



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ANTICORPO  
MONOCLONAL, INFLIXIMABE, NA  
CICATRIZAÇÃO DE ANASTOMOSES COLÔNICAS.  
ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS.**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**LUIZ ALBERTO MENDONÇA DE FREITAS**

Brasília, 2007.

**LUIZ ALBERTO MENDONÇA DE FREITAS**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ANTICORPO  
MONOCLONAL, INFLIXIMABE, NA  
CICATRIZAÇÃO DE ANASTOMOSES COLÔNICAS.  
ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS.**

**Dissertação submetida ao Programa de  
Pós-graduação em Ciências Médicas da  
Faculdade de Medicina da Universidade  
de Brasília como requisito parcial para  
obtenção do grau de Mestre.**

**Área de concentração: Medicina**

**Orientador:  
Prof. Dr. Paulo Gonçalves de Oliveira**

**BRASÍLIA  
2007**

# **TERMO DE APROVAÇÃO**

**LUIZ ALBERTO MENDONÇA DE FREITAS**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ANTICORPO MONOCLONAL, INFLIXIMABE,  
NA CICATRIZAÇÃO DE ANASTOMOSES COLÔNICAS. ESTUDO  
EXPERIMENTAL EM RATOS.**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, área de concentração: Medicina, da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília – UnB, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Orientador:

\_\_\_\_\_  
Professor Doutor Paulo Gonçalves de Oliveira – FM-UnB

Examinador:

\_\_\_\_\_  
Professor Doutor João Batista de Sousa – FM-UnB

Examinador:

\_\_\_\_\_  
Professor Doutor Luiz Pinto Fernandes – ESCS-FEPECS

Suplente:

\_\_\_\_\_  
Professora Doutora Anamélia Lorenzetti Bocca – IB/FM-UnB

Brasília, 14 de Dezembro de 2007.

# DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho:

A meus pais, Marly e José Antonio, pelo carinho, formação e educação que me proporcionaram.

A minha esposa Vanessa e aos meus filhos, Luiz Gustavo e Pedro Paulo, pela compreensão das horas de ausência de seu convívio e pelo incentivo na realização deste trabalho.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta pesquisa e especialmente:

Prof. Dr. Paulo Gonçalves de Oliveira, Diretor da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília - UnB, professor do Curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas, meu orientador e grande amigo.

Prof. Dr. João Batista de Sousa, Diretor do Hospital Universitário da Universidade de Brasília - UnB, professor do Curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas, amigo, companheiro e meu grande incentivador neste projeto.

Prof. Dr. Luiz Pinto Fernandes, professor da graduação do Curso de Medicina da Escola Superior de Ciências da Saúde – ESCS, da Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde – FEPECS, colega de trabalho na ESCS e no Hospital de Base do Distrito Federal, amigo sincero e incentivador.

Prof<sup>ta</sup>. Dr<sup>a</sup>. Anamélia Lorenzetti Bocca, professora do Curso de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília – UnB.

Prof. Dr. Ruy de Souza Lino Júnior, professor da disciplina Patologia Geral do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás – UFG.

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Flávia Aparecida de Oliveira, professora da disciplina Patologia Geral do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás – UFG.

Médico-veterinário Rafael Rocha de Andrade, do Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília – UnB.

Prof. Dr. Albino Verçosa Magalhães, chefe do Laboratório de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília - UnB.

Dr<sup>a</sup>. Maria Fátima de Carvalho Pires, patologista clínica do Hospital de Base do Distrito Federal e do Laboratório Central - LACEN, Secretaria de Saúde do Distrito Federal, colega do curso de graduação e de trabalho no Hospital de Base do Distrito Federal, amiga sincera.

Prof<sup>a</sup>. Ms Yanna Karla de Medeiros Nóbrega, farmacêutica-bioquímica do Laboratório de Imunopatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília – UnB.

Prof. João Vieira Lopes, professor da graduação da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília – UnB, grande amigo, incentivador e parceiro nesta jornada.

Ao LIB - Laboratório de Imunopatologia de Brasília e ao Prof. Dr. Florêncio Figueiredo pela realização da imunohistoquímica e fotografias das lâminas de histologia.

Engenheiro Eletricista José Cláudio Mendonça de Freitas, pela ajuda no trabalho estatístico.

Médica-veterinária Helenira Melo de Moura, Sr. José Tavares (Dedé), funcionários do Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília.

Professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília.

## EPÍGRAFE

“Uma droga é uma substância  
que quando injetada em um rato,  
produz um trabalho científico”.

Autor anônimo, in **Corman: Colon & Rectal Surgery**

... Valeu a pena? Tudo vale a pena  
Se a alma não é pequena.  
Quem quer passar além do Bojador  
Tem que passar além da dor.  
Deus ao mar o perigo e o abismo deu,  
Mas nele é que espelhou o céu.

Fernando Pessoa, in **Mensagem**



# SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	x
<b>LISTA DE GRÁFICOS</b> .....	xiii
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	xiv
<b>RESUMO</b> .....	xv
<b>ABSTRACT</b> .....	xvi
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 OBJETIVO</b> .....	8
<b>3 MATERIAL E MÉTODO</b> .....	10
3.1 ANIMAL DE EXPERIMENTAÇÃO .....	11
3.2 DISTRIBUIÇÃO E ALOCAÇÃO DOS ANIMAIS EM GRUPOS .....	12
3.3 PRÉ-OPERATÓRIO .....	13
3.4 ANESTESIA E TÉCNICA OPERATÓRIA .....	14
3.5 EVOLUÇÃO PÓS-OPERATÓRIA .....	19
3.6 RE-OPERAÇÃO E ANÁLISE OPERATÓRIA .....	21
3.7 EXAME HISTOLÓGICO E MORFOMÉTRICO .....	25
3.8 DEPOSIÇÃO DO COLÁGENO .....	26
3.9 RESISTÊNCIA TÊNซิล DA ANASTOMOSE .....	28
3.10 QUANTIFICAÇÃO DO TNF- $\alpha$ .....	30
3.11 QUANTIFICAÇÃO TECIDUAL DO TGF- $\beta$ .....	32
3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	32
<b>4 RESULTADOS</b> .....	33
4.1 MODELO EXPERIMENTAL .....	34
4.2 EVOLUÇÃO CLÍNICA PRÉ-OPERATÓRIA.....	34
4.3 EVOLUÇÃO CLÍNICA PÓS-OPERATÓRIA .....	34
4.4 AVALIAÇÃO PONDERAL .....	37
4.5 ANÁLISE DA RE-OPERAÇÃO .....	39
4.6 FORÇA TÊNซิล DA ANASTOMOSE.....	41
4.7 HISTOLOGIA.....	43
4.8 MORFOMETRIA E COLÁGENO .....	46
4.9 TNF- $\alpha$ SÉRICO E TECIDUAL.....	51
4.10 TGF- $\beta$ TECIDUAL (IMUNOHISTOQUÍMICA) .....	55
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	56
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	72
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	74
<b>APÊNDICES</b> .....	94
<b>ANEXOS</b> .....	128

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – EXPOSIÇÃO DO CÓLON A SER OPERADO .....	15
FIGURA 2 – SECÇÃO DO CÓLON COM TESOURA RETA .....	16
FIGURA 3 – ANASTOMOSE TÉRMINO-TERMINAL COM PONTOS DE REPARO (A) E ANASTOMOSE DA HEMICIRCUNFERÊNCIA POSTERIOR COM SUTURA CONTÍNUA (B).....	17
FIGURA 4 – ANASTOMOSE DA HEMICIRCUNFERÊNCIA POSTERIOR (A) E ANASTOMOSE COMPLETA COM SUTURA DA BORDA ANTERIOR DO CÓLON (B) .....	17
FIGURA 5 – INJEÇÃO DE SOLUÇÃO DE NaCl A 0,9% NA LUZ DO CÓLON PARA TESTE DE IMPERMEABILIDADE DA ANASTOMOSE (A) E DEMONSTRANDO QUE NÃO HOUE VASAMENTO DA SOLUÇÃO DE NaCl A 0,9% PELA ANASTOMOSE (B) .....	18
FIGURA 6 – COMPLETADO O PRIMEIRO PLANO DE FECHAMENTO DA PAREDE ABDOMINAL (MÚSCULO APONEURÓTICO), POR MEIO DE SUTURA CONTÍNUA COM FIO DE POLIPROPILENO 5-0 (A) E SUTURA EM BARRA GREGA DA PELE COM O MESMO FIO (B) .....	18
FIGURA 7 – OS FIOS DE POLIPROPILENO, 5-0 E 6-0, UTILIZADOS NO FECHAMENTO DA PAREDE E DA ANASTOMOSE, RESPECTIVAMENTE, (A) E COMPLETADA A SUTURA EM BARRA GREGA DA PELE (B) .....	19
FIGURA 8 – ALOJAMENTO DOS ANIMAIS E GAIOLAS COM ÁGUA E RAÇÃO <i>AD LIBITUM</i> (A) E (B) .....	20
FIGURA 9 – RÓTULO DE IDENTIFICAÇÃO DAS GAIOLAS (A) E GAIOLA COM CINCO ANIMAIS NO PÓS-OPERATÓRIO (B) .....	20
FIGURA 10 – SEGMENTOS DE PAREDE ABDOMINAL CONTENDO A LINHA DE SUTURA AO CENTRO (A) E (B) .....	21
FIGURA 11 – CAVIDADE PERITONEAL EXPOSTA PARA ANÁLISE, APÓS A RETIRADA DO SEGMENTO DE PAREDE ABDOMINAL (A) E (B) .....	22

FIGURA 12 – SEGMENTO DO CÓLON RESSECADO PARA ANÁLISE CONTENDO A ANASTOMOSE AO CENTRO (A) E APÓS A ABERTURA LONGITUDINAL DO SEGMENTO PELA BORDA MESENTÉRICA, OS DOIS SEGMENTOS PARA TESTE DE RESISTÊNCIA TÊNซิล, PARA EXAME HISTOLÓGICO E MORFOMÉTRICO (B) .....	23
FIGURA 13 – SEGMENTO DE CÓLON ABERTO COM A ANASTOMOSE AO CENTRO PARA TESTE DE RESISTÊNCIA TÊNซิล (A) E DEMONSTRANDO ULCERAÇÃO DE MUCOSA EM UM DOS SEGMENTOS DESIGNADO PARA EXAME HISTOLÓGICO E MORFOMÉTRICO (B) .....	23
FIGURA 14 – EXPOSIÇÃO DA VEIA CAVA INFERIOR DURANTE A REOPERAÇÃO (A) E COLETA COM SERINGA DE 1 ML DE SANGUE DA VEIA CAVA INFERIOR PARA DOSAGEM QUANTITATIVA DO TNF- $\alpha$ (B) .....	24
FIGURA 15 – SISTEMA DIGITALIZADOR DE IMAGENS .....	27
FIGURA 16 – TENSÍMETRO DE FORÇA CONSTANTE ACOPLADO A DINAMÔMETRO DIGITAL (A) E MAIOR DETALHE DO DINAMÔMETRO (B) .....	28
FIGURA 17 – POSICIONAMENTO DO SEGMENTO DE CÓLON A SER TESTADO NO TENSÍMETRO COM A LINHA DE ANASTOMOSE AO CENTRO (A) E (B) .....	29
FIGURA 18 – SEGMENTO DE CÓLON JÁ POSICIONADO NO TENSÍMETRO (A) E ROTURA DO SEGMENTO DE CÓLON TESTADO (B) .....	29
FIGURA 19 – KIT ELISA – IBL – PARA DOSAGEM DE TNF- $\alpha$ ESPECÍFICO PARA RATOS, COM PLACA DE 96 POÇOS .....	31
FIGURA 20 – LAVADORA E LEITORA AUTOMÁTICAS DE ELISA (THERMO PLATE) DO LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA .....	31
FIGURA 21 – AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA DA CICATRIZAÇÃO DE ANASTOMOSE COLÔNICA TÉRMINO-TERMINAL (PICRO-SIRIUS) .....	48
FIGURA 22 – AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA DAS LÂMINAS CORADAS PELO PICRO-SIRIUS COM LUZ POLARIZADA. O COLÁGENO TIPO I TEM COLORAÇÃO ALARANJADA E O TIPO III ESVERDEADA, SUBGRUPOS E3 E C3 .....	49

FIGURA 23 – AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA DAS LÂMINAS CORADAS PELO PICO-SIRIUS COM LUZ POLARIZADA. O COLÁGENO TIPO I TEM COLORAÇÃO ALARANJADA E O TIPO III ESVERDEADA, SUBGRUPOS E7 E E14 .....	50
FIGURA 24 - IMUNOHISTOQUÍMICA. AUMENTO: 400X. PRESENÇA DE HISTIÓCITOS PRODUTORES DE TNF- $\alpha$ EM ANIMAIS DO SUBGRUPO C3 .....	52
FIGURA 25 - IMUNOHISTOQUÍMICA. AUMENTO: 400X. PRESENÇA DE HISTIÓCITOS PRODUTORES DE TNF- $\alpha$ (SETAS) EM ANIMAL DO SUBGRUPO E3 .....	53
FIGURA 26 – PRODUÇÃO TECIDUAL DO TNF- $\alpha$ POR MEIO DE IMUNOHISTOQUÍMICA EM ANIMAIS DOS SUBGRUPOS C3 E E3. AUMENTO DE 40X E 400X, DEMONSTRANDO QUE NÃO HOUVE DIFERENÇA ENTRE OS SUBGRUPOS .....	54
FIGURA 27 – PRODUÇÃO TECIDUAL DO TGF- $\beta$ POR MEIO DE IMUNOHISTOQUÍMICA EM ANIMAIS DOS SUBGRUPOS C14 E E14. AUMENTO 400 X .....	55

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – ÓBITOS .....	36
GRÁFICO 2 – ALTERAÇÃO DE PESO APÓS ADMINISTRAÇÃO DE INFLIXIMABE OU SOLUÇÃO NaCl A 0,9% .....	38
GRÁFICO 3 – ALTERAÇÃO DE PESO APÓS CIRURGIA .....	39
GRÁFICO 4 – RESISTÊNCIA TÊNซิล DA ANASTOMOSE .....	42
GRÁFICO 5 – DISPOSIÇÃO DE FIBROBLASTOS .....	43
GRÁFICO 6 – PRESENÇA DE ABSCESSO .....	44
GRÁFICO 7 – CONCENTRAÇÃO DO COLÁGENO EM PIXELS % À HISTOMORFOMETRIA .....	47
GRÁFICO 8 – PRODUÇÃO DO TNF- $\alpha$ SÉRICO NOS GRUPOS CONTROLE, EXPERIMENTAL E “REFERÊNCIA” (pg/mL).	52

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – FORÇA TÊNซิล EM NEWTON (N) DA ANASTOMOSE COLÔNICA DE CADA ANIMAL AFERIDA IMEDIATAMENTE APÓS A EUTANÁSIA CONFORME OS GRUPOS EXPERIMENTAL (E), FORMADOS PELOS SUBGRUPOS E3, E7, E14, E CONTROLE (C) FORMADO PELOS SUBGRUPOS C3, C7 e C14 .....	41
TABELA 2 – FREQUÊNCIAS DA QUANTIDADE DE FIBROBLASTOS.....	43
TABELA 3 – FREQUÊNCIAS DA MATUREÇÃO DE FIBROBLASTOS.....	44
TABELA 4 – FREQUÊNCIAS DE FIBROSE .....	44
TABELA 5 – FREQUÊNCIAS DE INFILTRADO MONONUCLEAR .....	45
TABELA 6 – FREQUÊNCIAS DE INFILTRADO POLIMORFONUCLEAR.....	45
TABELA 7 – FREQUÊNCIAS DE VASCULARIZAÇÃO .....	45
TABELA 8 – FREQUÊNCIAS DE ULCERAÇÃO .....	45
TABELA 9 – MÉDIA, MEDIANA, DESVIO PADRÃO E VARIÂNCIA DA HISTOMORFOMETRIA DO COLÁGENO DAS ANASTOMOSES COLÔNICAS, UTILIZANDO-SE A COLORAÇÃO COM PICRO-SIRIUS .....	46

## RESUMO

A cicatrização das anastomoses do tubo digestivo depende de variáveis, como técnica cirúrgica, fatores locais e sistêmicos, condições gerais do paciente e uso de agentes farmacológicos, com conseqüente variação na frequência de deiscência das anastomoses. Drogas antiinflamatórias podem prejudicar a cicatrização das anastomoses, interferindo na etapa inflamatória da cicatrização. O objetivo deste estudo experimental foi avaliar os possíveis efeitos do infliximabe, um anticorpo monoclonal quimérico, humano-murino, com ação anti-TNF- $\alpha$ , no processo de cicatrização de anastomoses colônicas em ratos. Foram utilizados 60 ratos (*Rattus norvegicus*), distribuídos aleatoriamente em dois grupos de 30 cada. Ambos os grupos foram posteriormente randomizados em três subgrupos de dez animais, de acordo com o dia pós-operatório (DPO) de eutanásia (3°, 7° ou 14°). No grupo de estudo (E), foi administrado infliximabe na dose de 5 mg/kg, via subcutânea, 48 horas antes da operação e no grupo controle (C) foi administrado solução de NaCl a 0,9%, volume equivalente. Após laparotomia, os animais de ambos os grupos foram submetidos à secção do cólon e imediata anastomose término-terminal. Os animais foram reoperados no 3°, 7° e 14° DPO. Realizado ressecção de um segmento colônico de 4 cm, contendo a anastomose e dividido longitudinalmente em dois segmentos semelhantes. Um dos segmentos foi ao acaso designado para teste de resistência tênsil e outro para estudo histológico e de deposição do colágeno, após processamento e coloração com hematoxilina-eosina, tricrômico de Masson e *Picro-Sirius*. A deposição do colágeno foi avaliada por digitalização de imagens e calculada através do *software* Image J. Foi coletado sangue, por punção, da veia cava inferior para quantificação do TNF- $\alpha$  sérico, pelo método ELISA, utilizando-se um kit específico para ratos. A concentração tecidual do TNF- $\alpha$  foi avaliada por imunohistoquímica. Os animais que receberam o infliximabe perderam peso nas 48 horas entre a administração da droga e a operação, enquanto que no grupo controle os animais ganharam peso no mesmo período. Houve três óbitos no grupo estudo e um no grupo controle, sem que esta diferença tenha significância estatística e que se possa relacionar com o uso do infliximabe. Todos os animais, de ambos os grupos perderam peso no pós-operatório, porém observou-se que no 14° DPO os ratos recuperaram o peso perdido. A resistência tênsil das anastomoses foi maior, estatisticamente significativa, no grupo estudo, no 14° DPO, enquanto não houve diferenças significantes no 3° e 7° dias. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos na avaliação histológica bem como na histomorfométrica. Na avaliação do TNF- $\alpha$  sérico por ELISA houve diferença estatisticamente significativa entre os subgrupos C3 e E3 (3° DPO) e entre o grupo de referência e C3. Não houve diferença no TNF- $\alpha$  tecidual avaliado por imunohistoquímica. O TGF- $\beta$  tecidual foi maior no subgrupo E14 quando comparado com o subgrupo C14 (14° DPO). O estudo sugere que a administração subcutânea do infliximabe foi efetiva, exequível e segura. Nas condições que foi realizado este estudo o infliximabe interferiu na fase inflamatória caracterizando-se por redução na concentração de colágeno e melhorou a resistência tênsil das anastomoses na fase de remodelação.

## ABSTRACT

It has been well established that several factors affect healing of colonic anastomosis, resulting in the rise of morbidity and mortality rate. Drugs such steroids and anti-inflammatory non-steroids impair anastomotic healing, by affecting the inflammatory step. The aim of this experimental study was to evaluate the effects of infliximab, the mouse/human IgG1 chimeric anti-TNF- $\alpha$  monoclonal antibody, on the healing process of colonic anastomosis in rats. Sixty male Wistar rats were used, and were randomized in two groups of 30 each. Both groups were further randomized in to three sub-groups, each of ten animals, according with the post-operative day of sacrifice (third, seventh and fourteenth). The study group was subjected to infliximab subcutaneously administered at a dose of 5 mg/kg of body weight and the control group was subjected to 0.9% sodium chloride (NaCl) solution subcutaneously administered at volume equivalent dose to infliximab, 48 hours prior to surgery. Both groups underwent to colonic section followed by an immediate end-to-end anastomosis. Lots of five animals were killed in each session on post-operative days 3, 7 and 14. A colonic segment of 4 cm containing the anastomosis in its mid portion was resected, and divided longitudinally in two. One of these segments were stained with hematoxylin-eosin, Masson's trichomic and picrosirius red and examined by light microscopy. Deposition of collagen was evaluated by image digitalization and calculated by specific software (Image J). In the other segment of the colon, anastomotic breaking strengths were assessed using a tensiometer. Blood samples were collected from the inferior vena cava and underwent an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for quantitative detection of rat TNF- $\alpha$ . Immunohistochemistry techniques were used for tissue evaluation of TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ . There were 3 deaths in the infliximab group and one in the saline group and there was no statistical significance in this difference and we cannot state the deaths as related to infliximab. All animals that received infliximab lost weight prior to operation while all whom received saline solution gained weight in the same period of time. Animals of both groups lost weight in post-operative period but by the fourteenth post-operative day there were a tendency to recover the lost weight. The anastomosis breaking strength was significantly higher in the infliximab group by the fourteenth post-operative day while there were no differences by days 3 and 7. There were no significant differences between the groups in the histology and morphometric evaluation. There were statistic significant difference between infliximab and control groups on post-operative day 3 and reference group and control group on post-operative day 3, when serum TNF- $\alpha$  was measured by ELISA. There were no significant differences in tissue TNF- $\alpha$  evaluation by immunohistochemistry. TGF- $\beta$  concentrations were higher in infliximab group on post-operative day 14 as compared with controls. This study suggests that the subcutaneous administration of the infliximab was effective, feasible and safe. In the conditions this research was done, the infliximab interfered in the inflammatory step of anastomotic healing characterized by reduction on collagen concentration and improvement in anastomotic breaking strengths in collagen remodeling step.



# **1- INTRODUÇÃO**

# 1- INTRODUÇÃO

A realização de anastomoses no aparelho digestivo é utilizada no tratamento de diversas doenças há mais de um século. As complicações das anastomoses colônicas são potencialmente devastadoras, com altas taxas de morbidade e mortalidade, apesar dos avanços tecnológicos nos últimos 50 anos. Nas anastomoses colorretais, particularmente, a ocorrência de deiscência e vazamento, que pode variar de 3 a até 30%, tem maior gravidade pelo risco de ocasionar peritonites fecais (SCHIEDECK *et al.*, 2000; TOCCHI *et al.*, 2000; NESBAKKEN *et al.*, 2001; REGADAS *et al.*, 2005; FERREIRA *et al.*, 2006; KONSTANTINIDIS *et al.*, 2006; PLATELL *et al.*, 2006; PARRA-MEMBRIVES *et al.*, 2007; ORTIZ *et al.*, 2007).

A cicatrização das anastomoses do tubo digestivo depende de variáveis, como técnica cirúrgica, infecção, fatores locais e sistêmicos, condições gerais do paciente e uso de agentes farmacológicos, com conseqüente variação na frequência da deiscência das anastomoses (HAWLEY, 1973; IRVIN & HUNT, 1974; CARRICO *et al.*, 1984; OLIVEIRA, 1989; SOUSA, 1991; SOUSA, 1994; ALMEIDA, 2006; FERREIRA *et al.*, 2006; PLATELL *et al.*, 2006; KOSTANTINIDIS *et al.*, 2006; PARRA-MEMBRIVES *et al.*, 2007).

Pela ação de vários fatores sintetizados por macrófagos, plaquetas, células endoteliais e linfócitos T, a secção do cólon seguida de anastomose, desencadeia uma seqüência organizada e complexa de eventos celulares e bioquímicos que resultam na reparação do tecido (CLARK, 1996; STEED, 1997).

Os principais eventos biológicos da cicatrização podem, didaticamente, ser divididos em três fases distintas, porém, 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 provém do latim *enflamare*, que significa “atear fogo”. A origem da palavra provém de um símbolo hieroglífico de um papiro egípcio datado de 1500 a.C., representado por um braseiro, que foi traduzido como inflamação (SIQUEIRA JR. & DANTAS, 2000).

Inflamação pode ser definida como reação da micro circulação induzida por lesão aos tecidos, com a conseqüente movimentação de 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).

A inflamação normal é um processo intrínseco da cicatrização tecidual, daí a máxima: *Sem inflamação não haverá cicatrização* (CARRICO *et al.*, 1984).

Segue-se de imediato à resposta inflamatória normal expressa pelo aumento da permeabilidade capilar, aumento dos neutrófilos periféricos, migração de monócitos, transformação em macrófagos, fagocitose (LEIBOVICH & ROSS, 1976), liberação local de citocinas, como as interleucinas 1 e 6 (Il-1 e Il-6), o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e fatores de crescimento  $\alpha$ -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).

Drogas com atividade antiinflamatória, como os corticosteróides e antiinflamatórios não esteróides, têm despertado o interesse de pesquisadores, devido a seu potencial de interferência no processo cicatricial (SOUSA, 1989; EUBANKS *et al.*, 1997; SIRIMARCO, 2000; GOGIA 2003; MANTZOROS *et al.*, 2004, 2006).

Na fase proliferativa os fibroblastos e as células endoteliais têm um papel relevante, migrando dos tecidos circunjacentes e de vênulas intactas próximas à anastomose. Com a ativação de macrófagos, das células endoteliais, e a expressão do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), formam-se novos capilares pelo processo de angiogênese, iniciando-se a formação de tecido de granulação. Os fibroblastos desenvolvem grande capacidade sintetizadora de colágeno, proteína constitutiva das fibras do tecido conjuntivo dos metazoários em geral. 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). A quantidade de colágeno aumenta a partir do terceiro dia na evolução da cicatrização e, em cerca de 14 dias, suas fibras passam a predominar na matriz extracelular. O colágeno tipo I predomina em relação ao colágeno tipo III e a matriz de colágeno vai sendo remodelada, por meio de aumento e estabilização de suas ligações

transversais, tornando-se dessa forma mais resistente. Qualquer alteração em uma fase pode resultar no retardo ou falha da cicatrização da anastomose (SIQUEIRA JR. & DANTAS, 2000; REYS, 2004).

O colágeno, glicoproteína composta por três cadeias polipeptídicas em conformação de tripla hélice, é constituído pelos 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 da hidroxiprolina no tecido cicatricial possibilita estimar o conteúdo de colágeno na área da anastomose.

Em condições normais, na ausência de infecção ou de qualquer outro fator prejudicial, a cicatrização de anastomoses colônicas é mais rápida em relação a outras anastomoses do trato digestivo, considerando-se a deposição de colágeno (JÖNSSON *et al.*, 1985; RAVO *et al.*, 1988; ALMEIDA, 2006).

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).

As citocinas, são proteínas responsáveis pela modulação da função 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. Citocinas exercem a sua função sobre diferentes tipos celulares, propriedade

esta denominada de pleiotropismo. 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- $\alpha$ ) é uma citocina presente na inflamação, com atividade pró-inflamatória, 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- $\alpha$  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- $\alpha$  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- $\alpha$  na cicatrização ainda não está totalmente esclarecido (BETTINGER *et al.*, 1994; STREIT *et al.*, 2006). Citocinas pró-inflamatórias como o TNF- $\alpha$ , 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).

O infliximabe é um anticorpo monoclonal quimérico, humano-murino, da classe IgG1, que se liga com alta afinidade a formas solúveis e transmembranais de TNF- $\alpha$ , mas não à linfoxina (TNF- $\beta$ ). O infliximabe inibe a atividade funcional do TNF- $\alpha$  em vários tipos de bioensaios *in vitro*

(KNIGHT *et al.*, 1993; SIEGEL *et al.*, 1995). *In vivo*, o infliximabe forma rapidamente complexos estáveis com o TNF- $\alpha$ , um processo paralelo à perda da bioatividade do TNF- $\alpha$  (SIEGEL *et al.*, 1995; SCALLON *et al.*, 1995).

Estudos clínicos com o infliximabe, feitos pelo laboratório Schering-Plough, relatam comprometimento de cicatrização como um efeito indesejável pouco comum (GUIA DE ADMINISTRAÇÃO DO REMICADE<sup>®</sup>), porém um estudo recente sugere melhora na cicatrização de feridas crônicas com o uso tópico do infliximabe (STREIT *et al.*, 2006).

O infliximabe 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-infliximabe) 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 infliximabe no tratamento da doença de Crohn, aumenta em quatro vezes o risco de infecções por microrganismos oportunistas (ABREU, 2006) e tem uma taxa de mortalidade de 1%, na maioria das vezes, devido a infecções (COLOMBEL, *et al.*, 2004).

A utilização do infliximabe é de grande interesse clínico 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 em uso do infliximabe. Em decorrência disto o estudo dos efeitos potenciais do anticorpo monoclonal infliximabe na cicatrização das anastomoses torna-se importante por suas implicações práticas.

## **2- OBJETIVO**



## **2- OBJETIVO**

Avaliar os possíveis efeitos do anticorpo monoclonal quimérico, humano-murino, o infliximabe, na cicatrização de anastomoses colônicas em ratos.

## **3 - MATERIAL E MÉTODO**

## **3 – MATERIAL E MÉTODO**

O estudo foi realizado nos Laboratórios de Cirurgia Experimental da Área de Clínica Cirúrgica, de Patologia e de Imunopatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília – UnB e no Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública - Disciplina de Patologia Geral - da Universidade Federal de Goiás - UFG.

O protocolo da pesquisa foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal – CEUA, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília – UnB em 31 de outubro de 2006 e pela Área de Clínica Cirúrgica da Faculdade de Medicina (FM) da Universidade de Brasília – UnB.

Na redação do trabalho foram adotadas as Normas para Apresentação de Documentos Científicos do Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social (IPARDES) da Universidade Federal do Paraná e da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

Na editoração foram utilizados os *softwares* IPARDES.DOT e o Microsoft Word®.

### **3.1- ANIMAL DE EXPERIMENTAÇÃO**

Foram utilizados sessenta ratos, *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, machos, aparentemente saudáveis, com peso corporal inicial entre 215 e 390 g e 60 e 90 dias de vida.

Os animais foram fornecidos pelo Laboratório Bioagri Ltda, Planaltina – DF, alimentados com dieta padrão de laboratório (ração peletizada para pequenos roedores marca Biotec, modelo Biobase Nutrição Animal – (Basequímica Produtos Químicos Ltda – Águas Frias, SC) e água a vontade.

### **3.2- DISTRIBUIÇÃO E ALOCAÇÃO DOS ANIMAIS EM GRUPOS**

Os animais de experimentação foram distribuídos em dois grupos com trinta ratos cada, designados estudo (E) e controle (C).

#### **Grupo E**

Administrado dose única de 5mg/Kg de infliximabe (Remicade<sup>®</sup> - Ind. Química e Farmacêutica Schering-Plough S.A., Rio de Janeiro - RJ), via subcutânea (dorso à direita), 48 h antes da operação.

Preparo da droga:

O conteúdo de um frasco com 100 mg de pó liofilizado do infliximabe foi dissolvido em 10 ml de água destilada. Em seguida, a solução foi diluída em 90 ml de solução de NaCl a 0,9%, perfazendo um volume total de 100 ml.

#### **Grupo C**

Administrado dose única, volume equivalente, de solução de NaCl a 0,9% (Equiplex Indústria Farmacêutica Ltda., Goiânia – GO), via subcutânea (dorso à direita), 48 h antes da operação.

## **Subgrupos**

Os animais dos grupos E e C foram distribuídos em três subgrupos de dez animais, denominados E3, E7 e E14 e C3, C7 e C14, correspondendo, respectivamente, ao 3º, 7º e 14º dia pós-operatório em que foram submetidos a reoperação e eutanásia.

Os animais foram distribuídos de forma aleatória, efetivada por sorteio, uma a uma, por seis fichas semelhantes, identificadas pelas siglas E3, C3, E7, C7, E14 e C14.

Ao final do sorteio para determinação dos subgrupos, os animais tiveram a sua cauda marcada com canetas coloridas de retroprojeter para identificação.

Após a marcação, os animais tiveram seus pesos aferidos em balança eletrônica, modelo AS5500 C (Marte Balanças e Aparelhos de Precisão Ltda. – São Paulo, SP) e, em seguida, receberam a solução de infliximabe ou a solução de NaCl.

As operações foram realizadas em sessões, por lotes de cinco animais, 48 horas após receberem a medicação ou o placebo.

## **3.3- PRÉ-OPERATÓRIO**

Os animais permaneceram no alojamento de animais do Laboratório de Cirurgia Experimental, confinados em gaiolas, em lotes de cinco, com regime de doze horas de luz artificial (06h00min a 18h00min) e doze horas de escuro, recebendo dieta padrão de laboratório e água à vontade, após período de vinte dias de aclimatação.

Jejum pré-operatório de seis horas.

Imediatamente antes da indução anestésica, tiveram seus pesos aferidos e anotados.

### **3.4- ANESTESIA E TÉCNICA OPERATÓRIA**

Os procedimentos anestésicos e cirúrgicos nos animais foram supervisionados por médico-veterinário do Laboratório de Cirurgia Experimental e estão de acordo com os princípios éticos emanados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

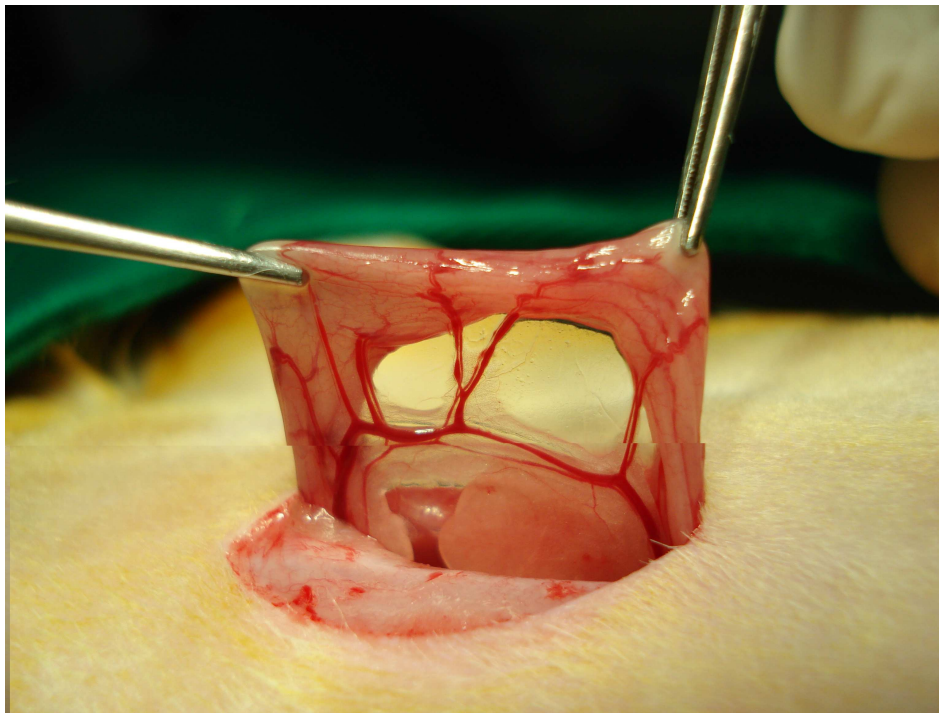
As operações foram realizadas com material cirúrgico limpo, desinfetado com solução de glutaraldeído ( $C_5H_8O_2$ ) a 2% antes de cada sessão.

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados pelo mesmo cirurgião, utilizando-se técnica asséptica e obedecendo a seguinte padronização de etapas (OLIVEIRA, 1989):

- Anestesia inalatória por éter etílico - ( $C_2H_5$ )<sub>2</sub>O - (VETEC – Vetec Química Fina Ltda. Duque de Caxias - RJ), seguido de anestesia com xilazina (Calmun, Agener União Saúde Animal - União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu-Guaçu – SP) na dose de 10 mg/kg associada à quetamina (Francotar, Virbac Saúde Animal – Eurofarma Laboratórios Ltda., São Paulo – SP) na dose de 100 mg/kg, administrados via intramuscular, na face medial da coxa direita do animal, por médico veterinário anestesista. No trans-operatório, doses adicionais de anestésico foram administradas, conforme a necessidade (MEZADRI *et al.*, 2004).

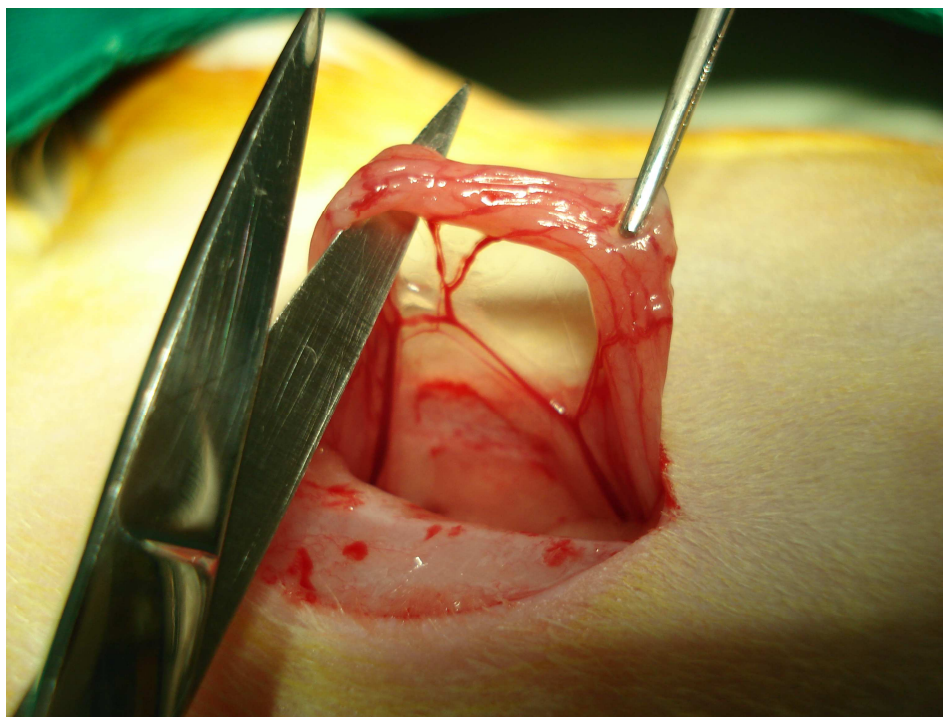
- Imobilização do animal em decúbito dorsal sobre placa de madeira revestida com Fórmica<sup>®</sup> e fixação de seus membros com esparadrapo;
- Tricotomia da parede abdominal anterior;
- Anti-sepsia da pele do abdome com solução degermante de iodo-polivinilpirrolidona e álcool a 70%;
- Laparotomia mediana de três cm de extensão a um cm da genitália;
- Exposição do cólon distal (FIGURA 1);

FIGURA 1 – EXPOSIÇÃO DO CÓLON A SER OPERADO.



- Malaxação divergente caso o segmento a ser operado apresentasse conteúdo fecal;
- Secção cólica: 2,5 cm proximal à reflexão peritoneal, com tesoura reta (FIGURA 2);

FIGURA 2 – SECÇÃO DO CÓLON COM TESOURA RETA.



- Reconstrução do trânsito colônico com anastomose término-terminal em plano único, com sutura contínua, englobando todas as camadas da parede intestinal, com fio de polipropileno 6-0 e agulha cilíndrica de 1,3 cm, (Prolene<sup>®</sup>, ETHICON – São José dos Campos – SP) (FIGURAS 3 e 4);



- Depois de completado a anastomose realizou-se teste de permeabilidade da anastomose por injeção de solução de NaCl a 0,9%, com seringa de 1 ml, sob pressão, na luz intestinal (FIGURA 5);

FIGURA 3 – ANASTOMOSE TÉRMINO-TERMINAL COM PONTOS DE REPARO (A) E ANASTOMOSE DA BORDA POSTERIOR COM SUTURA CONTÍNUA (B).

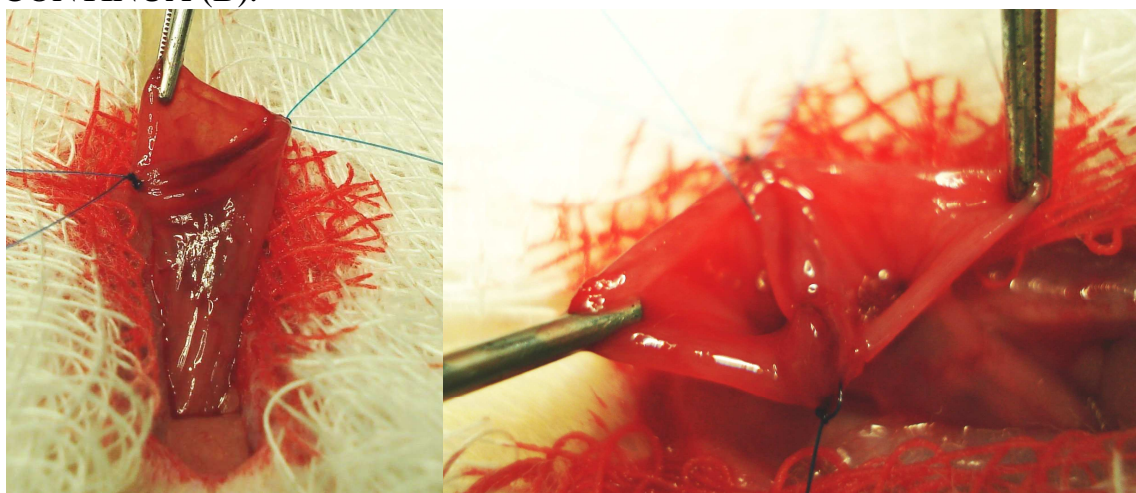


FIGURA 4 – ANASTOMOSE DA BORDA POSTERIOR (A) E ANASTOMOSE COMPLETA COM SUTURA DA BORDA ANTERIOR DO CÓLON (B).

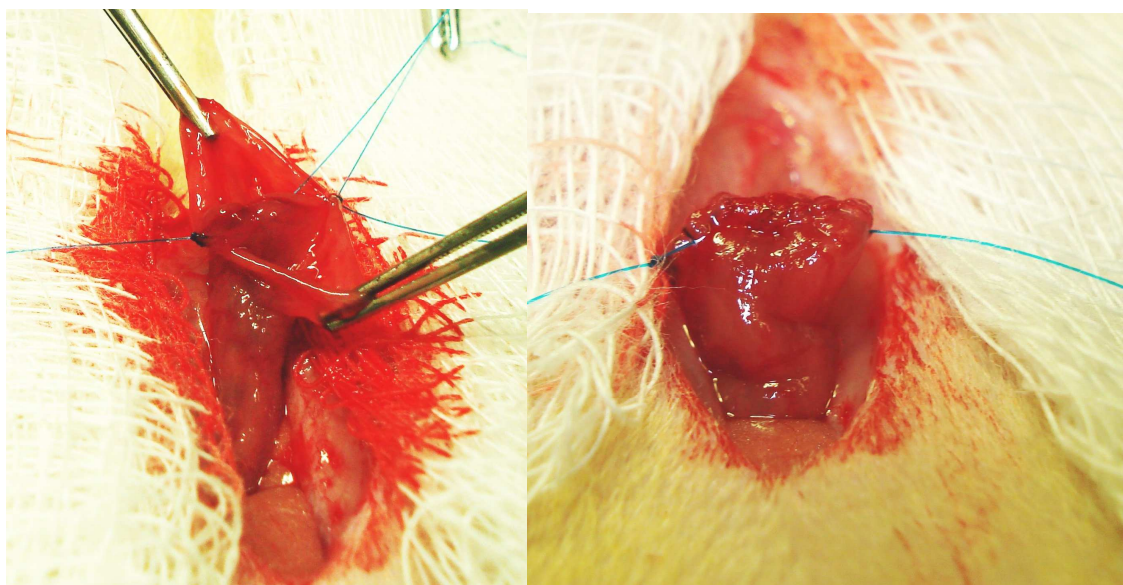
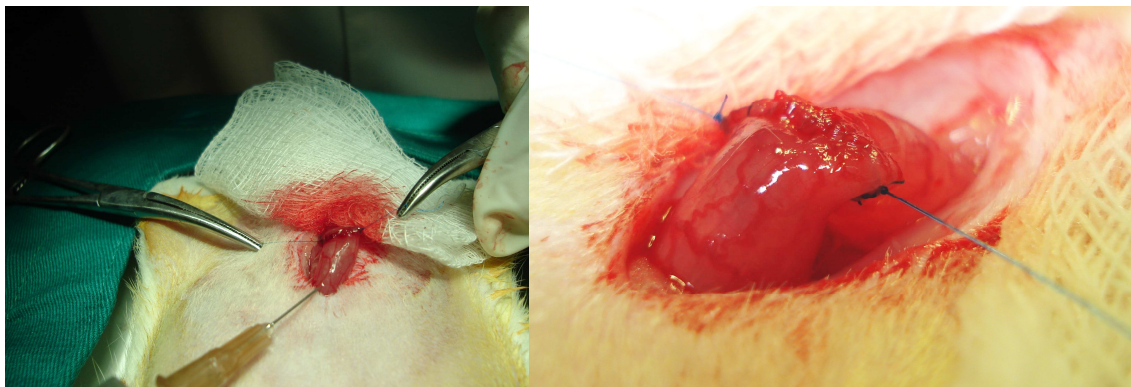


FIGURA 5 – INJEÇÃO DE SOLUÇÃO DE NaCl A 0,9% NA LUZ DO CÓLON PARA TESTAR A IMPERMEABILIDADE DA ANASTOMOSE (A) E DEMONSTRANDO QUE NÃO HOUVE VASAMENTO DA SOLUÇÃO DE NaCl A 0,9% PELA ANASTOMOSE (B).



- Síntese da parede abdominal em dois planos: o primeiro com sutura contínua simples interessando peritônio, músculo e aponeurose na linha média e o segundo com sutura contínua em barra grega interessando a pele – ambos com fio de polipropileno 5-0 e agulha cilíndrica de 1,5 cm, (Prolene<sup>®</sup>, ETHICON – São José dos Campos – SP) (FIGURAS 6 E 7).

FIGURA 6 – PRIMEIRO PLANO DE FECHAMENTO DA PAREDE ABDOMINAL (MÚSCULO APONEURÓTICO), SUTURA CONTÍNUA COM FIO DE POLIPROPILENO 5-0 (A) E SUTURA EM BARRA GREGA DA PELE COM O MESMO FIO (B).

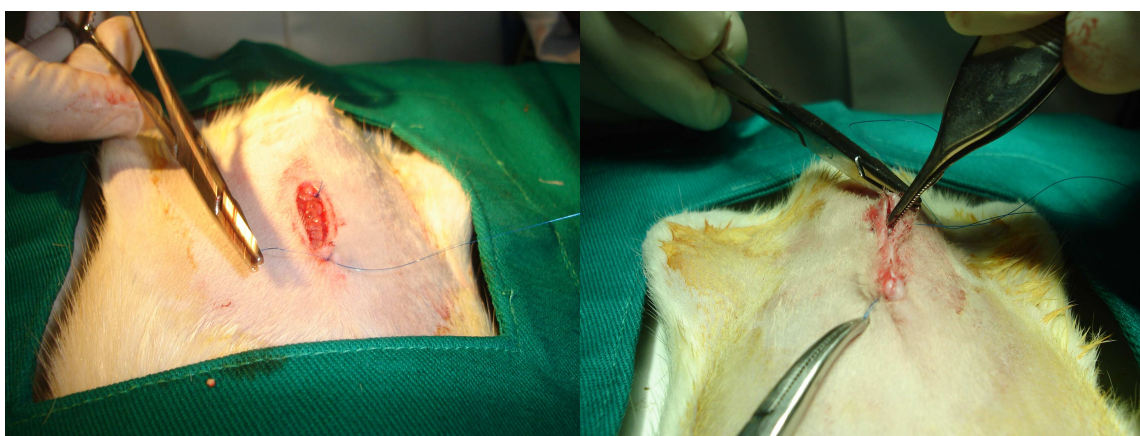


FIGURA 7 – FIOS DE POLIPROPILENO, 5-0 E 6-0, UTILIZADOS NO FECHAMENTO DA PAREDE E DA ANASTOMOSE (A) E COMPLETADA A SUTURA EM BARRA GREGA DA PELE (B).



### 3.5 - EVOLUÇÃO PÓS-OPERATÓRIA

Após a recuperação anestésica, os animais foram colocados em gaiolas em grupos de cinco, com água e ração a vontade. Analgesia pós-operatória com morfina na dose de 5 mg/kg via subcutânea a cada 8 horas, nas primeiras 24 horas. As maravalhas das gaiolas foram esterilizadas em autoclave e trocadas duas vezes por semana (FIGURAS 8 e 9). Os animais foram observados, diariamente, quanto ao aparecimento das seguintes alterações: apatia, eriçamento de pêlos, diarreia, distensão abdominal, hematomas ou sinais inflamatórios na ferida cirúrgica da parede abdominal. Cada um desses indicadores foi analisado e classificado em escores: (0) ausente; (+) leve; (++) moderado; (+++) marcante; e (+++++) intenso.

FIGURA 8 – ALOJAMENTO DOS ANIMAIS E GAIOLAS COM ÁGUA E RAÇÃO *AD LIBITUM* (A) E (B).



FIGURA 9 – RÓTULO DE IDENTIFICAÇÃO DAS GAIOLAS (A) E GAIOLA COM CINCO ANIMAIS NO PÓS-OPERATÓRIO (B).

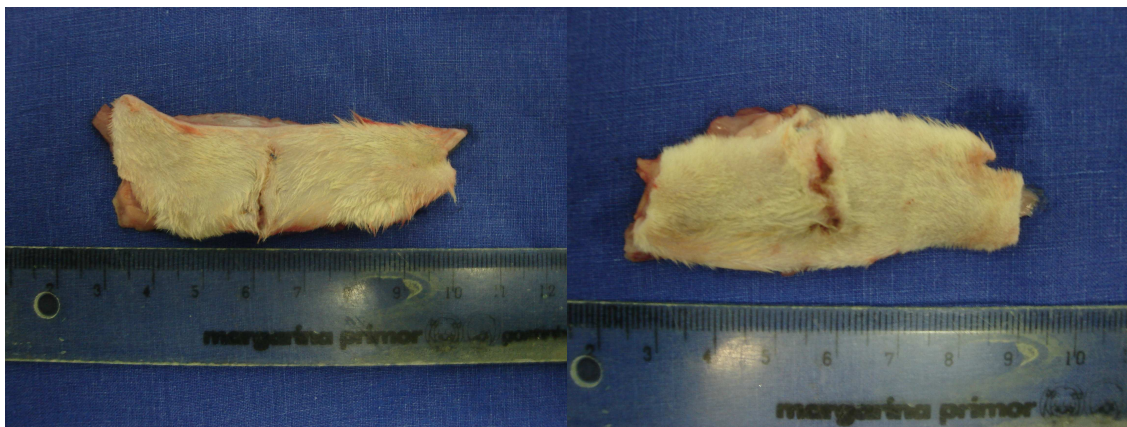


Em caso de óbito, os animais foram submetidos a exame *post mortem* por dois examinadores independentes que desconheciam a que grupo ou subgrupo o animal pertencia e não foram repostos.

### 3.6- REOPERAÇÃO E ANÁLISE OPERATÓRIA

- Os animais sobreviventes foram reoperados nos dias previamente determinados (3º, 7º e 14º dias).
- Antes da indução anestésica tiveram seus pesos novamente aferidos e anotados.
- Anestesia como descrito previamente.
- Após a anestesia, foi ressecada uma área retangular da parede abdominal de cinco por seis centímetros, englobando a cicatriz da laparotomia anterior (FIGURA 10).

FIGURA 10 – SEGMENTOS DE PAREDE ABDOMINAL CONTENDO A LINHA DE SUTURA AO CENTRO (A) E (B).



- Exame da cavidade peritoneal, para análise das seguintes ocorrências: aderências, obstrução intestinal mecânica, abscessos, hematomas, peritonite, deiscência ou vazamento da anastomose. Cada indicador foi classificado em escores: (0) ausente; (+) leve; (++) moderado; (+++) marcante; e (++++) intenso (FIGURA 11).

FIGURA 11 – CAVIDADE PERITONEAL EXPOSTA PARA ANÁLISE, APÓS A RETIRADA DO SEGMENTO DE PAREDE (A) E (B).

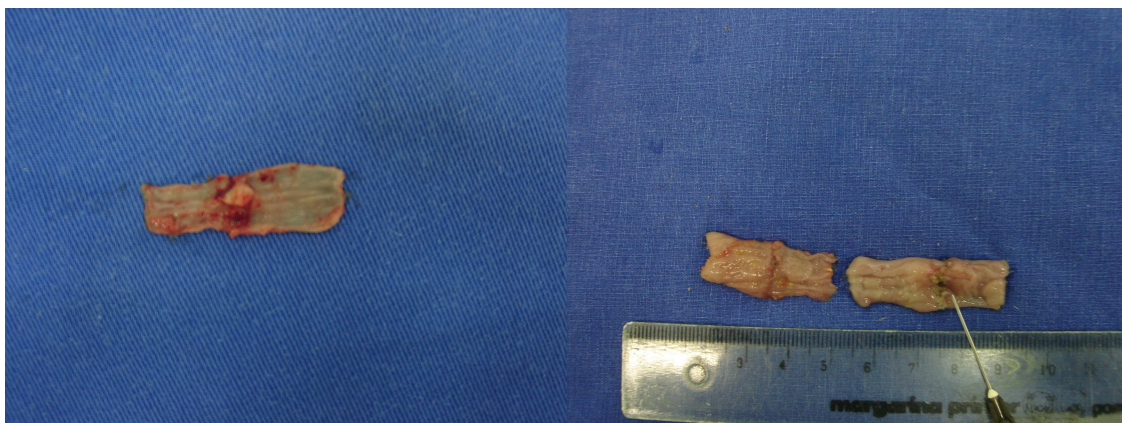


- Ressecção de segmento intestinal de 4 cm contendo a anastomose em sua porção central (FIGURA 12).
- Abertura pela borda mesentérica e fixação em papel cartão, ficando exposta a superfície mucosa. A peça foi seccionada ao meio em sentido longitudinal. Um fragmento escolhido ao acaso foi submetido ao teste de resistência tênsil no dinamômetro padronizado (FIGURA 13).

FIGURA 12 – SEGMENTO DO CÓLON RESSECADO PARA ANÁLISE, CONTENDO A ANASTOMOSE AO CENTRO (A) E APÓS A ABERTURA LONGITUDINAL DO SEGMENTO PELA BORDA MESENTÉRICA. OS DOIS SEGMENTOS PARA TESTE DE RESISTÊNCIA TÊNซิล E PARA EXAME HISTOLÓGICO E MORFOMÉTRICO (B).

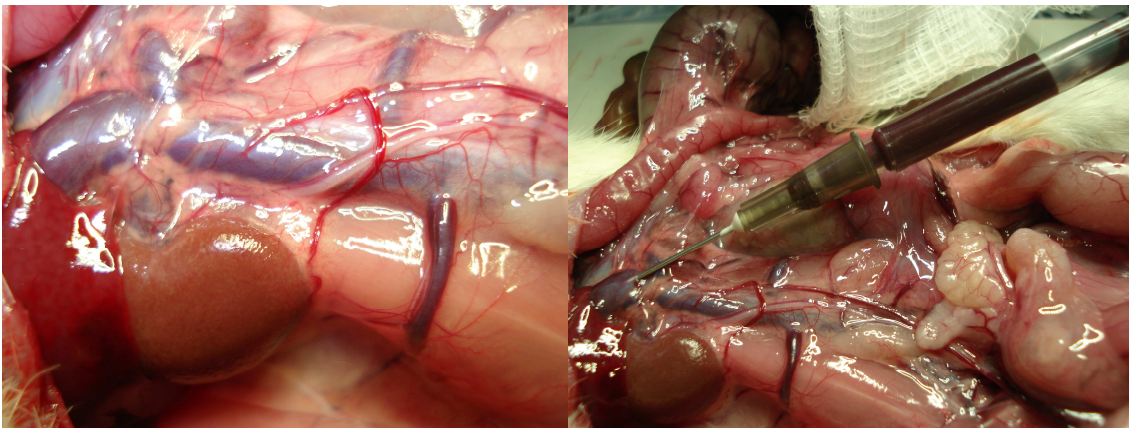


FIGURA 13 – SEGMENTO DE CÓLON ABERTO COM A ANASTOMOSE AO CENTRO PARA TESTE DE RESISTÊNCIA TÊNซิล (A) E SEGMENTOS DE CÓLON ABERTOS COM ANASTOMOSE AO CENTRO, DEMONSTRANDO ULCERAÇÃO DE MUCOSA EM UM DOS SEGMENTOS, PARA EXAME HISTOLÓGICO E MORFOMÉTRICO (B).



- O segundo fragmento foi fixado em formol tamponado a 10% para exame histopatológico, morfométrico e quantificação de colágeno (FIGURA 13).
- Com o animal vivo, realizado coleta de sangue com seringa de 1 ml, por de punção sob visão direta da veia cava inferior, centrifugação, separação do soro e congelamento a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior dosagem de  $\text{TNF-}\alpha$  (FIGURA 14).

FIGURA 14 – EXPOSIÇÃO DA VEIA CAVA INFERIOR DURANTE A REOPERAÇÃO (A) E COLETA COM SERINGA, DE 1 ML DE SANGUE DA VEIA CAVA INFERIOR PARA DOSAGEM QUANTITATIVA DO  $\text{TNF } \alpha$  (B).



- Em seguida, os animais foram submetidos à eutanásia pela secção da veia cava inferior e abertura da cavidade torácica.



### 3.7- EXAME HISTOLÓGICO E MORFOMETRIA

As peças cirúrgicas, após fixação em formol a 10% foram processadas e coradas pelos métodos de hematoxilina-eosina (HE), tricrômico de Masson e Vermelho da Síria (*Picro-Sirius Red*).

Para análise das condições de cicatrização, os seguintes indicadores foram utilizados:

Fibroblastos: Quantidade

Disposição: horizontalização X enovelamento

Maturação

Fibrose

Vascularização

Infiltrado mononuclear

Infiltrado polimorfo nuclear

Abscesso

Ulceração

- A avaliação histológica da cicatrização foi realizada por microscopia óptica por observador que desconhecia a que grupo ou subgrupo pertencia o material. Cada indicador foi analisado e classificado em escores.

#### **Fibroblastos:**

**Quantidade:** (0) ausente; (+) discreta; (++) moderado; (+++) acentuada.

**Disposição:** horizontalização X enovelamento.

**Maturação:** (0) ausente; (+) discreta; (++) moderado; (+++) acentuada.

**Fibrose:** (0) ausente; (+) discreta; (++) moderado; (+++) acentuada.

**Vascularização:** (0) ausente; (+) discreta; (++) moderado; (+++) acentuada.

**Infiltração mono e polimorfo nuclear:** (0) ausente; (+) infiltração focal; (++) infiltração multifocal; (+++) infiltração difusa.

**Abscesso:** sim X não.

**Úlcera:** (0) ausente; (+) discreta; (++) moderado; (+++) acentuada.

- As lâminas foram examinadas para quantificação da densidade de colágeno e dos elementos da reação inflamatória.

### 3.8 - DEPOSIÇÃO DE COLÁGENO

Análise quantitativa por histomorfometria do colágeno presente nas regiões peri-anastomóticas foi realizada pela avaliação das lâminas coradas pelo *Picro-Sirius*, através de sistema digital de análise de imagens. Observou-se a área total dos campos por microscopia de luz com objetiva de 10X e a análise foi realizada por um observador que desconhecia de que grupo ou subgrupo de animais a lâmina provinha. A captura das imagens foi obtida através de câmera digital Sony S85 (Tóquio – Japão) acoplada a um Microscópio de luz Zeiss Axion Star (Carl Zeiss Vision – Alemanha). O sinal de vídeo foi digitalizado em 8 bits em computador pessoal (*notebook* – HP-Pavilion ze2000). Todas as imagens tiveram uma resolução de 1280 x 960 pixels e foram analisadas através do *software Image J* (Wayne Rasband,

Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA) por observador diferente do que captou as imagens e que desconhecia de que grupo ou subgrupo de animais as imagens provinham (FIGURA 15).

A análise da presença de colágeno, quanto ao aparecimento das formas jovem (tipo III) e madura (tipo I), foi realizada através da coloração de *Picro-Sirius* (Vermelho da Síria) das lâminas contendo a região perianastomótica e leitura das mesmas por microscopia de luz polarizada (JUNQUEIRA, 1979, 1982; MONTES, 1991).

FIGURA 15 – SISTEMA DIGITALIZADOR DE IMAGENS.



### 3.9 - RESISTÊNCIA TÊNซิล DA ANASTOMOSE

Avaliação por análise computadorizada dos dados obtidos em tensiômetro de força constante, com capacidade de tração de 2.500N, máquina de ensaio vertical Versa Test (Mecmesin<sup>®</sup> *Versa Test, United Kingdom*) acoplada a dinamômetro digital AGF (Panambro Indústria Técnica S.A. – SP) de segmento colônico de 4 cm com anastomose central, conservado em solução de NaCl 0,9%, fixado no aparelho por suas bordas livres (FIGURAS 16, 17 E 18).

A velocidade do teste de ruptura foi de 25 mm/min. e o valor de ruptura foi expresso em Newtons (N). O dinamômetro foi aferido antes de cada série de medidas.

FIGURA 16 – TENSIOÛMETRO DE FORÇA CONSTANTE ACOPLADO A DINAMÔMETRO DIGITAL (A) E MAIOR DETALHE DO DINAMÔMETRO (B).



FIGURA 17 – POSICIONAMENTO DO SEGMENTO DE CÓLON A SER TESTADO NO TENSÍMETRO COM A LINHA DE ANASTOMOSE AO CENTRO (A) E (B).



FIGURA 18 – SEGMENTO DE CÓLON JÁ POSICIONADO NO TENSÍMETRO (A) E ROTURA DO SEGMENTO DE CÓLON TESTADO (B).



### 3.10- QUANTIFICAÇÃO DO TNF- $\alpha$

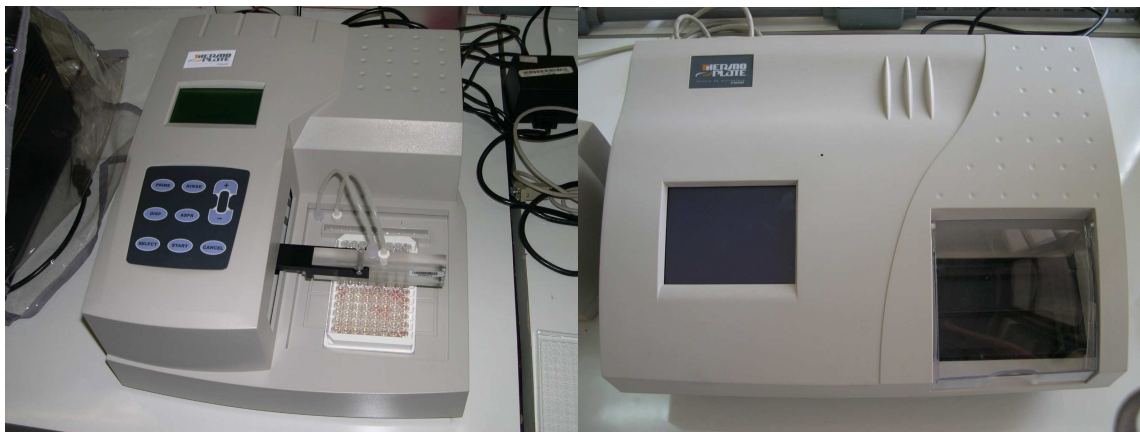
Foram coletados em seringa, 1 ml de sangue, por punção da veia cava inferior e em seguida transferido para um microtubo (Microtimer<sup>®</sup>) com gel separador. Após centrifugação por 5 minutos a 4000 RPM em temperatura ambiente o soro foi transferido para outro micro tubo (Ependorf<sup>®</sup>) e imediatamente armazenado a - 80°C. A dosagem quantitativa do TNF- $\alpha$  no soro de ratos foi realizada por meio de ensaio imunoenzimático – Instant ELISA, de acordo com protocolo referendado (MAURY, 1986; ECONOMOU, *et al.*, 1989; SMITH, *et al.*, 1990; CERDAN, *et al.* 1991). Foi utilizado kit ELISA específico para ratos (IBL<sup>®</sup> - Immuno-Biological Laboratories Co. Ltd., Gunma, Japan) – (FIGURA 19). Todas as instruções e recomendações do fabricante foram seguidas rigorosamente. Foi utilizada lavadora automática Thermo Plate<sup>®</sup> e leitora de ELISA automática Thermo Plate<sup>®</sup> (Thermo Scientific, Inc.; MA, USA) - (FIGURA 20 A e B) . Um painel de amostras séricas randomizadas de ratos aparentemente saudáveis e sem manipulação prévia foi testado para TNF- $\alpha$  e um intervalo referencial de valores obtidos. As amostras controle foram estabelecidas das concentrações de TNF- $\alpha$  de ratos conhecidas. Padrões e amostras foram corridos no mesmo ensaio.

Para confirmação dos dados obtidos através da dosagem quantitativa do TNF- $\alpha$  no soro por ELISA, foi quantificada a produção de TNF- $\alpha$  tecidual por imunohistoquímica utilizando-se os blocos de parafina. A imunomarcagem foi feita com anticorpo anti-TNF- $\alpha$  (anti-rato) – marca Santa Cruz<sup>®</sup>, na diluição 1:75.

FIGURA 19 – KIT ELISA – IBL® – PARA DOSAGEM DE TNF- $\alpha$  ESPECÍFICO PARA RATOS, COM PLACA DE 96 POÇOS.



FIGURA 20 – LAVADORA E LEITORA AUTOMÁTICAS DE ELISA (THERMO PLATE®) DO LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA.



### 3.11 – QUANTIFICAÇÃO TECIDUAL DO TGF- $\beta$

Através de imunohistoquímica, utilizando-se os blocos de parafina, apenas nos subgrupos C14 e E14, foi quantificada a produção do Fator de Crescimento Transformante - beta (TGF- $\beta$ ).

A imunomarcção foi feita com anticorpo anti-TGF- $\beta$  – marca Phamigen<sup>®</sup>, na diluição 1:100.

### 3.12 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram analisados sob o ponto de vista estatístico, utilizando-se os *softwares* SPSS<sup>®</sup> 13.0 (*Special package for social sciences*), SigmaStat<sup>®</sup> 2.0 e Microsoft<sup>®</sup> Excel:

- a) Teste *t* de Student, para comparação entre os dois grupos com distribuição “normal” e com variância semelhante.
- b) Teste de Mann-Whitney.
- c) Teste exato de Fisher para análise de dados não paramétricos (tabelas de contingência).
- d) Teste de Levene para homogeneidade das variâncias e *Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance* (ANOVA).

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



## **4- RESULTADOS**

## **4- RESULTADOS**

### **4.1 - MODELO EXPERIMENTAL**

O modelo experimental permitiu a realização do estudo de acordo com o desenho do mesmo.

### **4.2– EVOLUÇÃO CLÍNICA PRÉ-OPERATÓRIA**

Três animais do grupo experimental apresentaram apatia, dois apresentaram eriçamento de pêlos e um apresentou agitação nas 48 horas entre a administração do infliximabe e o procedimento cirúrgico. Nenhum animal do grupo controle apresentou qualquer alteração neste mesmo período.

Em dois animais do grupo controle (C 3.4 e C 3.10), foi verificado a presença de verminose à abertura do cólon, porém os ratos sobreviveram até a data da eutanásia.

### **4.3 – EVOLUÇÃO CLÍNICA PÓS-OPERATÓRIA**

Um animal do grupo experimental (E 7.1), que deveria ter sido submetido a eutanásia no sétimo dia, apresentou apatia, eriçamento de pêlos, distensão abdominal, diarreia e desidratação, foi encontrado morto na gaiola

no 5º DPO. A observação macroscópica da cavidade abdominal revelou sinais de deiscência anastomótica parcialmente bloqueada por aderências com pequeno extravasamento de conteúdo fecal e sinais de peritonite.

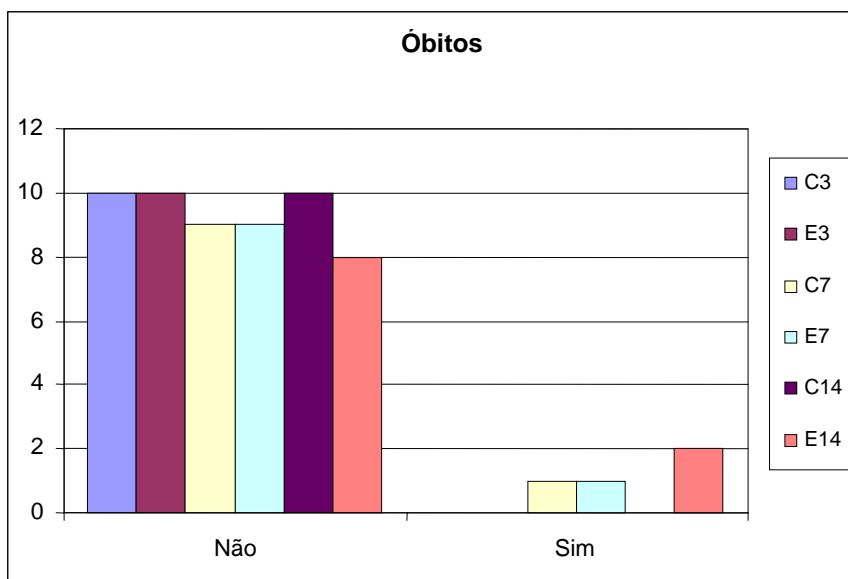
Dois animais do grupo experimental (E 14.5 e E 14. 10) que deveriam se submeter à eutanásia no décimo - quarto dia pós-operatório apresentaram apatia, eriçamento de pêlos e distensão abdominal, morreram no 10º e 7º dia pós-operatório, respectivamente. Em ambos, a observação macroscópica da cavidade abdominal não revelou sinais de deiscência anastomótica, hemorragia, abscesso ou peritonite.

Um animal do grupo controle (C 7.10) que deveria ser submetido a eutanásia no sétimo dia pós-operatório, apresentou apatia, eriçamento de pêlos e distensão abdominal, morreu no 6º dia pós-operatório. O exame macroscópico da cavidade peritoneal mostrou grande quantidade de aderências, distensão do cólon proximal à anastomose e necrose parcial da mucosa colônica no segmento proximal à anastomose, sem sinais de deiscência da anastomose ou de peritonite.

As observações *post mortem* da cavidade peritoneal foram realizadas em conjunto por médico veterinário e médico cirurgião que não participaram das operações e ambos desconheciam a que grupo pertencia os animais. Os animais mortos no pós-operatório não foram repostos.

A mortalidade foi de 10% no grupo experimental e 3,3% no grupo controle, perfazendo uma mortalidade global de 6,66%. Não houve significância estatística entre os grupos ( $p = 0,306$ ) (GRÁFICO 1).

GRÁFICO 1 – ÓBITOS.



$p = 0,306$

C3 – Subgrupo Controle sacrificado no 3º DPO

E3 – Subgrupo Estudo sacrificado no 3º DPO

C7 – Subgrupo Controle sacrificado no 7º DPO

E7 – Subgrupo Estudo sacrificado no 7º DPO

C14 – Subgrupo Controle sacrificado no 14º DPO

E14 – Subgrupo Estudo sacrificado no 14º DPO

Os demais 56 ratos sobreviveram até as datas estabelecidas para a eutanásia, sendo verificado um caso de desidratação (E 14.2) e um caso de sangramento nos olhos e nariz (C 7.2).

Apatia foi verificada em 10 animais do grupo experimental (33,33%) e em 8 animais do grupo controle (26,66%) perfazendo um total de 30%. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudo e controle ( $p = 0,389$ ).

Eriçamento de pêlos foi observado em 9 animais do grupo experimental (30%) e em 8 animais do grupo controle (26,66%), perfazendo um total de 28,33%, também sem que esta diferença seja estatisticamente significativa ( $p = 0,500$ ).

Distensão abdominal foi observada em 13 ratos do grupo experimental (43,33%) e em 11 do grupo controle (36,66%), perfazendo um total de 40%. A diferença entre os dois grupos demonstrou-se sem significância estatística ( $p=0,396$ ).

Diarréia foi verificada em dois ratos do grupo experimental (6,66%) e em sete do grupo controle (23,33%), perfazendo um total de 15%. Aqui também não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p=0,073$ ).

Nenhum dos sessenta animais, de ambos os grupos, apresentaram sinais de flogose ou hematoma na ferida abdominal.

Dois animais, um de cada grupo (C 7.4 e E14.4) apresentaram deiscência da pele, porém o restante da parede abdominal permaneceu íntegra e os animais sobreviveram até a data programada para eutanásia.

#### **4.4 – AVALIAÇÃO PONDERAL**

As tabelas 1, 2 e 9 do apêndice exibem a distribuição dos pesos dos animais nos diferentes subgrupos e períodos.

Todos os animais do grupo experimental apresentaram perda de peso no período de 48 horas entre a administração do infliximabe e o procedimento cirúrgico, enquanto que todos os animais do grupo controle tiveram um ganho ponderal significativo. A comparação entre os dois grupos foi estatisticamente significativa ( $p=0,0001$ )(GRÁFICO 2).

Dos 27 animais do grupo experimental que sobreviveram até as datas da eutanásia apenas três animais do subgrupo E 14, tiveram ganho ponderal no período entre o procedimento cirúrgico inicial e a eutanásia. Em

29 animais do grupo controle, seis animais do subgrupo C 14 tiveram ganho de peso no mesmo período. Foi observado também que esta perda ponderal foi menor nos subgrupos E 14 e C 14, quando comparada com os outros subgrupos. Não houve diferença de peso estatisticamente significativa na comparação entre os subgrupos (GRÁFICO 3).

GRÁFICO 2 – PESO DOS ANIMAIS (GRUPOS CONTROLE E ESTUDO) EM g, APÓS ADMINISTRAÇÃO DE INFLIXIMABE OU SOLUÇÃO DE NaCl A 0,9%.

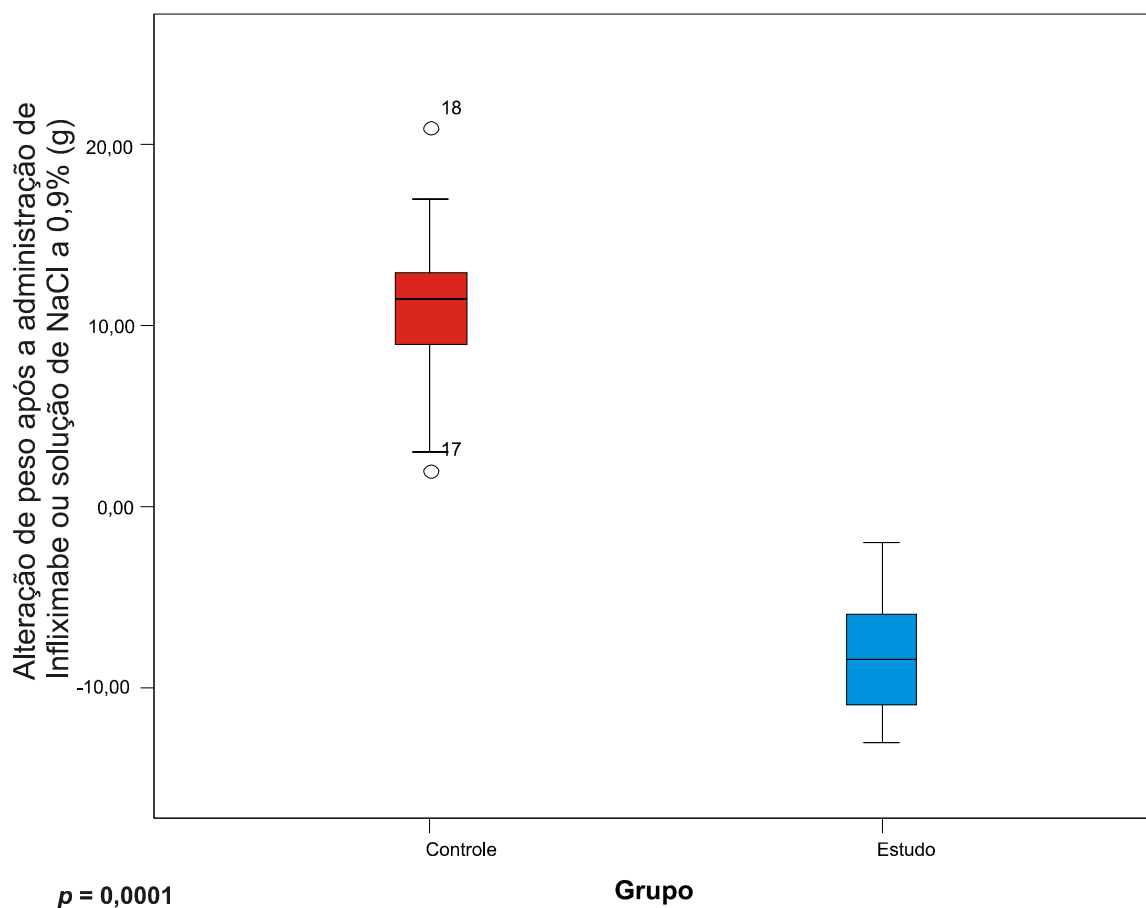
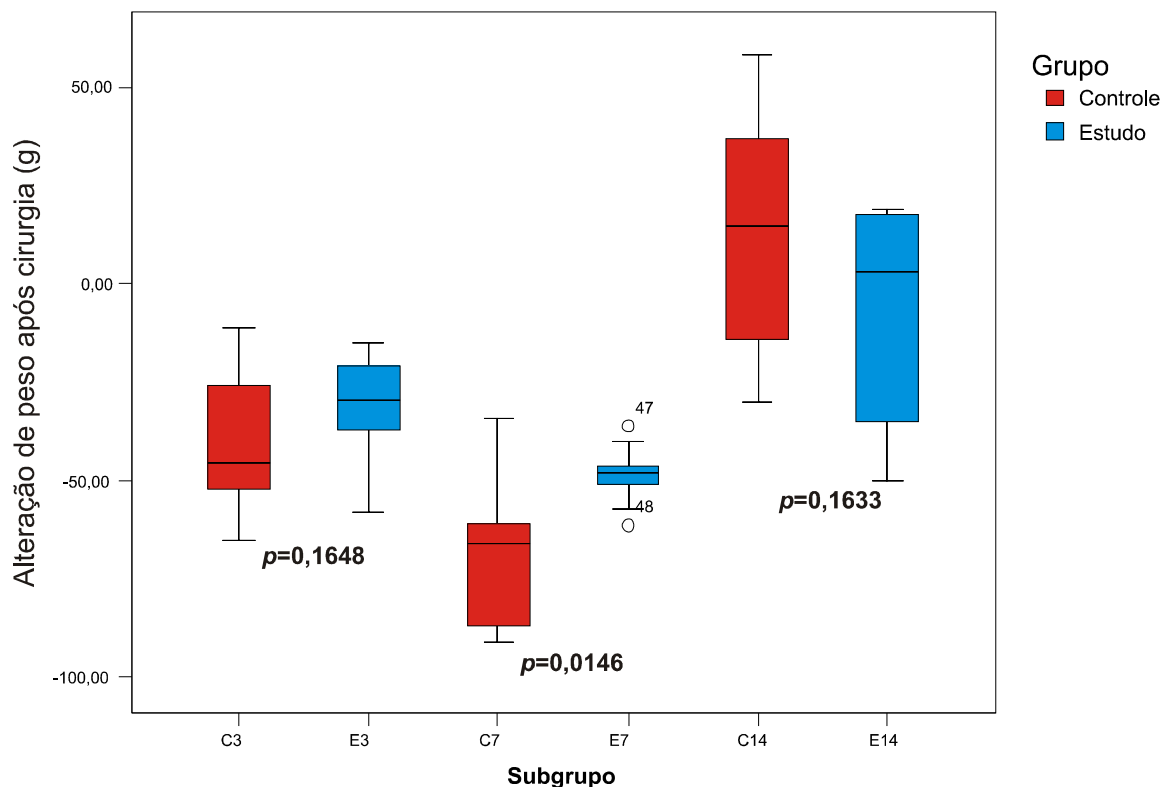


GRÁFICO 3 – PESO DOS ANIMAIS (SUBGRUPOS E3, C3, E7, C7, E14 E C14) EM g, APÓS OPERAÇÃO.



C3 – Subgrupo Controle sacrificado no 3º DPO  
 E3 – Subgrupo Estudo sacrificado no 3º DPO  
 C7 – Subgrupo Controle sacrificado no 7º DPO  
 E7 – Subgrupo Estudo sacrificado no 7º DPO  
 C14 – Subgrupo Controle sacrificado no 14º DPO  
 E14 – Subgrupo Estudo sacrificado no 14º DPO

## 4.5 – ANÁLISE DA REOPERAÇÃO

A grande maioria dos animais de ambos os grupos apresentaram aderências, 25 no grupo experimental (83,33%) e 22 no grupo controle (73,33%), levando a um total de 78,33%. Estas aderências foram principalmente de epíplon e vesículas seminais. No grupo experimental, além do número maior de aderências, foi verificado que estas eram mais firmes que

as do grupo controle que se desfaziam facilmente com tração. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p=0,266$ ).

Nenhum dos animais de ambos os grupos apresentaram hematoma ou sinais de hemorragia intraperitoneal.

Apenas um animal (E 7.1) do grupo experimental, que teve a morte constatada no 5º DPO, apresentou sinais de peritonite e pequeno vazamento fecal pela anastomose.

Três animais do grupo experimental tiveram deiscência parcial da anastomose, com bloqueio por epíplon, sem vazamento de conteúdo fecal e sem peritonite: E 7.5, E 7.9 e E 14.10, que morreu. Um animal do grupo controle, C 7.10, que foi encontrado morto, apresentou deiscência parcial de anastomose, com bloqueio de epíplon, sem vazamento de conteúdo fecal e sem peritonite.

Nenhum animal de ambos os grupos apresentou obstrução intestinal mecânica. Entretanto, no grupo experimental, oito animais do subgrupo E 3, oito do subgrupo E 7 e três do subgrupo E 14, apresentaram distensão do cólon proximal à anastomose. No grupo controle foi verificada distensão do cólon proximal à anastomose em oito animais do subgrupo C3, em cinco do subgrupo C 7 e em um do subgrupo C14. Estes dados demonstram um prevalência de distensão abdominal nos primeiros dias do período pós-operatório.

Em quatro ratos do subgrupo C 3 (C3.4, C3.5, C 3.8 e C 3.10) foi verificado aparente necrose de mucosa colônica no segmento proximal a anastomose (sero-muscular íntegra), porém sem sinais de deiscência, vazamento da anastomose ou peritonite. O mesmo achado foi observado no animal C 7.10 que morreu.



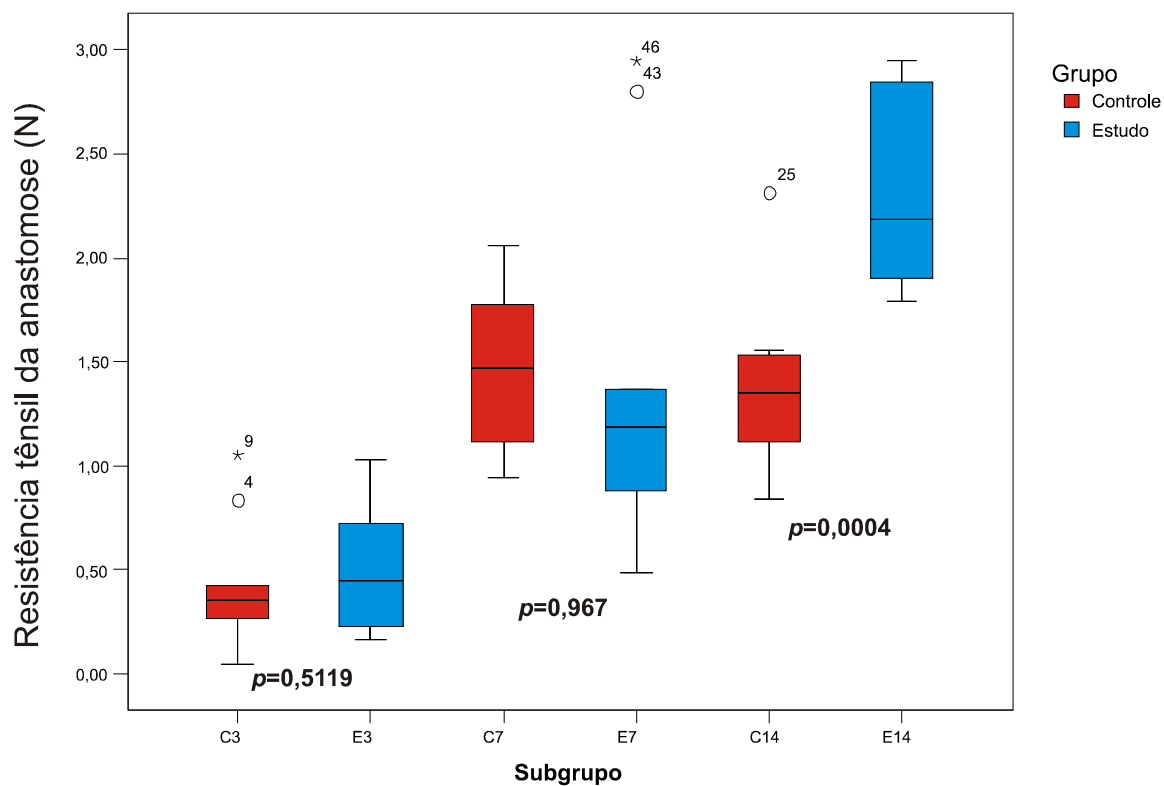
## 4.6 – FORÇA TÊNซิล DA ANASTOMOSE

A resistência tênsil das anastomoses colônicas submetidas ao teste de força em dinamômetro foi semelhante quando comparados os subgrupos E3 e C3 (média de 5,09 N x 4,15 N), ( $p=0,5119$ ). Também, nos subgrupos E7 e C7 não houve diferença (média de 12,91 N x 13,03 N) com valor de  $p$  sem significância estatística. Comparados os subgrupos E14 e C14, verificou-se que a força tênsil no subgrupo E14 foi maior (média de 18,58 N) em relação ao subgrupo C14 (média de 13,74 N) e que esta diferença foi estatisticamente significativa ( $p=0,0004$ ). Observou-se também que não houve diferença entre C7 e C14 (TABELA 1 E GRÁFICO 4).

TABELA 1 – FORÇA TÊNSIL EM NEWTON (N) DA ANASTOMOSE COLÔNICA DE CADA ANIMAL, AFERIDA IMEDIATAMENTE APÓS A EUTANÁSIA CONFORME OS GRUPOS EXPERIMENTAL (E), FORMADO PELOS SUBGRUPOS E3, E7, E14, E CONTROLE (C), FORMADO PELOS SUBGRUPOS C3, C7 e C14.

Animal	Grupos					
	Experimental			Controle		
	E3	E7	E14	C3	C7	C14
1	0,17	-----	2,94	0,05	1,02	0,93
2	0,19	1,37	2,92	0,27	0,94	1,33
3	0,39	2,80	1,95	0,07	1,76	1,43
4	0,23	0,88	1,85	0,84	2,06	1,36
5	0,52	0,49	-----	0,43	1,11	2,31
6	1,03	2,94	2,76	0,33	1,47	0,84
7	0,33	1,17	1,96	0,31	1,78	1,35
8	0,51	1,19	2,41	0,43	1,78	1,55
9	1,00	1,27	1,79	1,05	1,11	1,11
10	0,72	0,80	-----	0,37	-----	1,53

GRÁFICO 4 – RESISTÊNCIA TÊNซิล DA ANASTOMOSE.



C3 – Subgrupo Controle sacrificado no 3º DPO

E3 – Subgrupo Estudo sacrificado no 3º DPO

C7 – Subgrupo Controle sacrificado no 7º DPO

E7 – Subgrupo Estudo sacrificado no 7º DPO

C14 – Subgrupo Controle sacrificado no 14º DPO

E14 – Subgrupo Estudo sacrificado no 14º DPO

## 4.7 – HISTOLOGIA

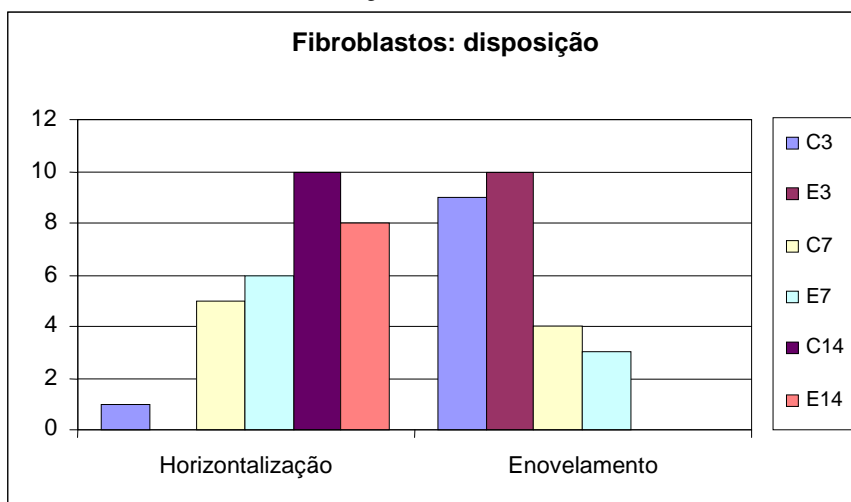
No estudo não se encontraram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos e subgrupos, em nenhuma das variáveis histológicas avaliadas como: quantidade, disposição e maturação de fibroblastos, fibrose, abscesso, infiltrado mono e polimorfonuclear, vascularização e ulceração, de acordo com o teste exato de Fisher (TABELAS 2, 3, 4, 5, 6, 7 E 8; GRÁFICOS 5 E 6).

**TABELA 2 – FREQUÊNCIAS DA QUANTIDADE DE FIBROBLASTOS.**

	C3	E3	C7	E7	C14	E14	C	E
0	0	0	0	0	0	0	0	0
+	1	3	0	1	1	1	2	5
++	7	6	5	3	6	4	18	13
+++	2	1	4	5	3	3	9	9

$p=1$

**GRÁFICO 5 – DISPOSIÇÃO DE FIBROBLASTOS.**



$p=0,5075$

C3 – Subgrupo Controle sacrificado no 3º DPO

E3 – Subgrupo Estudo sacrificado no 3º DPO

C7 – Subgrupo Controle sacrificado no 7º DPO

E7 – Subgrupo Estudo sacrificado no 7º DPO

C14 – Subgrupo Controle sacrificado no 14º DPO

E14 – Subgrupo Estudo sacrificado no 14º DPO

TABELA 3 – FREQUÊNCIAS DA MATURAÇÃO DE FIBROBLASTOS.

	C3	E3	C7	E7	C14	E14	C	E
0	9	8	0	0	0	0	9	8
+	1	2	4	3	0	0	5	5
++	0	0	5	5	4	4	9	9
+++	0	0	0	1	6	4	6	5

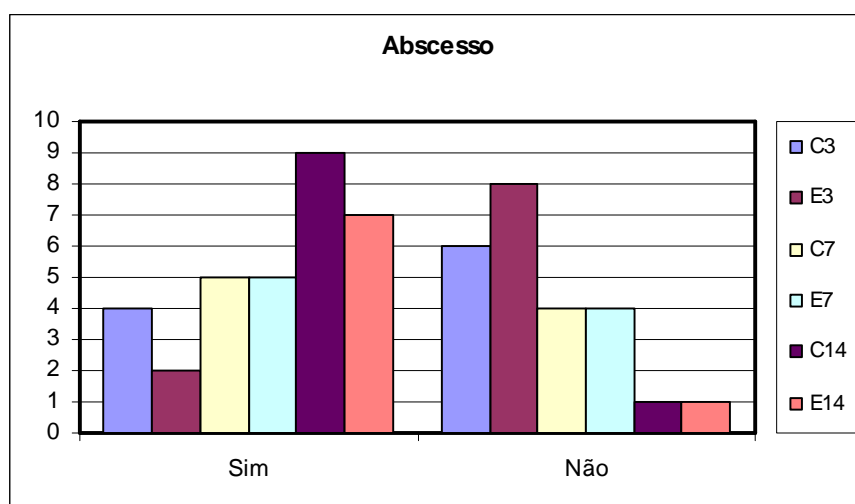
$p=0,5704$

TABELA 4 – FREQUÊNCIAS DE FIBROSE.

	C3	E3	C7	E7	C14	E14	C	E
0	9	9	0	0	0	0	9	9
+	1	1	5	2	0	0	6	3
++	0	0	4	6	6	4	10	10
+++	0	0	0	1	4	4	4	5

$p=0,6909$

GRÁFICO 6 – PRESENÇA DE ABSCESSO.



$p=0,308$

C3 – Subgrupo Controle sacrificado no 3º DPO

E3 – Subgrupo Estudo sacrificado no 3º DPO

C7 – Subgrupo Controle sacrificado no 7º DPO

E7 – Subgrupo Estudo sacrificado no 7º DPO

C14 – Subgrupo Controle sacrificado no 14º DPO

E14 – Subgrupo Estudo sacrificado no 14º DPO

TABELA 5 – FREQUÊNCIAS DE INFILTRADO MONONUCLEAR.

	C3	E3	C7	E7	C14	E14	C	E
0	0	0	0	0	0	0	0	0
+	7	7	6	2	0	0	13	9
++	3	3	3	7	5	3	11	13
+++	0	0	0	0	5	5	5	5

 $p=1$ 

TABELA 6 – FREQUÊNCIAS DE INFILTRADO POLIMORFONUCLEAR.

	C3	E3	C7	E7	C14	E14	C	E
0	0	0	0	0	0	0	0	0
+	0	1	0	0	5	4	5	5
++	6	5	6	6	5	4	17	15
+++	4	4	3	3	0	0	7	7

 $p=1$ 

TABELA 7 – FREQUÊNCIAS DE VASCULARIZAÇÃO.

	C3	E3	C7	E7	C14	E14	C	E
0	7	5	0	0	0	0	7	5
+	3	5	2	1	0	0	5	6
++	0	0	7	6	5	5	12	11
+++	0	0	0	2	5	3	5	5

 $p=0,4274$ 

TABELA 8 – FREQUÊNCIAS DE ULCERAÇÃO.

	C3	E3	C7	E7	C14	E14	C	E
0	4	4	3	4	8	7	15	15
+	3	4	3	3	2	1	8	8
++	2	2	3	2	0	0	5	4
+++	1	0	0	0	0	0	1	0

 $p=0,4925$

## 4.8 – MORFOMETRIA E COLÁGENO

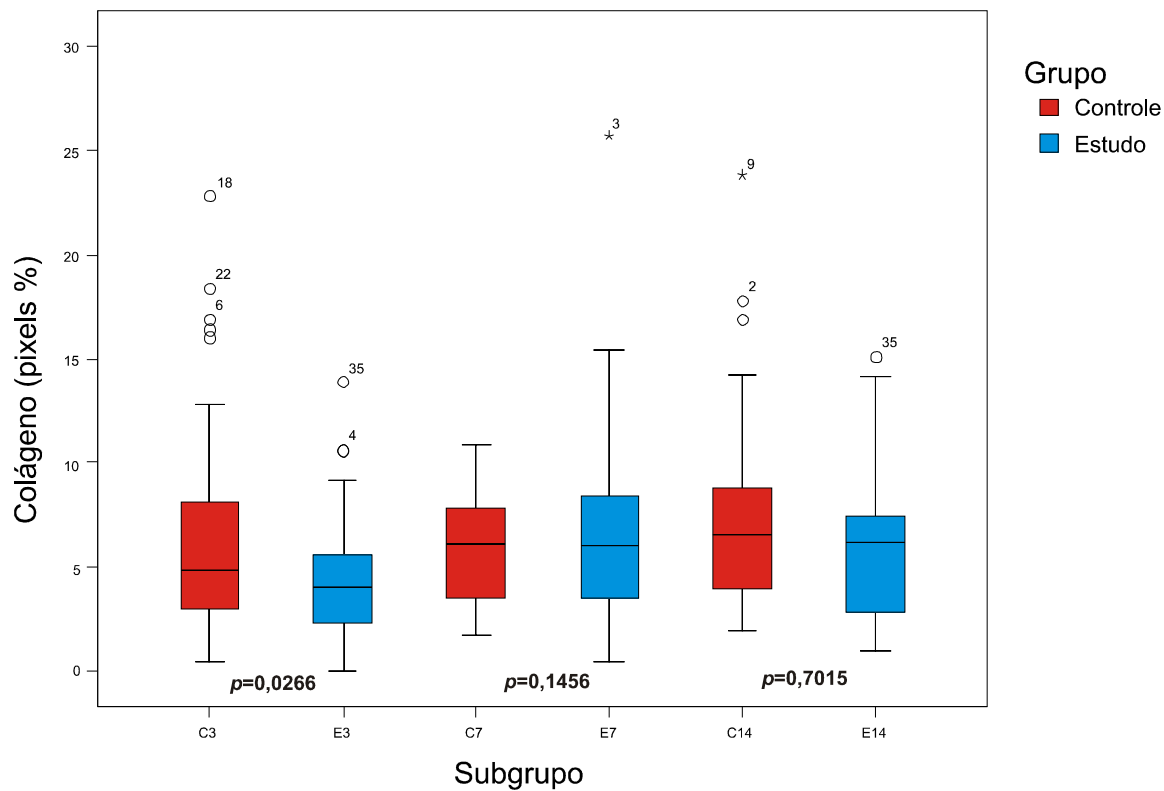
Na análise histomorfométrica do colágeno das regiões das anastomoses e peri-anastomóticas observou-se que a diferença entre as medianas dos percentuais de pixels foi maior que o esperado pela chance, e foi estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ) de acordo com o teste de Kruskal-Wallis. A análise das variâncias (ANOVA) também mostrou médias diferentes do ponto de vista estatístico ( $p = 0,0017$ ), assim como variâncias significativamente diferentes ( $p = 0,0002$ ) pelo teste de Bartlett.

Quando comparado o percentual de pixels entre os subgrupos, de acordo com o dia da eutanásia, utilizando-se o teste *t* de Student observou-se que a diferença das médias de C3 e E3 são estatisticamente significantes ( $p = 0,0266$ ). Já comparando C7 com E7 e C14 com E14, as diferenças das médias obtidas não foram estatisticamente significantes (TABELA 9, GRÁFICO 7 E FIGURAS 21 e 22).

TABELA 9 – MÉDIA, MEDIANA, DESVIO PADRÃO E VARIÂNCIA DA HISTOMORFOMETRIA DO COLÁGENO DAS ANASTOMOSES COLÔNICAS, UTILIZANDO-SE A COLORAÇÃO COM PÍCRO-SÍRIUS.

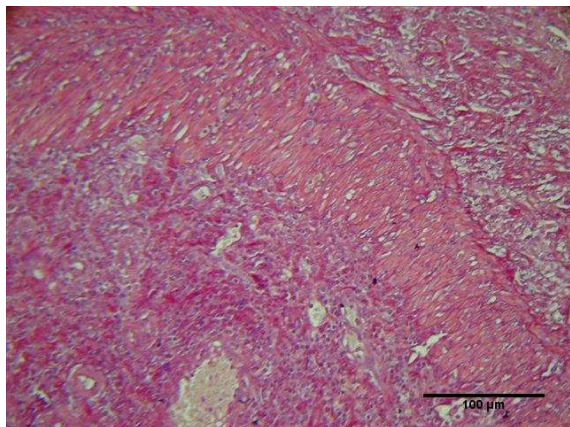
		Dia da eutanásia					
		3° DPO		7° DPO		14° DPO	
		$p=0,0266$		$p=0,1456$		$p=0,7015$	
		C3	E3	C7	E7	C14	E14
<b>Percentual de Pixels (%)</b>	Média	6,028	4,250	6,463	7,446	7,450	7,837
	Mediana	4,650	4,150	5,600	6,550	6,500	6,700
	Desvio padrão	4,663	2,884	4,483	5,710	4,740	5,097
	Variância	21,743	8,317	20,097	32,604	22,467	25,979

GRÁFICO 7 – CONCENTRAÇÃO DO COLÁGENO EM PIXELS % À HISTOMORFOMETRIA.

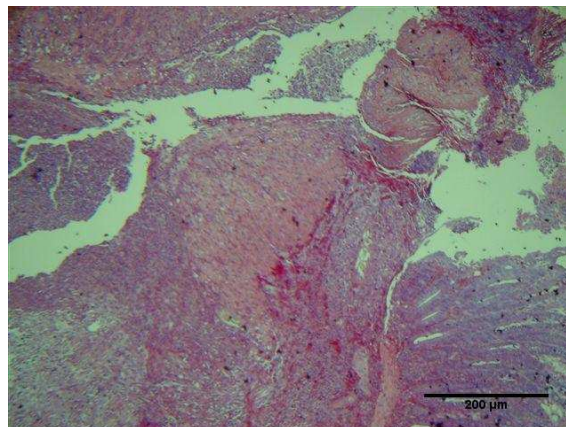


C3 – Subgrupo Controle sacrificado no 3º DPO  
 E3 – Subgrupo Estudo sacrificado no 3º DPO  
 C7 – Subgrupo Controle sacrificado no 7º DPO  
 E7 – Subgrupo Estudo sacrificado no 7º DPO  
 C14 – Subgrupo Controle sacrificado no 14º DPO  
 E14 – Subgrupo Estudo sacrificado no 14º DPO

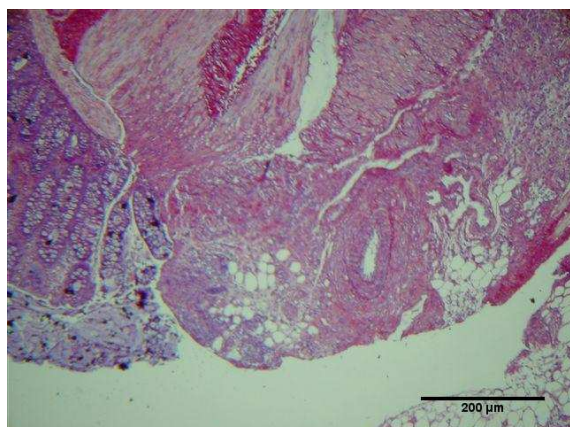
FIGURA 21 – AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA DA CICATRIZAÇÃO DE ANASTOMOSE COLÔNICA TÉRMINO-TERMINAL (PICRO-SIRIUS).



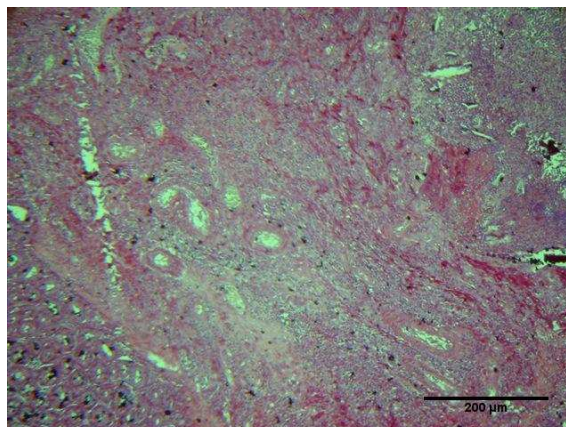
**C3.7**



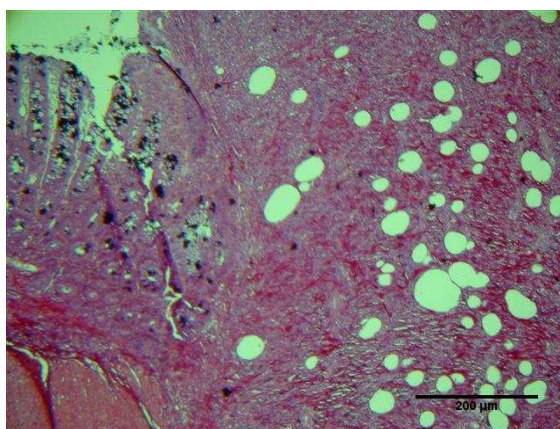
**E3.6**



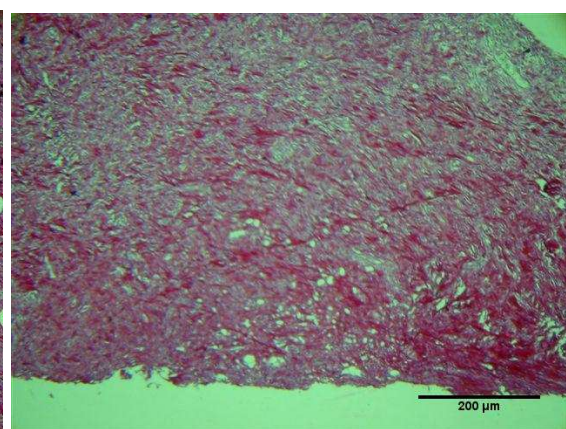
**C7.7**



**E7.10**



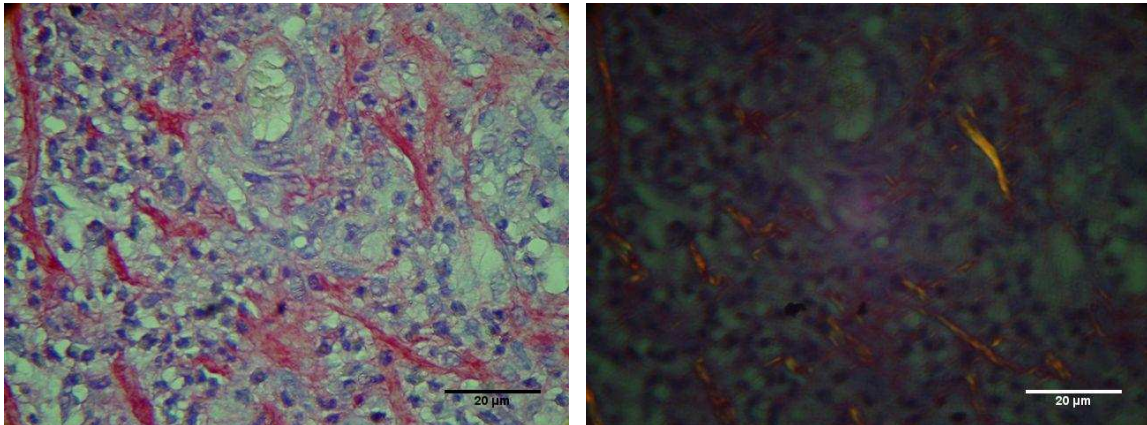
**C14.9**



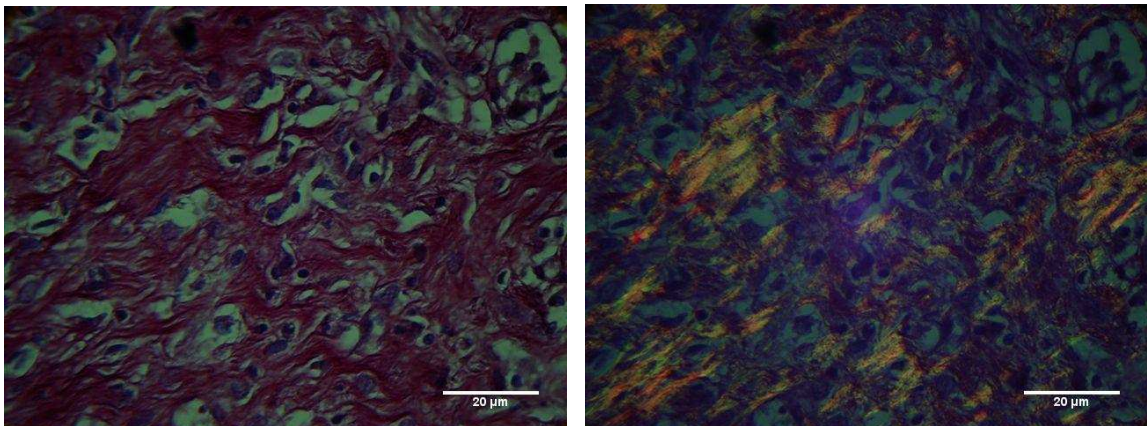
**E14.3**



FIGURA 22 – AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA DAS LÂMINAS CORADAS PELO PICO-SIRIUS COM LUZ POLARIZADA. O COLÁGENO TIPO I TEM COLORAÇÃO ALARANJADA E O TIPO III ESVERDEADA, SUBGRUPOS E3 E C3.

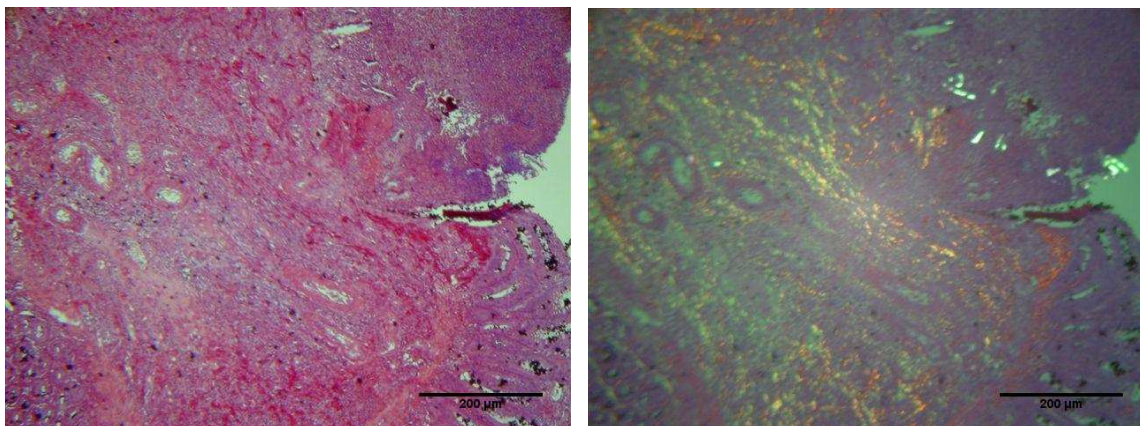


**E3.6**

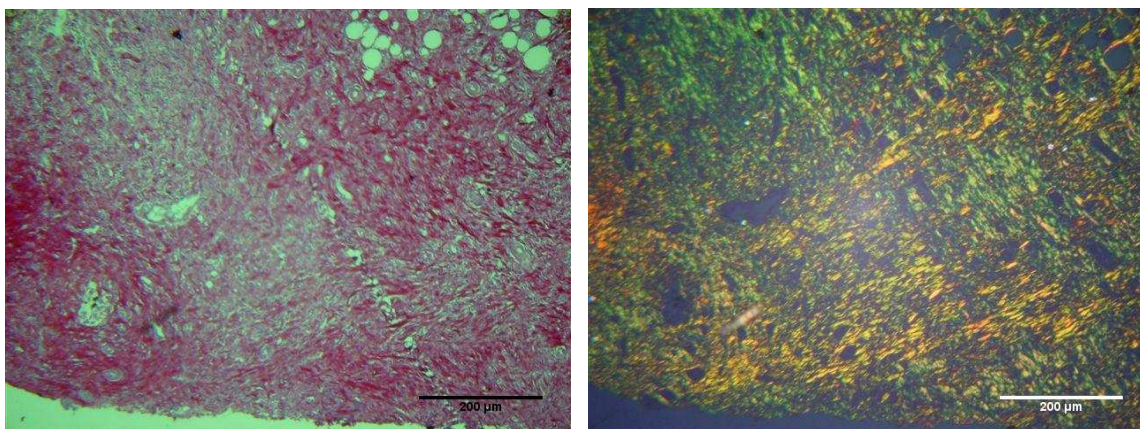


**C3.7**

FIGURA 23 – AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA DAS LÂMINAS CORADAS PELO PICO-SIRIUS COM LUZ POLARIZADA. O COLÁGENO TIPO I TEM COLORAÇÃO ALARANJADA E O TIPO III ESVERDEADA, SUBGRUPOS E7 E E14.



**E7.10**



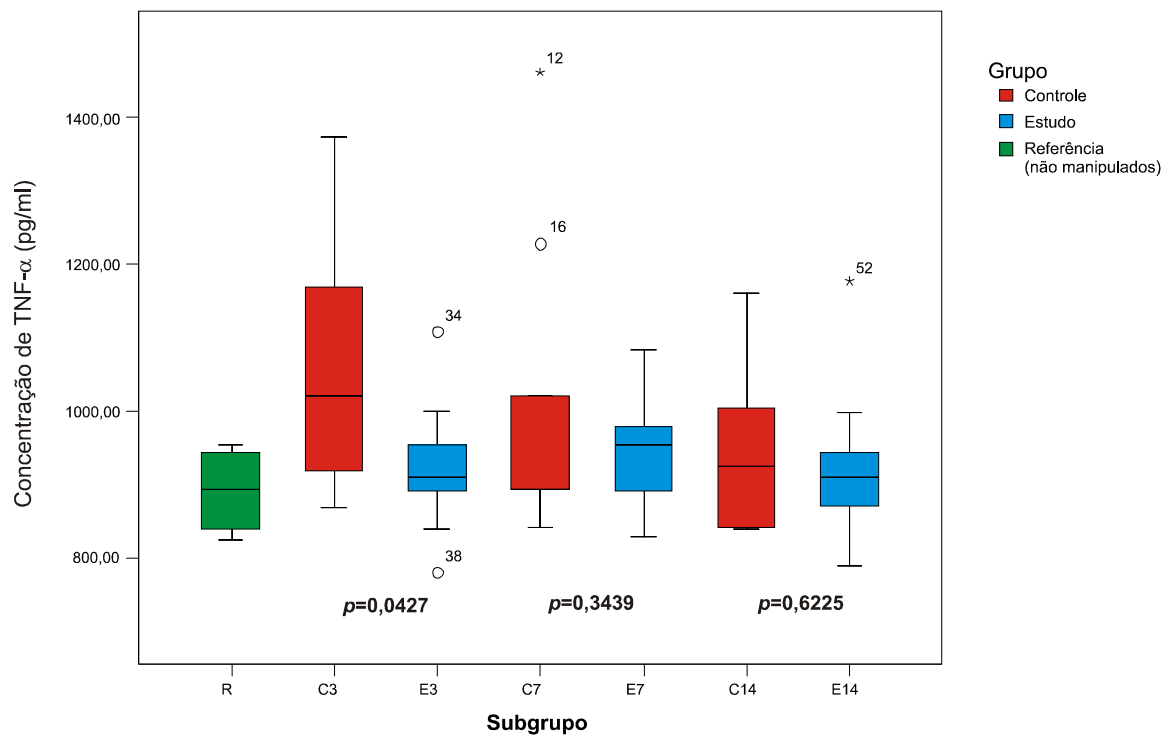
**E14.3**

## 4.9–TNF- $\alpha$ SÉRICO E TECIDUAL

Os resultados da quantificação do TNF- $\alpha$  no soro dos animais demonstraram que seus níveis de TNF- $\alpha$  circulantes são normalmente baixos como demonstrado pelo grupo “referência” (não submetidos a procedimentos cirúrgicos e administração de infliximabe ou solução de NaCl a 0,9%), que foram utilizados para se estabelecer um valor padrão para o TNF- $\alpha$  em ratos. Os valores do TNF- $\alpha$  não foram alterados de forma significativa com os procedimentos cirúrgicos a não ser no subgrupo C3 no qual a elevação da quantidade de TNF- $\alpha$  foi significativa, quando comparada aos demais subgrupos. Comparado com os animais normais, o grupo E3 não apresentou produção aumentada de TNF- $\alpha$ , assim como os demais grupos. Comparando os grupos com o mesmo tempo de pós-operatório, observou-se diferença estatisticamente significativa ( $p=0,0427$ ) no 3º dia (C3 e E3). Nos demais subgrupos não se observa diferenças (GRÁFICO 8).

Ao contrário, a produção tecidual de TNF- $\alpha$  avaliada por imunohistoquímica se manteve semelhante em ambos os subgrupos C3 e E3, assim como nos demais subgrupos avaliados (C7, E7, C14 e E14). A produção do TNF- $\alpha$  tecidual foi aparentemente igual e constante para todos os animais ao longo do estudo (FIGURAS 24, 25 e 26).

GRÁFICO 8 – PRODUÇÃO DO TNF- $\alpha$  SÉRICO NOS GRUPOS CONTROLE, EXPERIMENTAL E “REFERÊNCIA” (pg/mL).



R – Grupo de referência (não manipulados)  
 C3 – Subgrupo Controle sacrificado no 3º DPO  
 E3 – Subgrupo Estudo sacrificado no 3º DPO  
 C7 – Subgrupo Controle sacrificado no 7º DPO  
 E7 – Subgrupo Estudo sacrificado no 7º DPO  
 C14 – Subgrupo Controle sacrificado no 14º DPO  
 E14 – Subgrupo Estudo sacrificado no 14º DPO

FIGURA 24 - IMUNOHISTOQUÍMICA. AUMENTO: 400X. PRESENÇA DE HISTIÓCITOS PRODUTORES DE TNF- $\alpha$  EM ANIMAIS DO SUBGRUPO C3.

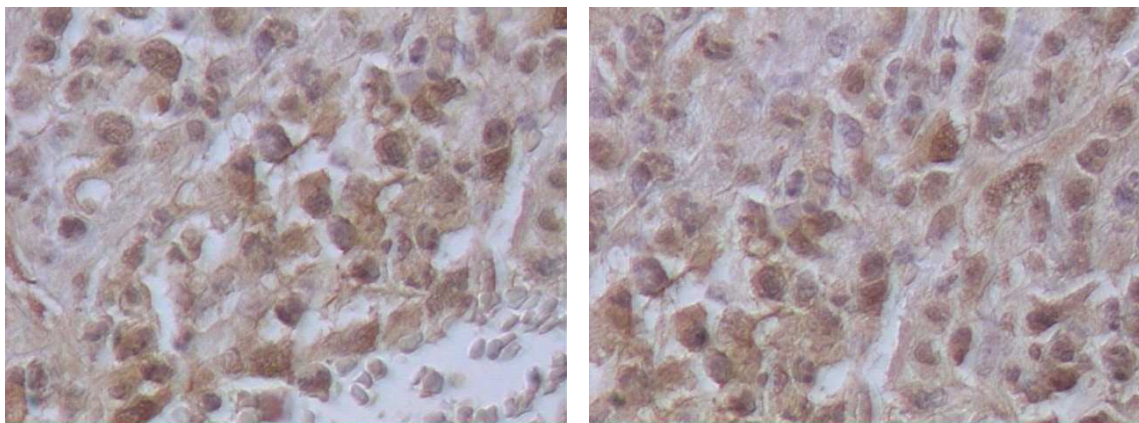


FIGURA 25 - IMUNOHISTOQUÍMICA. AUMENTO: 400X. PRESENÇA DE HISTIÓCITOS PRODUTORES DE TNF  $\alpha$  (SETAS) EM ANIMAL DO SUBGRUPO E3.

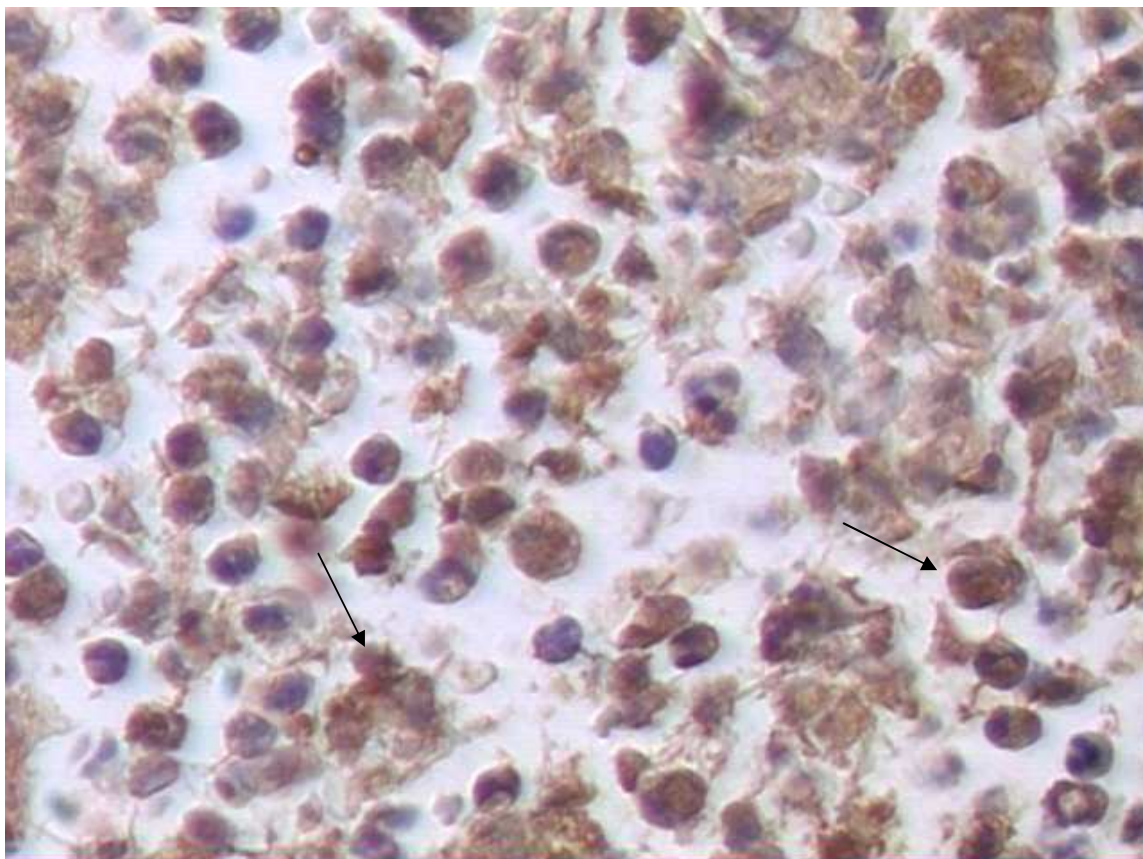
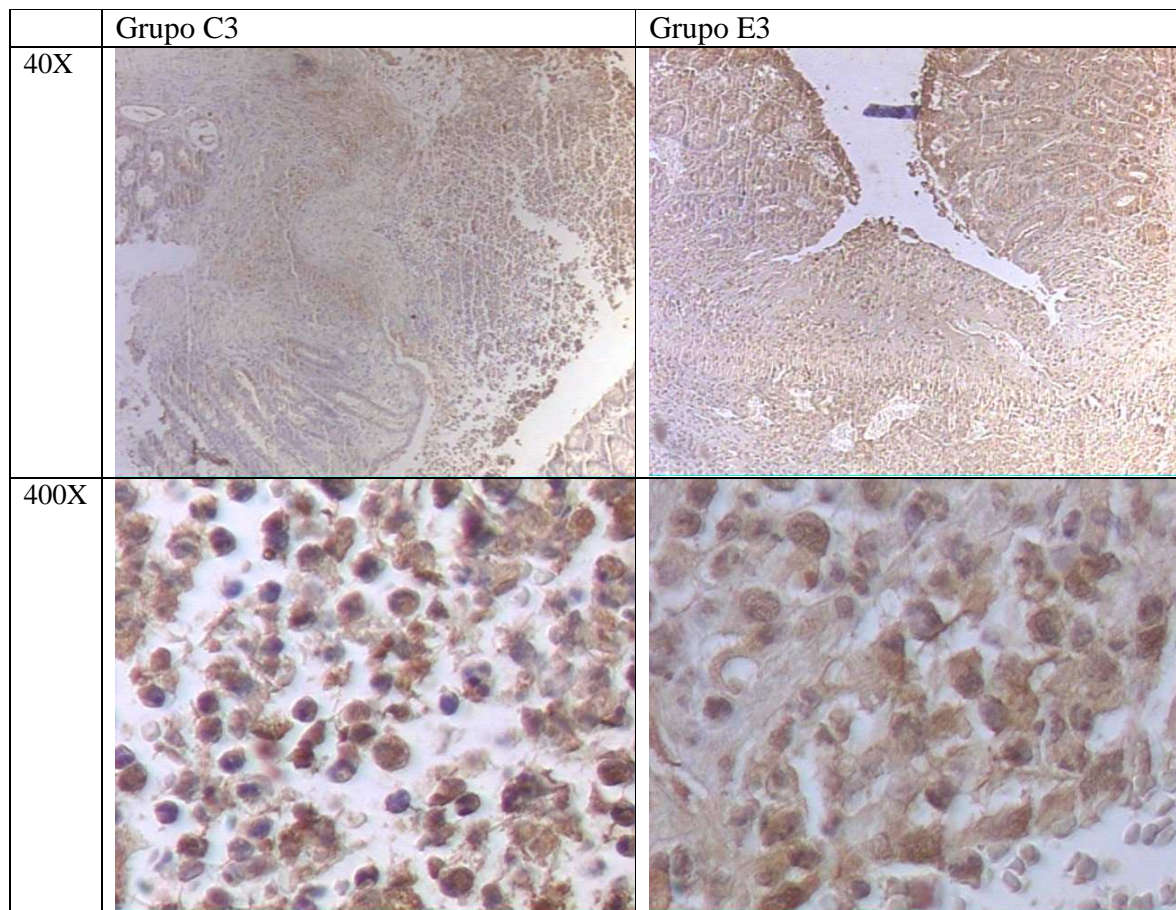


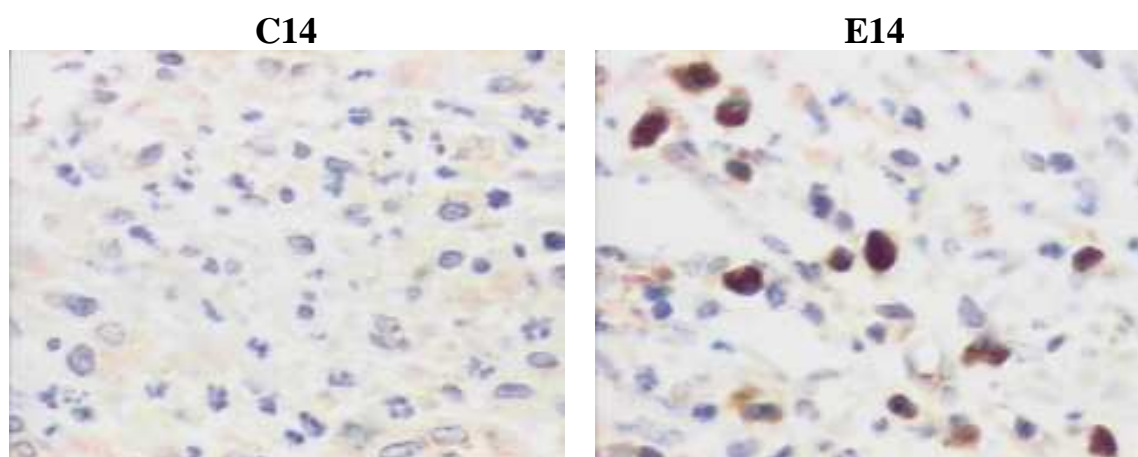
FIGURA 26 – PRODUÇÃO TECIDUAL DO TNF- $\alpha$  POR MEIO DE IMUNOHISTOQUÍMICA EM ANIMAIS DOS SUBGRUPOS C3 E E3. AUMENTO DE 40X E 400X, DEMONSTRANDO QUE NÃO HOUE DIFERENÇA ENTRE OS SUBGRUPOS.



#### 4.10 – TGF- $\beta$ TECIDUAL (IMUNOHISTOQUÍMICA)

A produção tecidual de TGF- $\beta$  através de imunohistoquímica demonstrou maior produção no subgrupo E14 quando comparado ao subgrupo C14 (FIGURA 27).

FIGURA 27 – PRODUÇÃO TECIDUAL DO TGF- $\beta$  POR MEIO DE IMUNOHISTOQUÍMICA EM ANIMAIS DOS SUBGRUPOS C14 E E14. AUMENTO 400 X.



## **5- DISCUSSÃO**



## 5- DISCUSSÃO

No presente estudo os parâmetros de avaliação de anastomoses utilizados foram: evolução clínica dos animais, avaliação do peso corporal, aspecto da cavidade peritoneal, medida da resistência tênsil da anastomose, concentração sérica e produção tecidual do TNF- $\alpha$ , avaliação dos achados operatórios macroscópicos, assim como a avaliação histológica e histomorfométrica das regiões peri-anastomóticas e das anastomoses. Estes parâmetros estão em concordância com a literatura pertinente (HENDRIKS & MASTBOOM, 1990). Previamente foi realizado estudo piloto no qual se utilizou cinco animais para padronização da técnica cirúrgica e de toda a metodologia empregada na experimentação.

Apesar de seu pequeno porte, diversos autores têm escolhido o *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, como animal de experimentação para estudo de anastomoses intestinais (JIBORN *et al.*, 1978b; JIBORN *et al.*, 1978c; OLIVEIRA, 1994; OLIVEIRA, 1995; SIRIMARCO, 2000; HÖER *et al.*, 2002; REYS, 2004; MANTZOROS *et al.*, 2004; TRIANTAFILLIDIS *et al.*, 2005; MANTZOROS *et al.*, 2006; ALMEIDA, 2006; FERREIRA *et al.*, 2006; KONSTANTINIDIS *et al.*, 2006, DE HINGH *et al.*, 2006; PARRA-MEMBRIVES *et al.*, 2007; ORTIZ *et al.*, 2007; ZACHARAKIS *et al.*, 2007; KANELLOS *et al.*, 2007). O rato é de fácil padronização quanto à raça, sexo e peso, além de ter grande resistência a infecções e ter sua anatomia bem conhecida (LOPES, 2006). Entre outras vantagens, o rato apresenta praticidade para experimentos que requeiram um grande número de animais com similaridade genética e fisiológica, baixo custo, grande taxa de fertilidade e facilidade de manutenção em biotério (HERRMANN *et al.*, 1964).

Os animais do grupo estudo, sem exceção, perderam peso nas 48 horas após a administração do infliximabe, enquanto que o oposto ocorreu no grupo controle, sugerindo toxicidade do infliximabe.

MASTBOOM *et al.* (1991) relataram que a perda de peso dos ratos que ocorre no pós-operatório é recuperada ao se alcançar o sétimo dia. No presente estudo apenas a metade dos animais alcançaram o peso inicial no 14º DPO.

No período pós-operatório ocorreu perda de peso nos grupos estudo e controle, sem diferença estatisticamente significativa no terceiro, sétimo ou décimo quarto DPO, o que condiz com a literatura. Observa-se perda de peso inicial, sendo recuperada em seguida, atingindo níveis próximos dos iniciais com o decorrer da pesquisa, e que esta perda deve estar relacionada ao estresse cirúrgico (HERMANN *et al.*, 1964; SIRIMARCO, 2000; REYS, 2004; ALMEIDA, 2006). No presente estudo a perda de peso inicial também foi imputada à toxicidade do infliximabe logo após sua administração.

Os períodos programados para a reoperação e eutanásia dos animais foram fundamentadas no estudo de HERRMANN *et al.* (1964) em que foi pesquisado a cicatrização de anastomoses colônicas em duzentos e vinte ratos, sacrificados a intervalos desde três horas até um ano após a operação, e submetidos a avaliações histológicas. Os eventos histológicos do processo cicatricial apresentaram três fases justapostas: exudativa ou de resposta inflamatória aguda (zero a quatro dias); proliferativa ou de fibroplasia (3 a 14 dias); e de remodelagem ou de maturidade do colágeno (10 a 180 dias ou mais). Desta forma as datas de reoperação representaram as três fases descritas acima.

A cicatrização da anastomose colônica é semelhante à que ocorre em outros órgãos, diferindo apenas no que tange ao colágeno. Estudos têm demonstrado que nas primeiras 48 horas ocorre diminuição da ordem de 72% na força de ruptura dessas anastomoses devido ao desequilíbrio entre a síntese e lise do colágeno nos primeiros três dias da cicatrização (HAWLEY, 1973; IRVIN & HUNT, 1974; RAVO *et al.*, 1988; CAHILL *et al.*, 2004). O metabolismo do colágeno parece não ser idêntico na pele e na parede intestinal (KLEIN & CHANDRARAJAN, 1977; SOUSA, 1989; HÖER, *et al.*, 2002; CAHILL *et al.*, 2004).

No estudo da força tênsil das anastomoses no terceiro e sétimo DPO ambos os grupos obtiveram resultados semelhantes, porém a resistência tênsil das anastomoses do subgrupo E 14 foi maior, sugerindo que o infliximabe pode aumentar a resistência tênsil das anastomoses no período remodelagem ou maturação do colágeno (10 a 180 dias). Estudo recente de STREIT *et al.* (2006) em humanos, sugere melhora na cicatrização de feridas crônicas com o uso tópico do infliximabe.

No presente estudo, a produção tecidual de TGF- $\beta$ , uma proteína envolvida no desenvolvimento de fibrose (SIQUEIRA JR. & DANTAS, 2000), foi mensurada através de imunohistoquímica e corroborou os resultados da avaliação da resistência tênsil entre os subgrupos C14 e E14 sugerindo um efeito positivo do infliximabe na fase de remodelagem ou maturação do colágeno.

A infecção peritoneal contribui para a deiscência de anastomoses por favorecer a inflamação e por alterar o metabolismo do colágeno (SCHROCK *et al.*, 1973; IRVIN, 1976; BALLANTYNE, 1984; OLIVEIRA, 1995; ISBISTER, 2001; STUMPF *et al.*, 2006; PLATELL *et al.*, 2007; KANELLOS *et al.*, 2007). A produção da enzima collagenase encontra-se

aumentada na vigência de infecção, levando à degradação e diminuição do colágeno no intestino, retardando a cicatrização e propiciando a deiscência da sutura (HAWLEY, 1973; HESP *et al.*, 1984; CLARK, *et al.*, 2000). Estudos têm demonstrado níveis circulantes elevados do TNF- $\alpha$  em associação a infecção da cavidade peritoneal e que a cicatrização na vigência de peritonite, depende de um balanço de citocinas pró-inflamatórias e antiinflamatórias (MARTINEAU & SHEK, 2000; RICHE *et al.*, 2000; CLARK, *et al.*, 2000; KHALILI *et al.*, 2001; YAMAMOTO *et al.*, 2005a; YAMAMOTO *et al.*, 2005b).

Alterações na qualidade e quantidade do colágeno presente no intestino, sobretudo na camada submucosa, influenciam de forma substancial na integridade da anastomose. O colágeno não é uma proteína inerte, pois está em constante equilíbrio entre lise e síntese. A diminuição da quantidade de colágeno pode ocorrer tanto por aumento na lise, quanto por diminuição da síntese protéica (HAWLEY, 1973; SIRIMARCO, 2000; STUMPF *et al.*, 2004; DE HINGH *et al.*, 2006).

É importante a especificação do local das anastomoses, uma vez que podem ocorrer diferenças de cicatrização ao longo do trato digestório. No intestino grosso do rato, além dos aspectos histológicos serem diversificados, a concentração e o metabolismo do colágeno mostram-se variáveis nos diferentes segmentos (JIBORN *et al.*, 1978a, JIBORN *et al.*, 1980). Em coelhos a atividade da colagenase varia ao longo do trato gastrointestinal após anastomoses colônicas (HAWLEY *et al.*, 1970). Tendo em vista estes estudos prévios, as ressecções e anastomoses foram realizadas em segmento colônico distal, padronizado pela distância fixa em relação à reflexão peritoneal, para que não ocorressem erros de interpretação de resultados (SIRIMARCO,

2000). No nosso estudo a anastomose foi padronizada a 2,5 cm da reflexão peritoneal.

O rigor técnico, a manipulação adequada dos tecidos, hemostasia e a utilização de materiais de suturas apropriados, diminuem a incidência de deiscência da anastomose intestinal (IRVIN *et al.*, 1976; SCHROCK *et al.*, 1973; WANINGER *et al.*, 1992; BURCH *et al.*, 2000; REYS, 2004; PLATELL, 2007). Alguns pesquisadores têm realizado anastomoses colônicas em murinos com pontos separados invertidos, em plano único, com bons resultados (CALI *et al.*, 1993; OLIVEIRA, 1995; EUBANKS *et al.* 1997). No entanto a literatura mostra relatos de excelentes resultados com anastomoses colônicas em ratos, empregando-se sutura contínua em plano único (HERRMANN *et al.*, 1964; HOUDART *et al.*, 1985; SIRIMARCO, 2000; REYS, 2004; ALMEIDA, 2006). Esse método tem a vantagem de ser simples, rápido e econômico, promovendo impermeabilidade e pouca reação inflamatória tecidual, o que o torna tão seguro quanto aquele realizado em um plano com pontos separados (ROCHA, 1989, BURCH *et al.*, 2000).

O sucesso da anastomose tem na fase inicial da cicatrização um momento crítico, pois a sua integridade nos primeiros dias depende da capacidade da sutura em manter a tensão na anastomose, responsabilidade esta que é aos poucos substituída pelos próprios tecidos da alça anastomosada (BURCH *et al.*, 2000; ALMEIDA, 2006).

A confecção das anastomoses com sutura contínua em plano único mostrou-se eficaz também no presente estudo, com a utilização de fio inabsorvível monofilamentar (polipropileno 6-0) para a confecção das anastomoses cólicas. As qualidades que favorecem alguns materiais de sutura na utilização em anastomoses intestinais são: manter a força de tensão por longo prazo, que exclua a falha da sutura como possível causa de deiscência

até que a integridade da anastomose tenha sido garantida pelo processo de cicatrização; causar reação tecidual mínima; não favorecer a infecção (KATZ *et al.*, 1981; BURCH *et al.*, 2000; HÖER *et al.*, 2002; STUMPF *et al.*, 2005). Portanto, os fios monofilamentares, tanto absorvíveis sintéticos, polidioxanona ou poliglecaprone, quanto inabsorvíveis, polipropileno ou poliamida (náilon), aproximam-se mais do material ideal no sentido de promover a cicatrização adequada da anastomose intestinal com sutura manual (KHOURY & WAXMAN, 1983; REYS, 2004; GARCIA-OSOGOBIO *et al.*, 2006).

No estudo de anastomoses intestinais os métodos utilizados têm sido clínicos, radiológicos, mecânicos, bioquímicos e histológicos (ROCHA, 1989; OLIVEIRA, 1989; SOUSA, 1989; SOUSA 1994; OLIVEIRA 1995; SIRIMARCO, 2000; BURCH *et al.*, 2000; ISBISTER, 2001; REYS, 2004; OLAISON, 2004; ALMEIDA, 2006; PLATELL *et al.*, 2007). No presente estudo foram utilizados métodos clínicos, mecânicos, imunológicos e histológicos.

HENDRIKS & MASTBOOM (1990) na discussão sobre parâmetros de cicatrização em anastomoses intestinais experimentais não relacionam a evolução clínica como critério de avaliação, mas o índice de deiscência das anastomoses tem importância crucial por tratar-se na prática médica, da complicação mais grave de uma anastomose pela sua associação com altas taxas de morbidade e mortalidade (SOUSA, 1994).

No presente estudo só houve um caso de deiscência, com vazamento para a cavidade peritoneal, de um animal do grupo estudo, que morreu no 5º DPO. Outros três animais no grupo estudo e um animal no grupo controle apresentaram deiscência parcial, bloqueada por epíplon, sem repercussão clínica e sem relação com o uso do infliximabe.

Variados fármacos como determinados antimicrobianos, quimioterápicos, imunomoduladores, corticosteróides e antiinflamatórios não hormonais foram descritos como prejudiciais à cicatrização de feridas e anastomoses. Os corticosteróides diminuem a resistência à tensão, a taxa de epitelização, a neovascularização, e também inibem intensamente a contração da ferida. Além disto, os corticosteróides suprimem o sistema imune, que torna as feridas suscetíveis à infecção (EHLRICH & HUNT, 1969; STEPHENS *et al.*, 1971; OLAISON, 2004; MANTZOROS *et al.*, 2004; MANTZOROS *et al.*, 2006). O uso pré-operatório de corticosteróides em pacientes com doença inflamatória intestinal submetidos à cirurgia eletiva dos intestinos foi associada a risco aumentado de complicações infecciosas pós-operatórias (ABERRA *et al.*, 2003).

De modo similar, drogas antiinflamatórias não hormonais causam vaso constrição, suprimem a resposta inflamatória, diminuem a síntese de colágeno e reduzem a resistência à tensão e a contração da ferida. Essas drogas também interferem na migração leucocitária para a ferida, causando suscetibilidade maior à infecção. Medicamentos antineoplásicos e imunossupressores podem prejudicar a produção de fibroblastos, resultando em resistência à tensão diminuída (GOGIA, 2003; KANELLOS *et al.*, 2007), entretanto algumas drogas antineoplásicas como a capecitabine, um precursor do 5-fluorouracil, não demonstrou nenhum impacto negativo na cicatrização de anastomoses colônicas em ratos (KONSTANTINIDIS *et al.*, 2006).

Apesar de seu pequeno efeito em culturas de células humanas normais, o TNF- $\alpha$  aparenta ser tóxico ao endotélio vascular. Outras ações incluem estímulo ao crescimento de fibroblastos, de outras linhagens celulares, ativação de neutrófilos polimorfonucleares, indução da IL1, Prostaglandina E2 e produção de collagenase (MARGETTS *et al.*, 2002;

BIOMYX TECHNOLOGY, 2007). Teoricamente, estimulando o crescimento de fibroblastos o TNF- $\alpha$  estaria promovendo ou melhorando a cicatrização, mas ao mesmo tempo, quando aumenta a produção de colagenase estaria prejudicando a cicatrização.

O TNF- $\alpha$  induz expressão da citocina promotora da angiogênese, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), a um aumento da expressão da citocina pró-fibrótica, o fator de crescimento transformante - beta (TGF- $\beta$ ), e expressão da fibronectina, além de promover deposição de colágeno nos tecidos peritoneais (MARGETTS *et al.*, 2002).

As citocinas Th1(linfócito T auxiliar – resposta imunológica voltada para ativação de macrófagos), tais como o interferon (IFN)- $\gamma$ , a Interleucina (IL)-2 e o TNF- $\alpha$ , estão freqüentemente elevadas na mucosa de pacientes com doença de Crohn e outras doenças inflamatórias crônicas. O TNF- $\alpha$  não é formalmente considerado uma citocina Th1 por ser habitualmente uma citocina derivada de macrófago, mas as evidências sugerem que as células T são uma importante fonte de TNF- $\alpha$  na lâmina própria. Na doença de Crohn, biópsias obtidas da região da anastomose nos primeiros três meses após cirurgia revelam um padrão de citocinas com predomínio de Th2 (linfócito T auxiliar – resposta imunológica voltada para produção de anticorpos) em vez da inflamação de Th1 na doença de Crohn estabelecida. Outras citocinas podem influenciar a cascata inflamatória em diferentes momentos (ABREU, 2003).

Para alguns autores o TNF- $\alpha$  adquiriu uma conotação negativa. Contudo, na concentração apropriada, é um potencializador de vários processos biológicos como a hematopoiese e angiogênese (MOONEY *et al.*, 1990; CLARK *et al.*, 2000). Quando localmente aplicado a ferimentos, demonstrou-se estimulação da angiogênese e aumento da força de ruptura



(MOONEY *et al.*, 1990) ou de deposição de hidroxiprolina (REGAN *et al.*, 1993). Já outros estudos não demonstraram alterações (STEENFOS, *et al.*, 1989) ou relataram redução da força de ruptura e diminuição do gene de expressão do colágeno (SALOMON *et al.*, 1991). Este último estudo é corroborado por uma pesquisa envolvendo camundongos com a produção de TNF- $\alpha$  prejudicada, nos quais se obteve aumento significativo da força de ruptura em associação a um aumento na produção de colágeno e da transcrição do gene procolágeno (BETTINGER, *et al.*, 1994).

Pacientes submetidos a bloqueio sistêmico do TNF- $\alpha$ , por receberem tratamento com anticorpo monoclonal anti TNF- $\alpha$ , dentro de 12 horas do diagnóstico de sépsis, não apresentaram alteração na deposição de colágeno (CLARK, *et al.*, 1998).

A produção de mediadores pró-inflamatórios pelo cólon seccionado, como o TNF- $\alpha$ , interleucinas, eicosanóides entre outros podem ocasionar efeitos não só no local da lesão, como em outros tecidos e órgãos a distância. Estes fatores pró-inflamatórios em excesso, podem inclusive contribuir para a síndrome de disfunção de múltiplos órgãos (CLARK *et al.*, 2000).

Na doença de Crohn o tratamento de pacientes com infliximabe foi associado com redução substancial do marcador inflamatório sérico comumente elevado, a proteína C reativa. Células mononucleares de sangue periférico (CMSP) de pacientes tratados com infliximabe não apresentaram diminuição das respostas proliferativas em resposta a estímulos em comparação com pacientes não tratados; não foram observadas alterações substanciais na produção de citocinas pelas CMSP estimuladas depois do tratamento com infliximabe. A análise de células da lâmina própria obtidas por biópsia da mucosa intestinal mostrou que o tratamento com infliximabe

provoca redução do número de células capazes de expressar o TNF- $\alpha$  e a interferona gama. Estudos histológicos adicionais forneceram evidência que o tratamento com infliximabe reduz a infiltração de células inflamatórias em áreas afetadas do intestino e a presença de marcadores inflamatórios nesses sítios (GUIA DE ADMINISTRAÇÃO-REMICADE<sup>®</sup>). Em nosso estudo os resultados obtidos não demonstraram diferenças entre os grupos na avaliação do parâmetro infiltrado inflamatório.

A avaliação histológica de biópsias de cólon obtidas em humanos, antes e quatro semanas após administração de infliximabe, revelou redução substancial de TNF- $\alpha$  detectável (YAMAMOTO *et al.*, 2005a).

No presente estudo, ao contrário, a produção tecidual de TNF- $\alpha$  se manteve constante e igual no 3º dia pós-operatório em ambos os subgrupos C3 e E3, assim como nos demais subgrupos avaliados (C7, E7, C14 e E14). A produção do TNF- $\alpha$  tecidual foi aparentemente igual e constante para todos os animais ao longo do estudo. O resultado do estudo imunohistoquímico sugere que o infliximabe não alterou de forma significativa a produção tecidual do TNF- $\alpha$ . Ao contrário, estudo de TRINTAFILLIDIS *et al* (2005), obteve uma diminuição do TNF- $\alpha$  tecidual em ratos com colite induzida, tratados com infliximabe.

Estudos sugerem que o infliximabe pré-operatório não foi associado a aumento de complicações pós-operatórias precoces após cirurgia abdominal eletiva para doença de Crohn (COLOMBEL *et al.*, 2004) e que, na verdade, citocinas antiinflamatórias podem melhorar a cicatrização bloqueando a liberação do TNF- $\alpha$  (TAY *et al.*, 2003).

O *Picro-Sirius* é um corante aniônico forte, que age por reação de seu grupamento ácido sulfônico com grupamentos básicos presentes na molécula do colágeno. Suas moléculas alongadas são fixadas paralelamente às

fibras do colágeno. Esta relação de paralelismo entre as moléculas do corante e do colágeno resulta em um aumento de sua birrefringência podendo, portanto, ser considerado um corante específico para colágeno. A análise histomorfométrica tem a vantagem de quantificar e inclusive analisar qualitativamente os subtipos de colágenos presentes no reparo cicatricial, utilizando-se luz polarizada (por filtro ótico específico) devido às diferenças características de birrefringência entre os colágenos tipos I e III (JUNQUEIRA *et al.*,1979; JUNQUEIRA *et al.*,1982; MONTES & JUNQUEIRA, 1991; REYS, 2004).

Na avaliação histológica, no presente estudo, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos estudo e controle e entre os subgrupos. Na avaliação histomorfométrica do colágeno, em lâminas coradas pelo *Picro-Sirius*, através de análise (quantitativa e qualitativa) por imagem digitalizada e *software* específico (Image J), houve diferenças estatisticamente significantes quando comparados os animais dos subgrupos E3 e E14. Entretanto quando comparado o subgrupo C14 com o E 14 não foi observada diferença estatisticamente significativa que pudesse inclusive corroborar os resultados da avaliação pelo teste de resistência tênsil.

Em uma revisão sistemática examinando o uso de imunomoduladores e os riscos de complicações pós-operatórias em pacientes com doença inflamatória intestinal submetidos à cirurgia abdominal, concluiu-se que, no momento, não existe evidência de aumento da taxa de complicações pós-operatórias associadas ao uso de imunomoduladores (SUBRAMANIAN *et al.*, 2006). O tratamento com imunomodulador (infiximabe) perioperatório, melhorou de forma significativa os resultados de pacientes com doença de Crohn submetidos à ressecção e anastomose (TAY *et al.*, 2003). Alguns

autores consideram como uma indicação potencial o uso do infliximabe no pré-operatório de pacientes com doença de Crohn (SIPAHI, 2004).

Apesar de o infliximabe, um anticorpo monoclonal quimérico, produto de engenharia genética, ser constituído por frações humanas (maioria) e de camundongo, interferiu na concentração sérica do TNF- $\alpha$  em ratos, como demonstrado no resultado verificado ao se comparar os subgrupos C3 e E3 com o grupo referência. A administração do infliximabe diminuiu no 3º dia pós-operatório os valores do TNF- $\alpha$  sérico, que deveriam estar aumentados com o estímulo cirúrgico.

Neste estudo os resultados da quantificação do TNF- $\alpha$  no soro dos animais demonstraram que os níveis de TNF- $\alpha$  circulante são normalmente baixos como demonstrado pelo grupo “referência” (não submetidos a procedimentos cirúrgicos ou a administração de fármacos), que foram utilizados para se estabelecer um valor de referência para o TNF- $\alpha$  em ratos. Os valores do TNF- $\alpha$  não foram alterados de forma significativa com os procedimentos cirúrgicos a não ser no subgrupo C3 no qual a elevação sérica de TNF- $\alpha$  foi estatisticamente significativa, sugerindo que a agressão cirúrgica eleva o TNF- $\alpha$  nos pós-operatório precoce, porém por volta do 7º DPO estes valores estão semelhantes ao do grupo “referência”. Também não houve alterações significativas dos valores no grupo estudo (E). Os resultados da comparação entre os subgrupos C3 e E3 foram estatisticamente significantes, sugerindo um efeito do infliximabe sobre o TNF- $\alpha$  em ratos na fase inflamatória da cicatrização.

Apesar de atualmente não existir nenhuma prova definitiva de ligação entre a terapia com infliximabe e câncer, foi descrito na literatura um caso de carcinoma anorretal após terapia com infliximabe na doença de Crohn, deixando dúvidas quanto ao aumento na incidência de câncer em pacientes

tratados com infliximabe (MELICHAR *et al.*, 2006). Outros autores relatam associação da terapia com infliximabe com linfoma, sepses e óbito.

Em um estudo de tratamento de doença de Crohn em duas coortes feitas no Massachusetts General Hospital em Boston, EUA, os autores concluíram que apesar do risco aumentado de linfoma e morte associados ao uso do infliximabe, a melhora clínica substancial e um menor número de operações como resultado do tratamento com infliximabe resultaram em aumento da qualidade de vida e que em pacientes selecionados, os benefícios do infliximabe são muito maiores que os riscos, justificando o seu uso (SIEGEL *et al.*, 2006).

Em recente revisão sobre o uso do infliximabe no tratamento da retocolite ulcerativa, verificou-se que o infliximabe foi efetivo induzindo a remissão como resposta clínica, promovendo cicatrização e diminuindo o número de colectomias, pelo menos em curto prazo. Efeitos adversos atribuídos ao infliximabe não foram comuns nos estudos incluídos na revisão (LAWSON *et al.*, 2006). No presente estudo não observamos reações anafiláticas ou eventos sépticos.

O guia de administração do infliximabe preconiza a administração através de infusão endovenosa em doses que variam de 1 a 20 mg/kg de peso. Na doença de Crohn, atualmente a maior indicação para o uso do infliximabe, a dose recomendada é de 5 mg/kg de peso. A administração por infusão endovenosa do infliximabe pode apresentar efeitos indesejáveis. Em estudos clínicos, 19% dos pacientes tratados com infliximabe em comparação com 8% dos pacientes tratados com placebo apresentaram efeito relacionado à infusão durante a infusão ou nas 2 horas de pós-infusão. Aproximadamente 3% das infusões foram acompanhadas de sintomas inespecíficos como febre e calafrios, 0,7% de prurido ou urticária, 1% por

reações cardiopulmonares (dor torácica primária, hipotensão, hipertensão ou dispnéia) e 0,1% por sintomas combinados ou prurido/urticária e reações cardiopulmonares. A interrupção do tratamento ocorreu em 0,3% dos pacientes e todos se recuperaram, com ou sem terapia clínica (GUIA DE ADMINISTRAÇÃO – REMICADE®).

Vias alternativas de administração do infliximabe vêm sendo estudadas e existem estudos demonstrando que a administração subcutânea do infliximabe reduz os níveis de atividade inflamatória do intestino grosso de ratos com colite química, bem como o TNF- $\alpha$  tecidual, tendo os melhores resultados quando administrados na dose de 5 mg/kg de peso (TRINTAFILLIDIS *et al.*, 2005). Um estudo fase I, para avaliação da segurança, resposta clínica, e farmacocinética de uma formulação experimental do infliximabe para administração subcutânea ou intramuscular concluiu que esta formulação foi bem tolerada e foi associada a uma resposta favorável (WESTHOVENS *et al.*, 2006).

A administração subcutânea do infliximabe foi bem tolerada pelos animais neste estudo. Optamos por esta via baseado nos trabalhos de TRIANTAFILLIDIS (2005) e WESTHOVENS (2006) descritos acima, face às dificuldades em se administrar o infliximabe por infusão venosa prolongada em ratos, o que poderia requerer procedimento anestésico ou de sedação do animal. Entendemos que a apatia observada em alguns e a perda ponderal observada em todos os animais do grupo experimental tem relação com a droga e não com a via de administração e que a via subcutânea pode ser uma excelente alternativa.

No estudo, a mortalidade foi de 10% no grupo experimental e 3,3% no grupo controle, perfazendo uma mortalidade global de 6,66% e está de acordo com a literatura pertinente que relata taxas de mortalidade entre 0 a 11,4%,

por diversos motivos, desde os efeitos diretos das drogas utilizadas, como a toxicidade, até a deiscência da anastomose, a peritonite e as intercorrências anestésicas (MASTBOOM *et al.*, 1991; EUBANKS *et al.*, 1997; SIRIMARCO, 2000; ALMEIDA, 2006).

Novas pesquisas são necessárias para a confirmação destes resultados obtidos neste estudo experimental.

## **6-CONCLUSÃO**



## **6-CONCLUSÃO**

Nas condições e forma em que foi realizado o presente estudo, o infliximabe interferiu na fase inflamatória, caracterizando-se por redução na concentração de colágeno e melhorou a resistência tênsil das anastomoses na fase de remodelação.

## **7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABERRA, F. N.; LEWIS, J. D.; HASS, D.; ROMBEAU, J. L.; OSBORNE, B.; LICHTENSTEIN, G. R. Corticosteroids and immunomodulators: postoperative infectious complication risk in inflammatory bowel disease patients. **Gastroenterology**, 2003; 125 (2): 320-327.

ABREU, M. T. A patogênese da doença inflamatória intestinal: implicações para os clínicos. **Current Gastroenterology Reports Brasil**. 2003; 1(1): 7-16.

ABREU, M. T. Evolving issues in biologic therapy for Crohn's disease: an expert interview with Maria T. Abreu, MD. **Medscape Gastroenterology**. 2006; 8(1). [www.medscape.com](http://www.medscape.com) ; acesso em 16/08/2006.

ALMEIDA, R. M. **Avaliação dos efeitos do hemissulfato de s-metiluréia, um inibidor da enzima óxido nítrico sintase induzível, sobre a cicatrização de anastomoses colônicas em ratos**. Brasília, 2006. 89p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília – UnB, DF.

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.

BALLANTYNE, G. H. The experimental basis of intestinal suturing. Effect of surgical technique, inflammation, and infection on enteric wound healing. **Dis Colon Rectum**. 1984; 27: 61-71.

BETTINGER, D. A.; PELLICANE, J. V.; TARRY, W. C.; YAGER, D. R.; DIEGELMANN, R. F.; LEE, R.; COHEN, I. K.; DeMARIA, E. J. The role of inflammatory cytokines in wound healing: accelerated healing in dotoxin-resistant mice. **J Trauma**. 1994; 38: 810-813.

BURCH, J. M.; FRANCIOSE, R. J.; MOORE, E. E.; BIFFI, W. L.; OFFNER, P. J. Single-layer continuous versus two-layer interrupted anastomosis. **Ann Surg**. 2000; 231(6): 832-837.

BIOMYX TECHNOLOGY. Manual de utilização: **Recombinant Human Tumor Necrosis Factor  $\alpha$** . [www.biomyx.net](http://www.biomyx.net); acesso em 17/06/2007.

CAHILL R. A.; SHEEHAN, K. M.; SCANLON R. W.; MURRAY, F. E.; KAY, E. W.; REDMOND, H. P. Effects of selective cyclo-oxygenase 2 inhibitor on colonic anastomotic and skin wound integrity. **Br J Surg**. 2004; 91(12): 1613-1618.

CALI, R. L.; SMYRK, T. C.; BLATCHFORD, G. J.; THORSON, A. G.; CHRISTENSEN, M. A. Effect of prostaglandin E1 and steroid on healing colonic anastomoses. **Dis Colon Rectum**. 1993; 36: 1148-1151.

CARRICO, T. J.; MEHRHOF, A. I.; COHEN, I. K. Biology of wound healing. **Surg Clin North Am**. 1984; 64: 721-732.

CERDAN, C.; MARTIN, Y.; BRAILLY, H.; CORCOUL, M.; FLAVETTA, S.; COSTELLO, R.; MAWAS, C.; BIRG, F.; OLIVE, D. Il-1 alpha is produced by T lymphocytes activated via CD 2 plus CD 28 pathways. **J Immunol.** 1991; 146(2): 560-564.

CLARK, M. A.; CONNOLLY, A. B.; HILL, A. A.; PLANK, L. D.; STREAT, S. J.; SHENKIN, A.; HILL, G. L. Effect of a monoclonal antibody to tumor necrosis factor- $\alpha$  on cytokine and physiologic responses in severe sepsis: a randomized, clinical trial. **Crit Care Med.** 1998; 26: 1650-1656.

CLARK, M. A.; PLANK, L. D.; HILL, G. L. Wound healing associated with severe surgical illness. **World J Surg.** 2000; 24(6): 648-654.

CLARK, R. A. F. (ed.). **The molecular and cellular biology of wound repair.** 2.ed. New York, Plenum Press, 1996. cap 1: 3-50.

COLOMBEL, J. F.; LOFTUS JR, E.V.; WOLFF, B.G.; YOUNG-FADOCK, T.; HARMSEM, W. S.; SCHLECK, C.D.; SANDBORN, W. J. Early Postoperative Complications are not Increased in Patients with Crohn's Disease Treated Perioperatively with Infliximab or Immunosuppressive Therapy. **Am J Gastroenterol.** 2004; 99 (5): 878-883.

DANESE, S.; SEMERARO, S.; ARMUZZI, A.; PAPA, A.; GASBARRINI, A. Biological therapies for inflammatory bowel disease: research drives clinics. **Mini Rev Med Chem.** 2006; 6 (7): 771-784.

DE HINGH, I. H.; VAN GOOR, H.; DE MAN, B. M.; LOMME, R. M.; BLEICHRODT, R. P.; HENDRICKS, T. Selective cyclo-oxygenase 2 inhibition affects ileal but not colonic anastomotic healing in the early post operative period. **Br j Surg.** 2006; 93(4): 489-497.

DWINELL, M. B.; JOHANESEN, P. A.; SMITH, J. M. Immunobiology of epithelial chemokines in the intestinal mucosa. **Surgery.** 2003; 133(6): 601-607.

ECONOMOU, J. S.; MCBRIDE, W. H.; ESSNER, R.; RHOADES, K.; GOLUB, S.; HOLMES, E. C.; MORTON, D. L. Tumor necrosis factor production by IL-2-activated macrophages *in vitro* and *in vivo*. **Immunol.** 1989; 67: 514-519.

EHLRICH, H. P.; HUNT, T. K. The effect of cortisone and anabolic steroids on the tensile strength of healing wounds. **Ann Surg.** 1969; 170: 203-206.

EUBANKS, T. R.; GREENBERG, J. J.; DOBRIN, P. B.; HARFORD, F. J.; GAMELLI, R. L. The effect of different corticosteroids on the healing colon anastomosis and cecum in a rat model. **Am Surg.** 1997; 63: 266-269.

FERREIRA, M. M.; SCIALOM, J. M.; CAMPOS, A. D.; RAMALHO, L. L. Z.; MARCHINI, J. S.; FÉRES, O.; ROCHA, J. J. R. Efeito da desnutrição na cicatrização de anastomoses colônicas: estudo experimental em ratos. **Rev Bras Coloproct.** 2006; 26 (3): 239-243.

GARCIA-OSOGOBIO, S. M.; TAKAHASHI-MONROY, T.; VELASCO, L.; GAXIOLA, M.; SOTRES-VEJA, A. Single-layer colonic anastomoses using polyglyconate VS. Two-layer anastomoses using chromic catgut and silk. Experimental study in dogs. **Rev Invest Clin.** 2006; 58(3): 198-203.

GOGIA, P. P. **Clinical Wound Management.** 2003 Copyright by SLACK Incorporated. USA.

HAAN, B. B.; ELLIS, H.; WILKS, M. The role of infection on wound healing. **Surg Gynecol Obstet** 1974; 138: 693-700.

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.

HAWLEY, P. R. Causes and prevention of colonic anastomotic breakdown. **Dis Colon Rectum.** 1973; 16: 272-277.

HENDRIKS, T.; MASTBOOM, W. J. B. Healing of experimental anastomoses: parameters of repair. **Dis Colon Rectum,** 1990; 33: 891-901.

HERRMANN, J. B.; WOODWARD, S. C.; PULASKI, E. J. Healing of colonic anastomoses in the rat. **Surg Gynecol Obstet.** 1964; 119: 269-275.

HESP, F. L. E. M.; HENDRICKS, T.; LUBBERS, E. C.; BOER, H. H. M. de. Wound healing in the intestinal wall. Effects of infection on experimental ileal and colonic anastomoses. **Dis Colon Rectum.** 1984; 27: 462-467.

HÖER, J. J.; JUNGE, K.; SCHACHTRUPP, A.; KLINGE, U.; SCHUMPELICK, V. Influence of laparotomy closure technique on collagen synthesis in the incisional region. **Hernia**. 2002; 6(3): 93-98.

HOUDART, R.; LAVERGNE, A.; VALLEUR, P.; VILLET, R.; HAUTEFEUILLE, P. Vascular evolution of single-layer end-on colonic anastomosis. A microangiographic study of 180 anastomosis in the rat from two to 180 days. **Dis Colon Rectum**. 1985; 28: 475-480.

IPARDES – INSTITUTO PARANAENSE DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL. **Normas para a apresentação de documentos científicos**. Curitiba, PR. Editora UFPR, 2002.

IRVIN, T. T.; HUNT, T. K. Effect of malnutrition on colonic healing. **Ann Surg**. 1974; 180: 765-772.

IRVIN, T. T. Collagen metabolism in infected colonic anastomoses. **Surg Gynecol Obstet**. 1976; 143: 220-224.

ISBISTER, W. H. Anastomotic leak in colorectal surgery: a single surgeon's experience. **ANZ J Surg**. 2001; 71: 516-520.

ISHIMURA, K.; MOROGUCHI, A.; OKANO, K.; MAEBA, T.; MAETA, H. Local expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-10 on wound healing of intestinal anastomosis during endotoxemia in mice. **J Surg Res**. 2002; 108: 91-97.



JIBORN, H.; AHONEN, J.; ZEDERFELDT, B. Healing of colonic anastomoses. The effect of suture technique on collagen concentration in the colonic wall. **Am J Surg.** 1978a; 135: 333-340.

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

JIBORN, H.; AHONEN, J.; ZEDERFELDT, B. Healing of colonic anastomoses. II. Breaking strength of the colon after left colon resection and anastomoses. **Am J Surg.** 1978c; 136: 595-599.

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

JÖNSSON, K.; JIBORN, H.; ZEDERFELDT, B. Comparison of healing in the left colon and ileum. Changes in collagen content and collagen synthesis in the intestinal wall after ileal and colonic anastomoses in the rat. **Acta Chir Scand.** 1985; 151(6): 537-541.

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

JUNQUEIRA, L. C.; MONTES, G. S.; SANCHEZ, E. M. The influence of tissue section thickness on the study of collagen by the Picrosirius-polarization method. **Histochemistry**. 1982; 74 (1) : 153-156.

KANELLOS, D.; BLOUHOS, K; PRAMETEFTAKIS, M. G.; KANELLOS, I.; DEMETRIADES, H.; SAKKAS, L.; BETSIS, D. Effect of 5-fluorouracil plus interferon on the integrity of colonic anastomoses covering with fibrin glue. **World J Surg**. 2007; 31: 186-191.

KATZ, S.; IZHAR, M.; MIRELMAN, D. Bacterial adherence to surgical sutures: a possible factor in suture induced infection. **Ann Surg**. 1981; 194: 35-41.

KHALILI, T. M.; NAVARRO, R. A.; MIDLETON, Y.; MARGULIES, D. R. Early postoperative enteral feeding increases anastomotic strength in a peritonitis model. **Am J Surg**. 2001; 182(6): 621-624.

KHOURY, G. A.; WAXMAN, B. P. Large bowel anastomoses. I. The healing process and sutured anastomoses. A review. **Br J Surg**. 1983; 70: 61-63.

KLEIN, L.; CHADRARAJAN, J. Collagen degradation in rat skin but not in intestine during rapid growth: effect on collagen types I and III from skin. **Proc Natl Acad Sci USA**. 1977; 74: 1436-1439.

KNIGHT, D. M.; TRINH, H.; LE, J.; SIEGEL, S.; SHEALY, D.; MCDONOUGH, M.; SCALLON, B.; MOORE, M. A.; VILCEK, J.; DADDONA, P.; et al. Construction and initial characterization of a mouse-human chimeric anti-TNF antibody. **Mol Immunol.** 1993; 30 (16) : 1443-1453.

KONSTANTINIDIS, H. D.; SLAVAKIS, A. P.; BALLAS, K. D.; SIOGA, A. C.; ECONOMOU, L. D.; DEMERTZIDIS, C. I.; PISSANIDOU, T. T.; ATHANASIDOU, Z. S.; SAKADAMIS, A. K. The effect of capecitabine on the healing of colonic anastomosis in rats. **Dis Colon Rectum.** 2006; 50 (1): 89-96.

LEIBOVICH, S. J.; ROSS, R. A macrophage dependent factor that stimulates the proliferation of fibroblasts in vitro. **Am J Pathol** 1976; 84: 501-506.

LAWSON, M.; THOMAS, A.; AKOBENG, A. Tumor necrosis factor alpha blocking agents for induction of remission in ulcerative colitis. **Cochrane Database Syst Rev.** 2006 Jul 19; 3: CD 005112.

LOPES, J. V. **Avaliação histopatológica do peritônio exposto a choque térmico. Estudo experimental em ratos.** Brasília, 2006. 79p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília – UnB, DF.

MANTZOROS, I.; KANELLOS, I.; DEMETRIADES, H.; CHRISTOFORIDIS, E.; KANELLOS, D.; PRAMATEFTAKIS, M. G.; ZARABOUKAS, T.; BETSIS, D. Effect of steroid on the healing of colonic anastomoses in the rat. **Tech Coloproctol.** 2004; 8: 180-183.

MANTZOROS, I.; KANELLOS, I.; ANGELOPOULOS, S.; KOLIAKOS, G.; PRAMATEFTAKIS, M. G.; KANELLOS, D.; ZACHARAKIS, E.; ZARABOUKAS, T.; BETSIS, D. The effect of insulin-like growth factor I on healing of colonic anastomoses in cortisone-treated rats. **Dis Colon Rectum**. 2006; 49(9): 1431-1438.

MARGETTS, P. J.; KOLB, M.; YU, L.; HOFF, C. M.; HOLMES, C. J.; ANTHONY, D. C.; GAULDIE, J. Inflammatory cytokines, angiogenesis, and fibrosis in the rat peritoneum. **American Journal of Pathology**. 2002. 160(6): 2285-2294.

MARTINEAU, L.; SHEK, P. N. 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.; DE MAN, B. M.; DE BOER, H. H.; Influence of methylprednisolone on the healing of intestinal anastomoses in rats. **Br J Surg**. 1991; 78(1): 54-56.

MAURY, C. P. Tumor necrosis factor-alpha – an overview. **Acta Med Scand**. 1986; 220(5): 387-394.

MELICHAR, B.; BURES, J.; DEDIC, K. Anorectal carcinoma after infliximab therapy in Crohn's disease: Report of a Case. **Dis Colon Rectum** 2006; 49(8): 1228-1233.

MEZADRI, T. J.; TOMÁZ, V. A.; AMARAL, V. L. L. **Animais de laboratório. Cuidados na iniciação experimental.** Editora da UFSC. 2004.

MONTES, G.S.; JUNQUEIRA, L. C. The use of the Picrosirius-polarization method for the study of the biopathology of collagen. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 1991; 86 Suppl 3: 1-11.

MOONEY, D. P.; O'REILLY, M.; GAMELLI, R. L. Tumor necrosis factor and wound healing. **Ann Surg.** 1990; 211: 124-129.

NESBAKKEN, A.; NYGAARD K.; LUND, O. C. Outcome and late functional results after anastomotic leakage following mesorectal excision for rectal cancer. **Br J Surg.** 2001; 88: 400-404.

OLAISON, G. Healing capacity in relation to disease activity & modern medical treatment. ISURCS ABSTRACTS. **Dis Colon Rectum.** 2004. 47(6): 1059-1060.

OLIVEIRA, P.G. **Estudo dos efeitos de uma prostaglandina sintético, o misoprostol, sobre a cicatrização de anastomose no intestino grosso de ratos.** Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto – SP – Brasil 1989.

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.

OLIVEIRA, P. G. **Efeitos da peritonite por *Candida albicans* na cicatrização de anastomoses colônicas. Estudo experimental em ratos.** Tese (Doutorado) 1995. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

ORTIZ, D. F.; LAUAND, F.; CAMPOS, A. D.; ROCHA, J. J. R.; FERES, O. Efeito da drenagem abdominal na cicatrização de anastomoses colônicas. Estudo experimental em ratos. **Rev Bras Coloproct.** 2007; 27 (1): 63-68.

PARRA-MEMBRIVES, P.; RUIZ-LUQUE, V.; ESCUDERO-SEVERÍN, C.; AGUILAR-LUQUE, J.; MÉNDEZ-GARCIA, V. Effect of pentoxifylline on the healing of ischemic colorectal anastomosis. **Dis Colon Rectum.** 2007; 50 (3): 369-375.

PLATELL, C.; BARWOOD, N.; DORFMANN, G.; MAKIN, G. The incidence of anastomotic leaks in patients undergoing colorectal surgery. **Colorectal Dis.** 2006; 9 (1): 71-79.

PROCKOP, D. J.; KIVIRIKKO, K. I. Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy. **Annu Rev Biochem** 1995; 64: 403-434.

RAVO, B. Colorectal anastomotic healing and intracolonic bypass procedure. **Surg Clin North Am.** 1988; 68: 1267-1294.

REGADAS, S. M. M.; REGADAS, F. S. P.; RODRIGUES, L.V.; CARVALHO, C. G. S. M.; REGADAS FILHO, F. S. P. Modelo experimental de sutura manual em cólon de cão por vídeo-laparoscopia. **Acta Cir Bras.** [periódico na internet] 2005 Jul-Ago;20(4). Disponível em URL: <http://www.scielo.br/acb>.

REGAN, M. C.; KIRK, S. J.; HURSON, M.; SODEYAMA, M.; WASSERKRUG, H. L.; BARBUL, A. Tumor necrosis factor- $\alpha$  inhibits in vivo collagen synthesis. **Surgery.** 1993; 113: 173-177.

REYS, L. G. V. **Avaliação dos efeitos de uma heparina de baixo peso molecular, a enoxiparina, sobre a cicatrização de anastomoses cólicas em ratos.** Brasília, 2004. 79p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília – UnB, DF.

RICHE, F. C.; CHOLLEY, B. P.; PANIS, Y.H.; LAISNE, M. J.; BRIARD, C. G.; GRAULET, A. M.; GUERIS, J. L.; VALLEUR, P. D. Inflammatory cytokine response in patients with septic shock secondary to generalized peritonitis. **Crit Care Med.** 2000 Feb; 28 (2): 433-437.

ROCHA, J. J. R. **Estudo comparativo entre sutura contínua e sutura com pontos separados em anastomoses colo-cólicas em plano único: trabalho experimental em cães.** Ribeirão Preto, 1989. 113p. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto – SP.

SALOMON, G. D.; KASID, A.; CROMACK, D. T.; DIRECTOR, E.; TALBOT, T. L.; SANK, A.; NORTON, J. A. The local effects of cachectin/tumor necrosis factor on wound healing. **Ann Surg.** 1991; 214: 175-180.

SANDBORN, W. J. Optimizing anti-tumor necrosis factor strategies in inflammatory bowel disease. **Curr Gastroenterol Rep.** 2003; 5(6): 501-505.

SANDBORN, W. J. New biologic strategies for reducing TNF-alpha in Crohn's disease. **Medscape Gastroenterology.** 2006; 8(1). [www.medscape.com](http://www.medscape.com) ; acesso em 16/08/2006.

SCALLON, B. J.; MOORE, M.A.; TRINH, H.; KNIGHT, D. M.; GHRAYEB, J. Chimeric anti-TNF-alpha monoclonal antibody cA2 binds recombinant transmembrane TNF-alpha and activates immune effector functions. **Cytokine.** 1995 Apr; 7 (3) : 251-159.

SCHIEDECCK, T. H.; SCHWANDER, O.; BACA, I. Laparoscopic surgery for the cure of colorectal cancer: results of a German five-center study. **Dis Colon Rectum.** 2000; 43: 1-8.

SCHROCK, T. R.; DEVENEY, C. W.; DUNPHY, J. E. Factors contributing to leakage of colonic anastomoses. **Ann Surg.** 1973; 177: 513-518.

SIEGEL, C. A.; HUR, C.; KORZENIK, J. R.; GAZELE, G. S.; SANDS, B. E. Risks and Benefits of Infliximab for the Treatment of Crohn's Disease. **Clin Gastroenterol Hepatol.** 2006 Aug; 4 (8): 1017-1024.



SIEGEL, S. A.; SHEALY, D. J.; NAKADA, M. T.; LE, J.; WOULFE, D. S.; PROBERT, L.; KOLLIAS, G.; GHRAYEB, J.; VILCEK, DADDONA, P. E. The mouse/human chimeric monoclonal antibody cA2 neutralizes TNF in vitro and protects transgenic mice from cachexia and TNF lethality in vivo. **Cytokine**. 1995 Jan; 7 (1): 15-25.

SIPAHI, A. M. O tratamento da doença de Crohn: As bases científicas do tratamento prático. In: SIMPÓSIO SATÉLITE SCHERING-PLOUGH, 2004, **Congresso Brasileiro de Coloproctologia**, 53.

SIQUEIRA JR., J. F.; DANTAS, C. J. S. **Mecanismos celulares e moleculares da inflamação**. 2000. Medsi – Editora Médica e Científica Ltda. Rio de Janeiro - RJ.

SIRIMARCO, M. T. **Estudo comparativo dos efeitos de dois corticosteróides sintéticos, deflazacort e prednisona, na cicatrização de anastomoses colônicas de ratos**. Tese (Doutorado) 2000 Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

SMITH, M. R.; MUNGER, W. E.; KUNG, H. F.; TAKACS, L.; DURUM, S. K. Direct evidence for an intracellular role for tumor necrosis factor-alpha 1. Microinjection of tumor necrosis factor kills target cells. **J Immunol**. 1990; 144(1): 162-169.

SOUSA, J. B. **Estudo da cicatrização em anastomoses no intestino delgado de coelhos tratados com diclofenaco sódico**. Dissertação (Mestrado) 1989. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

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.

SOUSA, J. B. **Evolução da cicatrização de anastomoses colônicas sob a ação do diclofenaco sódico administrado no período perioperatório. Estudo experimental em coelhos.** Tese (Doutorado) 1994 Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

STEED, D. L. The role of growth factors in wound healing. **Surg Clin North Am** 1997; 77: 576-586.

STEENFOS, H. H.; HUNT, T. K.; SCHEUENSTUHL, H.; GOODSON, W. H., III. Selective effects of tumor necrosis factor-alpha on wound healing in rats. **Surgery**. 1989; 106: 171-175.

STEPHENS, F. U.; DUNPHY J. E.; HUNT, T. K. The effect of delayed administration of corticosteroids on wound contraction. **Ann Surg** 1971; 173: 214-218.

STREIT, M.; BELEZNAY, Z.; BRAATHEN, L. R. Topical application of tumor necrosis factor-alpha antibody infliximab improves healing of chronic wounds. **Int Wound J**. 2006; 3(3): 171-179.

STUMPF, M.; KLINGE, U.; MERTENS, P. R. Anastomotic leakage in the gastrointestinal tract-repair and prognosis. **Chirurg**. 2004; 75(11): 1056-1062.

STUMPF, M.; KLINGE, U.; WILMS, A.; ZABROCKI, R.; ROSCH, R.; JUNGE, K.; KRONES, C.; SCHUMPELICK, V. Changes of the extracellular matrix as risk factor for anastomotic leakage after large bowel surgery. **Surgery**. 2005; 137(2): 229-234.

STUMPF, M. KRONES, C. J.; KLINGE, U.; ROSCH, R.; JUNGE, K.; SCHUMPELICK, V. Collagen in colon disease. **Hernia**. 2006; 10 (6): 498-501.

SUBRAMANIAN, V.; POLLOK, R. C.; KANG, J. Y.; KUMAR, D. Systematic review of postoperative complications in patients with inflammatory bowel disease treated with immunomodulators. **Br J Surg**. 2006 Jul; 93 (7): 793-799.

TAY, G. S.; BINION, D. G.; EASTWOOD, D.; OTTERSON, M. F. Multivariate analysis suggests improved perioperative outcome in Crohn's disease patients receiving immunomodulator therapy after segmental resection and / or strictureplasty. **Surgery** 2003; 134: 565-572.

TOCCHI, A.; MAZZONI, G.; LEPRE, L. Prospective evaluation of omentoplasty in preventing leakage of colorectal anastomosis. **Dis Colon Rectum**. 2000; 43: 951-955.

TRIANAFILLIDIS, J. K.; PAPALOIS, A. E.; PARASI, A.; ANAGNOSTAKIS, E.; BURNAZOS, S.; GIKAS, A.; MERIKAS, E. G.; DOUZINAS, E.; KARAGIANNI, M.; SOTIRIOU, H. Favorable response to subcutaneous administration of infliximab in rats with experimental colitis. **World J Gastroenterol.** 2005 Nov 21; 11 (43): 6843-6847.

WANINGER, J.; KAUFMANN, G. W.; SHAH, I. A.; FARTHMAN 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: 319-323.

WESTHOVENS, R.; HOUSSIAU, F.; JOLY, J.; EVERITT, D. E.; ZHU, Y.; SISCO, D.; VAN HARTIGVELDT, B.; MASCELLI, M. A.; DUREZ, P.; BOUMAN-THIO, E. A phase I study assessing the safety, clinical response, and pharmacokinetics of an experimental infliximab formulation for subcutaneous or intramuscular administration in patients with rheumatoid arthritis. **J Rheumatol.** 2006 May; 33 (5): 847-853.

YAMAMOTO, T.; UMEGAE, S.; KITAGAWA, T.; MATSUMOTO, K. Postoperative change of mucosal inflammation at strictureplasty segment in Crohn's disease: cytokine production and endoscopic and histologic findings. **Dis Colon Rectum.** 2005a; 48(4): 749-757.

YAMAMOTO, T.; UMEGAE, S.; KITAGAWA, T.; MATSUMOTO, K. Intraperitoneal cytokine productions and their relationship to peritoneal sepsis and systemic inflammatory markers in patients with inflammatory bowel disease. **Dis Colon Rectum.** 2005b; 48(5): 1005-1015.

ZACHARAKIS, E.; DEMETRIADES, H.; KANELLOS, D.; SAPIDIS, N.; MANTZOROS, I.; KANELLOS, I.; KOLIAKOS, G.; ZARABOUKAS, T.; TOPOURIDOU, K.; BETSIS, D. Contribution of insulin-like growth factor I to the healing of colonic anastomoses in rats. **J Invest Surg.** 2007; 20(1): 9-14.

# **APÊNDICES**

TABELA 1 – PESO PRÉ-OPERATÓRIO, PESO NO DIA DA OPERAÇÃO, PESO NO DIA DA EUTANÁSIA, EVOLUÇÃO CLÍNICA APÓS ADMINISTRAÇÃO DO INFLIXIMABE E RESISTÊNCIA TÊNSIL DA ANASTOMOSE E DOSAGEM QUANTITATIVA DO TNF- $\alpha$ .

Animal	Peso inicial	Infliximabe 5mg/kg (ml)	Evolução	Peso na operação	Peso na re-operação	Resistência tênsil (N) Anastomose	Dosagem quantitativa do TNF- $\alpha$ (ng/mL)
E 3.1	347	1,75	s/ alterações	337	279	0,17	0,005
E 3.2	368	1,85	s/ alterações	358	340	0,19	0,007
E 3.3	317	1,60	s/ alterações	309	280	0,39	0,010
E 3.4	349	1,75	ericação	336	306	0,23	0,048
E 3.5	363	1,80	s/ alterações	350	320	0,52	0,009
E 3.6	348	1,75	apatia	336	313	1,03	0,009/0,072
E 3.7	357	1,80	s/ alterações	352	337	0,33	0,013
E 3.8	390	1,90	s/ alterações	379	358	0,51	0,002/0,002
E 3.9	334	1,65	s/ alterações	330	293	1,00	0,017/0,025
E 3.10	358	1,80	s/ alterações	345	294	0,72	0,007/0,007
E 7.1	381	1,90	s/ alterações	379	-----	-----	-----
E 7.2	364	1,80	s/ alterações	358	312	1,37	0,041
E 7.3	328	1,65	apatia	317	277	2,80	0,025
E 7.4	355	1,75	s/ alterações	351	300	0,88	0,003/0,004
E 7.5	338	1,70	s/ alterações	332	284	0,49	0,017
E 7.6	326	1,65	agitação	316	269	2,94	0,023/0,011
E 7.7	295	1,45	s/ alterações	292	256	1,17	0,013/0,174
E 7.8	335	1,70	s/ alterações	328	267	1,19	0,007/0,004
E 7.9	336	1,70	s/ alterações	329	272	1,27	0,006/0,024
E 7.10	324	1,60	s/ alterações	313	264	0,80	0,006/0,009
E 14.1	326	1,65	s/ alterações	318	290	2,94	0,009
E 14.2	320	1,60	s/ alterações	309	312	2,92	0,087
E 14.3	351	1,75	apatia	345	303	1,95	0,025/0,002
E 14.4	306	1,55	s/ alterações	300	250	1,85	0,005/0,006
E 14.5	344	1,70	s/ alterações	335	-----	-----	-----
E 14.6	360	1,80	s/ alterações	348	364	2,76	0,014/0,008
E 14.7	325	1,65	s/ alterações	318	337	1,96	0,004/0,057
E 14.8	357	1,80	s/ alterações	347	366	2,41	0,016/0,008
E 14.9	345	1,75	s/ alterações	335	338	1,79	0,007/0,029
E14.10	354	1,75	ericação	347	-----	-----	-----

TABELA 2 – PESO PRÉ-OPERATÓRIO, PESO NO DIA DA OPERAÇÃO, PESO NO DIA DA EUTANÁSIA, EVOLUÇÃO CLÍNICA APÓS ADMINISTRAÇÃO DA SOLUÇÃO DE NaCl 0,9% E RESISTÊNCIA TÊNSIL DA ANASTOMOSE E DOSAGEM QUANTITATIVA DO TNF- $\alpha$ .

Animal	Peso inicial	Solução de NaCl 0,9% (ml)	Evolução	Peso na operação	Peso na re-operação	Resistência tênsil (N) Anastomose	Dosagem quantitativa do TNF- $\alpha$ (ng/mL)
C 3.1	215	1,10	s/ alterações	225	199	0,05	0,084
C 3.2	221	1,10	s/ alterações	238	202	0,27	0,017
C 3.3	238	1,20	s/ alterações	255	213	0,07	0,026
C 3.4	338	1,70	s/ alterações	352	326	0,84	0,319
C 3.5	338	1,70	s/ alterações	346	296	0,43	0,009
C 3.6	380	1,90	s/ alterações	393	341	0,33	0,005
C 3.7	219	1,10	s/ alterações	231	220	0,31	0,007
C 3.8	350	1,75	s/ alterações	359	310	0,43	0,024
C 3.9	384	1,90	s/ alterações	397	332	1,05	0,085
C 3.10	380	1,90	s/ alterações	391	338	0,37	0,023
<hr/>							
C 7.1	334	1,65	s/ alterações	346	285	1,02	0,024
C 7.2	325	1,65	s/ alterações	336	245	0,94	0,496
C 7.3	378	1,90	s/ alterações	391	330	1,76	0,007
C 7.4	390	1,95	s/ alterações	400	310	2,06	0,007
C 7.5	359	1,80	s/ alterações	368	334	1,11	0,006
C 7.6	370	1,85	s/ alterações	383	296	1,47	0,132
C 7.7	352	1,75	s/ alterações	354	307	1,78	0,023
C 7.8	351	1,75	s/ alterações	372	306	1,78	0,007
C 7.9	356	1,80	s/ alterações	371	300	1,11	0,004
C 7.10	370	1,85	s/ alterações	382	-----	-----	-----
<hr/>							
C 14.1	350	1,75	s/ alterações	355	341	0,93	0,053
C 14.2	347	1,75	s/ alterações	358	333	1,33	0,011
C 14.3	238	1,20	s/ alterações	246	283	1,43	0,004
C 14.4	222	1,10	s/ alterações	233	257	1,36	0,005
C 14.5	339	1,70	s/ alterações	352	410	2,31	0,015
C 14.6	334	1,65	s/ alterações	337	331	0,84	0,021
C 14.7	365	1,80	s/ alterações	379	384	1,35	0,009
C 14.8	244	1,20	s/ alterações	256	291	1,55	0,004
C 14.9	328	1,65	s/ alterações	336	306	1,11	0,077
C14,10	255	1,30	s/ alterações	262	313	1,53	0,005



TABELA 3 – EVOLUÇÃO CLÍNICA PÓS-OPERATÓRIA (GRUPO ESTUDO).

Animal	Apatia	Eriçamento de pelos	Distensão abdominal	Diarréia	Hematoma	Flogose	Deiscência de parede
E 3.1	++	+	+	0	0	0	0
E 3.2	0	0	0	0	0	0	0
E 3.3	0	0	+	0	0	0	0
E 3.4	+	0	+	0	0	0	0
E 3.5	+	+	0	0	0	0	0
E 3.6	0	0	+	0	0	0	0
E 3.7	0	0	0	0	0	0	0
E 3.8	0	0	0	0	0	0	0
E 3.9	+	0	+	0	0	0	0
E 3.10	0	0	0	0	0	0	0
E 7.1	++	++	+	+	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
E 7.2	0	+	0	0	0	0	0
E 7.3	0	0	0	0	0	0	0
E 7.4	0	0	0	0	0	0	0
E 7.5	+	+	++	0	0	0	0
E 7.6	0	0	0	0	0	0	0
E 7.7	0	0	0	0	0	0	0
E 7.8	0	0	0	0	0	0	0
E 7.9	+	+	++	0	0	0	0
E 7.10	0	0	0	0	0	0	0
E 14.1	0	0	+	0	0	0	0
E 14.2	+	+	0	0	0	0	0
E 14.3	0	0	0	0	0	0	0
E 14.4	0	0	+++	++	0	0	+++ (pele)
E 14.5	++	+++	+	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
E 14.6	0	0	0	0	0	0	0
E 14.7	0	0	0	0	0	0	0
E 14.8	0	0	0	0	0	0	0
E 14.9	0	0	+	0	0	0	0
E14.10	+++	++	+	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

TABELA 4 – EVOLUÇÃO CLÍNICA PÓS-OPERATÓRIA (GRUPO CONTROLE).

Animal	Apatia	Eriçamento de pelos	Distensão abdominal	Diarréia	Hematoma	Flogose	Deiscência de parede
C 3.1	0	+	0	+	0	0	0
C 3.2	+	0	+	0	0	0	0
C 3.3	+	0	+	0	0	0	0
C 3.4	0	0	+	0	0	0	0
C 3.5	0	+	+	0	0	0	0
C 3.6	0	0	0	0	0	0	0
C 3.7	+	0	0	0	0	0	0
C 3.8	0	0	+	0	0	0	0
C 3.9	0	0	0	+	0	0	0
C 3.10	0	0	+	0	0	0	0
C 7.1	0	++	0	0	0	0	0
C 7.2	+	+	0	++	0	0	0
C 7.3	0	0	+	0	0	0	0
C 7.4	0	0	0	+	0	0	+++ (pele)
C 7.5	0	+	+++	0	0	0	0
C 7.6	0	0	0	0	0	0	0
C 7.7	0	0	0	0	0	0	0
C 7.8	0	0	+	0	0	0	0
C 7.9	0	+	0	+	0	0	0
C 7.10	++	0	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
C 14.1	+	0	+	0	0	0	0
C 14.2	0	+	0	0	0	0	0
C 14.3	0	0	0	0	0	0	0
C 14.4	0	0	0	0	0	0	0
C 14.5	0	+++	0	0	0	0	0
C 14.6	+	0	0	0	0	0	0
C 14.7	0	0	0	0	0	0	0
C 14.8	0	0	0	+	0	0	0
C 14.9	+	0	+	0	0	0	0
C 14,10	0	++	0	+	0	0	0

TABELA 5 – AVALIAÇÃO DOS ACHADOS CIRÚRGICOS NA RE-OPERAÇÃO (GRUPO ESTUDO).

Animal	Aderência	Hematoma	Abscesso	Análise operatória	Obstrução intestinal	Deiscência da anastomose
E 3.1	++	0	0	s/ peritonite	s/ obstrução	s/ vazamento
E 3.2	+	0	0	s/ peritonite	s/ obstrução	s/ vazamento
E 3.3	+	0	0	s/ peritonite	s/ obstrução	s/ vazamento
E 3.4	+	0	0	s/ peritonite	s/ obstrução	s/ vazamento
E 3.5	+	0	0	s/ peritonite	s/ obstrução	s/ vazamento
E 3.6	+	0	0	s/ peritonite	s/ obstrução	s/ vazamento
E 3.7	+	0	0	s/ peritonite	s/ obstrução	s/ vazamento
E 3.8	+	0	0	s/ peritonite	s/ obstrução	s/ vazamento
E 3.9	+	0	0	s/ peritonite	s/ obstrução	s/ vazamento
E 3.10	0	0	0	s/ peritonite	s/ obstrução	s/ vazamento
<hr/>						
E 7.1	++	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>peritonite fecal</b>	<b>s/ obstrução</b>	<b>vazamento</b>
E 7.2	+	0	0	s/ peritonite	s/ obstrução	s/ vazamento
E 7.3	++	0	0	s/ peritonite	s/ obstrução	s/ vazamento
E 7.4	+	0	0	s/ peritonite	s/ obstrução	s/ vazamento
E 7.5	+++	0	0	s/ peritonite	s/ obstrução	bloqueio epiplon
E 7.6	+	0	0	s/ peritonite	s/ obstrução	s/ vazamento
E 7.7	++	0	0	s/ peritonite	s/ obstrução	s/ vazamento
E 7.8	+	0	0	s/ peritonite	s/ obstrução	s/ vazamento
E 7.9	++	0	0	s/ peritonite	s/ obstrução	bloqueio epiplon
E 7.10	+	0	0	s/ peritonite	s/ obstrução	s/ vazamento
<hr/>						
E 14.1	+	0	0	s/ peritonite	s/ obstrução	s/ vazamento
E 14.2	++	0	0	s/ peritonite	s/ obstrução	s/ vazamento
E 14.3	0	0	0	s/ peritonite	s/ obstrução	s/ vazamento
E 14.4	++	0	0	s/ peritonite	s/ obstrução	s/ vazamento
E 14.5	++	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>s/ peritonite</b>	<b>s/ obstrução</b>	<b>s/ vazamento</b>
E 14.6	0	0	0	s/ peritonite	s/ obstrução	s/ vazamento
E 14.7	0	0	0	s/ peritonite	s/ obstrução	s/ vazamento
E 14.8	0	0	0	s/ peritonite	s/ obstrução	s/ vazamento
E 14.9	+	0	0	s/ peritonite	s/ obstrução	s/ vazamento
E14.10	++	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>s/ peritonite</b>	<b>s/ obstrução</b>	<b>bloqueio epiplon</b>

TABELA 6 – AVALIAÇÃO DOS ACHADOS CIRÚRGICOS NA RE-OPERAÇÃO (GRUPO CONTROLE).

Animal	Aderência	Hematoma	Abscesso	Análise operatória	Obstrução intestinal	Deiscência da anastomose
C 3.1	+	0	0	s/ peritonite	s/ obstrução	s/ vazamento
C 3.2	+	0	0	s/ peritonite	s/ obstrução	s/ vazamento
C 3.3	+	0	0	s/ peritonite	s/ obstrução	s/ vazamento
C 3.4	+	0	0	s/ peritonite	s/ obstrução	s/ vazamento *
C 3.5	0	0	0	s/ peritonite	s/ obstrução	s/ vazamento *
C 3.6	0	0	0	s/ peritonite	s/ obstrução	s/ vazamento
C 3.7	+	0	0	s/ peritonite	s/ obstrução	s/ vazamento
C 3.8	+	0	0	s/ peritonite	s/ obstrução	s/ vazamento *
C 3.9	0	0	0	s/ peritonite	s/ obstrução	s/ vazamento
C 3.10	+	0	0	s/ peritonite	s/ obstrução	s/ vazamento *
C 7.1	+	0	0	s/ peritonite	s/ obstrução	s/ vazamento
C 7.2	+	0	0	s/ peritonite	s/ obstrução	s/ vazamento
C 7.3	++	0	0	s/ peritonite	s/ obstrução	s/ vazamento
C 7.4	+	0	0	s/ peritonite	s/ obstrução	s/ vazamento
C 7.5	++	0	0	s/ peritonite	s/ obstrução	s/ vazamento
C 7.6	+++	0	0	s/ peritonite	s/ obstrução	s/ vazamento
C 7.7	+	0	0	s/ peritonite	s/ obstrução	s/ vazamento
C 7.8	+	0	0	s/ peritonite	s/ obstrução	s/ vazamento
C 7.9	0	0	0	s/ peritonite	s/ obstrução	s/ vazamento
C 7.10	+++	0	0	<b>s/ peritonite</b>	<b>s/ obstrução</b>	<b>bloqueio epiplon</b>
C 14.1	+	0	0	s/ peritonite	s/ obstrução	s/ vazamento
C 14.2	+	0	0	s/ peritonite	s/ obstrução	s/ vazamento
C 14.3	0	0	0	s/ peritonite	s/ obstrução	s/ vazamento
C 14.4	+	0	0	s/ peritonite	s/ obstrução	s/ vazamento
C 14.5	+	0	0	s/ peritonite	s/ obstrução	s/ vazamento
C 14.6	0	0	0	s/ peritonite	s/ obstrução	s/ vazamento
C 14.7	0	0	0	s/ peritonite	s/ obstrução	s/ vazamento
C 14.8	0	0	0	s/ peritonite	s/ obstrução	s/ vazamento
C 14.9	+	0	0	s/ peritonite	s/ obstrução	s/ vazamento
C14.10	+	0	0	s/ peritonite	s/ obstrução	s/ vazamento

\*Necrose de mucosa perianastomótica proximal



TABELA 8 – PARÂMETROS HISTOLÓGICOS ANALISADOS (GRUPO CONTROLE).

Animal	Fibroblastos quantidade	Fibroblastos disposição	Fibroblastos maturação	Fibrose	Abscesso	Infiltrado mononuclear	Infiltrado polimorfonuclear	Vascularização	Ulceração
C 3.1	++	enov	0	0	S	+	+++	+	0
C 3.2	+++	enov	+	0	S	++	++	0	++
C 3.3	++	enov	0	0	N	+	++	0	++
C 3.4	++	enov	0	0	S	+	+++	0	0
C 3.5	++	enov	0	+	S	++	++	+	0
C 3.6	+	enov	0	0	S	+	++	0	+++
C 3.7	++	enov	0	0	N	++	++	0	+
C 3.8	++	enov	0	0	N	+	+++	0	+
C 3.9	++	enov	0	0	S	+	+++	0	+
C 3.10	+++	horiz	0	0	N	+	++	+	0
C 7.1	++	enov	+	+	N	+	++	++	++
C 7.2	++	horiz	++	++	S	+	++	++	++
C 7.3	+++	horiz	++	++	S	+	+++	++	++
C 7.4	++	enov	+	+	S	++	++	++	+
C 7.5	+++	horiz	++	++	N	+	++	++	0
C 7.6	++	horiz	++	+	N	+	+++	+	0
C 7.7	+++	enov	+	+	N	++	++	+	0
C 7.8	+++	horiz	++	++	N	++	++	++	+
C 7.9	++	enov	+	+	S	+	+++	++	+
C 7.10	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
C 14.1	+++	horiz	+++	++	N	+++	+	++	0
C 14.2	++	horiz	+++	+++	N	++	++	+++	+
C 14.3	++	horiz	+++	++	N	+++	+	++	0
C 14.4	+++	horiz	++	++	N	++	++	+++	0
C 14.5	++	horiz	++	+++	N	++	++	++	0
C 14.6	++	horiz	++	++	S	++	++	+++	0
C 14.7	+++	horiz	+++	+++	N	+++	+	++	+
C 14.8	+	horiz	++	++	N	+++	+	++	0
C 14.9	++	horiz	+++	++	N	++	++	+++	0
C14.10	++	horiz	+++	+++	N	+++	+	+++	0

TABELA 9 - VARIAÇÃO PONDERAL DOS ANIMAIS - ANOVA

		n	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	95% Intervalo de confiança para a média		Mínimo	Máximo
						Faixa inferior	Faixa superior		
Peso inicial	E3	10	353,10	19,63	6,21	339,06	367,14	317,00	390,00
	E7	10	338,20	23,84	7,54	321,15	355,25	295,00	381,00
	E14	10	338,80	18,29	5,78	325,72	351,88	306,00	360,00
	C3	10	306,30	73,57	23,27	253,67	358,93	215,00	384,00
	C7	10	358,50	19,62	6,20	344,46	372,54	325,00	390,00
	C14	10	302,20	55,21	17,46	262,70	341,70	222,00	365,00
	Total	60	332,85	44,91	5,80	321,25	344,45	215,00	390,00
Peso: dia da operação	E3	10	341,90	17,89	5,66	329,10	354,70	309,00	379,00
	E7	10	331,50	25,19	7,97	313,48	349,52	292,00	379,00
	E14	10	330,20	17,66	5,58	317,57	342,83	300,00	348,00
	C3	10	316,70	74,76	23,64	263,22	370,18	225,00	397,00
	C7	10	369,30	22,18	7,01	353,44	385,16	326,00	400,00
	C14	10	311,40	55,26	17,48	271,87	350,93	233,00	379,00
	Total	60	333,50	44,15	5,70	322,10	344,90	225,00	400,00
Peso: dia da re-operação	E3	10	312,00	26,72	8,45	292,89	331,11	279,00	358,00
	E7	9	277,89	18,01	6,00	264,05	291,73	256,00	312,00
	E14	8	320,00	39,31	13,90	287,13	352,87	250,00	366,00
	C3	10	277,70	61,23	19,36	233,90	321,50	199,00	341,00
	C7	9	301,44	26,19	8,73	281,31	321,58	245,00	334,00
	C14	10	324,90	46,08	14,57	291,94	357,86	257,00	410,00
	Total	56	302,14	42,24	5,65	290,83	313,46	199,00	410,00

TABELA 10 - COMPARAÇÃO DAS VARIÂNCIAS DOS PESOS DOS ANIMAIS AFERIDOS NO INÍCIO DO EXPERIMENTO, NO DIA DA OPERAÇÃO E NO DIA DA REOPERAÇÃO.

Pesos	Fonte		Soma dos quadrados	df	Mediana quadrada	F	Sig.
Peso Inicial	Entre os grupos (Combinado)		27763,35	5,00	5552,67	3,29	,012
	Dentro dos grupos		91212,30	54,00	1689,12		
	Total		118975,65	59,00			
Peso dia da operação	Entre os grupos (Combinado)		21377,40	5,00	4275,48	2,47	,044
	Dentro dos grupos		93613,60	54,00	1733,59		
	Total		114991,00	59,00			
Peso dia da re-operação	Entre os grupos (Combinado)		19974,75	5,00	3994,95	2,56	,039
	Dentro dos grupos		78178,11	50,00	1563,56		
	Total		98152,86	55,00			



TABELA 11- PROVA DE HOMOCEASTICIDADE DOS PESOS DOS ANIMAIS NO DIA DA ADMINISTRAÇÃO DO INFLIMABE, NO DIA DA OPERAÇÃO E NO DIA DA REOPERAÇÃO.

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Peso Inicial	22,221	5	54	,000
Peso dia operação	21,683	5	54	,000
Peso dia re-operação	6,048	5	50	,000

TABELA 12 – VARIAÇÃO PONDERAL APÓS ADMINISTRAÇÃO DO INFLIXIMABE OU SOLUÇÃO DE NaCl A 0,9%. TESTE DE LEVENE E TESTE *t*.

Subgrupo	N	Média	Desvio padrão	Erro padrão
E	30,000	-8,400	3,114	0,569
C	30,000	11,133	3,998	0,730

	Teste de Levene para igualdade de variâncias		Teste T para comparação de médias						
	F	Significância	t	df	Significância (bi-caudal)	Diferença das médias	Diferença do erros padrão	Intervalo de confiança - 95%	
								Inferior	Superior
Variâncias iguais presumidas	0,226	0,636	-21,113	58,000	<b>0,000</b>	-19,533	0,925	-21,385	-17,681
Variâncias diferentes presumidas			-21,113	54,722	0,000	-19,533	0,925	-21,388	-17,679

TABELA 13 – VARIAÇÃO PONDERAL APÓS A OPERAÇÃO (3º DIA PÓS-OPERATÓRIO). TESTE DE LEVENE E TESTE *t*.

Subgrupo	N	Média	Desvio padrão	Erro padrão
E3	10,000	-31,200	13,983	4,422
C3	10,000	-41,000	16,200	5,123

	Teste de Levene para igualdade de variâncias		Teste T para comparação de médias						
	F	Significância	t	df	Significância (bicaudal)	Diferença das médias	Diferença do erro padrão	Intervalo confiança - 95%	
								Inferior	Superior
Variâncias iguais presumidas	0,429	0,521	1,448	18,000	<b>0,165</b>	9,800	6,767	-4,417	24,017
Variâncias diferentes presumidas			1,448	17,624	0,165	9,800	6,767	-4,439	24,039

TABELA 14 – VARIAÇÃO PONDERAL APÓS A OPERAÇÃO (7º DIA PÓS-OPERATÓRIO). TESTE DE LEVENE E TESTE *t*.

Subgrupo	N	Média	Desvio padrão	Erro padrão
E7	9,000	-48,333	7,681	2,560
C7	9,000	-67,556	19,622	6,541

	Teste de Levene para igualdade de variâncias		Teste T para comparação de médias						
	F	Significância	t	df	Significância (bi-caudal)	Diferença das médias	Diferença do erros padrão	Intervalo de 95%	
								Inferior	Superior
Variâncias iguais presumidas	5,866	0,028	2,737	16,000	0,015	19,222	7,024	4,332	34,112
Variâncias diferentes presumidas			2,737	10,396	<b>0,020</b>	19,222	7,024	3,652	34,792

TABELA 15 – VARIAÇÃO PONDERAL APÓS A OPERAÇÃO (14º DIA PÓS-OPERATÓRIO). TESTE DE LEVENE E TESTE *t*.

Subgrupo	N	Média	Desvio	Erro	Teste T para comparação de médias				
			padrão	padrão					
E14	8,000	-7,500	28,269	9,995					
C14	10,000	13,500	31,788	10,052					

	Teste de Levene para igualdade de variâncias		Teste T para comparação de médias						
	F	Significância	t	df	Significância (bi-caudal)	Diferença das médias	Diferença do erros padrão	Intervalo de 95%	
								Inferior	Superior
Variâncias iguais presumidas	0,293	0,596	-1,461	16,000	<b>0,163</b>	-21,000	14,372	-51,467	9,467
Variâncias diferentes presumidas			-1,481	15,772	0,158	-21,000	14,175	-51,086	9,086

TABELA 16 – TESTE EXATO DE FISHER, PARA ÓBITO.

Óbito	C3	E3	C7	E7	C14	E14	C	E
Não	10	10	9	9	10	8	29	27
Sim	0	0	1	1	0	2	1	3
<i>p</i>		1,000		0,763		0,237		<b>0,306</b>

TABELA 17 – FREQUÊNCIA DE APATIA PÓS-OPERATÓRIA.

Apatia	C3	E3	C7	E7	C14	E14	C	E
0	7	6	8	7	7	7	22	20
+	3	3	1	2	3	1	7	6
++	0	1	1	1	0	1	1	3
+++	0	0	0	0	0	1	0	1

TABELA 18 – TESTE EXATO DE FISHER PARA APATIA PÓS-OPERATÓRIA.

Apatia	C3	E3	C7	E7	C14	E14	C	E
Ausente	7	6	8	7	7	7	22	20
Presente	3	4	2	3	3	3	8	10
<i>p</i>		0,500		0,500		0,686		<b>0,389</b>

TABELA 19 – FREQUÊNCIA DE ERIÇAMENTO DE PELOS.

Eriçamento	C3	E3	C7	E7	C14	E14	C	E
0	8	8	7	6	7	7	22	21
+	2	2	2	3	3	1	7	6
++	0	0	1	1	0	1	1	2
+++	0	0	0	0	0	1	0	1

TABELA 20 – TESTE EXATO DE FISHER PARA ERIÇAMENTO DE PELOS.

Eriçamento	C3	E3	C7	E7	C14	E14	C	E
Ausente	8	8	7	6	7	7	22	21
Presente	2	2	3	4	3	3	8	9
<i>p</i>		0,709		0,500		0,686		<b>0,500</b>



TABELA 21 – FREQUÊNCIA DE DISTENSÃO ABDOMINAL.

Dist. abdominal	C3	E3	C7	E7	C14	E14	C	E
0	4	5	7	7	8	5	19	17
+	6	5	2	1	2	4	10	10
++	0	0	0	2	0	0	0	2
+++	0	0	1	0	0	1	1	1

TABELA 22 – TESTE EXATO DE FISHER PARA DISTENSÃO ABDOMINAL.

Dist. abdominal	C3	E3	C7	E7	C14	E14	C	E
Ausente	4	5	7	7	8	5	19	17
Presente	6	5	3	3	2	5	11	13
<i>p</i>		0,500		0,686		0,175		<b>0,396</b>

TABELA 23 – FREQUÊNCIA DE DIARRÉIA.

Diarréia	C3	E3	C7	E7	C14	E14	C	E
0	8	10	7	9	8	9	23	28
+	2	0	2	1	2	0	6	1
++	0	0	1	0	0	1	1	1
+++	0	0	0	0	0	0	0	0

TABELA 24 – TESTE EXATO DE FISHER PARA DIARRÉIA.

Diarréia	C3	E3	C7	E7	C14	E14	C	E
Ausente	8	10	7	9	8	9	23	28
Presente	2	0	3	1	2	1	7	2
<i>p</i>		0,237		0,291		0,500		<b>0,073</b>

TABELA 25 – FREQUÊNCIA DE ADERÊNCIAS.

Aderência	C3	E3	C7	E7	C14	E14	C	E
0	3	1	1	0	4	4	8	5
+	7	8	5	5	6	2	18	15
++	0	1	2	4	0	4	2	9
+++	0	0	2	1	0	0	2	1

TABELA 26 – TESTE EXATO DE FISHER PARA ADERÊNCIAS.

Aderência	C3	E3	C7	E7	C14	E14	C	E
Ausente	3	1	1	0	4	4	8	5
Presente	7	9	9	10	6	6	22	25
<i>p</i>		0,291		0,500		0,675		<b>0,266</b>

TABELA 27 – FREQUÊNCIA DE HEMATOMA.

Hematoma	E3	C3	E7	C7	E14	C14	E	C
0	10	10	10	10	10	10	30	30
+	0	0	0	0	0	0	0	0
++	0	0	0	0	0	0	0	0
+++	0	0	0	0	0	0	0	0

TABELA 28 – TESTE EXATO DE FISHER PARA HEMATOMA.

Hematoma	E3	C3	E7	C7	E14	C14	E	C
Ausente	10	10	10	10	10	10	30	30
Presente	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>p</i>	1,000		1,000		1,000		<b>1,000</b>	

TABELA 29 – FREQUÊNCIA DE FLOGOSE.

Flogose	E3	C3	E7	C7	E14	C14	E	C
0	10	10	10	10	10	10	30	30
+	0	0	0	0	0	0	0	0
++	0	0	0	0	0	0	0	0
+++	0	0	0	0	0	0	0	0

TABELA 30 – TESTE EXATO DE FISHER PARA FLOGOSE.

Flogose	E3	C3	E7	C7	E14	C14	E	C
Ausente	10	10	10	10	10	10	30	30
Presente	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>p</i>	1,000		1,000		1,000		<b>1,000</b>	

TABELA 31 – RESISTÊNCIA TÊNซิล DA ANASTOMOSE COLÔNICA NO 3º DIA PÓS-OPERATÓRIO, TESTE DE LEVENE E TESTE *t*.

Subgrupo	N	Desvio Erro		
		Média	padrão	padrão
E3	10,000	0,509	0,316	0,100
C3	10,000	0,415	0,312	0,099

	Teste de Levene para igualdade de variâncias		Teste T para comparação de médias						
	F	Significância	t	df	Significância (bi-caudal)	Diferença das médias	Diferença do erros padrão	Intervalo de 95%	
								Inferior	Superior
Variâncias iguais presumidas	0,110	0,744	0,669	18,000	<b>0,512</b>	0,094	0,140	-0,201	0,389
Variâncias diferentes presumidas			0,669	17,998	0,512	0,094	0,140	-0,201	0,389

TABELA 32 – RESISTÊNCIA TÊNSIL DA ANASTOMOSE COLÔNICA NO 7º DIA PÓS-OPERATÓRIO, TESTE DE LEVENE E TESTE *t*.

Subgrupo	N	Média	Desvio padrão	Erro padrão	Teste T para comparação de médias				
					F	Significância	t	df	Significância (bi-caudal)
								Inferior	Superior
E7	9,000	1,434	0,858	0,286					
C7	9,000	1,448	0,413	0,138					
Variâncias iguais presumidas	2,314	0,148	-0,042	16,000	<b>0,967</b>	-0,013	0,317	-0,686	0,660
Variâncias diferentes presumidas			-0,042	11,511	0,967	-0,013	0,317	-0,708	0,682

TABELA 33 – RESISTÊNCIA TÊNซิล DA ANASTOMOSE COLÔNICA NO 14º DIA PÓS-OPERATÓRIO, TESTE DE LEVENE E TESTE *t*.

Subgrupo	N	Média	Desvio padrão	Erro padrão
E14	8,000	2,323	0,495	0,175
C14	10,000	1,374	0,407	0,129

	Teste de Levene para igualdade de variâncias		Teste T para comparação de médias						
	F	Significância	t	df	Significância (bi-caudal)	Diferença das médias	Diferença do erros padrão	Intervalo de 95%	
								Inferior	Superior
Variâncias iguais presumidas	2,084	0,168	4,469	16,000	<b>0,000</b>	0,949	0,212	0,499	1,398
Variâncias diferentes presumidas			4,368	13,536	0,001	0,949	0,217	0,481	1,416



TABELA 34 – TESTE EXATO DE FISHER PARA QUANTIDADE DE FIBROBLASTOS.

	C3	E3	C7	E7	C14	E14	C	E
Ausente	0	0	0	0	0	0	0	0
Presente	10	10	9	9	10	8	29	27
<i>p</i>		1		1		1		<b>1</b>

TABELA 35 – TESTE EXATO DE FISHER PARA DISPOSIÇÃO DE FIBROBLASTOS.

	C3	E3	C7	E7	C14	E14	C	E
Horizontalização	1	0	5	6	10	8	16	14
Enovelamento	9	10	4	3	0	0	13	13
<i>p</i>		0,5		0,5		1		<b>0,5075</b>

TABELA 36 – TESTE EXATO DE FISHER PARA MATURAÇÃO DE FIBROBLASTOS.

	C3	E3	C7	E7	C14	E14	C	E
Ausente	9	8	0	0	0	0	9	8
Presente	1	2	9	9	10	8	20	19
<i>p</i>		0,5		1		1		<b>0,5704</b>

TABELA 37 – TESTE EXATO DE FISHER PARA FIBROSE.

	C3	E3	C7	E7	C14	E14	C	E
Ausente	9	9	0	0	0	0	9	9
Presente	1	1	9	9	10	8	20	18
<i>p</i>	0,763		1		1		<b>0,6809</b>	

TABELA 38 – TESTE EXATO DE FISHER PARA ABSCESSO.

	C3	E3	C7	E7	C14	E14	C	E
Sim	4	2	5	5	9	7	18	14
Não	6	8	4	4	1	1	11	13
<i>p</i>	0,314		0,681		0,706		<b>0,308</b>	

TABELA 39 – TESTE EXATO DE FISHER PARA INFILTRADO MONONUCLEAR.

	C3	E3	C7	E7	C14	E14	C	E
Ausente	0	0	0	0	0	0	0	0
Presente	10	10	9	9	10	8	29	27
<i>p</i>		1		1		1		<b>1</b>

TABELA 40 – TESTE EXATO DE FISHER PARA INFILTRADO POLIMORFONUCLEAR.

	C3	E3	C7	E7	C14	E14	C	E
Ausente	0	0	0	0	0	0	0	0
Presente	10	10	9	9	10	8	29	27
<i>p</i>		1		1		1		<b>1</b>

TABELA 41 – TESTE EXATO DE FISHER PARA VASCULARIZAÇÃO.

	C3	E3	C7	E7	C14	E14	C	E
Ausente	7	5	0	0	0	0	7	5
Presente	3	5	9	9	10	8	22	22
<i>p</i>	0,325		1		1		<b>0,4274</b>	

TABELA 42 – TESTE EXATO DE FISHER PARA ULCERAÇÃO.

	C3	E3	C7	E7	C14	E14	C	E
Ausente	4	4	3	4	8	7	15	15
Presente	6	6	6	5	2	1	14	12
<i>p</i>	0,675		0,5		0,588		<b>0,4925</b>	

TABELA 43 – RESULTADOS DA DOSAGEM QUANTITATIVA DO TNF- $\alpha$  SÉRICO, ATRAVÉS DO MÉTODO ELISA, COM KIT ESPECÍFICO PARA RATOS, INCLUSIVE AS DOSAGENS EM DUPLICATA (ng/mL).

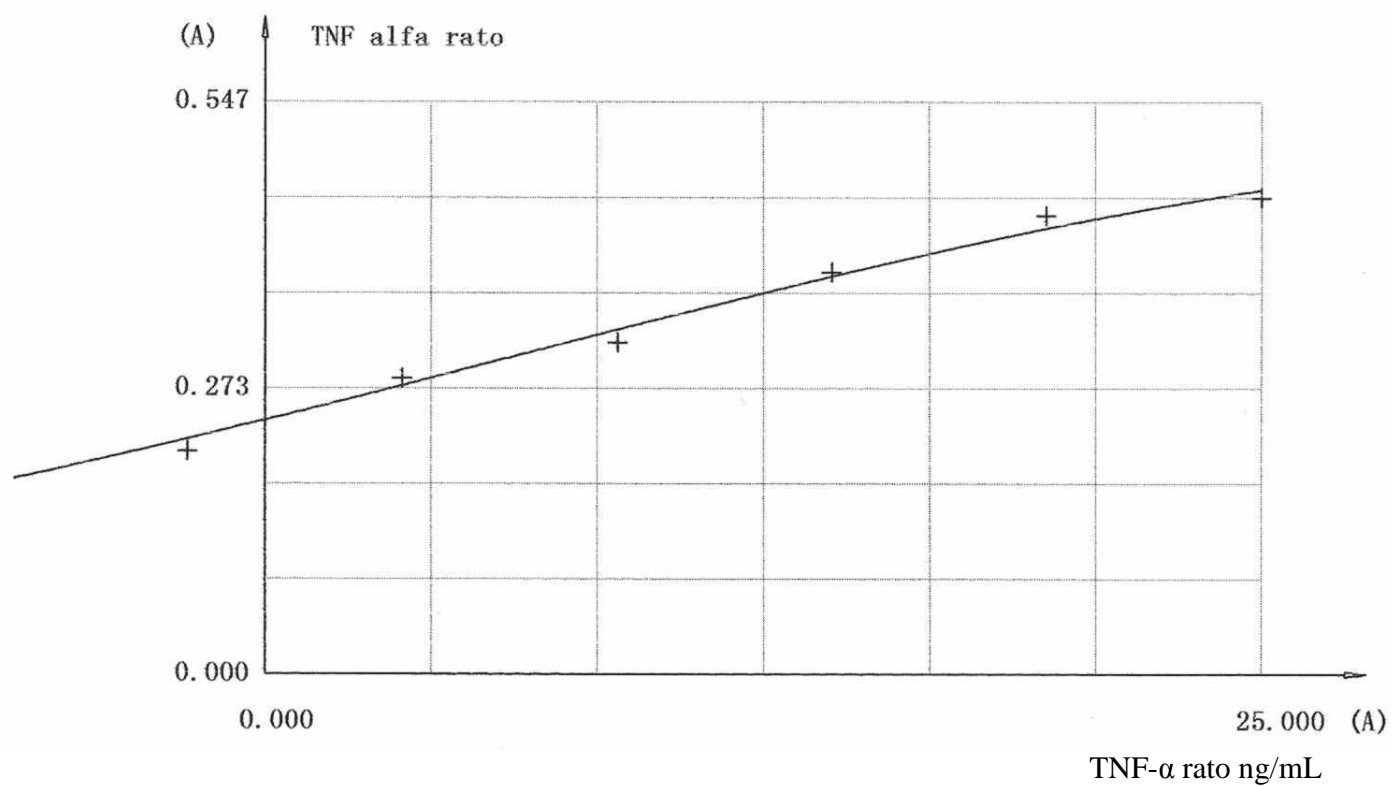
Rato	Grupos					
	Experimental		Controle			
	E3	E7	E14	C3	C7	C14
1	0,005	-----	0,009	0,084	0,024	0,053
2	0,007	0,041	0,087	0,017	0,496	0,011
3	0,010	0,025	0,025/0,002	0,026	0,007	0,004
4	0,048	0,003/0,004	0,005/0,006	0,319	0,007	0,005
5	0,009	0,017	-----	0,009	0,006	0,015
6	0,009/0,072	0,023/0,011	0,014/0,008	0,005	0,132	0,021
7	0,013	0,013/0,174	0,004/0,057	0,007	0,023	0,009
8	0,002/0,002	0,007/0,004	0,016/0,008	0,024	0,007	0,004
9	0,017/0,025	0,006/0,024	0,007/0,029	0,085	0,004	0,077
10	0,007/0,007	0,006/0,009	-----	0,023	-----	0,005

TABELA 44 – RESULTADO DA DOSAGEM QUANTITATIVA DO TNF- $\alpha$  SÉRICO, ATRAVÉS DO MÉTODO ELISA, COM KIT ESPECÍFICO PARA RATOS, EM ANIMAIS NÃO SUBMETIDOS A MEDICAÇÃO OU PROCEDIMENTO CIRÚRGICO, PARA ESTABELECIMENTO DE VALOR REFERÊNCIA (ng/mL).

Animais não manipulados	
Rato	TNF- $\alpha$ (ng/mL)
1	0,996
2	0,936
3	0,824
4	0,850
5	0,953

CURVA PADRÃO DO TNF- $\alpha$  EM RATOSReport

TP-READER



(A)– Absorbância 450 nm

# **ANEXOS**



## DECLARAÇÃO

Declaramos junto a Universidade de Brasília, a Área de Clínica Cirúrgica da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, ao CNPq e ao Comitê de Ética no Uso Animal – CEUA, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, que os resultados da pesquisa “Avaliação dos Efeitos do Infiximabe na Cicatrização de Anastomoses Colônicas em Ratos”, serão tornados públicos, sejam eles favoráveis ou não.

Declaramos ainda que os dados coletados serão enviados para publicação em revista indexada, de preferência em língua inglesa e as lâminas com os cortes histológicos ficarão arquivadas na Faculdade de Medicina.

Prof. Dr. Paulo Gonçalves de Oliveira – Pesquisador responsável  
Diretor da Faculdade de Medicina

Luiz Alberto Mendonça de Freitas – Pesquisador colaborador  
Aluno de Pós-Graduação – Mestrado – Faculdade de Medicina



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UnB

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - IB  
COMITÊ DE ÉTICA NO USO ANIMAL - CEUA

Brasília, 31 de outubro de 2006.

### **DECLARAÇÃO**

Declaramos que o projeto intitulado “**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO INFLIXIMABE NA CICATRIZAÇÃO DE ANASTOMOSES COLÔNICAS EM RATOS**”, sob responsabilidade do Prof. Paulo Gonçalves de Oliveira, foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

Profa. Anamélia Lorenzetti Bocca  
Coordenadora do CEUA