

THIAGO DE SÁ OLIVEIRA

**INFLUÊNCIA DA ADMINISTRAÇÃO PRECOCE DE INFLIXIMAB NA
CICATRIZAÇÃO DE ANASTOMOSE NO CÓLON ESQUERDO DE RATOS
COM OU SEM COLITE INDUZIDA**

Dissertação 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 Mestre.

Área de concentração: Medicina

Orientador: Prof. Dr. João Batista de Sousa

**BRASÍLIA – DF
2017**

THIAGO DE SÁ OLIVEIRA

**INFLUÊNCIA DA ADMINISTRAÇÃO PRECOCE DE INFLIXIMAB NA
CICATRIZAÇÃO DE ANASTOMOSE NO CÓLON ESQUERDO DE RATOS
COM OU SEM COLITE INDUZIDA**

Dissertação 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 Mestre

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. João Batista de Sousa

Prof. Dr. Paulo Gonçalves de Oliveira

Prof. Dr. Hélio Moreira Júnior

Suplente:

Profa. Dra. Ivone Kamada

Aos meus filhos João Pedro e Maria Luiza, pelo amor, carinho e dedicação.
À minha esposa Melina, pelo apoio incondicional durante esta empreitada.
Aos meus pais e irmãos por serem terra firme.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. João Batista de Sousa, que incentivou e apoiou meu interesse pelo mestrado, e, ao abrir as portas do meu retorno à vida acadêmica, reacendeu a chama pelo espírito científico e a busca de respostas a inquietações da alma.

Aos acadêmicos de medicina Pedro Henrique Farias Figueroa e José Moreira Kffuri Filho pelo apoio e ajuda durante a fase experimental da pesquisa

Aos veterinários e funcionários do laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, em especial ao veterinário Rafael Rocha de Andrade pelo suporte e apoio indispensáveis para a consecução dos experimentos.

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

À Profa. Dra. Fabiana Pirani Carneiro, pela avaliação histopatológica das lâminas apresentadas nesta dissertação.

Ao amigo Pedro Gonçalves Cerqueira por dedicar horas de apoio a correções e auxílio na formatação deste trabalho

À colega de especialidade e de trabalho Dra. Silvana Marques e Silva pelo incentivo, por compartilhar experiências já vividas na empreitada acadêmica e pela gentil cessão de algumas fotos para compor este trabalho.

Ao amigo Alex Pena Tosta pelo auxílio inestimável na análise estatística.

À equipe do Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, pela cordialidade e presteza em todas as etapas para a realização deste trabalho.

“ Para aprender é preciso passar por situações emocionantes. Para isso é preciso tirar as pessoas de suas rotinas físicas e mentais. Não aprendemos nada dentro de nossas "zonas de conforto", sentados todos os dias, no mesmo lugar, na mesma mesa, fazendo a mesma coisa, onde tudo é previsível. Na "zona de aprendizado" há uma dose de desconforto e as emoções são intensificadas."

Ernest Shacklet

RESUMO

Objetivo: Avaliar a influência da utilização precoce do INFLIXIMAB sobre a cicatrização de anastomose no cólon esquerdo de ratos em um modelo experimental de colite, comparando a força de ruptura da anastomose e analisar a relação com a cicatrização da parede abdominal. **Método:** Trinta e dois ratos foram distribuídos em quatro grupos contendo 08 animais cada. Dois grupos (16 animais) foram submetidos a indução de colite por enema de ácido acético com dose de 3 ml por via retal, e dois grupos (16 animais) não sofreram indução de colite. Todos os ratos foram submetidos à laparotomia para exposição do cólon distal com secção do mesmo a cerca de 2,5 a 3,5 cm cranial à reflexão peritoneal e anastomose término-terminal do segmento. Tanto no grupo com colite induzida como no grupo sem colite, metade dos animais (8) receberam infliximab (IFX), 4 no 1 DPO e 4 no 3 DPO; e 8 receberam NaCl a 0,9%. No sétimo DPO foi realizada a pesagem dos animais e a re-laparotomia para colectomia, seguida de eutanásia. Foram avaliados a variação de peso, a força tensil de ruptura da anastomose e da parede abdominal, além de achados histopatológicos nas lâminas de anastomoses. **Resultados:** Nos animais com colite houve maior perda de peso em relação aos sem colite, mais acentuada nos que receberam IFX no 1º DPO ($p=0,007$). O IFX piorou a força tensil de ruptura da anastomose nos animais com colite quando administrado no 1º DPO ($p=0,001$), porém quando administrado no 3º DPO ou com placebo, o IFX melhorou a força de ruptura anastomótica nos animais com colite, sendo esta, maior do que os animais sem colite ($p=0,001$). **Conclusão:** O IFX prejudicou a cicatrização das anastomoses no cólon esquerdo de ratos com colite, quando administrado no 1º DPO. Quando administrado no 3º DPO ou com placebo houve uma inversão, com melhora nos valores de força de ruptura da anastomose em relação ao grupo sem colite.

Descritores: Anastomose intestinal. Cólon. Infliximab. Colite. Ratos.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the influence of the early use of INFLIXIMAB (IFX) on the anastomosis healing in the left colon of rats in an experimental model of acetic acid colitis induced, comparing the tensile strength of the anastomosis, and to analyze the relationship with the healing of the abdominal wall. **Method:** Thirty-two rats were divided into four groups containing 08 animals each. Two groups (16 rats) were carried out the induction of colitis by enema of acetic acid with dose of 3 ml, per rectally, with no induction of colitis in the other two groups (16 rats). All the rats were submitted to laparotomy for exposure of the distal colon and sectionated approximately 2.5 to 3.5 cm cranial from the peritoneal reflection and proceeded end-to-end anastomosis. In both groups, with and without colitis, half the animals (8) received infliximab administration, 4 rats in the 1th POD and 4 in the 3th POD, and the other half (8) received NaCl solution 0,9% administration. In the 7th POD the animals were weighed and re-laparotomy was performed for colectomy followed by euthanasia. Were evaluated the weight variation, anastomosis and abdominal wall scar rupture tensile strength and histopathological findings by H-E stain. **Results:** In the animals with colitis, there was greater weight loss in relation to the without colitis group, more pronounced in who received IFX in the 1st POD ($p=0.007$). The IFX has deteriorated the rupture tensile strength of the anastomosis in the animals with colitis when administered in the 1st POD ($p=0.001$), but when administered in the 3rd POD or placebo, IFX has improved the anastomotic rupture tensile strength in animals with colitis, this being, greater than the animals without colitis ($p=0.001$). **Conclusion:** The Infliximab impaired the healing of anastomoses in the left colon of rats with colitis when administered in the 1st POD. When administered in the 3rd POD or when placebo was given, there was a reversal, with the improvement in the values of the breaking strength of the anastomosis in relation to the group without colitis.

Keywords: Intestinal anastomosis. Colon. Infliximab. Colitis. Rats.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Alocação dos animais em grupos de acordo com o dia de eutanásia, indução de colite e droga administrada.	21
Figura 2- Fotografia dos animais no alojamento da Faculdade de medicina da Universidade de Brasília.	22
Figura 3 - Laparotomia mediana com extensão de 4 cm.	24
Figura 4 –A posição do afastador auto-estático e aexposição do cólon distal.	24
Figura 5 - Secção total do cólon a 3,0cm acima da reflexão peritoneal.	25
Figura 6 - Justaposição das extremidades da alça do cólon.	25
Figura 7 - Anastomose colo-colônica término-terminal	25
Figura 8 – Processo de reabertura da cavidade abdominal.	27
Figura 9 – A: Segmento anastomótico com estruturas aderidas, B: Segmento anastomótico com aderências liberadas.	28
Figura 10 - Divisão do segmento colônico em três porções com a anastomose.	29
Figura 11 - Aparelho de ensaio para determinação da força de ruptura da anastomose.	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Número de repetições em cada célula experimental.....	31
Tabela 2: Testes de efeitos entre sujeitos (Variável dependente: diferença de peso).....	32
Tabela 3: Médias marginais estimadas - Fator Colite * Fator Infliximab (Variável dependente: diferença de peso).....	33
Tabela 4: Comparações por Método Pairwise – Fator Colite (Variável dependente: diferença de peso).....	34
Tabela 5: Comparações por Método Pairwise – Fator Infliximab (Variável dependente: diferença de peso).....	35
Tabela 6: Teste de efeito entre sujeitos (Variável dependente: FT- Parede).....	38
Tabela 7: Fator Colite (Variável dependente: FT - Parede).....	38
Tabela 8: Fator Infliximab (Variável dependente: FT - Parede).....	39
Tabela 9: Teste de efeito entre sujeitos (Variável dependente: FT- Anastomose).....	42
Tabela 10: Estimativas (Variável dependente: FT- Anastomose).....	42
Tabela 11: Comparações por Método Pairwise - 1º e 3º DPO (Variável dependente: FT- Anastomose).....	43
Tabela 12: Comparações por Método Pairwise (Variável dependente: FT- Anastomose).....	44
Tabela 13: Força de ruptura (N) da anastomose.....	45
Tabela 14: Mediana da intensidade de achados histológicos.....	48

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1: Médias da variação de peso dos animais entre os grupos avaliando o fator colite e o fator IFX no início do experimento e no dia eutanásia. 33
- Gráfico 2: Mediana e valores intervalares da variação de peso dos animais entre os grupos considerando o fator colite e o fator IFX no início do experimento e no dia eutanásia..... 33
- Gráfico 3: Mediana e valores intervalares de peso dos animais entre os grupos considerando o fator colite no início do experimento e no dia eutanásia. 37
- Gráfico 4: Mediana e valores intervalares da variação de peso dos animais entre os grupos considerando o fator Infiximab no início do experimento e no dia eutanásia. .. 37
- Gráfico 5: Mediana e valores intervalares da força tênsil de ruptura da cicatriz da parede abdominal expressa em Newtons (N) entre os grupos considerando o fator colite e o fator Infiximab no dia eutanásia. 40
- Gráfico 6: Mediana e valores intervalares da força tênsil de ruptura da cicatriz da parede abdominal expressa em Newtons (N) entre os grupos considerando o Fator colite no dia eutanásia..... 41
- Gráfico 8: Mediana e valores intervalares da força tênsil de ruptura da anastomose expressa em Newtons (N) entre os grupos considerando o fator colite e o fator Infiximab no dia eutanásia. 46
- Gráfico 9: Mediana e valores intervalares da força tênsil de ruptura da anastomose expressa em Newtons (N) entre os grupos considerando o fator colite..... 46
- Gráfico 10: Mediana e valores intervalares da força tênsil de ruptura da anastomose expressa em Newtons (N) entre os grupos considerando o Fator Infiximab no dia eutanásia..... 47
- Gráfico 11: Médias da Força tênsil de ruptura da anastomose expressa em Newtons (N) entre os grupos considerando o fator colite e o fator Infiximab no dia eutanásia. 47

LISTA DE ABREVIATURAS

A – Ausente.

ABNT - Associação Brasileira de Normas e Técnicas.

CE - Corpo estranho.

CEUA - Comitê de Ética no Uso Animal.

cDNA - Ácido desoxirribonucleico complementar.

cIFX1- Grupo com colite que recebeu Infliximab no 1º DPO.

cIFX3- Grupo com colite que recebeu Infliximab no 3º DPO.

cSAL - Grupo com colite que recebeu Salina.

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.

H2O2 - Água oxigenada.

HE - Hematoxilina-eosina.

HP – Hidroxiprolina.

IFX - Infliximab

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.

P – Presente.

scIFX1- Grupo sem colite que recebeu Infliximab no 1º DPO.

scIFX3- Grupo sem colite que recebeu Infliximab no 3º DPO.

scSAL- Grupo sem colite que recebeu Salina.

TGI - Trato gastrointestinal.

TNF-alfa - Fator de necrose tumoral alfa.

TNF-beta – Fator de necrose tumoral beta.

UnB – Universidade de Brasília

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVO	19
3 MATERIAL E MÉTODO	19
3.1 ANIMAL DE EXPERIMENTAÇÃO.....	20
3.2 ALOCAÇÃO DOS ANIMAIS EM GRUPOS	20
3.3 PRÉ-OPERATÓRIO	21
3.4 INDUÇÃO DA COLITE	22
3.4 ANESTESIA E TÉCNICA OPERATÓRIA.....	23
3.5 ADMINISTRAÇÃO DO INFLIXIMAB E DA SALINA.....	26
3.6 PÓS-OPERATÓRIO	26
3.7 REOPERAÇÃO E ANÁLISE OPERATÓRIA.....	27
3.8 ESTUDO DA FORÇA DE RUPTURA DA PAREDE ABDOMINAL E DA ANASTOMOSE COLÔNICA	29
3.9 ESTUDO HISTOPATOLÓGICO	30
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
4. RESULTADOS	32
4.1 MORTES	32
4.2 VARIÁVEL RESPOSTA: DIFERENÇA DE PESO (DIFERENÇA ENTRE O PESO FINAL E O PESO INICIAL DOS ANIMAIS)	32
4.3 VARIÁVEL RESPOSTA: ANÁLISE DA FORÇA TÊNซิล DE RUPTURA NA PAREDE ABDOMINAL.....	38
4.4 VARIÁVEL RESPOSTA: ANÁLISE DA FORÇA TÊNซิล DE RUPTURA DA ANASTOMOSE	42
4.5 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA	48
4.6 AVALIAÇÃO CLÍNICA DOS ANIMAIS COM E SEM COLITE TRATADOS COM INFLIXIMAB OU PLACEBO	48
5 DISCUSSÃO	49
6. CONCLUSÃO	54

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 55

1 INTRODUÇÃO

O processo de cicatrização propriamente dito, começa com a hemostasia (SOUSA; OLIVEIRA, 1999; TOGNINI et al., 2000). Segue-se a resposta inflamatória, durante a qual os macrófagos e os polimorfonucleares migram da circulação para o sítio da ferida em resposta ao aumento dos níveis de citocinas. Posteriormente, ocorre a proliferação de fibroblastos, a síntese do colágeno, o remodelamento do tecido conjuntivo e a aquisição da resistência da ferida (GOLDMAN, 2004).

Desde 1997 alguns autores já descreviam os principais eventos biológicos da cicatrização, que podem ser divididos em três fases bastante distintas, mas também muito complexas e que se sobrepõe uma à outra. São a inflamação, a fibroblástica ou proliferativa, e remodelagem do colágeno (STEED, 1997; CLARK et al., 2000; HÖER et al., 2002).

O termo inflamação pode ser definido como uma reação da microcirculação, induzida por algum tipo de lesão aos tecidos, com a conseqüente movimentação de vários elementos intravasculares, como fluidos, células e moléculas para o espaço extra vascular. A agressão tecidual estimula a liberação de substâncias químicas no local afetado, denominadas de mediadores químicos da inflamação que podem ter origem plasmática ou tecidual (SIQUEIRA JR & DANTAS, 2000).

Logo após a resposta inflamatória normal que é caracterizada pelo aumento da permeabilidade capilar, aumento dos neutrófilos periféricos, migração de monócitos, transformação em macrófagos, fagocitose (LEIBOVICH & ROSS, 1976), ocorre a liberação local de citocinas, como as interleucinas 1 e 6 (Il-1 e Il-6), o fator de necrose tumoral-alfa (TNF-alfa) e fatores de crescimento alfa-plaquetários, como o fator de crescimento transformante-beta (TGF-beta), de enzimas, de mediadores químicos, como a serotonina e síntese do colágeno (SIQUEIRA JR & DANTAS, 2000).

O TGF-beta é uma proteína que atua na cicatrização estimulando a angiogênese e está relacionada ao desenvolvimento de fibrose na cicatriz. (SIQUEIRA JR & DANTAS, 2000).

Em seguida, já na fase proliferativa, as células endoteliais e os fibroblastos representam um papel importante, migrando dos tecidos circunjacentes e de vênulas intactas próximas à anastomose. Os fibroblastos então, desenvolvem uma grande capacidade de formar colágeno. Este tecido conjuntivo frouxo é rico em capilares,

leucócitos e em matriz extracelular formada por fibras finas de colágeno (tipo III) e proteínas estruturais não fibrosas como o ácido hialurônico, as glicosaminoglicanas e as proteoglicanas (REGAN et al., 1993; SIQUEIRA JR & DANTAS, 2000; REYS, 2004).

Durante a fase proliferativa, o colágeno da ferida é submetido tanto a colagenólise quanto a síntese, com predominância da última na cicatrização normal (JIBORN et al., 1980).

Normalmente o colágeno do tipo I é predominante em relação ao colágeno do tipo III e a matriz de colágeno vai sendo remodelada, por meio de aumento e estabilização de suas ligações transversais, tornando-se desta forma, mais resistente. Qualquer alteração que venha a ocorrer em uma das fases, pode resultar em um retardo ou uma falha na cicatrização da anastomose (SIQUEIRA JR & DANTAS, 2000; REYS, 2004).

O colágeno se apresenta como uma glicoproteína composta por uma tripla hélice de cadeias polipeptídicas e é constituído basicamente pelos seguintes aminoácidos: glicina, alanina, lisina, prolina, hidroxilisina e hidroxiprolina. A enzima prolil-hidroxilase transforma a prolina em hidroxiprolina, que passa a ser um aminoácido exclusivo do colágeno, e é indispensável para a estabilidade da tripla hélice de proteína (PROCKOP & KIVIRIKKO, 1995). A concentração de hidroxiprolina no tecido cicatricial possibilita estimar o conteúdo de colágeno na área da anastomose.

Múltiplos fatores podem atuar sobre as diferentes fases da cicatrização de anastomoses do tubo digestivo, sendo de especial interesse aqueles que alteram o conteúdo de colágeno, por interferirem no equilíbrio entre a lise e a síntese desta proteína (OLIVEIRA, 1989), como a infecção, que aumenta a produção de colagenase e inibe a cicatrização (HAAN, et al., 1974; CLARK et al., 2000; CAHILL et al., 2004).

Por meio da ação de vários fatores sintetizados por macrófagos, plaquetas, células endoteliais e linfócitos T é que se desencadeia uma sequência organizada e complexa de eventos celulares e bioquímicos que resultam na reparação do tecido (CLARK, 1996; STEED, 1997).

As citocinas exercem a sua função sobre diferentes tipos celulares, propriedade esta denominada de pleiotropismo. Elas são as proteínas responsáveis pela modulação de diferentes tipos celulares e possuem várias funções, dentre elas: mediação da resposta imunológica adaptativa e da inflamação, regulação da ativação do crescimento e da diferenciação de linfócitos e de outras células. Elas podem ter vários efeitos diferentes sobre o mesmo tipo celular e alguns, inclusive, ocorrendo simultaneamente.

Esses efeitos dependem da interação de citocinas com receptores de superfície na célula alvo (SIQUEIRA JR & DANTAS, 2000).

O Fator de Necrose Tumoral – alfa (TNF-alfa) é uma citocina comumente presente na inflamação, podendo interferir na cicatrização tecidual. Foi assim denominada devido a sua atividade em provocar necrose tumoral *in vivo*, quando injetado em ratos portadores de tumores (MAURY, 1986; MOONEY et al., 1990; SALOMON et al., 1991; BAKER et al., 2006).

O TNF-alfa é expresso em várias células, mas principalmente em macrófagos como resposta imunológica a outras citocinas, a bactérias, vírus, parasitas e ao estímulo de outras citocinas. Acredita-se que o TNF-alfa desempenhe papel importante na atividade antitumoral, imunomodulação, caquexia, choque séptico, hematopoiese, replicação viral e inflamação (SIQUEIRA JR & DANTAS, 2000; ISHIMURA et al., 2002; DWINELL et al., 2003; BAKER et al., 2006; BIOMYX TECHNOLOGY, 2007).

O papel do TNF-alfa no processo cicatricial ainda não está totalmente esclarecido (BETTINGER et al., 1994; STREIT et al., 2006). Citocinas pró inflamatórias como o TNF-alfa, demonstram respostas sinérgicas ou antagônicas em relação à cicatrização (interferindo na fase inflamatória e na fase de deposição do colágeno), dependendo da sua concentração (BAKER et al., 2006).

A deiscência de anastomose é uma complicação potencial da cirurgia colorretal e tem incidência variável, podendo ocorrer em até 35% (trinta e cinco por cento) dos casos (FIELDING et al., 1980; HENDRIKS & MASTBOOM, 1990). Está associada ao aumento da morbimortalidade, da estada hospitalar e dos custos totais do tratamento (GOLUB et al., 1997; SARABEYOGLU et al., 2003; NURSAL et al., 2004). São fatores que afetam a cicatrização e a integridade intestinal: o suprimento sanguíneo, a tensão na linha de anastomose, a magnitude da inflamação, a presença de contaminação fecal, o estado nutricional do paciente e a 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). Após a introdução da terapia biológica no tratamento das doenças inflamatórias intestinais, relata-se que a ação anti-TNF destes medicamentos, pode influenciar o processo cicatricial, sendo que os dados de literatura são bastante controversos em relação as drogas que modulam esta citocina, alguns estudos apontando piora da cicatrização em anastomoses e outros relatam efeito benéfico da droga em feridas crônicas (TURSI et al., 2013; STREIT et al., 2006)

Modelos experimentais de colite têm sido largamente utilizados por vários autores para estudar a patogênese e tratamento das DII. A colite induzida por enema de ácido acético em animais de pequeno porte é um método simples, barato e reproduzível, apresentando similaridades com DII em humanos quanto a aspectos histológicos e metabólicos relacionados ao ácido araquidônico.

Frostberg e colaboradores (2014) em um estudo com o objetivo de determinar os efeitos da utilização de droga anti-TNF em dose única, 7 dias antes da avaliação da força tênsil da anastomose intestinal em coelhos, concluíram não haver diferença estatística, para aquela metodologia empregada em uma pequena amostra. Os animais foram sacrificados no quarto dia de pós-operatório.

O INFLIXIMAB tem demonstrado grande eficácia clínica na indução e manutenção da remissão sustentada, avaliada através da cicatrização de mucosa em portadores de doenças inflamatórias intestinais (DII), e seu uso tem sido largamente ampliado para os portadores destas moléstias.

O INFLIXIMAB é um anticorpo monoclonal quimérico, humano-murino, da classe IgG1, que se liga com alta afinidade a formas solúveis e transmembranais de TNF-alfa, mas não à linfotóxina (TNF-beta). O INFLIXIMAB inibe a atividade funcional do TNF-alfa em vários tipos de bioensaios *in vitro* (KNIGHT et al., 1993; SIEGEL et al, 1995). *In vivo*, o INFLIXIMAB forma rapidamente complexos estáveis com o TNF-alfa, um processo paralelo à perda da bioatividade do TNF-alfa (SIEGEL et al, 1995; SCALLON et al., 1995).

O INFLIXIMAB é eficaz na indução e manutenção da terapia da doença de Crohn fistulizante ativa e um dos compostos biológicos aprovados para seu tratamento, mas com limitações no tocante à imunogenicidade (desenvolvimento de anticorpos anti-infliximab) que pode ocorrer em alguns casos, devido a sua fração murina. Também há relatos de reações de hipersensibilidade imediata ou tardia e fenômenos auto-ímmunes, levando a perda de sua eficácia ou mesmo impossibilitando a continuidade do tratamento (SANDBORN, 2003; DANESE et al., 2006; SANDBORN, 2006).

Em humanos, o uso do INFLIXIMAB no tratamento da doença de Crohn, aumenta em quatro vezes o risco de infecções por micro-organismos oportunistas (ABREU, 2006) e tem uma taxa de mortalidade de 1% (um por cento), na maioria das vezes, devido a infecções (COLOMBEL, et al., 2004).

Desta forma, a utilização do INFLIXIMAB torna-se de grande interesse clínico para utilização nos pacientes portadores de doença inflamatória intestinal. Estes

pacientes estão sujeitos a tratamentos cirúrgicos com anastomoses de forma eletiva ou de urgência, podendo ou não estar fazendo uso do INFLIXIMAB.

Devido ao mecanismo de antagonismo da ação do TNF-alfa, e conseqüentemente, ao fato de interferir na cascata de inflamação, a hipótese da influência de seus efeitos antiinflamatórios no processo de cicatrização de anastomose, parece ganhar relevância, ainda mais na potencialidade de desfechos clínicos desfavoráveis para aqueles portadores desta enfermidade, submetidos a tratamento operatório.

São vários os parâmetros de avaliação da cicatrização de anastomoses intestinais que podem ser estabelecidos. 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 determinação de fatores prejudiciais à cicatrização, assume então, grande relevância clínica, uma vez que pode contribuir para a diminuição dos riscos de deiscências de anastomoses e, por consequência, da morbi-mortalidade associada a estas operações.

Observa-se, portanto, e a partir do descrito, a grande importância de se estudar a aplicação e os efeitos do anticorpo monoclonal INFLIXIMAB na cicatrização das anastomoses.

Assim delineamos o presente estudo, para testar a hipótese de que o uso de medicação anti-TNF, durante as etapas iniciais do processo cicatricial, influencia distintamente a cicatrização tecidual, quando comparadas a etapas um pouco mais tardias.

2 OBJETIVO

Estudar os possíveis efeitos da administração precoce do INFLIXIMAB sobre a cicatrização de anastomose no cólon esquerdo de ratos em um modelo experimental de colite e na ausência dela. Avaliação clínica e histopatológica.

2.1 OBJETIVO ESPECÍFICO:

Comparar os resultados da influência do infliximab na cicatrização da anastomose com a cicatrização da parede abdominal, testando a hipótese de que a inflamação local (colite) desempenhe ação biológica distinta dala do sítio onde ela não se faz presente.

2.1 OBJETIVO ESPECÍFICO

Comparar os resultados encontrados na avaliação da anastomose com aqueles encontrados no estudo da cicatriz da parede abdominal, afim de testar a hipótese de que a inflamação local possui efeitos distintos daqueles onde esta não ocorre.

3 MATERIAL E MÉTODO

O estudo foi executado e acompanhado nas instalações do Laboratório de Cirurgia Experimental da Área de Clínica Cirúrgica da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (UnB) e com a colaboração do Laboratório de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (UnB).

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 60540/2016 (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 e a formatação do trabalho, foram utilizadas as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 14724:2011).

3.1 ANIMAL DE EXPERIMENTAÇÃO

Foram utilizados 32 ratos, *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, machos e saudáveis, adquiridos do biotério da Universidade Federal de Campinas (UNICAMP), mantidos por três semanas, no período pré-operatório, em gaiolas no alojamento de animais do Laboratório de Cirurgia Experimental da Universidade de Brasília, sendo fornecida dieta padrão e água à vontade, em regime de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão e que pesaram em média 336,19g (+/- 9,04g) no dia da primeira operação.

3.2 ALOCAÇÃO DOS ANIMAIS EM GRUPOS

Os animais foram distribuídos por locação casual probabilística, imediatamente antes do procedimento operatório, sem que o operador soubesse a qual grupo pertencia cada animal. Separados em blocos, em dois grupos de 16 animais cada, para indução ou não de colite (C= colite 16 animais / SC = sem colite 16 animais). Posteriormente, foi realizada nova randomização, separando os grupos que receberam INFLIXIMAB (IFX = receberam INFLIXIMAB) e salina (SAL= receberam Solução salina 0,9%), Para os grupos que receberam INFLIXIMAB, houve nova divisão em 2 subgrupos de acordo com o momento pós operatório, sejam eles 1º ou 3º dia pós-operatório). Todos os animais foram mortos no 7º dia de pós-operatório, conforme esquema a seguir, após re-laparotomia.

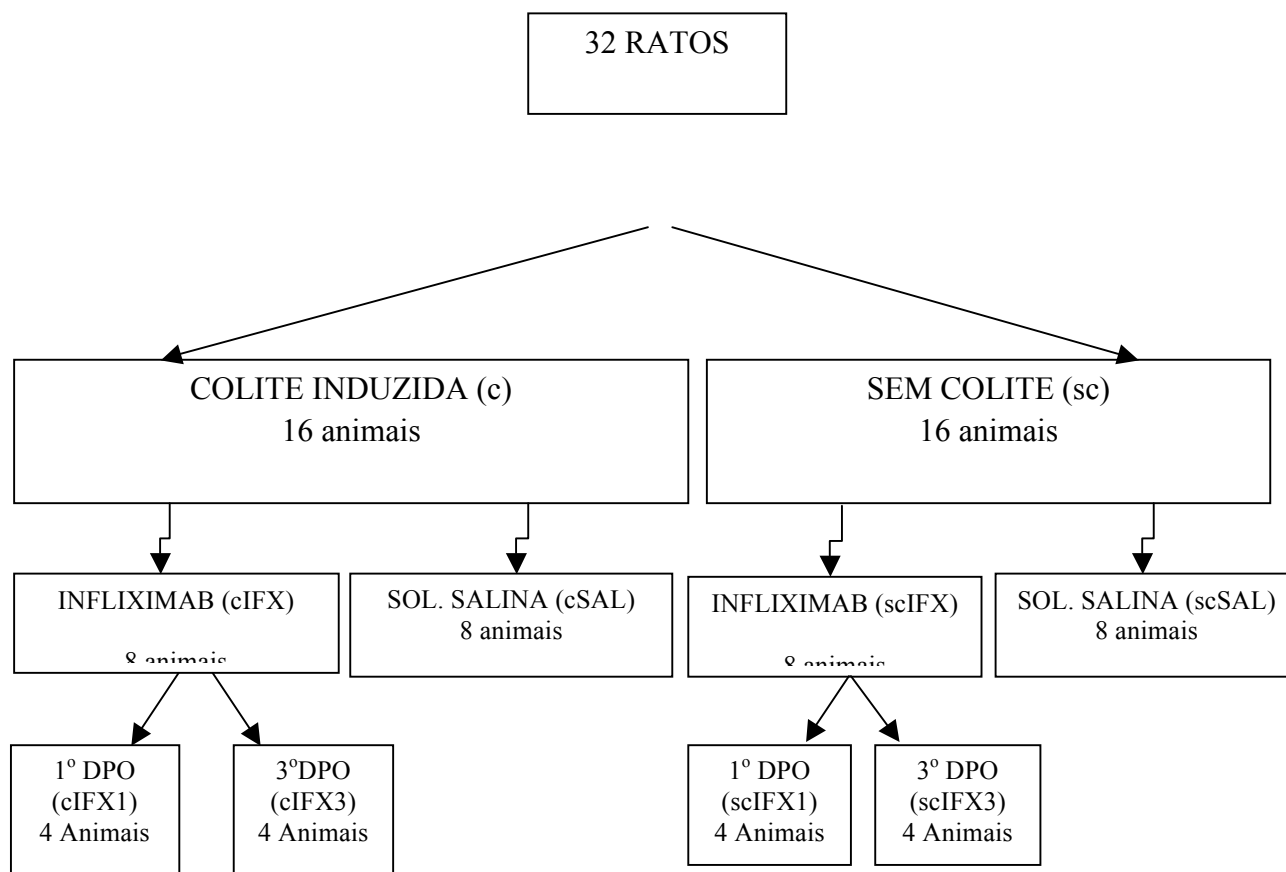


Figura 1 - Alocação dos animais em grupos de acordo com indução de colite ou não, droga administrada e momento da administração.

3.3 PRÉ-OPERATÓRIO

No tempo correspondente ao período pré-operatório, os animais foram mantidos por três semanas confinados em gaiolas com oito 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. Os animais foram pesados em balança eletrônica imediatamente antes do início de cada procedimento operatório. No 3º dia anterior ao procedimento operatório, os animais dos grupos com colite induzida (cIFX e cSAL) foram submetidos ao enema de ácido acético conforme protocolo abaixo.

3.4 INDUÇÃO DA COLITE

A indução da colite foi realizada pela técnica publicada por Yamada et al. (1992) e Tannahill et al. (1995). Cada animal sem anestesia era contido, e um cateter de 8mm introduzido pelo ânus até 6,0cm da margem anal e submetidos à administração intracolônica, por enema, de uma solução de ácido acético a 7% e com volume de 3 ml e segurados de ponta-cabeça por 15 segundos. Não houve jejum ou preparo anteriores à indução da colite, retornando os animais para suas respectivas gaiolas após o procedimento.



Figura 2- Fotografia dos animais no alojamento da Faculdade de medicina da Universidade de Brasília.

3.4 ANESTESIA E TÉCNICA OPERATÓRIA

Foi realizada a anestesia geral. Inicialmente o animal era colocado em uma câmara de indução onde havia um chumaço de algodão embebido em isoflurano. Após relaxamento e perda da consciência, eram anestesiados 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, eram administradas doses adicionais dos anestésicos, quando necessário.

Os 32 animais foram imobilizados sobre as placas de madeira com a fixação dos seus membros. Realizada tricotomia da parede abdominal anterior e anti-sepsia com iodopovidine.

A laparotomia mediana com 4 cm de extensão foi iniciada a 1 cm acima da genitália externa dos animais.

Foi procedida exposição do cólon distal, secção do mesmo a cerca de 2,5 a 3,5 cm cranialmente à reflexão peritoneal e anastomose término-terminal do segmento, em plano único transmural, com pontos contínuos de fio de polipropileno 6.0 com agulha cilíndrica.

A síntese da parede abdominal foi realizada em dois planos contínuos com fio de polipropileno 5-0.

A analgesia pós-operatória foi realizada com a administração de tramadol na dose de 1 mg/Kg via subcutânea no primeiro dia pós-operatório e dispensada solução analgésica com dipirona na concentração de 500mg/5ml de água colocadas em bebedouro.

Foi utilizado material e instrumental 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 extensão de 4 cm.

b) A posição do afastador auto-estático e a exposição do cólon distal (figura 4);

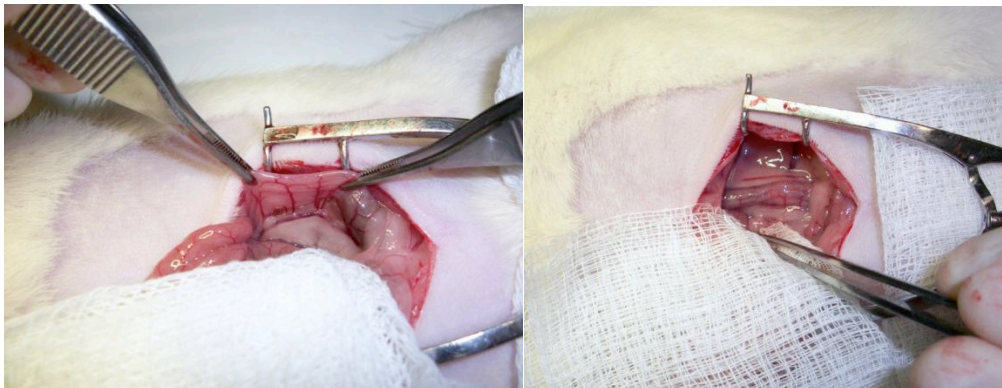


Figura 4 –A posição do afastador auto-estático e a exposição do cólon distal.

c) Malaxação divergente caso o segmento intestinal a ser operado apresentasse conteúdo fecal;

d) Secção do cólon esquerdo, aproximadamente 3,0 cm. acima da reflexão peritoneal, sem causar lesão dos ramos arteriais terminais (figura 5).

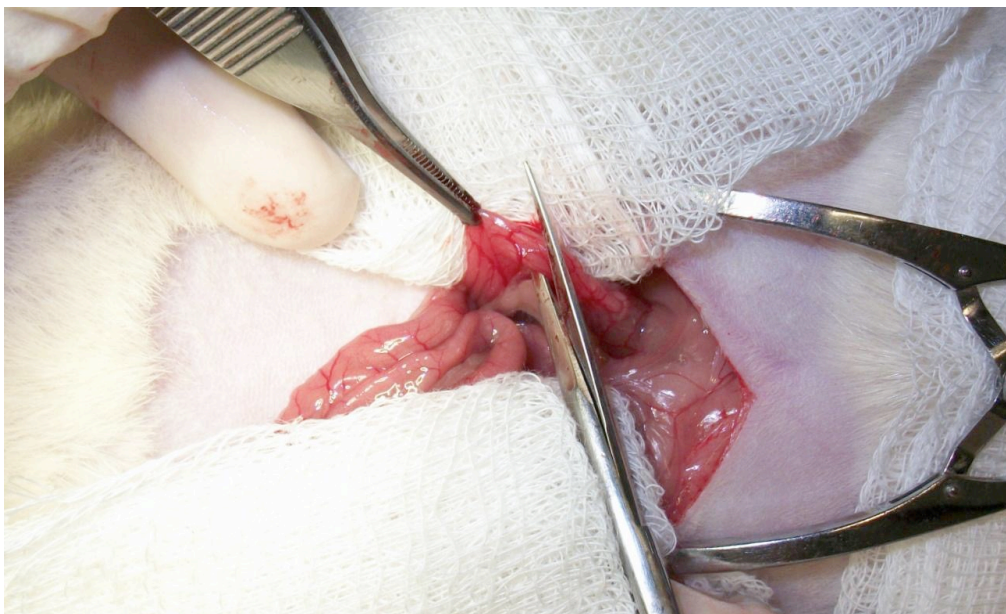


Figura 5 - Secção total do cólon a 3,0 cm acima da reflexão peritoneal.

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

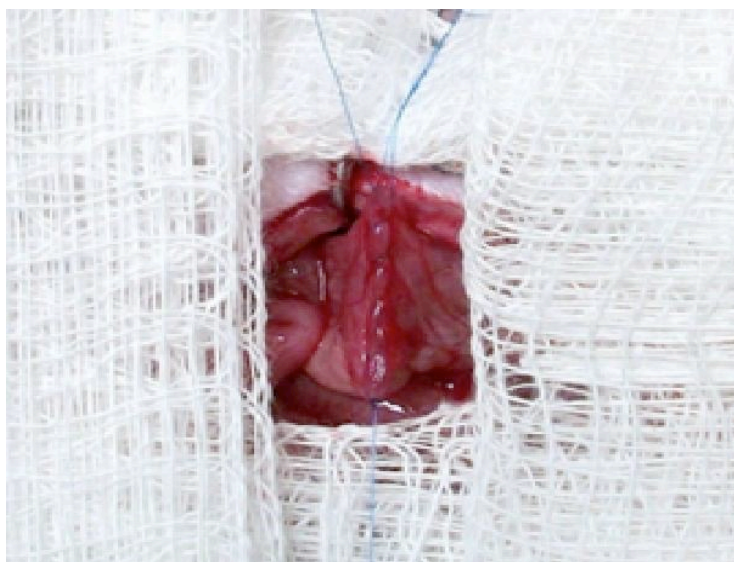


Figura 7 - Anastomose colo-colônica término-terminal

f) Síntese da parede abdominal com sutura em dois planos contínuos com fio de Polipropileno 5-0 (Ethicon®). O primeiro plano era constituído de peritônio, musculatura e aponeurose e o segundo, do tecido subcutâneo e pele.

3.5 ADMINISTRAÇÃO DO INFLIXIMAB E DA SALINA

O INFLIXIMAB foi administrado para os grupos correspondentes, na dose de 5 mg/Kg de peso, por via intraperitoneal, dose única, 24 horas após o procedimento operatório para os grupos cIFX1 e scIFX1, e 72 horas após a operação para os grupos medicação cIFX3 e scIFX3. A administração da solução fisiológica foi realizada após 24 horas do procedimento para os grupos controle (SAL). Todos os animais do grupo controle receberam volumes equivalentes (1,5 ml) de solução de NaCl 0,9%, pela mesma via de aplicação.

3.6 PÓS-OPERATÓRIO

Imediatamente após a realização da intervenção cirúrgica, os animais eram devolvidos às gaiolas, nos mesmos grupos separados previamente e receberam água com solução analgésica de dipirona e dieta padrão à vontade. A analgesia pós-operatória foi realizada com tramadol 1 mg/Kg via subcutânea, dose única no 1º DPO

Foram avaliados como parâmetros para seguimento clínico, os seguintes sinais: apatia, eriçamento de pêlos, diarreia, distensão abdominal, complicações da ferida operatória como hematomas e sinais de infecção do sítio cirúrgico. Estes parâmetros foram graduados por uma escala pré-estabelecida que varia de acordo com o descrito a seguir:

- 0 – Ausentes;
- 1 - Presença leve;
- 2 - Presença moderada;
- 3 - Presença marcante e
- 4 - Presença intensa.

3.7 REOPERAÇÃO E ANÁLISE OPERATÓRIA

A reoperação foi realizada no 7º DPO. Os animais foram pesados e anestesiados conforme técnica descrita para primeira operação. Ressecada uma área retangular de 4 cm por 6 cm da parede abdominal contendo a cicatriz mediana na sua porção central. Inventariada a cavidade abdominal sendopesquisada a presença de sinais de peritonite, abscesso e deiscência de anastomose. (Figura 8).

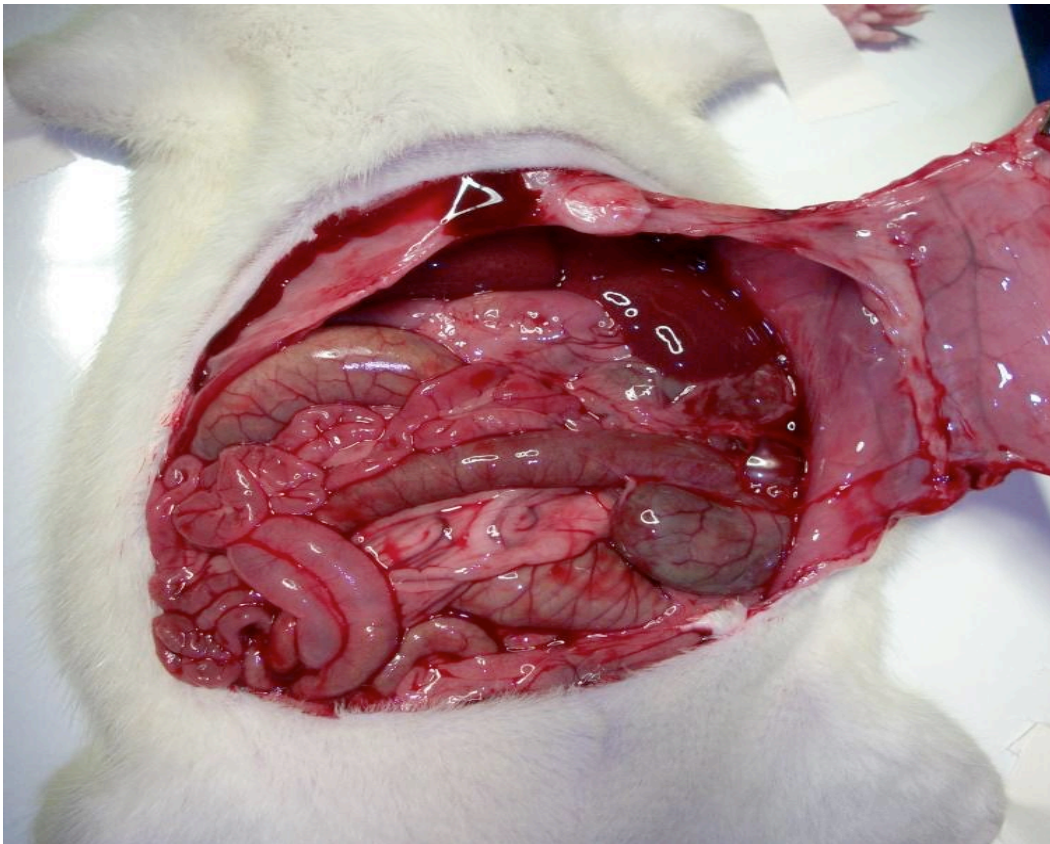


Figura 8 – Processo de reabertura da cavidade abdominal.

Foi considerado íleo paralítico a presença de distensão de alças do cólon proximal e distal à anastomose; e foi considerada obstrução intestinal, a presença de distensão de alças de cólon somente no segmento proximal à anastomose. Também 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.

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).

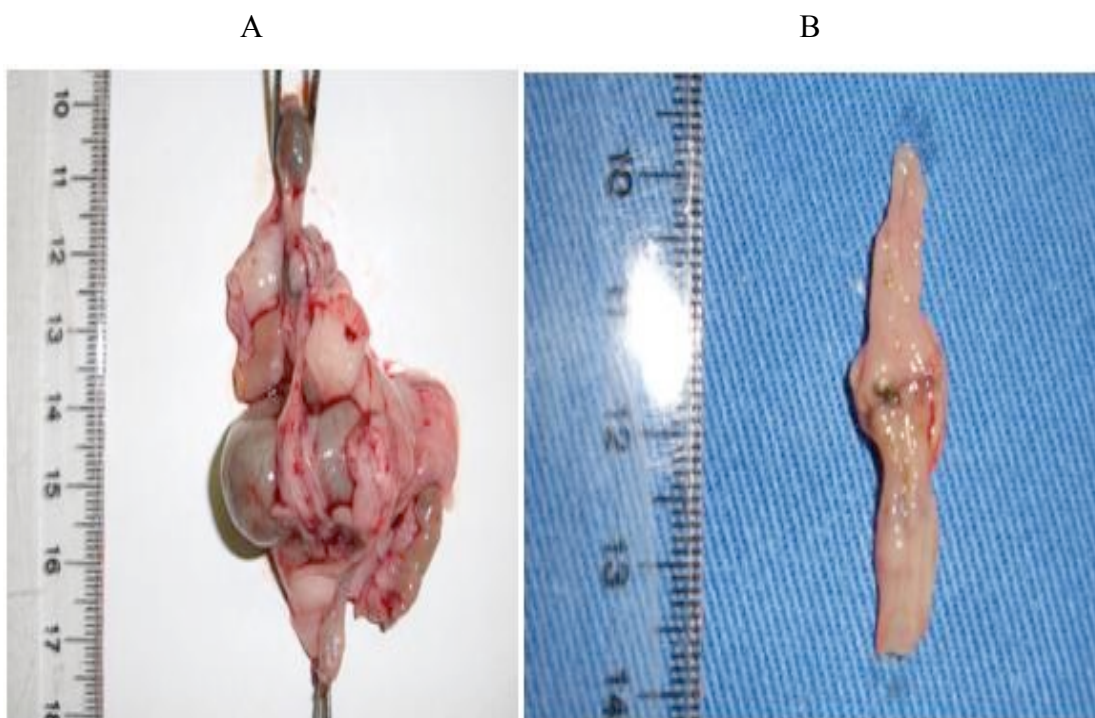


Figura 9 – A: Segmento anastomótico com estruturas aderidas, B: Segmento anastomótico com aderências liberadas.

A peça anatômica retirada do animal foi aberta pela borda anti-mesentérica e dividida em três segmentos longitudinais (figura 11). O segmento da direita foi então fixado em cartolina, ficando exposta a superfície mucosa, e conservado em formol tamponado a 10% (dez por cento), para posterior análise histopatológica. (Porção A). O segmento central foi encaminhado para análise da força de ruptura da anastomose. (Porção B). A parte restante (Porção C) foi congelada à -80° C para construção de biorepositório.

A eutanásia foi realizada com a secção dos vasos da base, após coleta de sangue intra-ventricular, sendo o sangue separado em soro e plasma por centrifugação e congelados a (-80°) a fim de se montar uma soroteca como biorepositório para análises futuras.

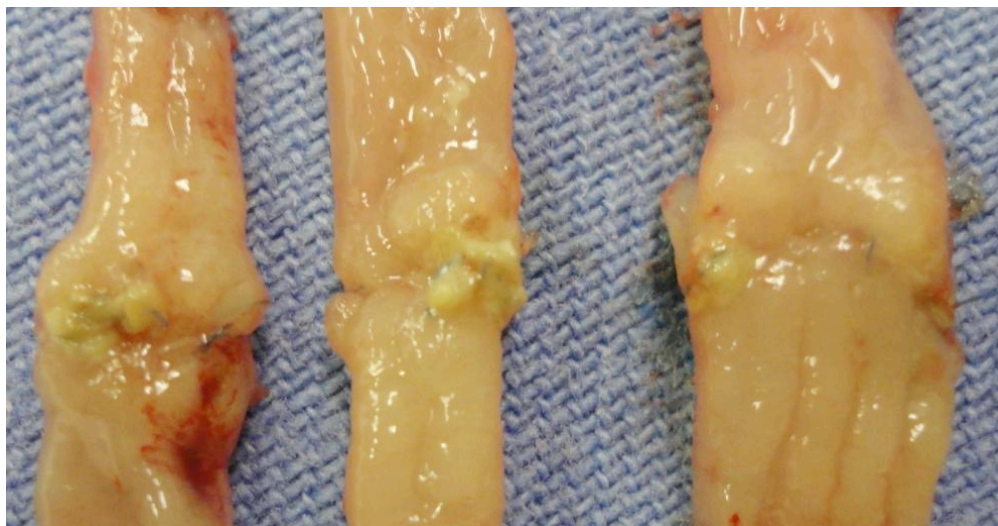


Figura 10 - Divisão do segmento colônico em três porções com a anastomose.

3.8 ESTUDO DA FORÇA DE RUPTURA DA PAREDE ABDOMINAL E DA ANASTOMOSE COLONICA

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 11).

Um pequeno 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).

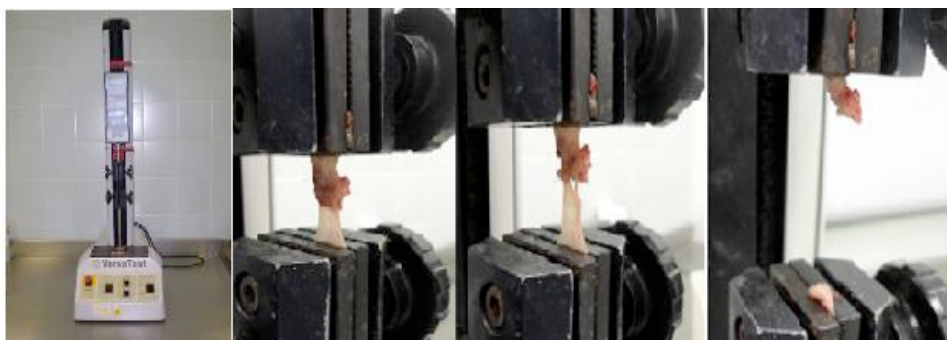


Figura 11 - Aparelho de ensaio para determinação da força de ruptura da anastomose

3.9 ESTUDO HISTOPATOLÓGICO

Neste estudo, todas as peças foram tratadas e fixadas em formol a 10% (dez por cento), incluídas em parafina, processadas conforme a rotina do Laboratório de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (UNB) e coradas pelo método hematoxilina-eosina (HE).

Um patologista experiente, sem saber de que grupo de animais provinha o material a ser analisado, procedeu à análise por microscopia óptica. Foram avaliados os seguintes indicadores:

- Fibroblastos;
- Mononucleares;
- Polimorfonucleares;
- Colágeno

Os indicadores de acima foram quantificados em: ausentes (0) leve (+); moderado (++); intenso (+++).

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A avaliação dos resultados se deu pela análise das seguintes variáveis: Médias da variação de peso entre os grupos no dia do procedimento e no 7º DPO. Comparação entre as médias da força de ruptura da anastomose expressa em newtons (N) entre os grupos. Análise comparativa entre as medias da força de ruptura da parede abdominal expressa em newntos (N). Avaliação descritiva das lâminas de histopatologia, considerando-se a intensidade da presença de mononucleares, polimorfonucleares, fibroblastos e colágeno, tabulados de maneira cega, por único patologista experiente em avaliação dos fenômenos de cicatrização.

Foi realizado análise estatística do experimento do tipo fatorial com dois fatores:

- Fator Colite (com colite; sem colite);
- Fator Infliximab (Infliximab no 1º DPO, Infliximab no 3º DPO, Placebo).

Testes estatísticos segundo ANOVA realizados utilizando o SPSS (Special Package for Social Sciences) versão 17.0.

a) Análise da diferença de peso entre o peso inicial e o peso final dos animais. As suposições de normalidade e homocedasticidade foram satisfeitas de acordo com o Teste de Shapiro-Wilk e o Teste de Levene para variâncias constantes;

b) Análise da força tênsil de ruptura da parede abdominal (teste t de student)

c) Análise da força tênsil de ruptura da anastomose (teste t de student)

d) Análise das associações com comparações da parede abdominal e das anastomoses; (análise descritiva)

Todas as probabilidades menores a 5% ($p < 0,05$) foram consideradas significantes.

Tabela 1: Número de repetições em cada célula experimental.

		Fator Infiximab			Total
		Infiximab no 1° DPO	Infiximab no 3° DPO	Placebo	
Fator Colite	Grupo com Colite	3	4	8	15
	Grupo sem Colite	4	4	7	15
Total		7	8	15	30

Apesar de o número de replicações não serem iguais (dados não balanceados) entre as parcelas de estudo o que poderia ocasionar dificuldades na estimação dos parâmetros da ANOVA, os dados da Tabela 2 estão distribuídos de forma aproximadamente proporcional, o que de acordo com Montgomery (2009) é o suficiente para que as análises possam ser conduzidas normalmente.

4. RESULTADOS

4.1 MORTES

Houve um óbito de animal alocado no grupo de estudo colite, tratado com INFLIXIMAB no 1º DPO (cIFX1), cuja necrópsia revelou obstrução intestinal, sem evidências de deiscência de anastomose. Outra morte ocorreu na fase pré-operatória, durante indução anestésica de animal pertencente ao grupo sem colite que recebeu placebo (scSAL), o qual foi excluído do estudo.

4.2 VARIÁVEL RESPOSTA: DIFERENÇA DE PESO (DIFERENÇA ENTRE O PESO FINAL E O PESO INICIAL DOS ANIMAIS)

Tabela 2: Testes de efeitos entre sujeitos (Variável dependente: diferença de peso).

Origem	Tipo III Soma dos Quadrados	gl	Quadrado Médio	F	Sig.	Eta parcial quadrado
Modelo corrigido	13883,901 ^a	5	2776,780	104,390	,000	,956
Intercepto	23169,069	1	23169,069	871,019	,000	,973
Fator_Colite	4577,915	1	4577,915	172,102	,000	,878
Fator_Infliximab	9450,114	2	4725,057	177,634	,000	,937
Fator_Colite *	1408,022	2	704,011	26,467	,000	,688
Fator_Infliximab						
Erro	638,399	24	26,600			
Total	30809,000	30				
Total corrigido	14522,300	29				

Observação: a. R Quadrado = ,956 (R Quadrado Ajustado = ,947).

Tabela 3: Médias marginais estimadas - Fator Colite * Fator Infiximab (Variável dependente: diferença de peso).

Fator Colite	Fator Infiximab	Média	Erro	Intervalo de Confiança 95%	
				Limite inferior	Limite superior
Grupo com Colite	Infiximab no 1º DPO	-63,667	2,978	-69,812	-57,521
	Infiximab no 3º DPO	-52,000	2,579	-57,322	-46,678
	Placebo	-12,125	1,823	-15,888	-8,362
Grupo sem Colite	Infiximab no 1º DPO	-37,500	2,579	-42,822	-32,178
	Infiximab no 3º DPO	-9,500	2,579	-14,822	-4,178
	Placebo	-2,143	1,949	-6,166	1,880

Gráfico 1: Médias da variação de peso dos animais entre os grupos avaliando o fator colite e o fator IFX no início do experimento e no dia eutanásia.

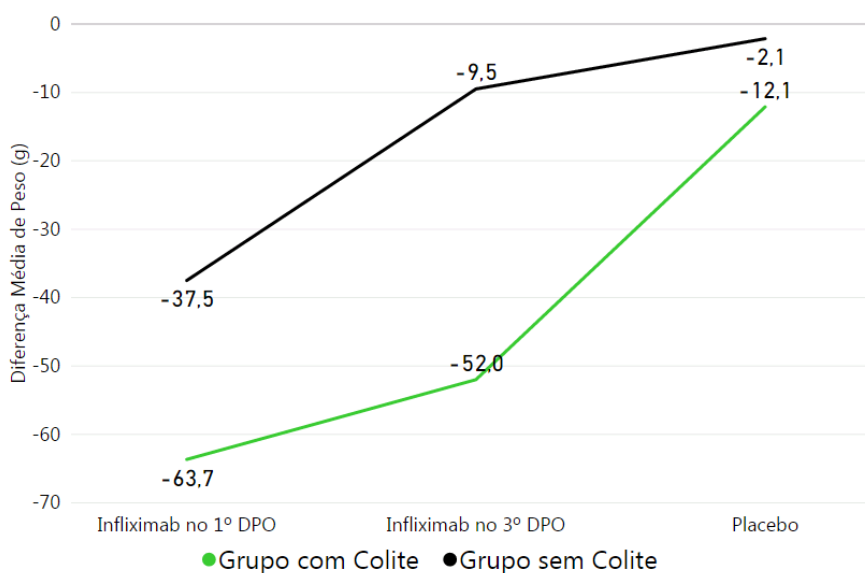


Tabela 4: Comparações por Método Pairwise – Fator Colite (Variável dependente: diferença de peso).

Fator Colite	(I) Fator Infiximab	(J) Fator Infiximab	Diferença média (I-J)	Erro	Sig. ^b	95% Intervalo de Confiança para Diferença ^b	
						Limite inferior	Limite superior
Grupo com Colite	Infiximab no 1º DPO	Infiximab no 3º DPO	-11,667*	3,939	,007	-19,797	-3,537
		Placebo	-51,542*	3,492	,000	-58,748	-44,335
	Infiximab no 3º DPO	Infiximab no 1º DPO	11,667*	3,939	,007	3,537	19,797
		Placebo	-39,875*	3,158	,000	-46,393	-33,357
	Placebo	Infiximab no 1º DPO	51,542*	3,492	,000	44,335	58,748
		Infiximab no 3º DPO	39,875*	3,158	,000	33,357	46,393
Grupo sem Colite	Infiximab no 1º DPO	Infiximab no 3º DPO	-28,000*	3,647	,000	-35,527	-20,473
		Placebo	-35,357*	3,233	,000	-42,029	-28,685
	Infiximab no 3º DPO	Infiximab no 1º DPO	28,000*	3,647	,000	20,473	35,527
		Placebo	-7,357*	3,233	,032	-14,029	-,685
	Placebo	Infiximab no 1º DPO	35,357*	3,233	,000	28,685	42,029
		Infiximab no 3º DPO	7,357*	3,233	,032	,685	14,029

Observações:

Baseado em médias marginais estimadas;

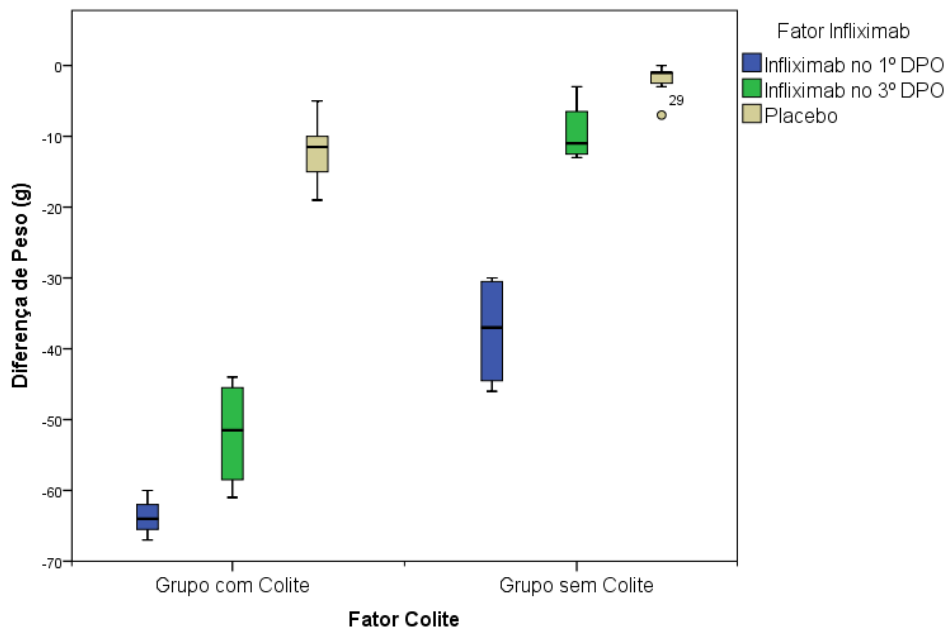
* A diferença média é significativa no nível - 05.

b. Ajustamento para diversas comparações: Diferença menos significativa (equivalente a nenhum ajustamento).

Tabela 5: Comparações por Método Pairwise – Fator Infiximab (Variável dependente: diferença de peso).

Fator Infiximab	(I) Fator Colite	(J) Fator Colite	Diferença média (I-J)	Erro Erro	Sig. ^b	95% Intervalo de Confiança para Diferença ^b	
						Limite inferior	Limite superior
Infiximab no 1º DPO	Grupo com Colite	Grupo sem Colite	-26,167*	3,939	,000	-34,297	-18,037
	Grupo sem Colite	Grupo com Colite	26,167*	3,939	,000	18,037	34,297
Infiximab no 3º DPO	Grupo com Colite	Grupo sem Colite	-42,500*	3,647	,000	-50,027	-34,973
	Grupo sem Colite	Grupo com Colite	42,500*	3,647	,000	34,973	50,027
Placebo	Grupo com Colite	Grupo sem Colite	-9,982*	2,669	,001	-15,491	-4,473
	Grupo sem Colite	Grupo com Colite	9,982*	2,669	,001	4,473	15,491

Gráfico 2: Mediana e valores intervalares da variação de peso dos animais entre os grupos considerando o fator colite e o fator IFX no início do experimento e no dia eutanásia.



Ao analisar as variáveis resposta Colite e uso de INFLIXIMAB, houve interação entre estes fatores. Quando este fenômeno ocorre, é necessário fazer a correlação entre todos os cruzamentos das variáveis respostas, sempre com a fixação de um dos fatores e proceder a comparação entre estas, diminuindo assim o viés de análise.

No grupo cIFX1 houve a maior variação negativa de peso (-63,7g). Este valor foi estatisticamente significativo quando comparado com todos os grupos de animais com colite: cIFX3 (-52g) ($p=0,007$) e cSAL (-12,1g) ($p=0,001$). Resultados estatisticamente significativos também foram encontrados na análise da comparação entre os grupos sem colite: scIFX1 (-37,5g), scIFX3 (-9,5g) e scSAL (-2,1g) ($p=0,001$). Quando comparamos todas as interações entre os grupos, observamos que tanto o fator colite quanto o uso do INFLIXIMAB acarretam variações negativas para os grupos estudados. Tanto nos grupos com colite e sem colite, a perda de peso foi maior nos animais que receberam a droga quando comparados com placebo, sendo esta perda mais expressiva quando a droga é administrada no 1º DPO ($p=0,001$). O grupo com colite foi o que mais variou negativamente de peso quando comparado com o grupo sem colite.

Gráfico 3: Mediana e valores intervalares de peso dos animais entre os grupos considerando o fator colite no início do experimento e no dia eutanásia.

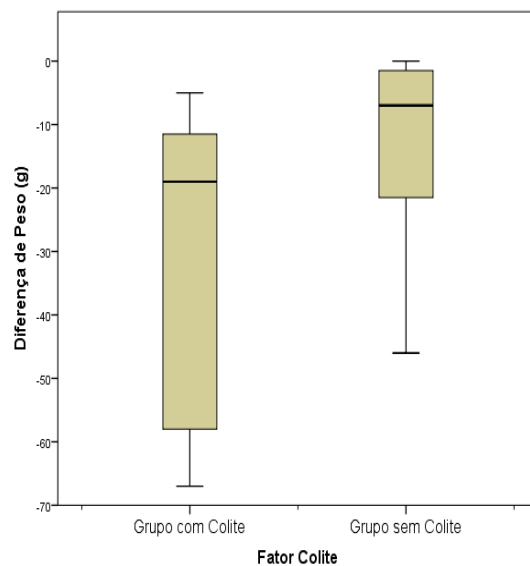
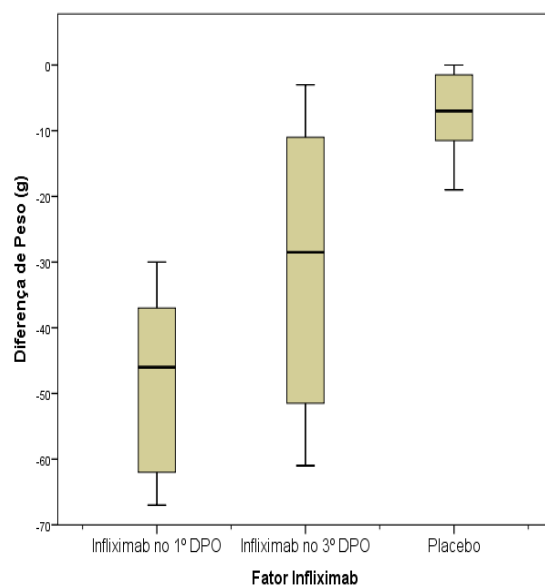


Gráfico 4: Mediana e valores intervalares da variação de peso dos animais entre os grupos considerando o fator Infiximab no início do experimento e no dia eutanásia.



4.3 VARIÁVEL RESPOSTA: ANÁLISE DA FORÇA TÊNซิล DE RUPTURA NA PAREDE ABDOMINAL

Tabela 6: Teste de efeito entre sujeitos (Variável dependente: FT- Parede).

Origem	Tipo III Soma dos Quadrados	gl	Quadrado Médio	F	Sig.	Eta parcial quadrado
Modelo corrigido	223,629 ^a	5	44,726	7,298	,000	,603
Intercepto	1503,821	1	1503,821	245,394	,000	,911
Fator_Infliximab	37,051	2	18,526	3,023	,067	,201
Fator_Colite	194,760	1	194,760	31,781	,000	,570
Fator_Infliximab *	37,343	2	18,672	3,047	,066	,202
Fator_Colite						
Erro	147,077	24	6,128			
Total	2260,426	30				
Total corrigido	370,705	29				

Observação:

- a. R Quadrado = ,603 (R Quadrado Ajustado = ,521).

Tabela 7: Fator Colite (Variável dependente: FT - Parede).

Fator Colite	Média	Erro Padrão	Intervalo de Confiança 95%	
			Limite inferior	Limite superior
Grupo com Colite	4,809	,694	3,376	6,243
Grupo sem Colite	10,217	,662	8,851	11,582

Tabela 8: Fator Infliximab (Variável dependente: FT - Parede).

Fator Infliximab	Média	Erro Padrão	Intervalo de Confiança 95%	
			Limite inferior	Limite superior
Infliximab no 1º DPO	5,891	,945	3,940	7,842
Infliximab no 3º DPO	7,953	,875	6,146	9,759
Placebo	8,695	,641	7,373	10,017

Em relação a força de ruptura da cicatriz da parede abdominal, não houve interação entre os fatores colite e uso de Infliximab. Não houve diferença estatística entre a força de ruptura nos animais sem colite (scIFX1, scIFX3 e scSAL), independente do uso de drogas. Para o grupo de animais com colite, aqueles que receberam a droga no 1º DPO, apresentaram uma diferença significativa: cIFX1 (1,6N) X cIFX3 (5,61N) ($p=0,001$). Não observamos diferença quando comparados o grupo cIFX3 com o cSAL ($p=0,066$)

Gráfico 5: Mediana e valores intervalares da força tênsil de ruptura da cicatriz da parede abdominal expressa em Newtons (N) entre os grupos considerando o fator colite e o fator Infiximab no dia eutanásia.

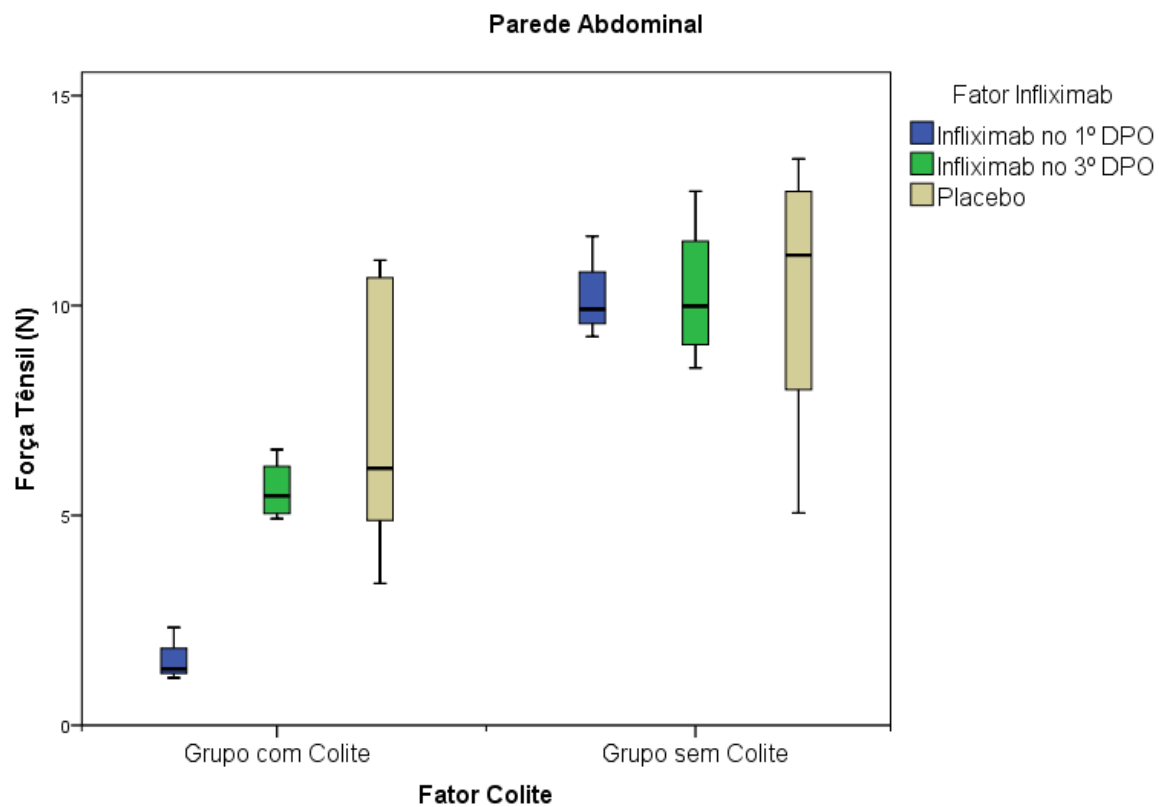


Gráfico 6: Mediana e valores intervalares da força tênsil de ruptura da cicatriz da parede abdominal expressa em Newtons (N) entre os grupos considerando o Fator colite no dia eutanásia.

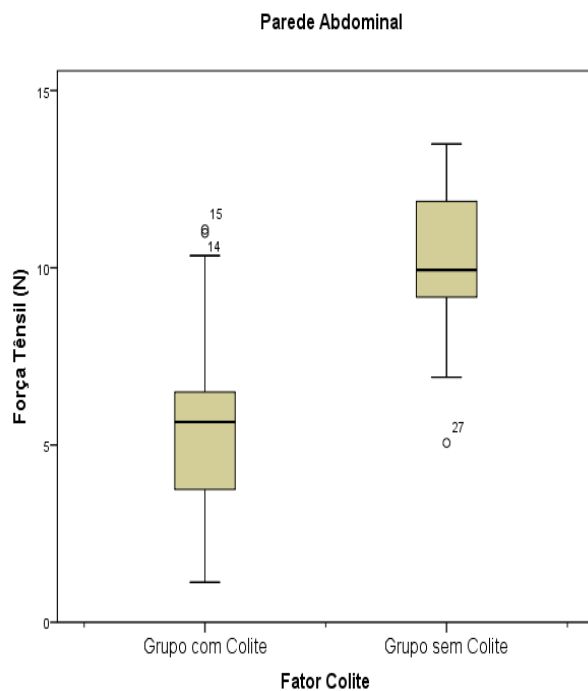
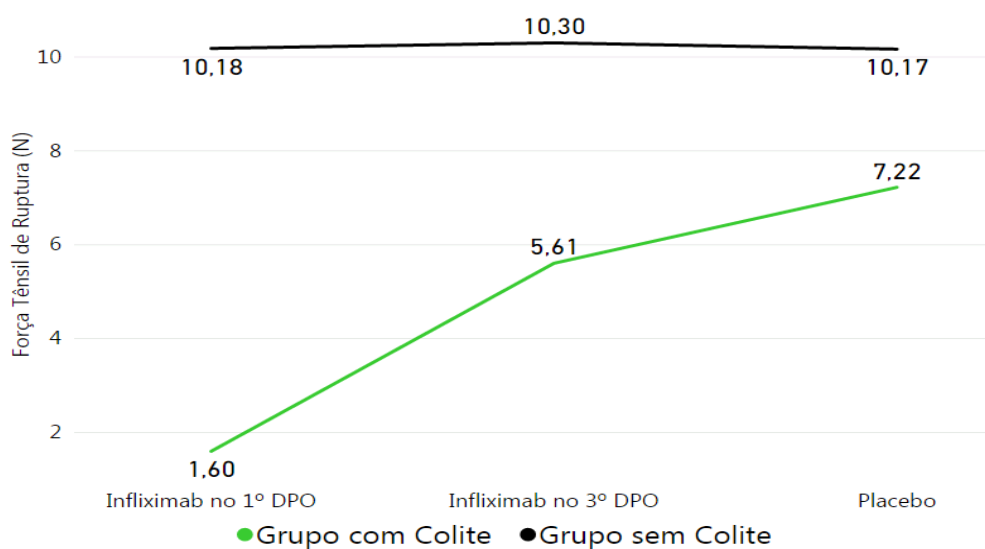


Gráfico 7: Médias da Força tênsil de ruptura da cicatriz da parede abdominal expressa em Newtons (N) entre os grupos considerando o fator colite e o fator Infiximab no dia eutanásia.



4.4 VARIÁVEL RESPOSTA: ANÁLISE DA FORÇA TÊNซิล DE RUPTURA DA ANASTOMOSE

Tabela 9: Teste de efeito entre sujeitos (Variável dependente: FT- Anastomose).

Origem	Tipo III Soma dos Quadrados	gl	Quadrado Médio	F	Sig.	Eta parcial quadrado
Modelo corrigido	12,942 ^a	5	2,588	9,766	,000	,670
Intercepto	45,121	1	45,121	170,243	,000	,876
Fator_Colite	,130	1	,130	,490	,491	,020
Fator_Infliximab	1,081	2	,541	2,040	,152	,145
Fator_Colite * Fator_Infliximab	11,016	2	5,508	20,782	,000	,634
Erro	6,361	24	,265			
Total	69,666	30				
Total corrigido	19,303	29				

Observação: a. R Quadrado = ,670 (R Quadrado Ajustado = ,602).

Tabela 10: Estimativas (Variável dependente: FT- Anastomose).

Fator Colite	Fator Infliximab	Média	Erro	Intervalo de Confiança 95%	
				Limite inferior	Limite superior
Grupo com Colite	Infliximab no 1º DPO	,553	,297	-,060	1,167
	Infliximab no 3º DPO	1,730	,257	1,199	2,261
	Placebo	1,411	,182	1,036	1,787
Grupo sem Colite	Infliximab no 1º DPO	2,640	,257	2,109	3,171
	Infliximab no 3º DPO	,625	,257	,094	1,156
	Placebo	,849	,195	,447	1,250

Tabela 11: Comparações por Método Pairwise - 1º e 3º DPO (Variável dependente: FT-Anastomose).

Fator Colite	(I) Fator	(J) Fator	Diferença média (I-J)	Erro	Sig. ^b	95% Intervalo de Confiança para Diferença ^b		
						Limite inferior	Limite superior	
Grupo com Colite	Infliximab no 1º DPO	Infliximab no 3º DPO	-1,177*	,393	,006	-1,988	-,365	
		Placebo	-,858*	,349	,021	-1,577	-,139	
	Infliximab no 3º DPO	Infliximab no 1º DPO	1,177*	,393	,006	,365	1,988	
		Placebo	,319	,315	,322	-,332	,969	
	Placebo	Infliximab no 1º DPO	,858*	,349	,021	,139	1,577	
		Infliximab no 3º DPO	-,319	,315	,322	-,969	,332	
	Grupo sem Colite	Infliximab no 1º DPO	Infliximab no 3º DPO	2,015*	,364	,000	1,264	2,766
			Placebo	1,791*	,323	,000	1,125	2,457
Infliximab no 3º DPO		Infliximab no 1º DPO	-2,015*	,364	,000	-2,766	-1,264	
		Placebo	-,224	,323	,495	-,890	,442	
Placebo		Infliximab no 1º DPO	-1,791*	,323	,000	-2,457	-1,125	
		Infliximab no 3º DPO	,224	,323	,495	-,442	,890	

Baseado em médias marginais estimadas;

* A diferença média é significativa no nível - 05.

Tabela 12: Comparações por Método Pairwise (Variável dependente: FT- Anastomose).

Fator	(I) Fator	(J) Fator	Diferença média (I-J)	Erro Erro	Sig. ^b	95% Intervalo de Confiança para Diferença ^b	
						Limite inferior	Limite superior
Infliximab no 1º DPO	Grupo com Colite	Grupo sem Colite	-2,087*	,393	,000	-2,898	-1,275
	Grupo sem Colite	Grupo com Colite	2,087*	,393	,000	1,275	2,898
Infliximab no 3º DPO	Grupo com Colite	Grupo sem Colite	1,105*	,364	,006	,354	1,856
	Grupo sem Colite	Grupo com Colite	-1,105*	,364	,006	-1,856	-,354
Placebo	Grupo com Colite	Grupo sem Colite	,563*	,266	,045	,013	1,113
	Grupo sem Colite	Grupo com Colite	-,563*	,266	,045	-1,113	-,013

Baseado em médias marginais estimadas;

* A diferença média é significativa no nível - 05.

b. Ajustamento para diversas comparações: Diferença menos significativa (equivalente a nenhum ajustamento).

Na avaliação da força tensil de ruptura da anastomose, houve interação entre os fatores colite e uso de INFLIXIMAB. Por esta razão, a mesma diretriz utilizada para a análise de variância para a diferença de peso foi utilizada, sempre com a fixação de um dos fatores para análise cruzada entre os grupos.

Quando comparados os com colite, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos cIFX1 (0,55N) X cIFX3 (1,73N) ($p=0,006$) e entre os grupos cIFX1 (0,55N) e cSAL (1,41) ($p=0,02$). Não houve diferença entre os grupos cIFX3 (1,73N) e cSAL (1,41N) ($p=0,322$)

Nos grupos sem colite observamos: scIFX1 (2,64N) X scIFX3 (0,63N) ($p=0,001$) e entre scIFX1 (2,64) e scSAL (0,85) ($p=0,001$). Também não houve significância quando comparados scIFX3 e scSAL ($p=0,495$)

Ao analisarmos o uso do INFLIXIMAB no 1º DPO, 3º DPO e placebo, e utilizamos como variável resposta a presença ou não de colite, obtivemos os seguintes resultados:

Tabela 13: Força de ruptura (N) da anastomose

	INFLIXIMAB	INFLIXIMAB	Placebo
	1º DPO	3º DPO	
Colite	0,55	1,73	1,41
Sem Colite	2,64	0,63	0,85
<i>p Valor</i>	<i>0,001</i>	<i>0,006</i>	<i>0,045</i>

Gráfico 8: Mediana e valores intervalares da força tênsil de ruptura da anastomose expressa em Newtons (N) entre os grupos considerando o fator colite e o fator Infiximab no dia eutanásia.

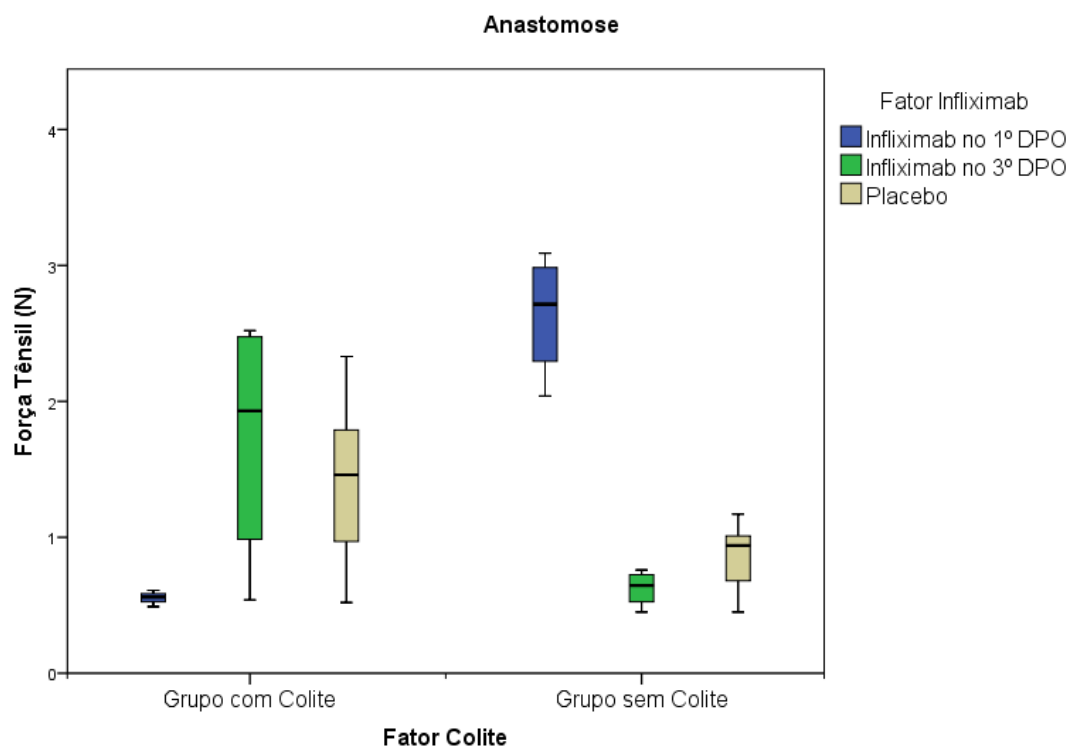


Gráfico 9: Mediana e valores intervalares da força tênsil de ruptura da anastomose expressa em Newtons (N) entre os grupos considerando o fator colite.

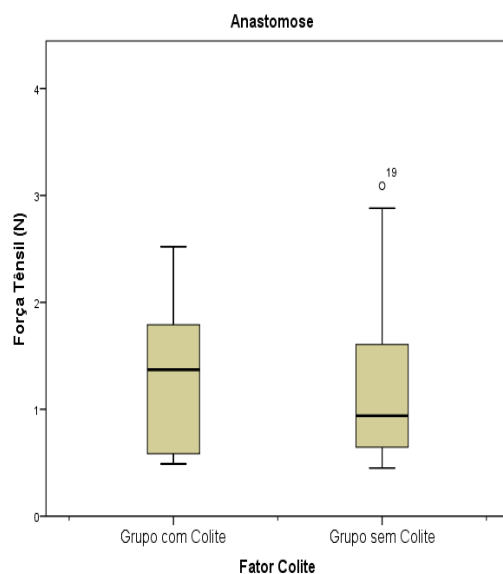


Gráfico 10: Mediana e valores intervalares da força tênsil de ruptura da anastomose expressa em Newtons (N) entre os grupos considerando o Fator Infiximab no dia eutanásia.

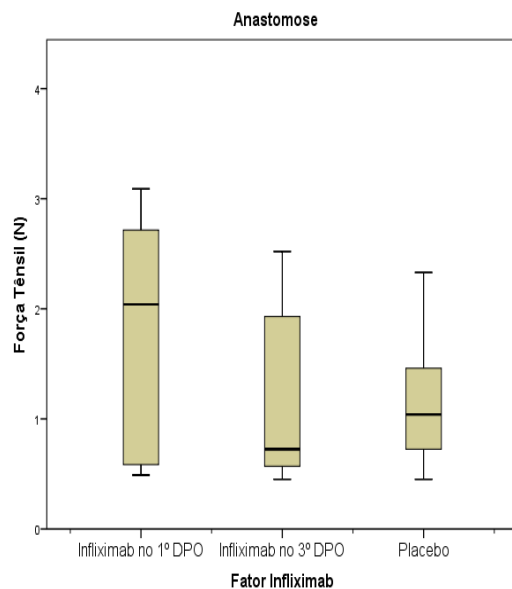
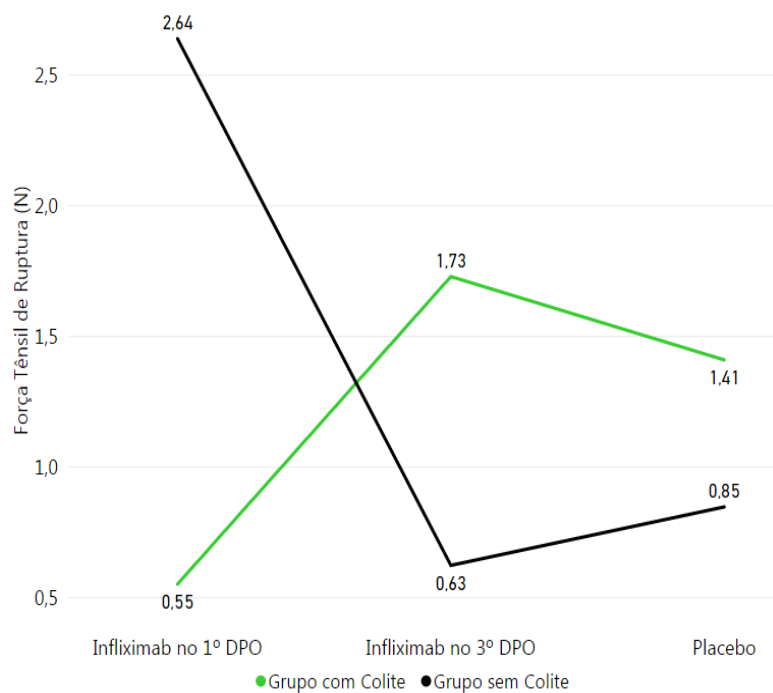


Gráfico 11: Médias da Força tênsil de ruptura da anastomose expressa em Newtons (N) entre os grupos considerando o fator colite e o fator Infiximab no dia eutanásia.



4.5 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Neste estudo, será apresentada tabela descritiva com a mediana das gradações de intensidade da presença de mononucleares, polimorfonucleares, fibroblastos e colágeno descritos pelo patologista.

Tabela 14: Mediana da intensidade de achados histológicos

	Mononucleares	Polimorfonucleares	Fibroblastos	Colágeno
cIFX1	++	++	+++	++
cIFX3	++	++	+++	++
cSAL	++	++	+++	++
scIFX1	++	++	+++	++
scIFX3	++	++	+++	++
scSAL	++	++	+++	++

Os indicadores utilizados acima foram quantificados em: ausentes (0) leve (+); moderado (++); intenso (+++).

Não foram observadas diferenças quanto a intensidade da presença de mononucleares, polimorfonucleares, fibroblastos ou colágeno entre os grupos de estudo.

4.6 AVALIAÇÃO CLÍNICA DOS ANIMAIS COM E SEM COLITE TRATADOS COM INFLIXIMAB OU PLACEBO

4.6.1 Desenvolvimento clínico

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.

4.6.2 Achados intra-operatórios

Não houve diferença estatística entre os grupos em relação à deiscência de anastomose. Não houve casos de deiscência de anastomose livre, com presença de fezes na cavidade abdominal à re-operação. Não houve casos de deiscência nos animais controles.

A avaliação da cavidade abdominal realizada à re-operação foi semelhante entre os grupos em relação à presença de peritonite, íleo paralítico, obstrução intestinal e abscesso intracavitário, não havendo diferenças.

5 DISCUSSÃO

Não houve diferença entre os subgrupos em relação aos parâmetros clínicos, incidência de deiscência de anastomose e achados intra-operatórios de peritonite, abscesso, obstrução ou íleo paralítico.

Apesar dos dados de literatura serem controversos, e alguns autores apontarem que a influência do IFX na cicatrização de feridas não é significativa (LOPES 2008), neste modelo experimental, foi observado que o uso de INFLIXIMAB, administrado 24 horas após o trauma operatório na vigência de colite induzida, apresentou um efeito negativo, com diminuição da força de ruptura de anastomose, e maior variação negativa na perda de peso. Porém, após 72 horas de trauma, ainda em vigência de colite, notamos uma inversão dos resultados de cicatrização, passando o IFX a apresentar resultados positivos, com aumento da força tênsil quando comparados com o grupo sem colite induzida, tanto quando receberam IFX no 3º DPO, quanto quando receberam salina.

Quando avaliamos a força de ruptura da cicatriz da parede abdominal, verificou-se que no grupo sem colite induzida, não houve interferência do uso da droga tanto no 1º DPO quanto no 3º DPO, e estes dois não diferiam do grupo que recebeu salina. No grupo com colite induzida, houve uma piora da cicatrização em relação ao grupo sem colite, sem significância estatística, a exceção daqueles que receberam IFX no 1º DPO, sendo a piora da cicatrização significativa neste grupo.

Notamos que o fator colite melhorou a cicatrização da anastomose, a exceção daquele grupo que recebeu IFX no 1º DPO, no qual houve uma piora.

O IFX quando administrado no 3º DPO, apresentou comportamento semelhante ao placebo, não influenciando a cicatrização seja da parede ou da anastomose, na vigência ou não de colite, o que nos leva a crer, que ocorre um efeito biológico distinto quando o anti-TNF é administrado na fase inflamatória inicial da cicatrização.

Não foram observadas diferenças entre os parâmetros histopatológicos avaliados no 7º DPO entre todos os grupos.

As pesquisas e experiências sobre a cicatrização de anastomoses têm sido realizadas nos ratos, pois acredita-se que o modelo básico da reparação tecidual e a composição da microflora fecal deste animal sejam bastante semelhantes aos do ser humano (SIEMONSMA et al., 2003; CAKMAK et al., 2009; HERRMANN et al., 1964). Os ratos apresentam 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 dos animais; na resistência às infecções, o que dispensa a utilização de técnicas assépticas; no baixo custo de aquisição e na sua fácil manutenção em biotério (SIRIMARCO et al., 2001).

A colite induzida por ácido acético em modelo animal com ratos, há várias décadas têm sido utilizada para estudo de doenças inflamatórias, devido a similaridade em relação ao padrão inflamatório histológico e de derivados eicoisanóides. O ácido acético permite, rapidamente, o estudo do processo inflamatório, pois apenas 12 horas após a indução já é possível que sejam observadas as alterações inflamatórias. (El-Medany 2006).

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

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

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.

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 relacionado à qualidade do colágeno (LEITE et al., 1993).

A anastomose é mais fraca no 3º e 4º 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).

A resistência máxima é atingida entre o 8º e 10º DPO, época na qual o rompimento ocorre proximal ou distal à anastomose.

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).

O TNF α 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 α 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 α 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 α 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 α sobre a resistência tênsil de anastomoses do cólon esquerdo de ratos. Outros autores demonstraram relação entre o aumento do TNF α e o prejuízo na cicatrização de anastomoses no 7° DPO em camundongos na presença de sepse (ISHIMURA et al., 2002).

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 1° DPO, com posterior decréscimo até o 7° DPO. Os valores de TNF α foram baixos no 1° e 3° DPO, com aumento gradativo até o 7° DPO. A IL1 β teve pico no 1° DPO, com posterior queda até o 5° DPO e leve recuperação posterior até o 7° DPO.

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

BERTRAM et al. (2003) também encontraram aumento dos níveis de TNF α 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 α 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 β , IL6 e TNF α e tempo operatório prolongado, maior perda sanguínea e contaminação bacteriana do fluido do dreno peritoneal (TSUKADA et al., 1993).

É necessário salientar que a detecção da expressão dos genes para citocinas ou mesmo dos níveis de citocinas em tecidos ou secreções nem sempre se correlaciona 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).

O TNF α , a IL6 podem ser fatores inibitórios do processo de cicatrização de anastomoses intestinais na presença de fatores adversos (MARTINEAU; SHEK, 2000; ISHIMURA et al., 2002). ISHIMURA et al. (1998), em um estudo experimental em

camundongos, demonstraram, por imuno-histoquímica, que a expressão de IL 6 no segmento anastomótico é suprimida após a indução da sepse por injeção intraperitoneal 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 α ao fim do período de infusão bacteriana têm correlação com má evolução clínica (MARTINEAU; SHEK, 2000).

Em nosso desenho, propusemos a avaliação da influência de uma droga anti-TNF, verificando sua ação quando administrada precocemente após o trauma cirúrgico, modulando o TNF na fase inflamatória, na presença ou não de inflamação local e comparando com a administração do fármaco mais tardiamente, já na fase proliferativa, com o intuito de testar a hipótese de que o uso precoce da droga alteraria a cicatrização da anastomose.

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, fatos que corroboram nossos achados histopatológicos, onde não foram encontradas diferenças entre a quantidade de fibroblastos e colágeno, a despeito dos resultados de força de ruptura da anastomose.

Como paradigma, utilizamos a força de ruptura da cicatriz da parede abdominal, tentando demonstrar a diferença entre cicatrização em um sítio exposto a estresse adicional, representado neste estudo pela colite induzida.

Vale ressaltar que a análise da variável colite induzida, quando associada com IFX no 3º DPO ou SAL, parece ser fator isolado de melhora na cicatrização, quando comparados com os grupos que não foram submetidos a colite, recebendo IFX no 3º DPO ou salina.

Quando foi observada a força de ruptura de cicatriz de parede abdominal, para o grupo sem colite, não houve influência da droga na cicatrização, independente do momento em que a droga foi utilizada. Porém, no grupo com colite induzida que recebeu IFX no 1º DPO, houve uma piora significativa na força de ruptura da parede.

Os achados acima descritos, demonstram a necessidade de estudos adicionais, que visem determinar a expressão tecidual e a atividade molecular do TNF e sua modulação pelo IFX, na fase inflamatória da cicatrização, afim de confirmar a hipótese de que a modulação desta citocinas, representa relação direta com a qualidade da cicatrização em sua fase tardia, após 7 dias do trauma, preenchendo, assim, a lacuna ainda existente acerca desta controvérsia.

6. CONCLUSÃO

Nas condições em que o estudo foi conduzido, podemos concluir que a utilização do INFLIXIMAB (IFX) precocemente após anastomose colônicas em ratos, influenciou negativamente a cicatrização, na presença de colite, quando utilizado no 1o DPO. Após este período, o grupo com colite induzida, apresentou melhora nos parâmetros avaliados, mesmo em uso do IFX no 3o DPO quanto com o uso de salina.

O IFX utilizado no 1o DPO, quando associado ao modelo de colite induzida por ácido acético, piorou a cicatrização da anastomose e da parede abdominal, podendo a droga em questão possuir efeitos distintos a depender em qual fase da cicatrização o tecido se encontra, sendo necessários estudos de ação e expressão tecidual da citocinas para fortalecer estes achados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

AYDIN, C.; AYTEKIN, F.O.; TEKIN, K.; KABAY, B.; YENISEY, C.; KOÇBİL, G.; ÖZDEN, A. Effect of temporary abdominal closure on colonic anastomosis and postoperative adhesions in experimental secondary peritonitis. **World J Surg** 2006;30(4):612-619.

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.

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

BEDIRLI, A.; GOKAHMETOĞLU, S.; SAKRAK, O.; ERSOZ, N.; AYANGIL, D.; ESİN, 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.

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.

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.

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.

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

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.

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.

FRIED, L. E.; HESP, M. D.; THIJS, 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.

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

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

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

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

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.
- 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.
- 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.
- 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.
- MAUVIEL, A.; DAIREAUX, M.; REDINI, F. Tumor necrosis factor inhibits collagen and fibronectin synthesis in human dermal fibroblasts. **FEBS Lett** 1988; 236:47-52.
- MENZIES, D.; ELLIS, H. Intestinal obstruction from adhesions – how big is the problem? **Ann R Coll Surg Engl** 1990; 72(1): 60-63.

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.

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.

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.

RAPALA, K.; LAATO, M.; NINIKOSKI, J.; KUJARI, H.; SOˆDER, 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.

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

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.

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

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.

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.

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

TANNAHILL CL, STEVENOT SA, CAMPBELL-THOMPSON M, NICK HS, VALENTINE JF. Induction and immunolocalization of manganese superoxide dismutase in acute acetic acid-induced colitis in the rat. **Gastroenterology** 1995; 109: 800-811.

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.

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.

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.

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.

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

YAMADA Y., MARSHALL S., SPECIAN R. D., GRISHAM M. B. A comparative analysis of two models of colitis in rats. **Gastroenterology** 1992; 102: 1524-1534.

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.

ANEXO 1



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 3 de junho de 2016.

**DECLARAÇÃO**

Declaramos que o projeto intitulado "**AVALIAÇÃO DE ANASTOMOSE E DA PAREDE ABDOMINAL EM MODELO EXPERIMENTAL DE COLITE, SOB AÇÃO DO ADALIMUMAB (HUMIRA®) EM DIFERENTES ETAPAS DA CICATRIZAÇÃO. ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS.**", UnBDoC n.º 60540/2016, sob responsabilidade do Professor João Batista de Sousa foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de *Rattus norvegicus*: 32. A presente aprovação é válida pelo período de 1º/08/2016 a 15/12/2016.



Profa. Dra. Paula Diniz Galera
Coordenadora da CEUA - UnB

*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.

ANEXO 2

DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSES

O autor afirma e reitera que não houve conflito de interesses (financeiros ou de qualquer outra natureza) na realização da pesquisa ou na redação desta dissertação. O estudo não recebeu apoio ou patrocínio financeiro de nenhum laboratório ou empresa farmacêutica.