níveis plasmáticos de  $IL6$  correlacionaram-se com a mortalidade em pacientes sépticos (VAN DER STAPPEN et al., 1989) e altos níveis de  $IL6$  e  $TNF\alpha$  ao fim do período de infusão bacteriana têm correlação com má evolução clínica (MARTINEAU; SHEK, 2000).

A terceira fase deste estudo consistiu na avaliação da cicatrização das anastomoses do cólon esquerdo em animais submetidos à indução de sepse abdominal pelo método CLP sob a administração de drogas procinéticas. Não encontramos outros relatos na literatura a este respeito.

Não houve diferença entre os subgrupos em relação aos parâmetros de deiscência de anastomose e achados intra-operatórios. Ao contrário do ocorrido na ausência de infecção, não houve diferença entre os subgrupos em relação às aderências tanto na avaliação da global da cavidade abdominal quanto das aderências diretas à anastomose. Provavelmente a presença de infecção foi um fator tão expressivo para a formação de aderências que o estímulo à motilidade não foi capaz de diminuir o seu efeito.

Como ocorrido na ausência de infecção, a administração de bromoprida esteve associada aos menores valores de força de ruptura da anastomose no 3° DPO, sem diferença entre os subgrupos no 7° DPO.

No 3° DPO, a avaliação do efeito das drogas procinéticas sobre a concentração de hidroxiprolina na ausência de infecção não havia demonstrado diferença entre os subgrupos. Já no 7° DPO, os animais controles haviam tido redução da concentração de hidroxiprolina. Na análise dos animais submetidos à administração das mesmas drogas após a indução de sepse abdominal, houve menor redução da concentração de hidroxiprolina no subgrupo controle no 3° DPO. No 7° DPO, os resultados foram semelhante entre os subgrupos. Neste mesmo período, a quantidade de colágeno foi maior nos animais tratados com drogas procinéticas. Este achado não relacionou-se a nenhum dos outros parâmetros de avaliação.

Houve aumento da expressão dos genes para as MMPs 1a, 8 e 13 nos animais tratados com bromoprida e esta pode ser uma explicação para os menores valores de resistência tênsil e hidroxiprolina encontrados no 3° DPO. Ainda no 3° DPO, os animais que receberam procinéticos apresentaram aumento da expressão do gene para TNF $\alpha$  mas, aparentemente, esta não foi a causa do prejuízo à cicatrização, já que as anastomoses dos animais tratados com metoclopramida tiveram valores de resistência tênsil e hidroxiprolina semelhantes aos animais do grupo controle.

Em suma:

- na ausência de sepse abdominal, a administração de drogas procinéticas, principalmente da bromoprida, diminuiu a força de ruptura das anastomoses do cólon esquerdo de ratos. Esta ação pode ser explicada, em parte, pela diminuição da

porcentagem da anastomose coberta por aderências e pelo aumento da expressão de genes para MMP 1a, MMP 8 e MMP 13, além de IL6 e IL1 $\beta$ . No 7° DPO, houve reversão destes efeitos e a administração das drogas esteve associada a uma menor perda do conteúdo de colágeno avaliado por meio da dosagem de hidroxiprolina;

- a sepse abdominal, aumentou a quantidade de aderências intra-cavitárias e diminuiu a força de ruptura das anastomoses no 3° DPO, com posterior recuperação deste efeito no 7° DPO. Este achado poderia ser justificado pela alteração do perfil de expressão dos genes para MMP 1a;

- na presença de sepse abdominal, a administração de bromoprida não alterou a quantidade de aderências, porém prejudicou a cicatrização das anastomoses no 3° DPO ao diminuir a força de ruptura e concentração de hidroxiprolina. Este efeito não foi evidenciado pela administração de metoclopramida e pode estar relacionado ao aumento da expressão dos genes para MMP 1a, MMP 8 e MMP 13 nos animais tratados com bromoprida. Já no 7° DPO, o único parâmetro da cicatrização diferente entre os subgrupos foi a maior quantidade de colágeno presente nas anastomoses dos animais tratados com as drogas procinéticas;

- os efeitos das drogas procinéticas metoclopramida e bromoprida sobre a cicatrização das anastomoses do cólon esquerdo de ratos não podem ser atribuídos somente à alteração na formação de aderências à anastomose e podem envolver outros mecanismos, como alterações na expressão de MMP e interleucinas.

## 6. CONCLUSÃO

Nas condições experimentais nas quais esta investigação foi conduzida e baseado nos resultados obtidos, é lícito concluir que a droga procinética bromoprida prejudicou a cicatrização das anastomoses no cólon esquerdo de ratos no 3º DPO, tanto na presença quanto na ausência de sepse abdominal induzida. A metoclopramida não apresentou efeito deletério sobre a cicatrização.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ADAMS, W.; CTERCTEKO, G.; BILOUS, M. Effect of an omental wrap on the healing and vascularity of compromised intestinal anastomoses. **Dis Colon Rectum** 1992; 35(8):731-738.

AGALAR, F.; HAMALOGLU, E.; DAPHAN, C.; TARIM, A.; ONUR, R.; RENDA, N. Effects of CO2 insufflation and laparotomy on wound healing in mice. **Aust N Z J Surg** 2000;70(10):739-742.

ÅGREN, M.S.; JORGENSEN, L.N.; DELAISSÉ, J.M. Matrix Metalloproteinases and Colon Anastomosis Repair: A New Indication for Pharmacological Inhibition? **Mini-Rev in Med Chem** 2004; 4:769-778.

ÅGREN, M.S.; ANDERSEN, T.L.; MIRASTSCHIJSKI, U.; SYK, I.; SCHIØDT, C.B.; SURVE, V.; LINDEBJERG, J.; DELAISSÉ, J.M. Action of matrix metalloproteinases at restricted sites in colon anastomosis repair: an immunohistochemical and biochemical study. **Surgery** 2006; 140:72–82.

ÅGREN, M. S.; ANDERSEN, T. L.; ANDERSEN, L.; SCHIØDT, C.B.; SURVE, V.; ANDREASSEN, T.T.; RISTELI, J.;FRANZÉN, L.E.; DELAISSÉ, J. M.; HEEGAARD, A. M.; JORGENSEN, L.N. Nonselective matrix metalloproteinase but not tumor necrosis factor- $\alpha$  inhibition effectively preserves the early critical colon anastomotic integrity **Int J Colorectal Dis** 2011; 26(3):329-337.

AHRENDT, G.M.; GARDNER, K.; BARBUL, A. Loss of colonic structural collagen impairs healing during intra-abdominal sepsis. **Arch Surg** 1994; 129:1179–1183.

AHRENDT, G.M.; TANTRY, U.S.; BARBUL, A. Intra-abdominal sepsis impairs colonic reparative collagen synthesis. **Am J Surg** 1996;171(1):102-107.

AKIRA, S.; TAGA, T.; KISHIMOTO, T. Interleukin-6 in biology and medicine. **Adv Immunol** 1993;54:1-78.

ALBIBI, R.; MCCALLUM, R. Metoclopramide: pharmacology and clinical application. **Ann Intern Med** 1983; 98(1):86-95.

AYDIN, C.; AYTEKIN, F.O.; TEKIN, K.; KABAY, B.; YENISEY, C.; KOCBIL, G.; OZDEN, A. Effect of temporary abdominal closure on colonic anastomosis and

postoperative adhesions in experimental secondary peritonitis. **World J Surg** 2006;30(4):612-619.

AYTEN, R.; CETINKAYA, Z.; GIRGIN, M.; OZERCAN, I.; USTUNDAG, B.; AYGEN, E. The effects of intraperitoneal sildenafil administration on healing of left colonic anastomoses and intra-abdominal adhesion formation in the presence of intra-abdominal infection. **Dis Colon Rectum** 2008;51(12):1837-1841.

BAKER, E. A.; EL-GADDAL, S.; WILLIAMS, L.; LEAPER, D. J. Profiles of inflammatory cytokines following colorectal surgery: relationship with wound healing and outcome. **Wound Rep Reg** 2006; 14: 566-572.

BAKKE, O.M.; SEGURA, J. The absorption and elimination of metoclopramide in three animal species. **J Pharmacol** 1976; 28: 32-39.

BALBINO, C. A.; PEREIRA, L.M.; CURI R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Rev Bras Cienc Farm** 2005; 41: 27-51.

BATEMAN, D. N. Clinical pharmacokinetics of metoclopramide. **Clin Pharm** 1983; 8(6): 523-529.

BEANI, L.; BIANCHI, C.; CREMA, C. Effects of metoclopramide on isolated guinea-pig colon. 1. Peripheral sensibilization to acetylcholine. **Eur J Pharmacol** 1970; 12(3): 320-331.

BECK, D.E.; COHEN, Z.; FLESHMAN, J.W.; KAUFMAN, H.S.; VAN GOOR, H.; WOLFF, B.G. A prospective, randomized, multicenter, controlled study of the safety of Seprafilm adhesion barrier in abdominopelvic surgery of the intestine. **Dis Colon Rectum** 2003;46(10):1310-1319.

BECKER, J. M.; DAYTON, M.; FAZIO, V. W.; BECK, D. E.; STRYKER, S. J.; WEXNER, S. D.; WOLF, B. G.; ROBERTS, P. L.; SMITH, L. E.; SWEENEY, S. A.; MOORE, M. Prevention of postoperative abdominal adhesions by a sodium hyaluronate-based bioresorbable membrane: a prospective, randomized, double-blind multicenter study. **J Am Coll Surg** 1996; 183(4): 297-306.

BEDIRLI, A.; GOKAHMETOGLU, S.; SAKRAK, O.; ERSOZ, N.; AYANGIL, D.; ESIN, H. Prevention of intraperitoneal adhesion formation using beta-glucan after ileocolic anastomosis in a rat bacterial peritonitis model. **Am J Surg** 2003;185(4):339-343.

BERTRAM, P.; JUNGE, K.; SCHACHTRUPP, A.; GOTZE, C.; KUNZ, D.; SCHUMPELICK, V. Peritoneal release of TNF alpha and IL-6 after elective colorectal surgery and anastomotic leakage. **J Invest Surg** 2003; 16: 65–69.

BIFFL, W.L.; MOORE, E.E.; MOORE, F.A.; PETERSON, V.M. Interleukin-6 in the injured patient. Marker of injury or mediator of inflammation? **Ann Surg** 1996; 224(5):647-664.

BINNEBOSEL, M.; JUNGE, K.; KAEMMER, D. A.; KRONES, C. J.; TITKOVA, S.; ANUROV, M.; CHUMPELICK, V.; KLINGE, U. Intraperitoneally applied gentamicin increases collagen content and mechanical stability of colon anastomosis in rats. **Int J Colorectal Dis** 2009; 24(4): 433-440.

BIONDO-SIMÕES, M. L. P.; ADUR, R. C.; QUINTANA, L. F. C. L.; GONÇALVES, C. A.; DEMARCHI, H. L.; MELLO, A. L. C.; VAZ, L. I.; REPKA, J. C. Evolução de anastomoses do cólon esquerdo após a indução de peritonite focal, em ratos. **Arq Gastroenterol** 1996; 33(2): 79-85.

BIONDO-SIMÕES, M. L. P.; CANALLI, L. S.; FERREIRA, C.; MESCHINO, R.; KAIMOTO, T.; COLLAÇO L. M. Evaluation of the cicatrization of left colon anastomoses in the presence of peritonitis. An experimental study on rats. **Acta Cir Bras** 1997;12(2):94-99.

BIONDO-SIMÕES, M. L. P.; GRECA, F. H.; JUNIOR, A.B.; KOMATSU, M. C. G.; BITTENCOURT, F. O.; GRECA, L. M. Influence of peritonitis on the synthesis of collagen of the distal colon: experimental study in rats. **Acta Cir Bras** 2000;15(suppl 3): 69-73.

BIRTLEY, R. D.; BAINES, M. W. The effects of metoclopramide on some isolated intestinal preparations. **Postgrad Med J** 1973; 49(4): 13-18.

BLOUHOS, K.; PRAMATEFTAKIS, M.; TSACHALIS, T.; KANELLOS, D.; ZARABOUKAS, T.; KOLIAKOS, G.; BETSIS, D. The integrity of colonic anastomoses following the intraperitoneal administration of oxaliplatin. **Int J Colorectal Dis** 2010; 25(7):835–841.

BORDEN, P.; HELLER, R.A. Transcriptional control of matrix metalloproteinases and the tissue inhibitors of matrix metalloproteinases. **Crit Rev Euk Gene Exp** 1997;7:159–178.

BOTHIN, C. The effect of early postoperative ambulation and stimulation physical activity on adhesion formation in the rat. **Res Surg** 1991; 3: 201-230.

BOTHIN, C.; OKADA, M.; MIDTVEDT, T.; PERBECK, L. The intestinal flora influences adhesion formation around surgical anastomoses. **Br J Surg** 2001;88(1):143-145.

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

BRASKEN, P.; LETHO, M.; RENVALL, S. Changes in the connective tissue composition of the submucosal layer of colonic anastomosis. An immunohistologic study in rats. **Acta Chir Scand** 1989; 155(8): 413-419.

BREW, K.; DINAKARPANDIAN, D.; NAGAS, E H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. **Biochim Biophys Acta** 2000; 1477: 267-283.

BROMOPRIDA: solução oral. Responsável técnico Eric Correna Carlo. Pouso Alegre: União Química Farmacêutica Nacional S/A. Bula de remédio.

BROWN, L. F.; VAN DE WATER, L.; HARVEY, V. S.; DVORAK, H. F. Fibrinogen influx and accumulation of cross-linked fibrin in healing wounds and in tumor stroma. **Am J Pathol** 1988; 130(3): 445-465.

BUCHS, N. C.; GERVAZ, P.; SECIC, M.; MUGNIER-KONRAD, B.; MOREL, P. Incidence, consequences and risk factors for anastomotic dehiscence after colorectal surgery: a prospective monocentric study. **Int J Colorectal Dis** 2008; 23(3): 265-270.

BUCK, M.; HOUGLUM, K.; CHOJKIER, M. Tumor necrosis factor inhibits collagen 1 gene expression and wound healing in a murine model of cachexia. **Am J Pathol** 1996; 149:195-197.

BUCKMIRE, M. A.; PARQUET, G.; GREENWAY, S.; ROLANDELLO, R. H. Temporal expression of TGF-beta1, EGF and PDGF-BB in a model of colonic wound healing. **J Surg Res** 1998; 80(1): 52-57.

BURY, R.; MASHFORD, M. L. The effects of metoclopramide in modifying the response of isolated guinea-pig ileum to various agonists. **J Pharm Exp Ther** 1976; 197: 614-646.

CAHILL, R.A.; WANG, J.H.; SOOHKAI, S.; REDMOND, H.P. Mast cells facilitate local VEGF release as an early event in the pathogenesis of postoperative peritoneal adhesions. **Surgery** 2006;140(1):108-112.

CAHILL, R.A.; WANG, J.H.; REDMOND, H.P. Enteric bacteria and their antigens may stimulate postoperative peritoneal adhesion formation. **Surgery** 2007; 141(3): 403-410.

CAKMAK, G. K.; IRKORUCU, O.; UCAN, B.H.; TASCILAR, O.; EMRE, A.U.; KARAKAYA, K.; BAHADIR, B.; ACIKGOZ, S.; PASAOGLU, H.; ANKARALI, H.; UGURBAS, E.; DEMIRTAS, C.; COMERT, M. The effects of resveratrol on the healing of left colonic anastomosis. **J Invest Surg** 2009;22(5):353-361.

CASTEELS-VEN DAELE, M.; JAEKEN, J.; VAN DER SCHEURAN, P.; VAN DEN BON, P. Dystonic reactions in children caused by metoclopramide. **Arch Dis Child** 1970; 45: 130-133.

CATS, A. New developments in systemic chemotherapy in advanced colorectal cancer. **Scand J Gastroenterol Suppl** 2003; 239: 78-86.

CAVAILLON, J.M.; DUFF, G. Cytokines and the cellular mechanism of inflammation. In Théze J (ed) The cytokine network and immune functions. **Oxford University Press** 1999, 251–261.

CHEONG, Y.C.; LAIRD, S.M.; SHELTON, J.B.; LEDGER, W.L.; LI, T.C.; COOKE, I.D. The correlation of adhesions and peritoneal fluid cytokine concentrations: a pilot study. **Human reprod** 2002; 17(4): 1039-1045.

CHOWCAT, N.L.; SAVAGE, F.J.; HEMBRY, R.I.V.L.; BOULOS, P.B. Role of collagenase in colonic anastomosis: a reappraisal. **Br J Surg** 1988;75: 55-60.

CHOWCAT, N.L.; SAVAGE, F.J.; LEWIS, M.; BOULOS, P.B. Direct measurement of collagenase in colonic anastomosis. **Br J Surg** 1990; 77: 1284-1287.

CLAUSS, M.; SUNDERKOTTER, C.; SVEINBJORNSSON, B.; HIPPENSTIEL, S.; WILLUWEIT, A.; MARINO, M.; HASS, E.; SEIJELID, R.; SCHEURICH, P.; SUTTORP, N.; GRELL, M.; RISAU, W. A permissive role for tumor necrosis factor in vascular endothelial growth factor-induced vascular permeability. **Blood** 2001; 97(5):1321-1329.

COHEN, S.; DIMARINO, A. J. Mechanism of action of metoclopramide on opossum lower esophageal sphincter muscle. **Gastroenterology** 1976;71(6): 996-998.

CONE, D. F. The effect of intestinal motility on the formation of adhesions. **Bull J Hopkins Hosp** 1959; 105(1): 8-13.

DECHERNEY, A.; DIZEREGA, G. Clinical problem of intraperitoneal postsurgical adhesion formation following general surgery and the use of adhesion prevention barriers. **Surg Clin North Am** 1997, 77:3, 671-688.

DE HANN, B. B.; ELLIS, H.; WILKS, M. The role of infection on wound healing. **Surg Gynecol Obst** 1974; 138(5):693-700.

DE HINGH, I.H.; SIEMONSMA, M. A.; DE MAN, B.M.; LOMME, R.M.; HENDRIKS, T. The matrix metalloproteinase inhibitor BB-94 improves the strength of intestinal anastomoses in the rat. **Int J Colorectal Dis** 2002; 17(5): 348-354.

DE HINGH, I.H.; DE MAN, B.M.; LOMME, R.M.; VAN GOOR, H.; HENDRIKS, T. Colonic anastomotic strength and matrix metalloproteinase activity in an experimental model of bacterial peritonitis. **Br J Surg** 2003;90(8):981-988.

DE OLIVEIRA, P. G.; SOARES, E. G.; APRILLI, F. Influence of misoprostol, a synthetic prostaglandin E1 analog on the healing of colonic anastomoses in rats. **Dis Colon Rectum** 1994; 37(7): 660-663.

DE SOUSA, J. B.; SOARES, E. G.; APRILLI, F. Effects of diclofenac sodium on intestinal anastomotic healing. Experimental study on the small intestine of rabbits. **Dis Colon Rectum** 1991; 34(7): 613-617.

DINC, S.; OZASLAN, C.; KURU, B.; KARACA, S.; USTUN, H.; ALAGOL, H.; RENDA, N.; OZ, M. Methylene blue prevents surgery-induced peritoneal adhesions but impairs the early phase of anastomotic wound healing. **Can J Surg** 2006;49(5):321-328.

DOUNGAN, D. F. H.; MEARRICK, P.; WADE, D. N. Metoclopramide as a dopamine antagonist in the heart and gut of the mollusc *Tapes Watlingi*. **Clin Exp Pharm Phys** 1974; 1(6): 473-478.

ECHTENACHER, B.; MANNEL, D. N.; HUNTNER, L. Critical protective role of mast cells in a model of acute septic peritonitis. **Nature** 1996; 381(6577): 75-77.

EISNER, M. Gastrointestinal effects of metoclopramide in man. In vitro experiments with human smooth muscle preparations. **Br Med J** 1968; 4(5632): 679-680.

EISNER, M. Effect of metoclopramide on gastrointestinal motility in man. A manometric study. **Am J Dig Dis** 1971; 16(5):409-419.

ENESTVEDT, C.K.; THOMPSON, S.K.; CHANG, E.Y.; JOBE, B.A. Clinical review: Healing in gastrointestinal anastomoses, part II. **Microsurgery** 2006;26(3):137-143.

FENG, C. W.; FAGUNDES, J. J.; COY, R. S.; GOES, J. R. N.; LEONARDI, L. S. Biomechanical study to evaluate the influence of abdominal adhesions in colonic anastomoses: experimental study in rats. **Acta Cir Bras** 2003; 18(3): 245-249.

FIELDING, L. P.; STEWART-BROWN, S.; BLESOVSKY, L.; KEARNEY, G. Anastomotic integrity after operations of large-bowel cancer: a multicentric study. **Br Med J** 1980; 281(6237): 411-414.

FRANZEN, L. GHASSEMIFAR, R.; SCHULTZ, G. Specific binding of EGF in connective tissue repair. **Eur Cell Biol** 1993; 60(2):346-350.

FREEDBERG, I.M.; TOMIC-CANIC, M.; KOMINE, M.; BLUMENBERG, M. Keratins and the keratinocyte activation cycle. **J Invest Dermatol** 2001; 116: 633-640.

FRIED, L. E.; HESP, M. D.; THUIS, H.; EVERT-JAN, C. L.; HERMAN, H. M. D. Wound healing in the intestinal wall. A comparison between experimental ileal and colonic anastomoses. **Dis Colon Rectum** 1984; 27(2): 99-104.

GARCIA-OLMO, D.; LUCAS, F. J.; PAYÁ, J. Effects of intra-abdominal latex (drain-like) tube on anastomotic resistance and adhesion formation in a rat model. **Dis Colon Rectum** 1996; 39(3): 311-317.

GARCIA-OLMO, D.; LUCAS, F. J.; PAYÁ, J. Relationship between peritoneal adhesion phenomena and the experimental resistance of colonic anastomoses: influence of omentoplasty. **Eur Surg Res** 1996; 28(4): 315-322.

GARCIA-OLMO, D.; LUCAS, F. J.; PAYÁ, J.; GARCIA-OLMO, D. C. The effects of the pharmacological manipulation of postoperative intestinal motility on colonic anastomoses. An experimental study in a rat model. **Int J Colorectal Dis** 1997; 12(2): 73-77.

GOLDMAN, R. Growth factors and chronic wound healing: past, present and future. **Adv Skin Wound Care** 2004; 17(1): 24-35.

GOLIGHER, J. C.; GRAHAM, N. G.; DEDOMBAL, F. T. Anastomotic dehiscence after anterior resection of rectum and sigmoid. **Br J Surg** 1970; 57(2): 109-118.

GOLUB, R.; CANTU, R. J. R.; STEIN, H. D. A multivariate analysis of factor contributing to leakage of intestinal anastomoses. **J Am Coll Surg** 1997; 184(4): 364-372.

GOMEL, V.; URMAN, B.; GURGAN, T. Pathophysiology of adhesion formation and strategies for prevention. **J Reprod Med** 1996; 41(1): 35-41.

GRECA, F.H.;FILHO, Z.A.S.; GIOVANINI, A.; JUNIOR, C.A.C.; RUBIN, M.R.; SILVA, R.F.K.C. Interleukin-6 (IL-6) influence on colonic anastomosis healing in rats. **Acta Cir Bras** 2007;22(2):110-114.

HACIYANLI, M.; FUZUN, M.; UNEK, T.; TOZGOZ, Z. Does the administration route of leucovorin have any influence on the impairment of colonic healing caused by intraperitoneal 5-fluorouracil treatment? **Eur Surg Res** 2001; 33(2): 80-85.

HANTASH, B.M.; ZHAO, L.; KNOWLES, J.; LORENZ, H.P. Adult and fetal wound healing. **Front Biosci** 2008; 13: 51-61.

HAWLEY, P. R.; FAULK, W.P.; HUNT, T.K.; DUNPHY, J.E. Collagenase activity in the gastro-intestinal tract. **Br J Surg** 1970; 57:896-900.

HAY, A.M. Pharmacological analysis of the effects of metoclopramide on the guinea pig isolated stomach. **Gastroenterology** 1977; 72(5): 864-869.

HAY, A. M.; MAN, W. K. Effect of metoclopramide on guinea pig stomach: critical dependence on intrinsic stores of acetylcholine. **Gastroenterology** 1979; 76(3): 492-496.

HENDRIKS, T.; MASTBOOM, W.J.B. Healing of experimental intestinal anastomosis. Parameters for repair. **Dis Col Rectum** 1990; 33(10):891-901.

HENRY, T. D. Therapeutic angiogenesis. **Br Med J** 1999; 318:1536-1539.

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

HERWIG, R.; GLODNY, B.; KUHLE, C. Early identification of peritonitis by peritoneal cytokine measurement. **Dis Colon Rectum** 2002; 45: 514–521.

HICKEY, M. J. Recent advances in adhesion prevention. **Contemp Obstet Gynecol** 1990; 35: 14-16.

HIRANO, T. IL6 and its receptor: ten years later. **Int Rev Immunol.**1998; 16: 249-284.

HO, Y. H.; ASHOUR, M. A. Techniques for colorectal anastomosis. **World J Gastroenterol** 2010; 16(13): 1610-1621.

HOEPPNER, J.; WASSMUTH, B.; MARJANOVIC, G.; TIMME, S.; HOPT, U.T.; KECK, T. Anastomotic Sealing by Extracellular Matrices (ECM) Improves Healing of Colonic Anastomoses in the Critical Early Phase. **J Gastrointest Surg** 2010, 14(6):977–986.

HOGSTROM, H.; HAGLUND, U. Postoperative decrease in suture holding capacity in laparotomy wounds and anastomoses. **Acta Chir Scand** 1985;151(6): 533-535.

HOGSTROM, H. L.; BONDESON, L. HAGLUND, U. Neutrophil-induced decrease in wound margin strength after intestinal anastomosis – influence on collagen and mechanisms of granulocyte action. **Eur Surg Res** 1988; 20(4): 260-266.

HOLMDAHL, L.; RISBERG, B.; BECK, D.E. Adhesions: Pathogenesis and prevention. **Eur J Surg** 1997; 577: 56-62.

HOLZHEIMER, R.G.; SCHEIN, M.; WITTMANN, D.H. Inflammatory response in peritoneal exsudate and plasma of patients undergoing planned relaparotomy for severe secondary peritonitis. **Arch Surg** 1995;12:1314– 1319.

HOUDART, R.; LAVERGNE, A.; VALLEUR, P.; VILLTE, R.; HAUTEFEUILLE, P. Vascular evolution of single-layer and-on colonic anastomosis. **Dis Col Rectum** 1955; 28(7): 475-480.

HOWDIESHELL, T. R.; CALLWAY, D.; GODDEN, U. Antibody neutralization of vascular endothelial growth factor inhibits wound granulation tissue formation. **J Surg Res** 2001; 96(2): 173-182.

INAN, A.; KOCA, C.; SEN, M. Effects of diclofenac sodium on bursting pressures of anastomoses and hydroxyproline contents of perianastomotic tissues in a laboratory study. **Int J Surg** 2006; 4(4): 222-227.

IRVIN, T.T.; HUNT, T.K. Reappraisal on the healing process of anastomosis of the colon. **Surg Gynecol Obstet** 1974; 138(5): 741-744.

ISHII, M.; TANAKA, E.; IMAIZUMI, T.; SUGIO, Y.; SEKKA, T.; TANAKA, M.; YASUDA, M.; FUKUYAMA, N.; SHINOZAKI, Y.; HYODO, K.; TANIOKA, K.; MOCHIZUKI, R.; KAWAI, T.; MORI, H.; MAKUUCHI, H. Local VEGF administration enhances healing of colonic anastomoses in a rabbit model. **Eur Surg Res** 2009;42(4):249-257.

ISHIMURA, K., TSUBOUCHI, T., OKANO, K., MAEBA, T., AND MAETA, H. Wound healing of intestinal anastomosis after digestive surgery under septic conditions: Participation of local interleukin-6 expression. **World J Surg** 1998;22(10):1069-1075.

ISHIMURA, K.;MOROGUCHI, A.; OKANO,K.; MAEBA, T.; MAETA, H. Local Expression of Tumor Necrosis Factor and Interleukin-10 on Wound Healing of Intestinal Anastomosis During Endotoxemia in Mice. **J Surg Res** 2002; 108: 91-97.

ITO, A; MUKAIYAMA, A.; ITOH, Y.; NAGASE, H.; THORGERSEN, I.B.; ENGHILD, J.J.; SASAGURI, Y.; MORI, Y. Degradation of interleukin 1 beta by matrix metalloproteinases. **J Biol Chem** 1996; 271: 14657-14660.

IUVONE, T. DEN BOSSCHE, R. V.; D'ACQUISITO, F.; CARNUCCIO, R.; HERMAN, A. G. Evidence that mast cell degranulation, histamine and tumor necrosis factor alpha release occur in LPS-induced plasma leakage in rat skin. **Br J Pharmacol** 1999; 128(3): 700-704.

JIAN, R.; DUCROT, F.; PIEDELOUP, C.; MARY, J. Y.; NAJEAN, Y.; BERNIER, J. J. Measurement of gastric emptying in dyspeptic patients: effect of a new gastrokinetic agent (cisapride). **Gut** 1985; 26(4): 352-358.

JIBORN, H.; AHONEN, J.;ZEDERFELDT, B. Healing of experimental colonic anastomoses I. Bursting strength of the colon after left colon resection and anastomosis. **Am J Surg** 1978; 136(5): 587-594.

JIBORN, H.; AHONEN, J.; ZEDERFELDT, B. Healing of experimental colonic anastomoses II. Breaking Strength of the colon after left colon resection and anastomosis. **Am J Surg** 1978; 136(5): 595-599.

JIBORN, H.; AHONEN, J.; ZEDERFELDT, B. Healing of experimental colonic anastomoses III. Collagen metabolism in the colon after left colon resection. **Am J Surg** 1980; 139(3): 398-405.

JIBORN, H.; AHONEN, J.; ZEDERFELDT, B. Healing of experimental colonic anastomoses IV. The effect of suture technic on collagen concentration in the colonic wall. **Am J Surg** 1980;139(3):406-413.

JOHNSON, A. G. The action of metoclopramide on human gastroduodenal motility. **Gut** 1971; 12(6): 421-426.

JÚNIOR, C.S.; SOUZA, C. Uso de 2-octil cianoacrilato em anastomose colônica: estudo experimental em ratos wistar. **Rev Col Bras Cir** 2010; 37(2): 135-142.

JUNQUEIRA, L. C.; BIGNOLAS, G.; BRETANI, R. R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **Histochem J** 1979; 11(4): 447-455.

JUSTIN-BESANÇON, L.; THOMINTE, M. Le métoclopramide et ses homologues: introduction à leur etude biologique. **C R Acad Sci** 1964; 258: 4384-4386.

KAIDI, A.; NAZZAL, M.; GURCHUMELIDZE, T. Preoperative administration of antibodies against tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 and their impact on peritoneal adhesion formation. **Am J Surg** 1995(a);61(5):569-572.

KAIDI, A.; GURCHUMELIDZE, T.; NAZZAL, M. Tumor necrosis factor alpha: a marker of peritoneal adhesion formation. **J Surg Res** 1995 (b);58: 516-518.

KANELLOS, D.; PRAMATEFTAKIS, M.G.; DEMETRIADES, H. Healing of colonic anastomoses after immediate postoperative intraperitoneal administration of oxaliplatin. **Int J Colorectal Dis** 2008; 23:1185–1191.

KARATAS, A.; KOCAEL, A.; AYTAÇ, E.; GÖKCAL, F.; SALIHOĞLU, Z.; UZUN, H.; PAKSOY, M. Amelogenin (an extracellular matrix protein) application on ischemic colon anastomosis in rats. **Ulus Travma Acil Cerrahi Derg** 2010;16(6):487-490.

KIYAMA,Z.; ONDA, M.; TOKUNAGA, A.; EFI-ON,D.; BARBUL,A. Effect of Matrix Metalloproteinase Inhibition on Colonic Anastomotic Healing in Rats. **J Gastroint Surg** 2001; 5(3): 303-311.

KLEESPIES, A.; GUBA, M.; JAUCH, K.W.; BRUNS, C.J. Vascular endothelial growth factor in esophageal cancer. **J Surg Oncol** 2004;87(2):95-104.

KOLOGLU, M.; YORGANCI, K.; RENDA, N.; SAYEK, I. Effect of local and remote ischemia-reperfusion injury on healing of colonic anastomoses. **Surgery** 2000; 128(1): 99-104.

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

KUZU, M. A.; KUZU, I.; KOKSOY, C.; AKYOL, F. H.; UZAL, D.; KALE, I. T.; ORHAN, D.; TERZI, C. Histological evaluation of colonic anastomotic healing in the rat following preoperative 5-fluorouracil, fractionated irradiation and combined treatment. **Int J Colorectal Dis** 1998; 13(5-6): 235-240.

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

LEVRANT, S. G.; BIEBER, E. J.; BARNES, R. B. Anterior abdominal wall adhesions after laparotomy or laparoscopy. **J Am Assoc Gynecol Laparosc** 1997; 4(3): 353-356.

LI, J.; ZHANG, Y. P.; KISNER, R. S. Angiogenesis in wound repair: angiogenic growth factors and the extracellular matrix. **Microsc Res Tech** 2003; 60(1): 107-114.

LI, J.; CHEN, J.; KIRSNER, R. Pathophysiology of acute wound healing. **Clin Dermatol** 2007; 25(1): 9-18.

LIAKAKOS, T.; THOMAKOS, N.; FINE, P. M.;DERVENIS, C.; YOUNG, R. L. Peritoneal adhesions: ethiology, pathophysiology and clinical significance. Recent advances in prevention and management. **Dig Surg** 2001; 18(4): 260-273.

LIEBMAN, S. M.; LANGER, J.C.; MARSHALL, J. S.; COLLINS, S.M. Role of mast cell in peritoneal adhesion formation. **Am J Surg** 1993; 165(1):127-130.

LIN, E.; CALVANO, S. E.; LOWRY, S. F. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. **Surgery** 2000; 127(2): 117-126.

LIVRAK, K. J.; SCHMITTGER, T. D. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T))Method. **Methods** 2001; 25(4): 402-408.

LONGO, W. E.; VERNAVA, A. M. Prokinetic agents for lower gastrointestinal motility disorders. **Dis Colon Rectum** 1993; 36(7): 696-708.

LOPES, J. V.; FREITAS, L. A. M.; MARQUES, R. D.; BOCCA, A. L.; SOUSA, J.B.; GONÇALVES, P. G. Analysis of the tensile strength on the healing of the abdominal wall of rats treated with infliximab. **Acta Cir Bras** 2008; 23(5): 441-446.

LORD, M.G.; VALIES, P. BROUGHTON, C. A morphometric study of the submucosa of the large intestine. **Surg Gynecol Obstet** 1977; 145(1): 55-60.

MALAGELADA, J. R.; REES, W.D.; MAZZOTTA, L. J.; GO, V. L. Gastric motor abnormalities in diabetic and postvagotomy gastroparesis: effect of metoclopramide and bethanecol. **Gastroenterology** 1980; 78(2): 286-293.

MALAVIYA, R.; ABRAHAM, S. N. Role of mast cell leukotrienes in neutrophil recruitment and bacterial clearance in infectious peritonitis. **J Leukoc Biol** 2000; 67(6): 841-846.

MARCHANT, A.; ALEGRE, M.L.; HAKIM, A. Clinical and biological significance of interleukin-10 plasma levels in patients with septic shock. **J Clin Immunol** 1995; 15:266-273.

MARGETTS, P.J.; KOLB, M.; YU, L. Inflammatory cytokines, angiogenesis, and fibrosis in the rat peritoneum. **Am. J. Pathol** 2002; 160: 2285-2294.

MARTIN, C. W.; MUIR, I. F. The role of lymphocytes in wound healing. **Br J Plast Surg** 1990; 43(6): 655-662.

MARTINEAU, L.; SHEK, P. Peritoneal cytokine concentrations and survival outcome in an experimental bacterial infusion model of peritonitis **Crit Care Med** 2000; 28(3): 788-794.

MASTBOOM, W.J.; HENDRIKS, T.; VAN ELTEREN, P.; DE BOER, H.H. The influence of NSAIDs on experimental intestinal anastomoses. **Dis Colon Rectum** 1991;34(3):236-243.

MATEO, R.B.; JONATHAN, S.R.; JORGE, E.A. Interleukin-6 activity in wounds. **Am J Physiol** 1994; 266:1840.

MATERNIS, M. F.; HENDRIKS, T. Postoperative changes in collagen synthesis in intestinal anastomoses of the rat: differences between small and large bowel. **Gut** 1992; 32(12): 1482-1487.

MATTEL, P.; ROMBEAU, J. L. Review of the pathophysiology and management of postoperative ileus. **World J Surg** 2006; 30(8): 1382-1391.

MAUVIEL, A.; DAIREAUX, M.; REDINI, F. Tumor necrosis factor inhibits collagen and fibronectin synthesis in human dermal fibroblasts. **FEBS Lett** 1988; 236:47–52.

MEDUGORAC, I. Collagen content in different areas of normal and hypertrophied rat myocardium. **Cardiovasc Res** 1980; 14: 551-554.

MENZIES, D.; ELLIS, H. Intestinal obstruction from adhesions – how big is the problem? **Ann R Coll Surg Engl** 1990; 72(1): 60-63.

MONTES, G. S.; JUNQUEIRA, L. C. The use of the Picrosirius-polarization method for the study of the biophatology of collagen. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 1991; 86 Suppl 1: 1-11.

MONTZ, F.; HOLSCHNEIDER, C.; BOZUK, M. Interleukin 10: ability to minimize postoperative intraperitoneal adhesion formation in a murine model. **Fertil Steril** 1994;61: 1136-1140.

MOLLOY, R.G.; MANNICK, J.A.; RODRICK, M.L. Cytokines, sepsis and immunomodulation. **Br J Surg** 1993;80: 289–297.

NAGASE, H.; WOESSNER, J.F.Jr. Matrix metalloproteinases. **J Biol Chem** 1999; 274(31): 21491-21494.

NAIR, S. K.; BHAT, I. K.; AURORA, A.L. Role of proteolytic enzyme in the prevention of postoperative intraperitoneal adhesion. **Arch Surg** 1974; 108(6): 849-853.

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

NEUMAN, R. E.; LOGAN, M. A. The determination of collagen and elastin in tissues. **J Biol Chem** 1950; 186(2): 549-556.

NURSAL, T. Z.; ANARAT, R.; BIRCAN, S.; YILDIRIM, S.; TARIM, A.; HABERAL, M. The effect of tissue adhesive octyl-cyanoacrylate on the healing of experimental high-risk and normal colonic anastomoses. **Am J Surg** 2004; 187(1): 28-32.

OKWUASABA, F.K.; HAMILTON, J. T. The effect of metoclopramide on intestinal muscle responses and the peristaltic reflex in vitro. **Can J Physiol Pharmacol** 1976; 54(3):393-404.

ONODERA, H.; IKEUCHI, D.; NAGAYAMA, S.; IMAMURA, M. Weakness of anastomotic site in diabetic rats is caused by changes in the integrity of newly formed collagen. **Dig Surg** 2004; 21:146-151.

OTERO-ANTÓN, E.; GONZÁLEZ-QUINTELA, A.; LÓPEZ-SOTO, A.; LÓPEZ-BEM, S.; LLOVO, J.; PÉREZ, L.F. Cecal ligation and puncture as a model of sepsis in the rat: influence of the puncture size on mortality, bacteremia, endotoxemia and tumor necrosis factor alpha levels. **Eur Surg Res** 2001;33(2):77-79.

OZEN, I.O.; EKINGEN, G.; TAŞLIPINAR, M.Y.; BUKAN, N.; DEMIROĞULLARI, B.; KARABULUT, R.; SÖNMEZ, K.; BAŞAKLAR, A.C.; KALE, N. Effect of melatonin on healing of colonic anastomosis in a rat model of peritonitis. **Eur Surg Res** 2007;39(2):122-127.

PAKS, W. C. Matrix Metalloproteinases in repair. **Wound Repair Regen** 1999; 7(6): 423-432.

PASTERNAK, B.; MATTHIESSEN, P.; JANSSON, K.; ANDERSSON, M.; ASPENBERG, P. Elevated intraperitoneal matrix metalloproteinases-8 and -9 in patients who develop anastomotic leakage after rectal cancer surgery: a pilot study **Colorectal Dis** 2010; 12(7Online): e93-e98.

PAVLIDIS, E.T.; BALLAS, K.D.; SYMEONIDIS, N.G.; PSARRAS, K.; KOLIAKOS, G.; KOUZI-KOLIAKOS, K.; TOPOURIDOU, K.; RAFAILIDIS, S.F.; PAVLIDIS,

T.E.; MARAKIS, G.N.; SAKANTAMIS, A.K. The effect of bevacizumab on colon anastomotic healing in rats. **Int J Colorectal Dis.** 2010 ;25(12):1465-1473.

PEARSON, M.; EDWARD, D.; TATE, A.; GILKES, R.; SAXTON, H. M.; HOWLAND, C. Comparison of the effect of oral and intravenous metoclopramide on the small bowel. **Postgrad Med J** 1973; 49 (Suppl 4): 47-51.

PERINGER, E.; JENNER,P.; MARSDEN, C.D. Effect of metoclopramide on turnover of brain dopamine, noradrenaline and 5-hydroxytryptane. **J Pharm Pharmacol** 1975; 27(6): 442-444.

PIIRKS, W.C. Matrix metalloproteinases in repair (review). **Wound Repair Reg** 1999; 7: 423-432.

PINDER, R. M.; BRODGEN, R. N.; SAWYER, P. R.; SPEIGHT, T. M.; AVERY, G. S. Metoclopramide: a review of its pharmacological properties and clinical use. **Drugs** 1976; 12(2): 81-131.

PLATELL, C.; BARWOOD, N.; DORFMANN, G.; MAKIN, G. The incidence of anastomotic leaks in patients undergoing colorectal surgery. **Colorectal Dis** 2007; 9(1): 71-79.

RAPALA, K., LAATO, M., NINIKOSKI, J., KUJARI, H., SO'DER, O., MAUVIEL, A., PUJOL, J. P. Tumor necrosis factor alpha inhibits wound healing in the rat. **Eur Surg Res** 1991; 23(5-6): 261-268.

REDDY, G. K.; ENWEMWKA, C. S. A simplified method for analysis of hydroxyproline in biological tissues. **Clin Biochem** 1996; 29(3):225-229.

RITTIRSCH, D.; HUBER-LANG, M. S.; FLIERL, M. A.; WARD, P. A. Immunodissection of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. **Nature Protocols** 2009; 4(1): 31-36.

ROCHA, A.A.; LEAL, R.F.; AYRIZONO, M.D.E. L.; CHUNG, W.F.; COY, C.S.; LEE, H.D.; FAGUNDES, J.J. Hyperbaric oxygen therapy and mechanical resistance of the colonics anastomosis in rats with peritonitis. **Acta Cir Bras** 2010;25(4):368-374.

RONG, H.; TANG, X.; ZHAO, Y. Postsurgical intraperitoneal exposure to glove powder modulates the inflammatory and immune-related cytokine production. **Wound Repair Regen** 1997; 5: 85-96.

RONGIONE, A.J.; KUSSKE, A.M.; ASHLEY, S.W.; REBER, H.A.; MCFADDEN, D.W. Interleukin-10 Prevents Early Cytokine Release in Severe Intraabdominal Infection and Sepsis. **J Surg Res** 1997; 70: 107–112.

RYAN, G. B.; GROBETY, J. Mesothelial injury and recovery. **Am J Pathol** 1973; 71(1): 93-112

SABA, A.A., KAIDI, A.A., GODZIACHVILI, V. Effects of interleukin-6 and its neutralizing antibodies on peritoneal adhesion formation and wound healing. **Am Surg** 1999; 62: 569 –572.

SAGAR, P. M.; COUSE, N.; KERIN, M.; MAY, J.; MACFIE, J. Randomized trial of drainage of colorectal anastomosis. **Br J Surg** 1993; 80(6): 769-771.

SAKALLIOGLU, A; E.; YAGMURLU, A.; DINDAR, H.; HASIRCI, N.; RENDA, N.; DEVECI, M. S. Sustained local application of low-dose epidermal growth factor on steroid-inhibited colonic wound healing. **J Pediatr Surg** 2004; 39(4): 591-595.

SALAMONSEN, L. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in endometrial remodeling and menstruation. **Reprod Med** 1996; 53:185–203.

SARABEYOGLU, K.; BACA, B.; HAMZAOGLU, I.; PEKMEZCI, S.; KARAHASANOGLU, T.; HAMZAOGLU, H. Does becaplermin (plated-derived growth factor BB) reverse detrimental effects of ischemia on colonic anastomosis? **Dis Colon Rectum** 2003; 46(4): 516-520.

SAVAGE, F. G.; LACOMBE, D. L.; BOLOUS, P. B.; HEMBRY, R. M. Role of matrix metalloproteinases in healing of colonic anastomosis. **Dis Colon Rectum** 1997; 40(8): 962-970.

SAVAGE, F.J.; LACOMBE, D.L.; HEMBRY, R.M.; BOULOS, P.B. Effect of colonic obstruction on the distribution of matrix metalloproteinases during anastomotic healing. **Br J Surg** 1998; 85:72–75.

SCHEINGRABER, S.; BAUERFEIND, F.; BOHME, J.; DRALLE, H. Limits of peritoneal cytokine measurements during abdominal lavage treatment for intraabdominal sepsis. **Am J Surg** 2001; 181:301–308.

SCHULZE-DELRIEU, K. Metoclopramide. **Gastroenterology** 1979; 77(4): 768-779.

SCHULZE-DELRIEU, K. Metoclopramide. **The New Engl J Med** 1981; 305: 28-33.

SEIFERT, W.F.; WOBBER, T.; HENDRIKS, T. Divergent patterns of matrix metalloproteinase activity during wound healing in ileum and colon of rats. **Gut** 1996; 39:114-119.

SEIFERT, W.F.; VERHOFSTAD, A.A.; WOBBER, T.; LANGE, W.; RIJKEN, P.F.; VAN DER KOGEL, A.J.; HENDRIKS, T. Quantitation of angiogenesis in healing anastomoses of the rat colon. **Exp Mol Pathol** 1997; 64(1):31-40.

SHANDAL, A. A.; WILLIAMS, G. T.; HALLETT, M. B.; YOUNG, H. L. Colonic healing: a role for polymorphonuclear leucocytes and oxygen radical production. **Br J Surg** 1986; 73(3): 225-228.

SHAPER, K.R.; SAVAGE, F.J.; HEMBRY, R.M.; BOULOS, P.B. Regulation of matrix metalloproteinases in a model of colonic wound healing in a rabbit. **Dis Colon Rectum** 2001; 44:1857-1866

SIEMONSMA, M. A.; DE HINGH, I.H.; DE MAN, B.M.; LOMME, R.M.; VERHOFSTAD, A.A.; HENDRIKS, T. Doxycycline improves wound strength after intestinal anastomosis in the rat. **Surgery** 2003;133(3):268-276.

SINGLETON, K.D.; WISCHMEYER, P.E. Distance of cecum ligated influences mortality, tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 expression following cecal ligation and puncture in the rat. **Eur Surg Res** 2003;35(6):486-491.

SIRIMARCO, M.T.; ZUCOLOTO, S.; APRILLE, F. Estudo comparativo dos efeitos de dois corticosteróides sintéticos, Deflazacort e Prednisona, na cicatrização de anastomoses colônicas de ratos. **Rev Bras Coloproct** 2001; 21(3): 167-195.

SNOJ, M.; ARRAJAB, A.; AHREN, B.; BENGMARK, S. Effect of phosphatidylcholine on postoperative adhesion after small bowel anastomosis in the rat. **Br J Surg** 1992; 79(5): 427-429.

SOUSA J. B.; OLIVEIRA, P.G. Cuidados com a ferida operatória: infecção. **Clin Cir Bras** 1999; 5(2): 215-237.

SPARNON, A.L.; SPITZ, L. Pharmacological manipulation of postoperative intestinal adhesion. **Aust N Z Surg** 1989; 59(9): 725-729.

SPRINGALL, R.G.; SPITZ, L. The prevention of post-operative adhesions using a gastrointestinal prokinetic agent. **J Pediatr Surg** 1989;24(6):530-533.

STAMENKOVIS, I. Extracellular matrix remodeling: the role of matrix metalloproteinases. **J Phatol** 2003; 200(4): 448-464.

STEGEMANN, H.; STALDER, K. Determination of hydroxyproline. **Clin Chim Acta** 1967;18: 267-273.

STUMPF, M.; CAO, W.; KLINGE, U.; KLOSTERHALFEN, B.; KASPERK, R.; SCHUMPELICK, V. Collagen distribution and expression of matrix metalloproteinases 1 and 13 in patients with anastomotic leakage after large-bowel surgery. **Langenbeck's Arch Surg** 2002; 386:502–506.

STUMPF, M.; KLINGE, U.; WILMS, A.; ZABROCKI, R.; ROSCH, R.; JUNGE, K.; et al. Changes of the extracellular matrix as a risk factor for anastomotic leakage after large bowel surgery. **Surgery** 2005; 137(2):229–34.

SYK, I.; MIRASTSCHIJSKI, U.; JEPPSSON, B.W.; ÅGREN, M.S. Experimental colonic obstruction increases collagen degradation by matrix metalloproteinases in the bowel wall. **Dis Colon Rectum**. 2003; 46:1251-9.

TEKE, Z.; SACAR, S.; YENISEY, C.; ATALAY, A.O.; KAVAK, T.; ERDEM, E. Role of activated protein C on wound healing process in left colonic anastomoses in the presence of intra-abdominal sepsis induced by cecal ligation and puncture: an experimental study in the rat. **World J Surg** 2008;32(11):2434-2443.

TENG, L. BRUCE, R. B.; DUNNING, L. K. Metoclopramide metabolism and determination by high-pressure liquid chromatography. **J Pharm Sci** 1977; 66: 1615-1618.

THOMPSON, S.K.; CHANG, E.Y.; JOBE, B.A. Clinical review: Healing in gastrointestinal anastomoses, part I. **Microsurgery** 2006;26(3):131-136.

THOMPSON, J. N.; WHAWELL, S. A. Pathogenesis and prevention of adhesion formation. **Br J Surg** 1995; 82(1) 3-5.

THORNER, M. O. Dopamine is an important neurotransmitter in the autonomic nervous system. **Lancet** 1975; 1: 662-665.

THORNTON, F.J.; AHRENDT, G.M.; SCHÄFFER, M.R.; TANTRY, U.S.; BARBUL, A. Sepsis impairs anastomotic collagen gene expression and synthesis: a possible role for nitric oxide. **J Surg Res** 1997;69(1):81-86.

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

TINGSTEDT, B.; NEHÉZ, L.; AXELSSON, J.; LINDMAN, B.; ANDERSSON, R. Increasing anastomosis safety and preventing abdominal adhesion formation by the use of polypeptides in the rat. **Int J Colorectal Dis** 2006; 21: 566-572.

TOGNINI, J. R.; NOVO, N. F.; JULIANO, Y. Estudo biomecânico da cicatrização da parede abdominal sob a ação de meloxicam. **Acta Cir Bras** 2000; 15:146-155.

TRUBIAN, P.S. Influência do octreotide na cicatrização de sutura gástrica em ratos: estudo tensiométrico e da morfologia do colágeno [dissertação]. Curitiba (PR): **Universidade Federal do Paraná**; 2004

TSUKADA, K.; KATOH, H.; SHIOJIMA, M.; SUZUKI, T.; TAKENOSHITA, S.; HAGAMACHI, Y. Concentrations of cytokines in peritoneal fluid after surgery. **Eur J Surg** 1993; 159: 475-479.

TURKCAPAR, A. G.; DEMIRER, S.; SENGUL, N.; ERSOZ, S.; KUTERDEM, E.; RENDA, N.; KUZU, I. The adverse effects of octreotide on the healing of colonic anastomoses in rats. **Surg Today** 1998; 28(3): 279-284.

VAALAMO, M.; KARJALAINEN-LINDSBERG, M.L.; PUOLAKKAINEN, P.; KERE, J.; SAARIALHO-KERE, U. Distinct expression profiles of stromelysin- 2 (MMP-10), collagenase-3 (MMP-13), macrophage metalloelastase (MMP-12), and tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) in intestinal ulcerations. **Am J Pathol** 1998; 152:1005-1014.

VAN DER POLL, T.; MARCHANT, A.; BUURMAN, L. Endogenous IL-10 protects mice from death during septic peritonitis. **J Immunol** 1995; 155: 5397-5401.

VAN DER STAPPEN, J.W.; HENDRIKS, T.; DE BOER, H.H. Collagenolytic activity extracted from intestinal anastomoses of the rat. **Matrix** 1989; 9:238-243

VERLINDEN, M.; MICHIELS, G.; BOGHAERT, A.; DE COSTER, M.; DEHERTOG, P. Treatment of post-operative gastrointestinal atony. **Br J Surg** 1987;74:614-617.

VINCENT, J.L. Update on sepsis: pathophysiology and treatment. **Acta Clin Belg** 2000; 55:79-87.

VIPOND, M. N.; WHAWELL, S. A.; THOMPSON, J. N.; DUDLEY, H. A. Peritoneal fibrinolytic activity and intra-abdominal adhesion. **Lancet** 1990; 335(8698): 1120-1122.

WALKER, K. G.; BELL, S. W.; RICKARD, M. J.; MEHANNA, D.; DENT, O. F.; CHAPUIS, P. H.; BOKEY, E. L. Anastomotic leakage is predictive of diminished survival after potentially curative resection for colorectal cancer. **Ann Surg** 2004; 240(2): 255-259.

WANG, H.; KEISER, J.A. Vascular endothelial growth factor upregulates the expression of matrix metalloproteinases in vascular smooth muscle cells: role of flt-1. **Circ Res** 1998 ;83(8):832-840.

WANG, P.; GONG, G.; LI, Y.; LI, J. Hydroxyethyl starch 130/0.4 augments healing of colonic anastomosis in a rat model of peritonitis. **Am J Surg** 2010;199(2):232-239.

WANINGER, J.; KAUFFMAN, G. W.; SHAH, I. A.; FARTHAMANN, E. H. Influence of the distance between interrupted sutures and the tension of sutures on the healing of experimental colonic anastomoses. **Am J Surg** 1992; 163(3): 319-323.

WERTHER, K.; CHRISTENSEN, I. J.; BRUNNER, N.; NIELSEN, H. J. Soluble vascular endothelial growth factor levels in patients with primary colorectal carcinoma. The Danish RANX05 Colorectal Cancer Study Group. **Eur J Surg Oncol** 2000; 26(7): 657-662.

WHITTE, M.; BARBUL, A. General principles of wound healing. **Surg Clin North Am** 1997;77(3): 509-528.

WHITTE, M.; BARBUL, A. Repair of full-thickness bowel injury. **Crit Care Med** 2003; 31(Suppl 8): S538-546.

WIIK, H.; KARTTUNEN, R.; HAUKIPURO, K.; SYRJALA, H. Maximal local and minimal systemic cytokine response to colorectal surgery: the influence of perioperative filgrastim. **Cytokine** 2001; 14: 188-192.

WU, F. C.; AURIZONO, M. L. S.; FAGUNDES, J. J.; COY, C. S. R.; GOÉS, J. R. N.; LEONARDI, L. S. Estudos biomecânicos da ação de aderências sobre anastomose cólica. Trabalho experimental em ratos. **Acta Cir Bras** 2003; 18 (3): 216-223.

WU, F.P.; HOEKMAN, K.; SIETSES, C.; VON BLOMBERG, B.M.; MEIJER, S.; BONJER, H.J.; CUESTA, M.A. Systemic and peritoneal angiogenic response after laparoscopic or conventional colon resection in cancer patients: a prospective, randomized trial. **Dis Colon Rectum** 2004; 47(10):1670-1674.

YARIMKAYA, A.; APAYDIN, B.; UNAL, E.; KARABICAK, I.; AYDOGAN, F.; USLU, E.; ERGINOZ, E.; ARTIS, T.; EYUBOGLU, E. Effects of Recombinant Human Growth Hormone and Nandrolone Phenylpropionate on the Healing of Ischemic Colon Anastomosis in Rats. **Dis Colon Rectum** 2003;46(12):1690-1697.

ZACHARAKIS, E.; DEMETRIADES, H.; PRAMATEFTAKIS, M.G. Effect of IGF-I on healing of colonic anastomoses in rats under 5-FU treatment. **J Surg Res** 2008; 144:138-144.





APÊNDICE C - PARÂMETROS CLÍNICOS PÓS-OPERATÓRIOS DE APATIA E ERIÇAMENTO DE PÊLOS DOS ANIMAIS AVALIADOS NO 3º DIA DE PÓS-OPERATÓRIO NA PRESENÇA DE SEPSE ABDOMINAL

<b>Sub grupo</b>	<b>Animal nº</b>	<b>Apatia no 1º PO</b>	<b>Apatia no 2º PO</b>	<b>Apatia no 3º PO</b>	<b>Eriçamento no 1º PO</b>	<b>Eriçamento no 2º PO</b>	<b>Eriçamento no 3º PO</b>	
<b>SM3</b>	1	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	
	2	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	
	3	ausente	ausente	leve	ausente	ausente	leve	
	4	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	
	5	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	
	6	leve	leve	ausente	leve	leve	ausente	
	7	leve	ausente	ausente	leve	ausente	ausente	
	11	leve	leve	leve	leve	ausente	ausente	
	12	leve	leve	leve	ausente	ausente	ausente	
	13	ausente	leve	leve	ausente	ausente	ausente	
	<b>SB3</b>	1	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente
		2	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente
		3	moderada	leve	ausente	moderada	leve	ausente
4		ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	
5		ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	
7		ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	
8		ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	
10		moderada	moderada	moderada	leve	moderada	moderada	
11		leve	leve	leve	leve	leve	leve	
12		leve	leve	leve	leve	leve	leve	
<b>SS3</b>		1	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente
		2	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente
	3	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	
	4	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	
	5	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	
	6	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	
	8	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	
	9	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	
	11	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	
	12	leve	leve	moderada	leve	leve	moderada	

APÊNDICE D - PARÂMETROS CLÍNICOS PÓS-OPERATÓRIOS DE DIARRÉIA E DISTENSÃO ABDOMINAL DOS ANIMAIS AVALIADOS NO 3º DIA DE PÓS-OPERATÓRIO NA PRESENÇA DE SEPSE ABDOMINAL

<b>Sub grupo</b>	<b>Animal n°</b>	<b>Diarréia no 1º PO</b>	<b>Diarréia no 2º PO</b>	<b>Diarréia no 3º PO</b>	<b>Distensão abdominal no 1º PO</b>	<b>Distensão abdominal no 2º PO</b>	<b>Distensão abdominal no 3º PO</b>	
<b>SM3</b>	1	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	
	2	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	
	3	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	
	4	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	
	5	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	
	6	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	
	7	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	
	11	ausente	leve	leve	ausente	ausente	ausente	
	12	ausente	leve	leve	ausente	ausente	ausente	
	13	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	
	<b>SB3</b>	1	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente
		2	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente
		3	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente
4		ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	
5		ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	
7		ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	
8		ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	
10		ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	
11		ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	
12		ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	
<b>SS3</b>		1	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente
		2	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente
	3	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	
	4	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	
	5	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	
	6	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	
	8	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	
	9	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	
	11	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	
	12	ausente	leve	leve	ausente	ausente	ausente	

APÊNDICE E - PARÂMETROS CLÍNICOS PÓS-OPERATÓRIOS DE APATIA DOS ANIMAIS AVALIADOS NO 7º DIA DE PÓS-OPERATÓRIO NA AUSÊNCIA DE SEPSE ABDOMINAL

Subgrupo	Animal n°	1º PO	2º PO	3º PO	4º PO	5º PO	6º PO	7º PO
NM7	1	ausente						
	2	ausente						
	3	ausente						
	4	ausente						
	7	ausente						
	8				Óbito			
	11	ausente						
	12	ausente						
	14	ausente						
	15	ausente						
NB7	1	ausente	leve	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente
	2	ausente						
	3	ausente						
	4	ausente						
	5	ausente						
	6	ausente						
	7	leve	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente
	11	ausente						
	12	ausente						
	13	ausente						
NS7	1	ausente						
	2	leve	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente
	3	ausente						
	4	ausente						
	5	ausente						
	6	ausente						
	7	ausente						
	11	ausente						
	12	ausente						
	13	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	leve	ausente



APÊNDICE G - PARÂMETROS CLÍNICOS PÓS-OPERATÓRIOS DE DIARRÉIA DOS ANIMAIS AVALIADOS NO 7º DIA DE PÓS-OPERATÓRIO NA AUSÊNCIA DE SEPSE ABDOMINAL

Subgrupo	Animal n°	1º PO	2º PO	3º PO	4º PO	5º PO	6º PO	7º PO	
NM7	1	ausente							
	2	ausente							
	3	ausente							
	4	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	leve	ausente	
	7	ausente							
	8				Óbito				
	11	ausente							
	12	ausente							
	14	ausente							
	15	ausente							
	NB7	1	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	leve
		2	ausente	ausente	ausente	leve	leve	ausente	ausente
		3	ausente						
4		ausente							
5		ausente							
6		ausente							
7		ausente							
11		ausente							
12		ausente							
13		ausente							
NS7		1	ausente						
		2	ausente	ausente	ausente	ausente	leve	leve	ausente
		3	ausente						
	4	ausente							
	5	ausente							
	6	ausente							
	7	ausente							
	11	ausente							
	12	ausente							
	13	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	leve	ausente	



APÊNDICE I - PARÂMETROS CLÍNICOS PÓS-OPERATÓRIOS DE APATIA DOS ANIMAIS AVALIADOS NO 7º DIA DE PÓS-OPERATÓRIO NA PRESENÇA DE SEPSE ABDOMINAL

<b>Sub grupo</b>	<b>Animal n°</b>	<b>1º PO</b>	<b>2º PO</b>	<b>3º PO</b>	<b>4º PO</b>	<b>5º PO</b>	<b>6º PO</b>	<b>7º PO</b>	
<b>SM7</b>	2	ausente							
	3	ausente							
	4	ausente							
	5	leve	moderada	leve	leve	leve	moderada	moderada	
	6	leve	leve	leve	leve	leve	moderada	moderada	
	8	ausente							
	9	ausente							
	11	ausente	ausente	leve	leve	ausente	marcante	leve	
	12	ausente	ausente	leve	leve	ausente	leve	leve	
	13	ausente	ausente	ausente	leve	leve	leve	leve	
	<b>SB7</b>	1	ausente	leve	leve	leve	ausente	ausente	ausente
		2	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente
		4	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente
5		ausente							
6		ausente							
7		ausente	leve	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	
11		ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	moderada	leve	
12		leve	moderada	moderada	moderada	leve	moderada	leve	
13					Óbito				
14		ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	leve	ausente	
<b>SS7</b>		2	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente
		4	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente
		5	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente
	6	ausente							
	7	ausente							
	8	ausente							
	9	ausente							
	10	ausente							
	11				Óbito				
	12	ausente	ausente	ausente	leve	ausente	ausente	ausente	

APÊNDICE J - PARÂMETROS CLÍNICOS PÓS-OPERATÓRIOS DE  
 ERIÇAMENTO DE PÊLOS DOS ANIMAIS AVALIADOS NO 7º DIA DE PÓS-  
 OPERATÓRIO NA PRESENÇA DE SEPSE ABDOMINAL

Subgrupo	Animal nº	1º PO	2º PO	3º PO	4º PO	5º PO	6º PO	7º PO	
SM7	2	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	
	3	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	
	4	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	
	5	ausente	ausente	ausente	leve	leve	moderada	moderada	
	6	ausente	ausente	ausente	leve	leve	moderada	moderada	
	8	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	
	9	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	
	11	ausente	ausente	leve	leve	ausente	marcante	moderada	
	12	ausente	ausente	ausente	leve	ausente	leve	moderada	
	13	ausente	ausente	leve	leve	leve	leve	moderada	
	SB7	1	ausente	leve	leve	leve	ausente	ausente	ausente
		2	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	leve	ausente
		4	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	leve	ausente
5		ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	
6		ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	
7		ausente	leve	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	
11		ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	moderada	leve	
12		ausente	moderada	moderada	moderada	leve	moderada	leve	
13					Óbito				
14		ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	
SS7	2	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	
	4	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	
	5	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	
	6	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	
	7	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	
	8	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	
	9	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	
	10	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	
	11				Óbito				
	12	ausente	ausente	ausente	leve	ausente	ausente	ausente	





APÊNDICE M - PESO PRÉ E PÓS-OPERATÓRIO DOS ANIMAIS AVALIADOS  
NO 3º DIA DE PÓS-OPERATÓRIO

Subgrupo	Animal nº	Peso antes da 1ª operação (g)	Peso antes da re- operação (g)	Subgrupo	Animal nº	Peso antes da 1ª operação (g)	Peso antes da re- operação (g)
NM3	1	424	437	SM3	1	446	425
	3	451	437		2	437	425
	4	392	431		3	419	388
	5	381	447		4	461	460
	6	395	455		5	442	407
	7	361	444		6	465	440
	8	438	488		7	485	447
	9	385	411		11	387	330
	10	388	476		12	381	327
	11	411	364		13	404	350
NB3	1	371	402	SB3	1	427	475
	3	399	456		2	375	464
	4	419	436		3	529	498
	5	417	426		4	359	433
	6	454	450		5	395	463
	7	452	438		7	437	491
	8	469	450		8	356	408
	9	464	517		10	350	288
	10	480	483		11	402	337
	11	433	377		12	403	353
NS3	1	466	448	SS3	1	487	473
	2	475	451		2	464	430
	3	478	445		3	469	451
	4	446	437		4	379	363
	5	456	417		5	454	447
	6	475	469		6	431	420
	7	475	465		8	468	447
	8	463	440		9	472	458
	9	400	370		11	404	347
	10	508	489		12	395	353

APÊNDICE N - PESO PRÉ E PÓS-OPERATÓRIO DOS ANIMAIS AVALIADOS NO 7º DIA DE PÓS-OPERATÓRIO

Subgrupo	Animal n°	Peso antes da 1ª operação (g)	Peso antes da re-operação (g)	Subgrupo	Animal n°	Peso antes da 1ª operação (g)	Peso antes da re-operação (g)		
NM7	1	526	534	SM7	2	522	474		
	2	491	511		3	489	440		
	3	512	515		4	560	539		
	4	485	439		5	521	485		
	7	472	437		6	553	506		
	8	Óbito	Óbito		8	536	524		
	11	454	425		9	463	445		
	12	462	430		11	465	346		
	14	458	387		12	443	350		
	15	433	385		13	430	344		
	NB7	1	508		447	SB7	1	536	471
		2	592		527		2	504	453
		3	420		511		4	492	426
		4	515		511		5	532	505
		5	552		515		6	494	412
6		524	472	7	575		529		
7		549	519	11	422		369		
11		444	383	12	440		350		
12		433	396	13	Óbito		Óbito		
13		427	362	14	440		385		
NS7		1	476	530	SS7		2	483	413
		2	524	536			4	526	507
		3	501	535			5	532	516
	4	530	559	6		505	465		
	5	509	521	7		519	478		
	6	566	494	8		473	480		
	7	485	503	9		553	450		
	11	423	404	10		563	559		
	12	471	383	11		Óbito	Óbito		
	13	436	331	12		417	357		

APÊNDICE O - TESTE DA FORÇA DE RUPTURA DAS ANASTOMOSES DOS ANIMAIS AVALIADOS NO 3º DIA DE PÓS-OPERATÓRIO

Subgrupo	Animal n°	Força de ruptura (N)	Subgrupo	Animal n°	Força de ruptura (N)
NM3	1	0,19	SM3	1	0,00
	3	0,21		2	0,09
	4	0,35		3	0,00
	5	0,56		4	0,01
	6	0,00		5	0,17
	7	0,03		6	0,19
	8	0,01		7	0,13
	9	0,00		11	0,07
	10	0,00		12	0,07
	11	0,05		13	0,07
	NB3	1		0,07	SB3
3		0,09	2	0,00	
4		0,07	3	0,00	
5		0,09	4	0,00	
6		0,00	5	0,00	
7		0,00	7	0,00	
8		0,00	8	0,00	
9		0,07	10	0,00	
10		0,11	11	0,00	
11		0,01	12	0,00	
NS3		1	0,37	SS3	
	2	0,80	2		0,00
	3	0,21	3		0,09
	4	0,35	4		0,00
	5	0,27	5		0,07
	6	0,01	6		0,03
	7	0,21	8		0,09
	8	0,00	9		0,09
	9	0,13	11		0,00
	10	0,00	12		0,19

APÊNDICE P - TESTE DA FORÇA DE RUPTURA DAS ANASTOMOSES DOS ANIMAIS AVALIADOS NO 7º DIA DE PÓS-OPERATÓRIO

Subgrupo	Animal	Força de ruptura (N)	Subgrupo	Animal	Força de ruptura (N)		
NM7	1	0,03	SM7	2	0,21		
	2	0,13		3	0,19		
	3	0,00		4	0,21		
	4	0,23		5	0,33		
	7	0,17		6	0,43		
	8	Óbito		8	0,21		
	11	0,21		9	2,78		
	12	0,52		11	2,94		
	14	1,74		12	1,21		
	15	1,11		13	0,23		
	NB7	1		0,25	SB7	1	0,21
		2		0,11		2	0,27
		3		0,23		4	0,43
		4		0,17		5	0,21
		5		0,21		6	0,23
6		0,33	7	0,33			
7		0,09	11	0,49			
11		1,00	12	0,13			
12		0,70	13	Óbito			
13		0,33	14	0,21			
NS7		1	0,19	SS7		2	0,00
		2	0,09			4	0,23
		3	0,07			5	0,25
	4	0,13	6		0,23		
	5	0,17	7		0,41		
	6	0,21	8		0,27		
	7	0,17	9		0,29		
	11	0,23	10		0,21		
	12	0,39	11		Óbito		
	13	0,76	12		1,33		

APÊNDICE Q - DOSAGEM DA CONCENTRAÇÃO DE HIDROXIPROLINA DAS ANASTOMOSES DOS ANIMAIS AVALIADOS NO 3º DIA DE PÓS-OPERATÓRIO

	Animal	HP na cirurgia	HP na eutanásia		Animal	HP na cirurgia	HP na eutanásia
<b>NM3</b>	1	0,40	0,10	<b>SM3</b>	1	0,80	0,07
	3	0,60	0,06		2	0,70	0,10
	4	0,28	0,20		3	0,60	0,06
	5	0,60	0,20		4	0,40	0,09
	6	0,70	0,10		5	0,50	0,09
	7	0,40	0,10		6	0,60	0,08
	8	0,50	0,20		7	0,50	0,20
	9	0,60	0,10		11	0,60	0,04
	10	0,70	0,20		12	1,50	0,10
	11	1,26	0,10		13	1,20	0,20
	<b>NB3</b>	1	0,70		0,06	<b>SB3</b>	1
3		0,50	0,20	2	0,60		0,30
4		0,30	0,30	3	0,70		0,20
5		0,60	0,07	4	1,00		0,20
6		0,70	0,10	5	1,10		0,20
7		0,50	0,10	7	1,30		0,20
8		1,10	0,10	8	0,90		0,20
9		0,70	0,30	10	0,10		0,20
10		0,40	0,10	11	1,00		0,20
11		0,10	0,10	12	1,60		0,04
<b>NS3</b>		1	0,50	0,20	<b>SS3</b>		1
	2	0,50	0,20	2		0,10	0,20
	3	0,60	0,20	3		0,10	0,07
	4	1,10	0,20	4		0,06	0,10
	5	0,70	0,20	5		0,10	0,06
	6	0,20	0,20	6		0,40	0,08
	7	0,60	0,20	8		0,60	0,05
	8	0,90	0,20	9		0,30	0,06
	9	1,10	0,20	11		0,40	0,09
	10	0,20	0,20	12		2,00	0,20

APÊNDICE R - DOSAGEM DA CONCENTRAÇÃO DE HIDROXIPROLINA DAS ANASTOMOSES DOS ANIMAIS AVALIADOS NO 7º DIA DE PÓS-OPERATÓRIO

	Animal	HP na cirurgia	HP na eutanásia		Animal	HP na cirurgia	HP na eutanásia		
NM7	1	0,30	0,20	SM7	2	0,90	0,30		
	2	0,60	0,20		3	0,50	0,20		
	3	0,50	0,20		4	0,80	0,50		
	4	0,50	0,40		5	0,50	0,20		
	7	0,20	0,30		6	0,70	0,20		
	8	Óbito			8	0,07	0,70		
	11				0,40	0,30	9	0,60	0,30
	12	0,30	0,30		11	0,80	0,20		
	14	0,40	0,30		12	0,90	0,20		
	15	0,30	0,40		13	0,90	0,20		
	NB7	1	0,80		0,30	SB7	1	0,60	0,30
		2	0,60		0,30		2	0,70	0,20
		3	0,70		0,30		4	0,80	0,30
4		0,60	0,40	5	0,20		0,20		
5		0,70	0,20	6	0,80		0,30		
6		0,50	0,40	7	0,70		0,30		
7		0,60	0,30	11	0,70		0,40		
11		0,50	0,50	12	0,90		0,30		
12		0,90	0,30	13	Óbito				
13		0,90	0,70	14				0,80	0,30
NS7		1	0,80	0,30	SS7		2	1,00	0,40
		2	0,80	0,30			4	0,50	0,30
		3	1,00	0,30			5	1,20	0,40
	4	0,60	0,30	6		0,40	1,20		
	5	0,50	0,30	7		0,30	0,40		
	6	0,80	1,00	8		1,20	0,40		
	7	0,80	0,30	9		0,90	0,60		
	11	0,70	0,60	10		1,40	0,40		
	12	1,10	0,20	11		Óbito			
	13	0,90	0,30	12				0,80	0,30

APÊNDICE S - ACHADOS HISTOPATOLÓGICOS DAS ANASTOMOSES  
 AVALIADOS NO 3º DIA DE PÓS-OPERATÓRIO NA AUSÊNCIA DE SEPSE  
 ABDOMINAL

Sub Grupo	Animal	Fibro- blastos	Mono- Nuclea res	Polimorfo nucleares	Neo vasos	Edema	Úl- cera	Ne- crose	Abs- cesso	Colô- nias	C E	Cros ta
NM3	1	++	++	+++	++	++	P	P	P	A	A	P
	3	++	++	+++	++	++	P	A	P	P	A	P
	4	++	++	++	++	++	P	P	P	A	A	P
	5	++	++	+++	++	++	P	P	P	A	A	P
	6	++	++	+++	++	++	P	P	P	P	A	P
	7	++	++	+++	++	++	P	P	P	A	A	P
	8	++	++	+++	++	++	P	P	P	P	A	P
	9	++	++	+++	++	++	P	P	P	A	A	P
	10	+	+	+++	++	++	P	P	P	P	A	P
	11	+	++	+++	++	++	P	P	P	A	A	P
	NB3	1	++	++	+++	++	++	P	P	P	P	A
3		++	++	+++	++	++	P	P	P	P	A	P
4		++	++	+++	++	++	P	P	P	P	A	P
5		++	++	+++	++	++	P	P	P	A	A	P
6		++	++	+++	++	++	P	P	P	P	A	P
7		++	++	++	++	++	P	A	A	A	A	A
8		++	++	+++	++	++	P	P	P	A	A	P
9		+	+	+++	+	++	P	P	P	P	A	P
10		++	++	+++	++	++	P	P	P	P	A	P
11		++	++	+++	++	++	P	P	P	A	A	P
NS3		1	++	++	++	++	++	P	P	P	P	A
	2	++	++	+++	++	++	P	P	P	P	A	P
	3	++	++	+++	++	++	P	P	P	A	A	P
	4	++	++	+++	++	++	P	P	P	P	A	P
	5	++	++	+++	++	++	P	P	P	P	A	P
	6	++	++	+++	++	++	P	P	P	A	A	P
	7	++	++	+++	++	++	P	P	P	P	A	P
	8	++	++	+++	++	++	P	P	P	P	A	P
	9	+	++	+++	++	++	P	P	P	A	A	P
	10	++	++	+++	++	++	P	P	P	P	A	P

APÊNDICE T - ACHADOS HISTOPATOLÓGICOS DAS ANASTOMOSES  
 AVALIADOS NO 3º DIA DE PÓS-OPERATÓRIO NA PRESENÇA DE SEPSE  
 ABDOMINAL

Sub grupo	Animal	Fibro- blastos	Mono- nucleare s	Polimorfo -nucleares	Neo vasos	Edema	Úlce- ra	Necr o-se	Abs- cesso	Colô- nias	C E	Cros- ta	
<b>SM3</b>	1	++	++	+++	++	++	P	P	P	A	A	P	
	2	++	++	+++	++	++	P	P	P	P	A	P	
	3	++	++	+++	++	++	P	P	P	A	A	P	
	4	++	++	+++	++	++	P	P	P	P	A	P	
	5	++	++	+++	++	++	P	P	P	A	A	P	
	6	++	++	++	++	++	P	P	P	A	A	A	
	7	++	++	+++	++	++	P	P	P	A	A	P	
	11	++	++	+++	++	++	P	P	P	A	A	P	
	12	++	++	+++	++	++	P	P	P	A	A	P	
	13	++	++	+++	++	++	P	P	P	P	A	P	
	<b>SB3</b>	1	++	++	++	++	++	P	A	A	A	A	P
		2	++	++	+++	++	++	P	P	P	A	A	P
3		++	++	+++	++	++	P	P	P	A	A	P	
4		++	++	+++	++	++	P	P	P	A	A	P	
5		++	++	+++	++	++	P	P	P	A	A	P	
7		++	++	+++	++	++	P	P	P	A	A	P	
8		++	++	+++	++	++	P	P	P	A	A	P	
10		++	++	+++	++	++	P	P	P	A	A	P	
11		+	++	+++	+	++	P	P	P	A	A	P	
12		++	++	+++	++	++	P	P	P	P	A	P	
<b>SS3</b>		1	++	++	+++	++	++	P	P	P	P	A	P
		2	++	++	+++	++	++	P	P	P	P	A	P
	3	++	++	+++	++	++	P	P	P	P	A	P	
	4	++	++	+++	++	++	P	P	P	P	A	P	
	5	++	++	+++	++	++	P	P	P	P	A	P	
	6	++	++	+++	++	++	P	A	P	A	A	P	
	8	++	++	+++	++	++	P	P	P	P	A	P	
	9	++	++	+++	++	++	P	A	P	A	A	P	
	10	++	++	+++	++	++	P	P	P	P	A	P	
	11	+	+	+++	+	++	P	P	P	A	A	P	

APÊNDICE U - ACHADOS HISTOPATOLÓGICOS DAS ANASTOMOSES  
 AVALIADOS NO 7º DIA DE PÓS-OPERATÓRIO NA AUSÊNCIA DE SEPSE  
 ABDOMINAL

Sub grupo	Animal	Colágeno	Fibroblastos	Mono-nucleares	Polimorfo-nucleares	Neo vasos	Ede -ma	Úlce ra	Necrose	Abs cesso	Colô nias	Cros ta	E ta	
NM7	1	+	+++	++	+++	++	++	P	A	P	P	P	P	
	2	+	+++	++	+++	++	++	P	A	A	P	P	P	
	3	+	+++	++	+++	++	++	P	A	A	P	P	P	
	4	+	+++	++	+++	++	++	P	A	A	P	P	P	
	7	+	+++	++	+++	++	++	P	A	A	A	A	P	
	8							<b>OBITO</b>						
	11	+	+++	++	+++	++	++	P	A	A	A	P	P	
	12	+	+++	++	+++	++	++	P	A	A	A	A	P	
	14	+	+++	++	+++	++	++	P	A	A	A	A	A	
	15	+	+++	++	+++	++	++	P	A	A	P	P	P	
	NB7	1	+	+++	++	+++	++	++	P	P	P	P	A	P
		2	+	+++	++	+++	++	++	P	A	A	P	P	P
		3	+	+++	++	+++	++	++	P	A	P	P	P	P
		4	+	+++	++	+++	++	++	P	A	A	A	P	P
		5	+	+++	++	+++	++	++	P	A	P	P	P	P
6		+	+++	++	+++	++	++	P	A	A	P	A	P	
7		+	+++	++	+++	++	++	P	A	P	P	A	P	
11		+	+++	++	+++	++	++	P	P	P	P	A	P	
12		+	+++	++	+++	++	++	P	P	P	A	A	P	
13		+	+++	++	+++	++	++	P	P	P	P	A	P	
NS7		1	+	+++	++	+++	++	++	P	A	A	P	P	P
		2	+	+++	++	+++	++	++	P	P	P	P	P	P
		3	+	+++	++	+++	++	++	P	A	P	P	P	P
	4	+	+++	++	+++	++	++	P	A	A	P	P	P	
	5	+	+++	++	+++	++	++	P	A	A	A	P	P	
	6	+	+++	++	+++	++	++	P	A	A	P	P	P	
	7	+	+++	++	+++	++	++	P	A	A	P	P	P	
	11	+	+++	++	+++	++	++	P	A	A	P	A	P	
	12	+	+++	++	+++	++	++	P	A	A	P	P	P	
	13	+	+++	++	+++	++	++	P	A	A	P	A	P	

APÊNDICE V - ACHADOS HISTOPATOLÓGICOS DAS ANASTOMOSES DOS ANIMAIS AVALIADOS NO 7º DIA DE PÓS-OPERATÓRIO NA PRESENÇA DE SEPSE ABDOMINAL

Sub grupo	Animal	Colágeno	Fibroblastos	Mono nucleares	Polimorfo nucleares	Neovasos	Edema	Úlcera	Neocrose	Abscesso	Colônias	C E	Cros ta	
SM7	2	+	+++	++	+++	++	++	P	A	P	A	P	P	
	3	+	+++	++	+++	++	++	P	A	A	A	A	P	
	4	+	+++	++	+++	++	++	P	A	A	P	A	A	
	5	+	+++	++	+++	++	++	P	A	A	A	A	P	
	6	+	+++	++	+++	++	++	P	A	P	P	P	P	
	8	+	+++	++	+++	++	++	P	A	P	P	P	P	
	9	+	+++	++	+++	++	++	P	A	P	P	P	P	
	11	+	+++	++	+++	++	++	P	P	P	P	P	P	
	12	+	+++	++	+++	++	++	P	A	A	P	A	P	
	13	+	+++	++	+++	++	++	P	A	A	P	P	P	
	SB7	1	+	+++	++	+++	++	++	P	A	P	A	P	P
		2	+	+++	++	+++	++	++	P	A	P	P	P	P
		4	+	+++	++	+++	++	++	P	A	P	P	P	P
5		+	+++	++	+++	++	++	P	A	P	P	P	P	
6		+	+++	++	+++	++	++	P	A	A	A	P	P	
7		+	+++	++	+++	++	++	P	A	P	P	P	P	
11		+	+++	++	+++	++	++	P	A	P	A	A	P	
12		+	+++	++	+++	++	++	P	A	P	A	P	P	
13								<b>OBITO</b>						
14		+	+++	++	+++	++	++	P	A	P	A	A	P	
SS7		2	+	+++	++	+++	++	++	P	A	A	P	A	P
		4	+	+++	++	+++	++	++	P	A	A	A	A	P
		5	+	+++	++	+++	++	++	P	A	A	P	A	P
	6	+	+++	++	+++	++	++	P	P	P	P	A	P	
	7	+	+++	++	+++	++	++	P	A	P	P	P	P	
	8	+	+++	++	+++	++	++	P	A	A	A	P	P	
	9	+	+++	++	+++	++	++	P	A	A	P	A	P	
	10	+	+++	++	+++	++	++	P	A	A	P	P	P	
	11							<b>OBITO</b>						
	12	+	+++	++	+++	++	++	P	A	A	P	A	P	

## ANEXO 1



**Universidade de Brasília**  
Instituto de Ciências Biológicas  
Comitê de Ética no Uso Animal

Brasília, 09 de outubro de 2009.

**DECLARAÇÃO**

Declaramos que o projeto intitulado "**EVOLUÇÃO DA CICATRIZAÇÃO DE ANASTOMOSES CÓLICAS E DE PAREDE ABDOMINAL SOB A AÇÃO DE DROGAS PROCINÉTICAS - ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS.**", UnBDOC nº 67336/2009, sob responsabilidade do Prof. Dr. João Batista de Sousa, foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'A. Sebben', written over a horizontal line.

Prof. Antonio Sebben  
Coordenador do CEUA

## ANEXO 2

**DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSES**

Os autores afirmam que não houve conflito de interesses (financeiros ou de outra natureza) na realização da pesquisa ou redação desta tese. O estudo não recebeu apoio financeiro de nenhum laboratório ou empresa farmacêutica.