



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

**EFEITOS DA HIPOTERMIA PERIOPERATÓRIA NA  
CICATRIZAÇÃO DAS ANASTOMOSES DE CÓLON, EM RATOS**

**DOUTORADO**

**João Carlos Costa de Oliveira**

**Florianópolis  
2013**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

João Carlos Costa de Oliveira

**EFEITOS DA HIPOTERMIA PERIOPERATÓRIA NA  
CICATRIZAÇÃO DAS ANASTOMOSES DE CÓLON, EM RATOS**

Tese apresentada à Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Ciências Médicas.

Orientador: Prof. Dr. Armando José D'Acâmpora

Área de Concentração: Investigação Biomédica.

Linha de Pesquisa: Modelos experimentais em procedimentos cirúrgicos.

Florianópolis  
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Oliveira, João Carlos Costa de  
Efeitos da Hipotermia Perioperatória na Cicatrização das  
Anastomoses de Cólon, em Ratos / João Carlos Costa de  
Oliveira ; orientador, Armando José D'Acâmpora -  
Florianópolis, SC, 2013.  
70 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-  
Graduação em Ciências Médicas.

Inclui referências

1. Ciências Médicas. 2. Anastomose cirúrgica. 3.  
Hipotermia. 4. Cicatrização. 5. Cólon. I. D'Acâmpora, Armando  
José . II. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas. III. Título.

**JOÃO CARLOS COSTA DE OLIVEIRA**

**EFEITOS DA HIPOTERMIA PERIOPERATÓRIA NA  
CICATRIZAÇÃO DAS ANASTOMOSES DE CÓLON, EM RATOS**

Esta dissertação foi submetida ao processo de avaliação pela Banca Examinadora para obtenção do título de:

**DOCTOR EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

E aprovada em 05 de junho de 2013, atendendo as normas da legislação vigente da Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Área de Concentração: **Investigação Biomédica.**



Prof. Dr.ª Tânia Silvia Fróde

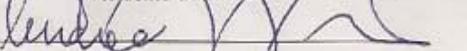
Coordenadora do Programa

Banca Examinadora:



Prof. Dr. Armando José D'Acâmpora

Presidente/Orientador



Prof. Dr.ª Andréa Gonçalves Trentin

Membro



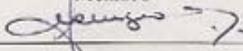
Prof. Dr. José Marino Neto

Membro



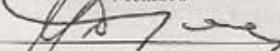
Prof. Dr. Leonardo de Lucca Schiavon

Membro



Prof. Dr.ª Maria de Lourdes Pessole Biondo Simões

Membro



Prof. Dr. Manoel Roberto Maciel Trindade

Membro

Florianópolis, 2013



Este trabalho é dedicado à minha  
mãe **Alice Costa de Oliveira**, que  
com seu coração de mãe educou  
muito bem a mim e aos meus  
irmãos.



## AGRADECIMENTOS

À minha esposa Cátia com amor, por sua presença sempre ao meu lado em nossa trajetória por esta vida.

Aos meus filhos Camila e Henrique, dois jovens que a todo o momento me enchem de orgulho.

Ao meu pai Manoel Palhano de Oliveira “*in memoriam*”.

Ao meu orientador Prof. Armando José D’Acâmpora, pelo crédito depositado em mim, pela orientação e por estar sempre disponível às minhas solicitações.

À Prof<sup>ª</sup>. Márcia Pizzichinni por reestruturar o Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas em nossa Universidade.

À Prof<sup>ª</sup>. Tânia Silvia Fröde, coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas (PPGCM), que sempre esteve disponível a ajudar e consistentemente contribuiu em diversas fases da realização desta tese.

Aos demais professores do PPGCM, por partilharem seus conhecimentos com seus alunos de forma desprendida.

Aos meus colegas e amigos, alunos do curso de doutorado, que compartilharam comigo as dificuldades e os avanços.

Ao Prof. André Bafica e à Nicoli De Bona Heck por sua contribuição na realização da determinação da expressão gênica de citocinas e fatores de crescimento.

Ao Prof. Marcelo Maraschin e à Aline Pereira por sua contribuição na realização das mensurações da hidroxiprolina tecidual e dos marcadores do estresse oxidativo.

Ao colega Gianfranco Luigi Colombeli por sua colaboração na realização do estudo histológico das amostras.

Ao Prof. Paulo Freitas por sua colaboração na análise estatística deste trabalho.

Aos funcionários Maicon Oliveira Buss, Luiz Henrique Prazeres e Carlos Alberto Joaquim, do Laboratório de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental, incansáveis em seu auxílio.



## RESUMO

OLIVEIRA, João Carlos Costa de (2013). *Efeitos da hipotermia perioperatória na cicatrização das anastomoses de cólon, em ratos*. 70f. Tese (Tese de Doutorado em Ciências Médicas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2013.

**Introdução:** O cólon é a região do trato gastrointestinal mais vulnerável à deiscência anastomótica, complicação que apresenta risco potencialmente letal. A hipotermia perioperatória está associada a efeitos prejudiciais ao paciente, aumentando as taxas de complicações operatórias, anestésicas e pós-operatórias. A hipotermia prejudica a função imune e também reduz a pressão parcial de oxigênio tecidual no sítio cirúrgico.

**Objetivo:** Avaliar a hipótese de que a hipotermia perioperatória induzida ( $32 \pm 1^\circ \text{C}$ ) em ratos influi na cicatrização das anastomoses de cólon.

**Método:** Ratos Wistar machos ( $n=48$ ) foram aleatoriamente divididos em 2 grupos e posteriormente em oito subgrupos com seis animais, que foram submetidos à laparotomia, secção do sigmoide e anastomose imediata. Quatro subgrupos experimentais (grupo I) foram operados sob normotermia ( $36 \pm 1^\circ \text{C}$ ) e os outros quatro (grupo II) sob hipotermia ( $32 \pm 1^\circ \text{C}$ ), as reoperações dos animais foram realizadas nos dias 3, 7 e 14 de pós-operatório e dois grupos SHAM com 3 dias. Foram avaliados pressão de ruptura da anastomose, teor de hidroxiprolina tecidual, análise histológica de parâmetros inflamatórios e cicatriciais (infiltrado celular inflamatório, edema, fibrina, deposição de colágeno e células apoptóticas). A partir dos tecidos cicatriciais, foram avaliadas as atividades das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) e os níveis dos marcadores não enzimáticos de estresse oxidativo como a glutatona reduzida (GSH) e a peroxidação lipídica (TBARS); e a quantificação relativa da expressão gênica (DNAc) de citocinas: interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6) e interleucina 10 (IL-10) e fatores de crescimento: fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e fator de crescimento insulina-like (IGF-1), por reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (PCR-RT) em tempo real. As médias foram comparadas entre grupos correspondentes de cada tempo em dias da coleta de amostras e da morte indolor assistida (MIA).

**Resultados:** Os grupos hipotérmicos apresentaram pressão de ruptura da anastomose menor nos dias 7 e 14 de pós-operatório, teor de hidroxiprolina reduzido no dia 14, redução do infiltrado inflamatório e de edema no dia 3 e deposição de colágeno inferior no dia 14. Os grupos hipotérmicos apresentaram redução estatisticamente significativa da atividade da enzima SOD no dia 7 de pós-operatório, da CAT nos dias 7 e 14 de pós-operatório e nos níveis de GSH no dia 7 de pós-operatório. O nível de peroxidação lipídica esteve aumentado no grupo hipotérmico no dia 7 de pós-operatório e reduzido no dia 14, em comparação aos grupos normotérmicos. A expressão gênica de citocinas nos animais hipotérmicos foi reduzida em IL-1 no dia 3, IL-6 nos dias 7 e 14 e IL-10 nos dias 7 e 14 e no fator de crescimento IGF-1 no dia 7.

**Conclusão:** A hipotermia perioperatória apresentou efeitos prejudiciais à cicatrização das anastomoses de cólon em ratos.

**Descritores:** Anastomose Cirúrgica. Hipotermia. Cicatrização. Cólon. Hidroxiprolina.

## ABSTRACT

**Introduction:** The colon is the region of the gastrointestinal tract more vulnerable to anastomotic dehiscence, a complication that presents potentially lethal risk. Perioperative hypothermia is associated with detrimental effects to the patient, increasing the rates of operative, anesthetic and postoperative complications. Hypothermia impairs immune function and also reduces the partial pressure of oxygen tissue at the surgical site.

**Objective:** We evaluated the hypothesis that induced perioperative hypothermia ( $32 \pm 1^\circ \text{C}$ ) in rats causes adverse effects on healing of colonic anastomosis.

**Materials and methods:** Male Wistar rats ( $n= 48$ ) were randomly divided into 2 groups and then into eight groups with six animals that underwent laparotomy, sigmoid section and immediate anastomosis. Four experimental subgroups (group I) were operated under normothermia ( $36 \pm 1^\circ \text{C}$ ) and four (group II) under hypothermia ( $32 \pm 1^\circ \text{C}$ ), the reoperations were performed on days 3, 7 and 14 after the first surgery and two groups SHAM on 3 days. We evaluated anastomotic bursting pressure, tissue hydroxyproline content, histological analysis of inflammatory parameters and healing (inflammatory cell infiltrate, edema, fibrin, collagen deposition and apoptotic cells). From the scar tissue, we evaluated the activities of antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) and levels of non-enzymatic markers of oxidative stress such as reduced glutathione (GSH) and lipid peroxidation (TBARS) and quantification relative gene expression (cDNA) of inflammatory cytokines [interleukin 1 (IL-1), interleukin 6 (IL-6) and interleukin 10 (IL-10)] and growth factors [vascular endothelial growth factor (VEGF) and insulin-like growth factor (IGF-1)] by polymerase chain reaction reverse transcription (RT-PCR) in real time. Means were compared between groups corresponding to each time days of sampling and underwent to assisted painless death.

**Results:** Both hypothermic groups showed anastomotic burst pressure lower on days 7 and 14 after surgery, reduced hydroxyproline content on day 14, reduction of inflammatory infiltrates and edema at day 3 and less collagen deposition on day 14. The hypothermic groups showed statistically significant reduction in activity of SOD on day 7 postoperatively, the CAT on days 7 and 14 postoperatively and levels of GSH on day 7 postoperatively. The level of lipid peroxidation was increased in the hypothermia group at day 7 postoperatively and

decreased on day 14, compared with normothermic groups. Cytokine gene expression in animals hypothermic was reduced by IL-1 on days 3, IL-6 on days 7 and 14 and IL-10 on days 7 and 14 and in the growth factor IGF-1 on day 7.

**Conclusion:** Perioperative hypothermia had detrimental effects on healing of colonic anastomosis in rats.

**Keywords:** Colonic Anastomosis. Hypothermia. Healing. Bursting Pressure. Hydroxyproline.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Divisão dos grupos de estudo. ....	34
Figura 2 - Temperatura retal em °C, monitorada durante as cirurgias. Na imagem superior o animal mantido em normotermia e na imagem inferior o animal submetido à hipotermia.....	35
Figura 3 - Imagem do cólon sigmoide identificado, isolado e com local da secção e anastomose definidos.....	37
Figura 4 - Anastomose colônica concluída. ....	37
Figura 5 - Segmento de cólon sigmoide retirado para as análises.....	38
Figura 6 - Equipamento para determinação da pressão de ruptura da anastomose. ....	39
Figura 7 - Fragmentos da anastomose com 2 cm de extensão, posteriormente foram seccionados 0,5 cm de cada extremidade, restando 1 cm central, para mensuração de hidroxiprolina, análise histológica, estresse oxidativo e PCR-RT, respectivamente. ....	39
Figura 8 - Sistema de detecção de sequências de DNAC, para determinação em PCR-RT .....	44
Figura 9- Pressão de ruptura da anastomose em mmHg, conforme os dias de pós-operatório e os subgrupos: subgrupos 1 e 2 (3 dias), subgrupos 3 e 4 (7dias) e subgrupos 5 e 6 (14 dias). * $p < 0,05$ .....	45
Figura 10 - Teor de hidroxiprolina em µg/mg de tecido, conforme os dias de pós-operatório e os subgrupos: subgrupos 1 e 2 (3 dias), subgrupos 3 e 4 (7dias) e subgrupos 5 e 6 (14 dias). * $p < 0,05$ . ....	46
Figura 11 - Atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) no tecido da anastomose colônica em U SOD/mg, conforme os dias de pós-operatório e os subgrupos: subgrupos 1 e 2 (3 dias), subgrupos 3 e 4 (7dias) e subgrupos 5 e 6 (14 dias). * $p < 0,05$ .....	48

Figura 12 - Atividade enzimática da catalase no tecido da anastomose colônica em mM/mg, conforme os dias de pós-operatório e os subgrupos: subgrupos 1 e 2 (3 dias), subgrupos 3 e 4 (7dias) e subgrupos 5 e 6 (14 dias). \* $p < 0,05$ . ..... 49

Figura 13 - Níveis da glutathiona reduzida (GSH) no tecido da anastomose colônica em mM/mg, conforme os dias de pós-operatório e os subgrupos: subgrupos 1 e 2 (3 dias), subgrupos 3 e 4 (7dias) e subgrupos 5 e 6 (14 dias). \* $p < 0,05$ . ..... 50

Figura 14 - Níveis das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) tecido da anastomose colônica em nM/mg, conforme os dias de pós-operatório e os subgrupos: subgrupos 1 e 2 (3 dias), subgrupos 3 e 4 (7dias) e subgrupos 5 e 6 (14 dias). \* $p < 0,05$ . ..... 51

Figura 15 - Expressão de mRNA para citocinas em anastomoses de cólon, em ratos. Os animais foram submetidos à cirurgia sob hipotermia ou normotermia e a expressão relativa do RNAm de IL-1 (a), IL-6 (b), IL-10 (c) foi determinado no tecido do intestino aos 3, 7 e 14 dias após a cirurgia. \* $p < 0,05$ . RQ= Quantificação relativa. .... 53

Figura 16 - Expressão de mRNA para fatores de crescimento em anastomoses de cólon, em ratos. Os animais foram submetidos à cirurgia sob hipotermia ou normotermia e a expressão relativa do RNAm de VEGF (a) e IGF1 (b) foi determinado no tecido do intestino aos 3, 7 e 14 dias após a cirurgia. \* $p < 0,05$ . RQ= Quantificação relativa. .... 54

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1- Complicações perioperatórias induzidas por hipotermia ..... 28

Tabela 2 - Efeitos da hipotermia nos escores de parâmetros  
inflamatórios, avaliados por estudo histológico, no tecido de  
anastomose de cólon, em ratos; nos dias 3, 7 e 14 de pós-operatório ... 47



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAT	Catalase
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DNAc	Ácido desoxiribonucleico complementar
GPx	Glutaciona peroxidase
GSH	Glutaciona reduzida
GST	Glutaciona S transferase
DTNB	Ácido ditionitrobenzóico
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
IGF-1	Fator de crescimento <i>insulina-like</i>
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
MDA	Malonaldeído
NaOH	Hidróxido de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
PAF	Fator ativador de plaquetas
PCR-RT	Reação de cadeia da polimerase, após transcrição reversa e em tempo real
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PMN	Polimorfonucleares
RNA	Ácido ribonucleico
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucleico mensageiro
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SH	Pequenos tóis
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TGF-β	Fator de crescimento transformante beta
TOCE	Laboratório de técnica operatória e cirurgia experimental
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
U SOD	Unidades SOD



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	21
1.1 A CIRURGIA COLORRETAL .....	21
1.2 O PROCESSO INFLAMATÓRIO .....	22
1.3 O PROCESSO BIOLÓGICO DA CICATRIZAÇÃO.....	23
1.4 O ESTRESSE OXIDATIVO.....	24
1.5 A HIPOTERMIA PERIOPERATÓRIA.....	26
1.6 JUSTIFICATIVA.....	29
1.7 HIPÓTESES.....	29
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	31
2.1 OBJETIVO GERAL .....	31
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	31
<b>3 MÉTODOS</b> .....	33
3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	33
3.2 GRUPOS.....	33
3.3 ANIMAIS.....	35
3.4 PRESSÃO DE RUPTURA DA ANASTOMOSE .....	38
3.5 TEOR DE HIDROXIPROLINA .....	40
3.6 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA .....	40
3.7 MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO .....	41
<b>3.7.1 Atividade da Enzima Superóxido Dismutase (SOD)</b> .....	41
<b>3.7.2 Atividade da Enzima Catalase (CAT)</b> .....	42
<b>3.7.3 Conteúdo de Glutathiona Reduzida (GSH)</b> .....	42
<b>3.7.4 Nível de Peroxidação Lipídica (TBARS)</b> .....	42
3.8 MEDIÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE CITOCINAS E FATORES DO CRESCIMENTO .....	43
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
<b>4 RESULTADOS</b> .....	45
4.1 PRESSÃO DE RUPTURA DA ANASTOMOSE .....	45
4.2 TEOR DE HIDROXIPROLINA .....	46
4.3 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA .....	46
4.4 MARCADORES DO ESTRESSE OXIDATIVO .....	48
<b>4.4.1 Enzima Superóxido Dismutase</b> .....	48
<b>4.4.2 Enzima Catalase</b> .....	48
<b>4.4.3 Glutathiona Reduzida (GSH)</b> .....	49
<b>4.4.4 Nível de Peroxidação Lipídica (TBARS)</b> .....	50
4.5 CITOCINAS E FATORES DE CRESCIMENTO .....	51
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	55
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	59

6.1 CONCLUSÃO GERAL.....	59
6.2 CONCLUSÕES ESPECÍFICAS .....	59
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	61
<b>ANEXO A – Resultado de Solicitação de Protocolo</b> .....	69

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 A CIRURGIA COLORRETAL

A cirurgia colorretal eletiva é uma das operações mais comuns na prática cirúrgica atual, que apesar das técnicas apuradas e dos recursos tecnológicos e hospitalares que tornam o procedimento mais seguro, apresenta taxas expressivas de deiscência e fístula anastomóticas, variando de 2,6 a 26,2% (1-4), estas complicações são as mais temidas neste tipo de cirurgia, por serem graves e potencialmente letais (1, 5). O cólon é a região do trato gastrointestinal mais vulnerável à deiscência anastomótica e sua ocorrência é particularmente elevada quando a anastomose é realizada no cólon distal (6-7). No século XX, a ressecção do cólon e anastomose primária não era utilizada de maneira geral até o advento da era dos antibióticos. De fato, em muitos centros, a ressecção do cólon sigmóide não era tentada sem uma colostomia de derivação até os anos 50. Dixon, entre outros, é reconhecido como um dos que advogaram a anastomose primária (8). Posteriormente houve a popularização do uso dos grampeadores mecânicos nas anastomoses intestinais, com o protótipo criado por autores russos (9). Atualmente a utilização da anastomose mecânica término-terminal com grampeador circular é rotineira em muitos centros hospitalares em todo o mundo.

Muitos fatores têm sido relacionados à cicatrização das anastomoses colônicas, sua integridade e consequentes complicações, como a técnica cirúrgica aplicada, material cirúrgico como fios de sutura, suprimento sanguíneo, idade, estado nutricional, doenças associadas, irradiação e uso de drogas, principalmente corticosteróides, imunossupressores e anti-inflamatórios (5, 10-13).

A sequência de eventos que podem ser afetados na cicatrização anastomótica, inclui a agregação e dreganulação plaquetária no processo de hemostasia, a resposta inflamatória inicial ao trauma cirúrgico e ao material de sutura utilizado, a proliferação celular, a reepitelização mucosa, a deposição e maturação do colágeno, a colagenólise e a remodelação. A resistência da anastomose é baseada no colágeno e sua maturação na submucosa, porém a integridade precoce da anastomose é dependente da formação de um selo de fibrina na camada serosa, que lhe dá impermeabilidade. Durante a primeira semana de pós-operatório ocorre uma significativa redução da resistência da anastomose devido à colagenólise, com auge entre o 3.º e o 5.º dia de pós-operatório, momento em que este processo excede à própria síntese de colágeno. A

colagenólise é realizada pela colagenase, enzima derivada de neutrófilos, macrófagos e bactérias intraluminais. A síntese de colágeno no trato gastrointestinal é feita pelos fibroblastos e células do músculo liso, conferindo a força tênsil da cicatriz anastomótica, que é rapidamente recuperada aos níveis pré-operatórios, a partir do 14º dia de pós-operatório(14).

## 1.2 O PROCESSO INFLAMATÓRIO

A fase inflamatória inicia-se após à lesão tecidual e é caracterizada pela formação de edema e proliferação celular, principalmente na camada submucosa(15). Os granulócitos são as células predominantes nas primeiras 24 horas, seguidas de macrófagos após 48 horas. A angiogênese se inicia precocemente 2 a 3 dias após o trauma cirúrgico no cólon(15-16), após fibroblastos recrutados e células do músculo liso iniciam produção das proteínas da matriz extracelular(17). A reação inflamatória é um evento complexo que envolve o reconhecimento do agente ou estímulo lesivo, para sua posterior destruição e formação de um novo tecido(18-19). O reconhecimento desencadeia a ativação e a amplificação do sistema imune resultando na ativação de células e na liberação de diversos mediadores inflamatórios que são responsáveis pela vasodilatação, permeabilidade e migração de leucócitos(19-20). Na resposta inflamatória ocorre uma cascata de eventos. Inicialmente ocorre uma fase aguda, de duração variável, na qual há vasodilatação local e aumento da permeabilidade capilar, seguida de uma fase caracterizada por infiltração de leucócitos e de células fagocíticas e posteriormente, regeneração tecidual ou fibrose(21). A resposta inflamatória é caracterizada por uma série de eventos na tentativa de reconstituir o tecido lesado por meio da ativação de células mesenquimatosas, incluindo hipertrofia, hiperplasia e ativação de matriz extracelular. Posteriormente, o processo inflamatório é mantido e induz a cicatrização que frequentemente reconstitui o tecido lesado com tecido fibroso não especializado(21).

O sistema fagocítico mononuclear é composto por dois tipos de células que participam na defesa do sistema imune do hospedeiro, desenvolvendo funções distintas: os macrófagos e os monócitos. Os macrófagos têm a função de remover antígenos particulados e atuar como células apresentadoras de antígeno, internalizando e apresentando antígenos aos linfócitos T(22). Os monócitos encontram-se circulando no sangue e, quando necessário, migram para diferentes órgãos e

cavidades do corpo em resposta a um estímulo lesivo, diferenciando-se em macrófagos. Os leucócitos do tipo polimorfonucleares são as primeiras células que são ativadas na defesa imune do hospedeiro contra a infecção. Estas células migram e infiltram-se no sítio inflamatório por gradientes quimiotáticos, onde juntamente com os macrófagos, fagocitam e destroem o agente causador da inflamação, ocorre liberação de enzimas hidrolíticas, proteínas bactericidas e espécies reativas de oxigênio (ROS), muitas vezes, estocadas nos grânulos dos polimorfonucleares.(23-24).

Outros mediadores que participam do processo inflamatório são as citocinas. Estas também estão envolvidas no crescimento, diferenciação e ativação celular, na imunidade e no reparo tecidual, além de outras funções no processo inflamatório(25). Diversos são os estímulos para a liberação das citocinas, incluindo infecção bacteriana, viroses, parasitoses, micoses, tumores, trauma, estímulos físicos (queimadura, irradiação), necrose tecidual (infarto), resposta imunológica das doenças autoimunes(25).

### 1.3 O PROCESSO BIOLÓGICO DA CICATRIZAÇÃO

A secção tecidual do cólon gera uma solução de continuidade, lesa tecidos, interrompe o fluxo sanguíneo e acumula restos celulares, com grau maior ou menor de contaminação, além da exposição da matriz extracelular às plaquetas. O organismo reage com um mecanismo complexo, dinâmico e bem orquestrado, a cicatrização, que é dividida em cinco fases: hemostasia, inflamação, proliferação, contração da ferida e remodelação(14, 26), em determinados momentos do período cicatricial as fases coincidem parcialmente e se desenvolvem simultaneamente. Durante a hemostasia, com o colágeno subendotelial em contato com as plaquetas, estas promovem agregação, degranulação e ativação da cascata da coagulação. Seguindo-se então a migração das células inflamatórias. Os grânulos plaquetários liberam uma variedade de substâncias com atividade no processo cicatricial, tais como fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformante beta (TGF- $\beta$ ), fator ativador de plaquetas (PAF), fator de crescimento endotelial vascular(VEGF), fibronectina e serotonina(14). O VEGF estimula a formação de novos capilares e consequente formação do tecido de granulação. Outro fator de crescimento fundamental na cicatrização das anastomoses colônicas é fator de crescimento *insulina-like* (IGF-1), que promove aumento do reparo epitelial e estimula a proliferação celular. A administração sistêmica ou

intraperitoneal do IGF-1 aumenta a pressão de ruptura das anastomoses de cólon, em ratos(27).

Dentre as camadas da parede do cólon a submucosa é a mais importante na sustentação das suturas e na resposta inflamatória ao trauma e cicatrização, pois é composta por tecido conjuntivo frouxo contendo a maioria das matrizes proteicas, é ricamente vascularizada por um plexo arterial e venoso, além de um ampla rede de linfáticos(17). Na fase proliferativa, os fibroblastos e as células endoteliais migram dos tecidos e vênulas próximas à anastomose. Com a ativação de macrófagos, das células endoteliais, e a expressão do VEGF, ocorre aumento expressivo da angiogênese, formação de novos vasos capilares e tecido de granulação. Os fibroblastos desenvolvem a produção de grande quantidade de colágeno, proteína constitutiva do tecido conjuntivo(28). O colágeno, glicoproteína composta por três cadeias polipeptídicas em conformação de tripla hélice, é constituída pelos aminoácidos glicina, alanina, lisina, prolina, hidroxilisina e hidroxiprolina, que é um aminoácido exclusivo do colágeno e é indispensável para a estabilidade da tripla hélice da proteína(29). O teor de hidroxiprolina no tecido cicatricial possibilita estimar a quantidade de colágeno na região da anastomose. A continuidade do cólon é restabelecida pela deposição de pontes de colágeno no local da anastomose, os tipos de colágeno I, III e V são os principais durante a cicatrização do cólon, sendo o tipo I predominante(17). Nas fases iniciais da cicatrização da parede do cólon, entre o terceiro e quinto dia, a fibronectina, uma glicoproteína de alto peso molecular, é altamente expressa nas camadas da parede do cólon, mantendo a continuidade e resistência até a proliferação do colágeno(30). A quantidade e qualidade da síntese de colágeno sintetizado e depositado, tanto quanto a sua degradação promovida pelas colagenases, geram um balanço que determina a força e integridade da anastomose. A degradação do colágeno é feita pelas colagenases, cujas principais fontes são granulócitos e fibroblastos, sua produção se inicia em poucas horas após a lesão e é restrita ao local da anastomose(31).

#### 1.4 O ESTRESSE OXIDATIVO

Grande quantidade de espécies reativas de oxigênio (ROS) são produzidas em tecido lesionado e inflamado pela nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase, um complexo enzimático, que é expresso em níveis elevados em particular nas células inflamatórias. Este fenômeno tem sido descrito como o “*burst* respiratório”. Após a

ativação da NADPH oxidase, as células produzem o ânion superóxido, um radical livre altamente reativo. Este radical é rapidamente dismutado a peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e água, um processo facilitado pela enzima superóxido dismutase (SOD). Embora o  $H_2O_2$  não seja um radical, este pode causar dano celular grave devido à geração de radical hidroxila na presença de íons ferro ou de íons cobre (reação de Fenton)(32). O estresse oxidativo induz a geração de ROS, como por exemplo os ânions superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais livres, os quais são fatores importantes na etiologia de diversas doenças(33-34). Nas lesões por estresse ou trauma ou na resposta inflamatória podem ser importantes fontes na geração destes radicais(34). Dentre as enzimas antioxidantes destacam-se: a catalase (CAT), a Glutathione peroxidase (GPx), a glutathione S transferase (GST) e superóxido dismutase (SOD), importantes enzimas relacionadas à defesa do organismo frente aos radicais livres. A superóxido dismutase e a catalase servem como linha primária de defesa na detoxificação dos radicais livres. Por fim, um dos maiores efeitos tóxicos do excesso de ROS é o dano à membrana celular pelo processo de peroxidação lipídica, que pode ser dimensionado pela mensuração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)(35). Se a detoxificação/neutralização de ROS é insuficiente ou se as ROS são produzidas em excesso, ocorre o estresse oxidativo, que nada mais é que uma situação de desequilíbrio entre a quantidade de radicais livres e de defesas antioxidantes(32).

A cicatrização requer um fino equilíbrio entre os efeitos positivos e deletérios das ROS, um grupo de moléculas extremamente potentes, com poder limitante na velocidade de regeneração tecidual(36). A produção excessiva de ROS está associada com lesão tecidual, gera muitos processos patológicos e causa destruição do tecido saudável do estroma(36-37). ROS em excesso lesa membranas celulares por peroxidação lipídica e também causa danos no ácido desoxirribonucleico (DNA) e proteínas. O ataque de ROS ao DNA quebra sua fita e altera o processo normal de translação e transcrição, alterando expressão gênica, replicação do DNA e induzindo à apoptose(38). As proteínas também podem ser alvos das ROS, a oxidação de proteínas rompem receptores, prejudicam as funções enzimáticas e interrompem as vias de transduções de sinais(37, 39). A redução da peroxidação lipídica e o aumento da glutathione reduzida (GSH) do tecido da anastomose de cólon está relacionada ao aumento do teor de hidroxiprolina tecidual e aumento da pressão de ruptura da anastomose, em ratos(40). O malonaldeído (MDA), que é um

produto da peroxidação lipídica, tem seus níveis aumentados em feridas com retardo de cicatrização decorrente do uso de hidrocortisona em ratos, em relação ao grupo animais controle(41).

## 1.5 A HIPOTERMIA PERIOPERATÓRIA

A hipotermia perioperatória consiste na redução da temperatura corporal, devido à exposição dos pacientes às baixas temperaturas das salas cirúrgicas, ao tempo de exposição de vísceras ou outras estruturas do meio interno e às alterações causadas pelo ato anestésico no controle térmico central. O termo hipotermia leve é amplamente aceito, referindo-se a temperatura corporal central variando entre 34 e 36° C(42-43). A hipotermia está associada a efeitos prejudiciais ao paciente, aumentando as taxas de complicações operatórias, anestésicas e pós-operatórias, como eventos cardiovasculares, aumento da perda sanguínea, metabolização e eliminação das drogas anestésicas, aumento do tempo de internação hospitalar e aumento da incidência de infecção de sítio cirúrgico(43) (Tabela 1). Também é afetada a formação do agregado plaquetário inicial, que exerce papel importante nos estágios iniciais da cicatrização pela liberação de fatores de crescimento e quimiotáticos(44). Kurs et al.(45), em um ensaio clínico controlado, randomizado e duplo cego, com pacientes submetidos à cirurgia colorretal eletiva, comparando pacientes com hipotermia leve em um grupo e pacientes com temperatura normal em outro, obtiveram como resultado uma incidência três vezes maior de infecção de sítio cirúrgico nos pacientes do grupo hipotérmico em relação ao grupo de pacientes cujas cirurgias transcorreram com temperaturas normais e mantidas. Em nosso meio, em um estudo de coorte, dentre doze fatores de risco avaliados para infecção de sítio cirúrgico, em cirurgia colorretal eletiva, após análise multivariada, a hipotermia perioperatória foi o fator que apresentou o maior risco relativo, 4,6 (2,4 - 8,9 com IC 95%)(46). A hipotermia prejudica a função imune(47), inibe a produção de anticorpos mediados por células T, a atividade bactericida de neutrófilos, a atividade das células *natural killer* (42-43, 47-48), reduz a produção de citocinas e promove supressão da atividade fagocitária (47-49).

Também é conhecido que a pressão parcial de oxigênio tecidual no sítio cirúrgico é reduzida em pacientes que tiveram períodos de hipotermia, o que é agravada pela vasoconstrição termorregulatória que é intensificada nestes pacientes, levando à relativa hipóxia tecidual(50-52). Estes últimos fatos, por um lado aumentam o risco de infecção de

sítio cirúrgico e por outro comprometem os processos cicatriciais, além de aumentar a perda proteica pós-operatória(53). A hipóxia tecidual também está associada a prejuízo na cicatrização anastomótica e na sua integridade, em modelo animal com ratos(54). Dois grandes ensaios clínicos randomizados demonstraram que a manutenção da normotermia e normoxia diminui as taxas de infecção(45, 50). Por outro lado, apresentam redução das taxas de complicações, quando a suplementação de oxigênio é realizada no período perioperatório, incluindo deiscência e fístulas anastomóticas(50)

Foi demonstrado em ratos, que a hipotermia induzida, com redução da temperatura central até 31 °C, compromete a pressão arterial e a tensão de oxigênio arterial(55). Também em ratos, foi demonstrado, que a hipotermia leve (32° C) reduz a sobrevivência dos animais, prejudica o recrutamento de granulócitos e altera o balanço de citocinas, sugerindo imunossupressão(49, 56). Não obstante, tem sido demonstrado que o aquecimento ativo do paciente antes de cirurgias limpas ajuda a prevenir a infecção de sítio cirúrgico no período pós-operatório(45, 57). No entanto, o excesso de calor intra-abdominal, como o utilizado em quimioterapia peritoneal hipertérmica, é prejudicial à cicatrização de anastomoses colônicas em ratos(58).

Tabela 1- Complicações perioperatórias induzidas por hipotermia

Consequência	Autor	N	T em °C	Normotermia	Hipotermia	p
Eventos cardíacos	Frank, et al.(59)	300	1.3	1.4%	6.3%	<0.05
Taquicardia ventricular pós-operatória	Frank, et al.(59)	300	1.3	2.4%	7.9%	<0.05
Ativação adrenérgica	Frank, et al.(60)	74	1.5	330 ± 30 pp/ml	480 ± 70 pp/ml	<0.05
Infecção de sítio cirúrgico	Kurz et al.(45)	200	1.9	6%	19%	<0.01
Tempo de internação	Kurz et al.(45)	200	1.9	12.1 ± 4.4 dias	14.7 ± 6.5 dias	<0.01
Proliferação de linfócitos	Beilin, et al.(47)	60	1.0	4800 CPM	2750 CPM	<0.05
Necessidade de transfusão	Schmied, et al.(61)	60	1.6	1 unidade	8 unidades	<0.05
Perda sanguínea intraoperatória	Schmied, et al.(61)	60	1.6	1.7 ± 0.3 L	2.2 ± 0.5 L	<0.001
Perda sanguínea intraoperatória	Winkler, et al.(62)	150	0.4	488 ml	618 ml	<0.005
Perda sanguínea intraoperatória	Widman, et al.(63)	46	0.5	516 ± 272 ml	702 ± 344 ml	<0.05
Perda sanguínea intraoperatória	Johansson, et al.(64)	50	0.8	665 ± 292 ml	698 ± 314 ml	NS
Excreção nitrogenada na urina	Carli, et al.(53)	12	1.5	982 mmol/dia	1798 mmol/dia	<0.05
Mortalidade em 24 hs em trauma	Gentilello, et al.(65)	57	1.0–2.0	7%	43%	<0.05
Duração do vacurônio	Heier, et al.(66)	20	2.0	28 ± 4 min	62 ± 8 min	<0.001
Duração do atracúrio	Leslie, et al.(67)	6	3.0	44 ± 4 min	68 ± 7 min	<0.05
Tremor pós-operatório	Just, et al.(68)	14	2.3	141 ± 9 ml min <sup>-1</sup> m <sup>-2</sup>	269 ± 60 ml min <sup>-1</sup> m <sup>-2</sup>	<0.001
Tempo de recuperação pós-anestésica	Lenhardt, et al.(69)	150	1.9	53 ± 36 min	94 ± 65 min	<0.001
Desconforto térmico	Kurz, et al.(70)	74	2.6	50 ± 10 mm VAS	18 ± 9 mm VAS	<0.001

VAS

N: número de casos do estudo; T: diferença da temperatura entre os grupos de estudo em °C; p: significância estatística; CPM: contagem por minuto; VAS: 100 mm de comprimento em uma escala analógica visual

## 1.6 JUSTIFICATIVA

As complicações decorrentes da deiscência de anastomose colônica têm caráter extremamente grave com altos índices de morbidade e mortalidade. A busca na redução da incidência destas complicações deve ser incansável, principalmente com procedimentos possíveis de serem realizados rotineiramente, como a prevenção da hipotermia perioperatória.

Na literatura consultada (Pubmed, Lilacs, Scielo, teses e dissertações, com o uso dos descritores, em inglês e português, hipotermia, anastomose, anastomose colônica, anastomose intestinal, cicatrização, fístula e deiscência com todas as possíveis combinações) não foram encontrados artigos que esclarecessem os aspectos específicos que se está procurando, embora algumas das referências encontradas nas diversas revisões realizadas sugerem esta possibilidade, porém carecem de comprovação, seja essa experimental ou mesmo clínica.

Com a confirmação desta hipótese será um dado um passo fundamental para que medidas de aquecimento do paciente no período perioperatório sejam adotadas rotineiramente, com consequente redução das taxas de deiscência e fístulas das anastomoses de cólon.

## 1.7 HIPÓTESES

**H<sub>1</sub>:** A hipotermia perioperatória tem efeito prejudicial ao processo cicatricial das anastomoses colônicas, em ratos.

**H<sub>0</sub>:** A hipotermia perioperatória não tem efeito prejudicial ao processo cicatricial das anastomoses colônicas, em ratos.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar se a ocorrência da hipotermia, no período per-operatório, influi na cicatrização das anastomoses colônicas em ratos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Verificar a pressão de ruptura da anastomose colônica nos grupos de animais em estudo, com e sem hipotermia.
- II. Determinar os níveis de hidroxiprolina tecidual na anastomose colônica, comparando-os entre os grupos de animais estudados.
- III. Avaliar parâmetros inflamatórios, por análise histológica, com a utilização de escores pré-determinados. Os parâmetros são: infiltrado inflamatório, deposição de colágeno tecidual, edema, fibrina e apoptose celular no tecido da anastomose colônica.
- IV. Avaliar liberação das espécies reativas de oxigênio (ROS) no tecido cicatricial das anastomoses, com a dosagem de enzimas antioxidantes catalase (CAT) e superóxido desmutase (SOD), da glutatona reduzida (GSH) e da peroxidação lipídica com a dosagem das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).
- V. Avaliar os níveis de citocinas pró-inflamatórias interleucina 1 (IL1) e interleucina 6 (IL6) e anti-inflamatória interleucina 10 (IL10), e de fatores de crescimento: fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e fator de crescimento insulina-like (IGF-1) a partir de tecido da anastomose colônica, pelo método da reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa, em tempo real (PCR-RT).



## 3 MÉTODOS

### 3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Este trabalho é um estudo experimental, prospectivo e controlado.

### 3.2 GRUPOS

Os animais foram distribuídos randomicamente em 2 grupos, um grupo com normotermia e o outro com hipotermia, cada grupo foi redistribuído em 4 subgrupos com  $n=6$ , que foram numerados de acordo com o tempo em dias de pós-operatório no qual ocorreu a reoperação e a morte indolor assistida (MIA): (1) normotermia e 3 dias, (2) hipotermia e 3 dias, (3) normotermia e 7 dias, (4) hipotermia e 7 dias, (5) normotermia e 14 dias, (6) hipotermia e 14 dias, (7) SHAM, normotermia e 3 dias (8) SHAM, hipotermia e 3 dias (Figura 1).

Os animais dos subgrupos com hipotermia tiveram sua temperatura central diminuída até  $32^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  utilizando bolsas plásticas com gelo em gel sobre o tórax, mantendo em hipotermia por 1 hora no decorrer da cirurgia e após foram aquecidos com calor proveniente de uma lâmpada de infravermelho até a temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$ . Os animais dos subgrupos de normotermia tiveram sua temperatura mantida em  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  com o uso da lâmpada de infravermelho. A temperatura foi medida com um termômetro digital (Getec<sup>®</sup> Brasil) inserido 3 cm dentro do reto antes e durante o procedimento e até o reaquecimento completo do animal, com tomadas de temperatura a cada 5 minutos. A temperatura foi mantida nos níveis desejados em cada grupo com a aproximação ou afastamento das fontes de calor e frio do corpo do animal, conforme necessário (Figura 2).

Em todas as avaliações, com exceção da medida da pressão de ruptura da anastomose, os examinadores desconheciam a que subgrupos as amostras estudadas pertenciam.

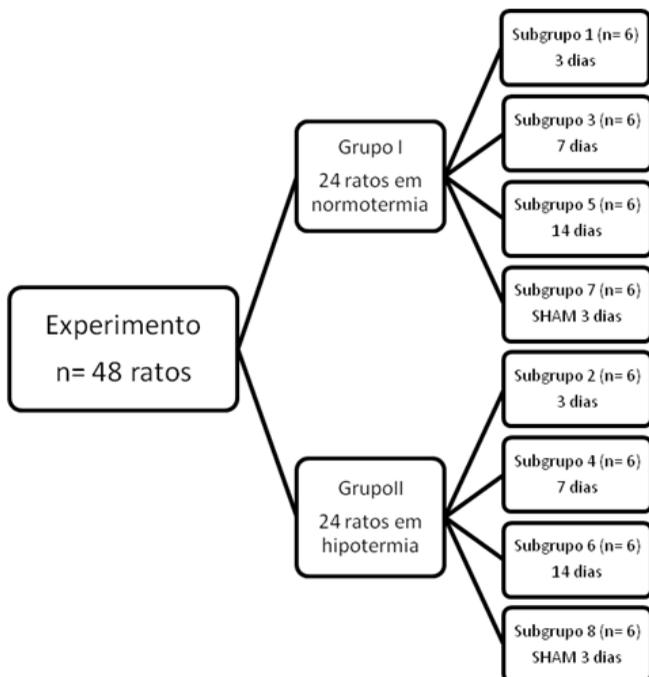


Figura 1 - Divisão dos grupos de estudo.



Figura 2 - Temperatura retal em °C, monitorada durante as cirurgias. Na imagem superior o animal mantido em normotermia e na imagem inferior o animal submetido à hipotermia.

### 3.3 ANIMAIS

Quarenta e oito ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) foram utilizados nesta pesquisa, que foi previamente aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC,

processo cadastrado sob o número: 23080.019985/2010-80. Os animais pesavam entre 360 e 480 g e com idades entre 180 a 220 dias, foram ambientados por 7 dias, no Laboratório de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental (TOCE) da UFSC, recebendo água e alimentação *ad libitum* com ração padronizada, ciclo claro-escuro de 12 horas, temperatura de 22° C +- 2° C e umidade do ar entre 50 e 60%. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os “*Principles of Laboratory Animal Care*” (NIH Publication No. 96-01, revised 1996).

As cirurgias foram realizada sob anestesia geral utilizando uma combinação de ketamina (9 mg/100g de peso corporal) e tiazina (1,25mg/100g de peso), ambas por via intramuscular. A laparotomia mediana com 2 cm de extensão foi realizada sob condições de assepsia. O cólon sigmóide foi identificado e seccionado, com tesoura reta, a 2 cm acima da reflexão peritoneal (Figura 3). Imediatamente após, uma anastomose termino-terminal foi realizada com 8 pontos separados de polipropileno 6/0 (Ethicon®, Somerville, NJ) em plano único extramucosos (Figura 4). A parede abdominal foi fechada em dois planos, aponeurose e pele, com suturas contínuas de polipropileno 4/0 (Ethicon®, Somerville, NJ)

As reoperações foram realizadas nas mesmas condições da cirurgia inicial. A anastomose foi identificada e o cólon sigmóide contendo a anastomose foi ressecado para as análises, a parede abdominal foi fechada conforme descrito na primeira cirurgia. Ainda anestesiados os animais foram submetidos à MIA, com uma dose letal intracardíaca de cloreto de potássio.



Figura 3 - Imagem do cólon sigmoide identificado, isolado e com local da secção e anastomose definidos.



Figura 4 - Anastomose colônica concluída.

### 3.4 PRESSÃO DE RUPTURA DA ANASTOMOSE

Um segmento de 4 cm do cólon sigmoide contendo a anastomose foi isolado e lavado com solução salina (Figura 5), uma extremidade foi fechada com fio de seda 3/0 e na outra extremidade foi introduzido um cateter de polivinil 4 Fr, fixado firmemente com fio de seda 3/0 ao redor do cateter, que foi conectado numa configuração em “Y” à uma bomba de infusão contínua (Samtronic<sup>®</sup>, São Paulo, SP) de um lado e a um manômetro com coluna de mercúrio do outro. O segmento foi submerso em solução salina e inflado com ar no regime de 1 ml/minuto, o valor da pressão foi registrado em mm de Hg no momento exato da ruptura da anastomose e do escape do ar (Figura 6)(71).

Após, um segmento de 1 cm contendo a anastomose foi retirado e seccionado longitudinalmente em 4 tiras de tecido iguais com 1 cm de extensão, cada uma contendo uma parte da anastomose (Figura 7). Um dos fragmentos foi armazenado em criotubos e transferidos a freezer a -80° C, para análises do conteúdo de hidroxiprolina, outro fragmento foi acondicionado em solução *RNAlater*<sup>®</sup> (Invitrogen, São Paulo, Brazil) e em freezer a -18° C para determinação do PCR-RT, o terceiro fragmento em solução de formol a 10% para estudo histológico e o quarto fragmento foi acondicionado em criotubos e armazenado em freezer a -80° C para posterior análise do estresse oxidativo.



Figura 5 - Segmento de cólon sigmoide retirado para as análises.



Figura 6 - Equipamento para determinação da pressão de ruptura da anastomose.

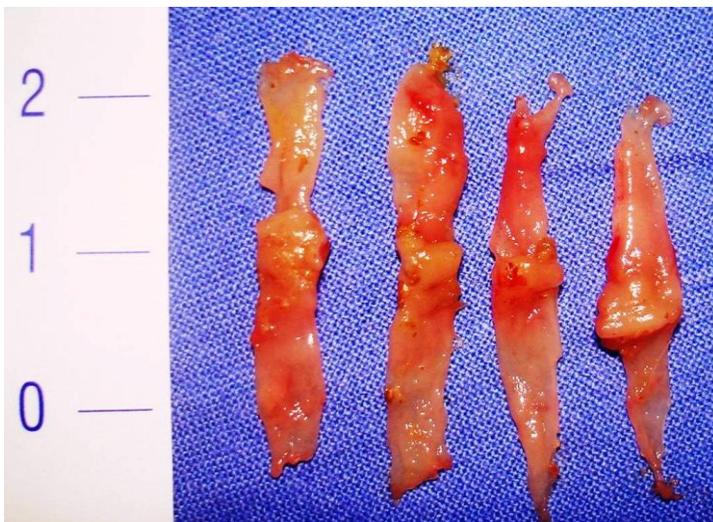


Figura 7 - Fragmentos da anastomose com 2 cm de extensão, posteriormente foram seccionados 0,5 cm de cada extremidade, restando 1 cm central, para mensuração de hidroxiprolina, análise histológica, estresse oxidativo e PCR-RT, respectivamente.

### 3.5 TEOR DE HIDROXIPROLINA

A hidroxiprolina é um aminoácido essencial para a síntese das fibras de colágeno, as quais são produzidas, principalmente, em processos cicatriciais. Por essa razão, o conteúdo de hidroxiprolina é utilizado, normalmente, como um indicador bioquímico para determinar o teor de colágeno presente em uma amostra. Para essa determinação, alíquotas de padrão de hidroxiprolina e de amostras de tecido hidrolisado da anastomose colônica foram misturados com hidróxido de sódio. As amostras (20 mg) foram hidrolisadas em 500 µL de solução de NaOH 2N, submetidas à autoclavagem a 120 °C durante 40 minutos e centrifugadas a 10.000 rpm durante 5 min. Em seguida, foram coletados 20 µL do sobrenadante do conteúdo hidrolisado e, juntamente, com alíquotas da solução padrão foram adicionados 30 µL de solução de NaOH 2N e 450 µL do reagente cloramina T. A reação de oxidação deu-se por um período de 25 minutos a temperatura ambiente. Após a adição de 500 µL do reagente de Ehrlich, as amostras e as soluções padrão foram incubadas em banho-maria a 65° C por 40 minutos. Como a absorbância do cromóforo formado é instável em temperatura elevada, foi realizado um ciclo de resfriamento gradual durante 10, 15 e 10 minutos (temperatura ambiente, 4 °C e temperatura ambiente, respectivamente). A absorbância foi determinada em espectrofotômetro em 550 nm. Para quantificação da hidroxiprolina foi construída uma curva padrão externa compreendendo concentrações entre 1 - 400 µg/mL. Foi utilizada como amostra padrão N-Acetil-L-hidroxiprolina 99 %, Sigma® 01192. Os resultados correspondem à média ± desvio padrão de amostras de tecido hidrolisado a partir de análises realizadas em triplicata(72).

### 3.6 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

Fragments de tecido incluindo a anastomose, preservados em solução de formalina a 10%, foram desidratados e embebidos em parafina. Os blocos de parafina foram seccionados em micrótomos com 4 µm de espessura, e logo após as fatias foram coradas com hematoxilina e eosina e ácido tricrômico de Masson. As amostras foram examinadas em microscópio ótico em aumento de 400 vezes. Toda a avaliação foi realizada por um único patologista examinador, que se desconhecia para que qual grupo cada amostra pertencia. As avaliações obedeceram o método de escore semiquantitativo(73). Os parâmetros analisados foram identificados como [1] infiltrado inflamatório, representado pela

identificação das células inflamatórias: polimorfonucleares (PMN), linfócitos, macrófagos e fibroblastos, [2] edema, [3] deposição de colágeno, [4] fibrina e [5] células apoptóticas. As amostra foram categorizadas, em cada parâmetro, de acordo com o método de escores em: 0 = ausente, 1 = discreto, 2 = moderado ou 3 = acentuado.

### 3.7 MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO

#### 3.7.1 Atividade da Enzima Superóxido Dismutase (SOD)

A análise da enzima superóxido dismutase foi realizada por meio da oxidação da adrenalina com a formação de ânion superóxido ( $O_2^-$ ) e do adenocromo róseo. A formação de  $O_2^-$  é retardada pela enzima SOD presente na amostra analisada. Em uma cubeta de plástico foram adicionados 1,95 mL de tampão glicina 50 mM (pH 10,2) a temperatura ambiente e ajustou-se o zero de absorvância do espectrofotômetro. Adicionou-se 50  $\mu$ L da solução de adrenalina 60 mM (pH  $\cong$  2,0), mantida em gelo durante o ensaio e a solução (tampão + adrenalina) foi homogeneizada. Foi observado o gráfico da cinética da reação de oxidação da adrenalina expressa pela formação de uma curva ascendente até que se deu o seu decaimento, em comprimento de onda de 480nm. Assim, antes de iniciar o ensaio propriamente dito, verificou-se qual o tempo de reação mais propício para executar as medidas das constantes  $K_1$  e  $K_2$ . Este tempo é correspondente a porção ascendente da curva de oxidação da adrenalina. Após determinar a porção ascendente da curva de oxidação da adrenalina ao longo do tempo, adicionou-se alíquotas entre 5-50  $\mu$ L de amostra antes que a reação de oxidação terminasse, ou seja, antes do início do decaimento da curva expressa no gráfico. Para o preparo das amostras, foi pesada uma alíquota de 25 mg de tecido homogeneizada em 1000  $\mu$ L de tampão fosfato 20 mM (pH 7,4) contendo 0,1% Triton, 150 mM NaCl e inibidores de proteases. Repetiu-se o ensaio com mais 3 ou 4 alíquotas do homogenato da amostra. A porcentagem de inibição foi calculada da seguinte maneira: % inibição =  $[(k_2/k_1) - 1] \cdot 100$ , onde  $k_1$  corresponde a porção ascendente da curva de oxidação da adrenalina sem adição da amostra e  $k_2$  corresponde a porção de inibição da oxidação da adrenalina decorrente da adição da amostra, provocada pela enzima SOD presente nesta. Para determinar o número de Unidades de SOD (U SOD) na amostra, interpolou-se a alíquota de amostra ( $\mu$ L, eixo x) *versus* porcentagem de inibição (% , eixo y). Determinou-se a quantidade ( $\mu$ L) de amostra necessária para causar 50% de inibição na taxa de oxidação da adrenalina. A curva teve

no mínimo 4 pontos. Então, foi realizado o seguinte cálculo:  $(1 / \text{quantidade de amostra } (\mu\text{L}) \text{ correspondente a } 50\% \text{ de inibição}) \cdot 1000 \cdot \text{diluição do homogenato} = \text{U SOD} \cdot \text{mg de proteína}^{-1} (74)$ .

### 3.7.2 Atividade da Enzima Catalase (CAT)

Para análise da atividade desta enzima foi verificada a velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) em um comprimento de onda de 240 nm. Uma solução de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (10 mM) em tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0) foi preparada e utilizada como substrato da reação. Para o preparo das amostras, foi pesada uma alíquota de 25 mg de tecido homogeneizada em 1000  $\mu\text{L}$  tampão fosfato 20 mM (pH 7,4) contendo 0,1% Triton, 150 mM NaCl e inibidores de proteases. Em uma cubeta de quartzo, foram adicionados 2 mL da solução tampão contendo  $\text{H}_2\text{O}_2$  e 20  $\mu\text{L}$  do homogenato da amostra. Após homogeneização, a velocidade de decomposição do  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi mensurada durante 90 segundos, sendo está diretamente proporcional a atividade da enzima catalase. As amostras foram analisadas em triplicata, sendo os valores expressos em  $\text{mmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1} (75)$ .

### 3.7.3 Conteúdo de Glutathiona Reduzida (GSH)

A concentração de pequenos tióis (SH) foi avaliada imediatamente após a obtenção dos homogenatos de tecido em solução ácida, a fim de evitar a sua oxidação. A quantificação de glutathiona reduzida baseia-se na reação dos SH com o ácido ditionitrobenzóico (DTNB) com a formação de ânion tiolato (TNB) de cor amarela, mensurável em 412 nm. A intensidade de coloração é proporcional à quantidade de GSH presente na amostra. Para o preparo das amostras, foi pesada uma alíquota de 20 mg de tecido homogeneizada em 500  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético (TCA) 20 %, homogeneizou-se o conteúdo e centrifugou-se a 10000 rpm, por 5 minutos. Utilizou-se o sobrenadante para a reação de quantificação dos SH. As análises foram realizadas em triplicata e os valores expressos em  $\text{mM} \cdot \text{mg de proteína}^{-1} (76)$ .

### 3.7.4 Nível de Peroxidação Lipídica (TBARS)

As amostras de tecido cicatricial (35 mg) foram homogeneizadas com 1600  $\mu\text{L}$  ácido fosfórico 1,1%. Uma alíquota de 400  $\mu\text{L}$  deste homogenato foi utilizada como amostra. A lipoperoxidação foi determinada pela reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA). Esta baseia-

se na reação de uma molécula de malonildialdeído (MDA) com 2 moléculas de TBA e a eliminação de 2 moléculas de água, formando um pigmento cor-de-rosa com absorção máxima em 532 e 600nm. As análises foram realizadas em triplicata(77). O nível de peroxidação lipídica foi calculado da seguinte maneira: TBARS (nmol.mg de proteína<sup>-1</sup>) = {[Absorbância da amostra (A<sub>532</sub> - A<sub>600</sub>) . diluição]/156 /mg de proteína.

### 3.8 MEDIÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE CITOCINAS E FATORES DO CRESCIMENTO

As citocinas com efeito na reação inflamatória liberadas após o trauma cirúrgico e os fatores de crescimento com efeito no processo cicatricial foram mensurados com o uso em tempo real da reação em cadeia da polimerase, após transcrição reversa (PCR-RT). Foram mensurados a expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias IL-1 e IL-6, da citocina anti-inflamatória IL-10 e dos fatores de crescimento VEGF e IGF1

O ácido ribonucleico (RNA) total foi isolado com TRIZOL (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) a partir de tecido da anastomose colônica, a PCR-RT foi realizada em um sistema de detecção de sequência ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems<sup>®</sup>) utilizando SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems<sup>®</sup>) (Figura 9). A transcrição reversa foi realizada com 1 µg de RNA, utilizando a Superscript II transcriptase reversa (Invitrogen Corp<sup>®</sup>) para sintetizar a primeira sequência de ácido desoxiribonucleico complementar (DNAC). O nível relativo da expressão do gene foi determinada pelo método comparativo Ct, tal como descrito pelo fabricante, em que os dados para cada amostra foram normalizados de acordo com a expressão de RNA 18S e expressos como o número de vezes em que foi replicado em comparação com controles não tratados. Os pares de *primers* utilizados foram: para 18S, CGTTGATTAAGTCCCTGCCCTT (forward) e TCAAGTTCGACCGTCTTCTCA (reverse); IL-1, TCAGGAAGGCAGTGTCACTCAT (forward) e ACACACTAGCAGGTGCGTCATCA (reverse); IL-10, GCCAAGCCTTGTGAGAAATGA (forward) e TTTCTGGGCCATGGTTCTCT (reverse). IL-6, AAGAGACTTCCAGCCAGTTGCC (forward) e ACTGGTCTGTTGTGGGTGGTA (reverse). VEGF, ATCATGCGGATCAAACCTCACC (forward) e GGTCTGCATTACATCTGCTAT (reverse). IGF1,

TTCAGTTCGTGGTGTGGACCAAG (forward) e  
GCTTCAGCGGAGCACAGTACAT (reverse).

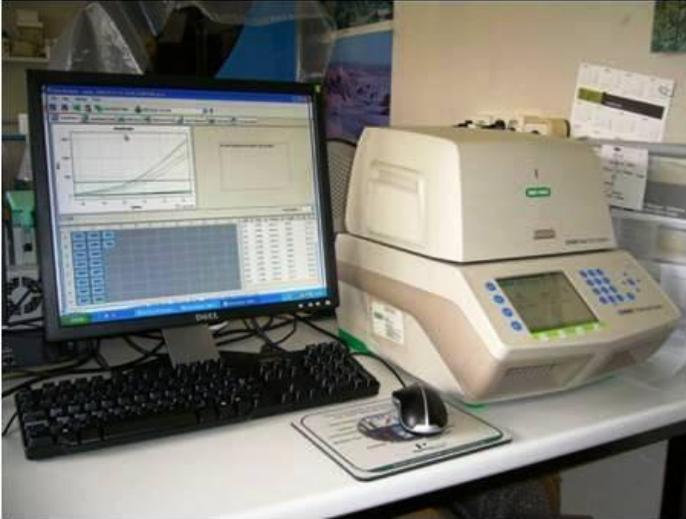


Figura 8 - Sistema de detecção de seqüências de DNAc, para determinação em PCR-RT

### 3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados obtidos das diversas avaliações realizadas foram submetidos a cálculo de médias e desvios-padrão. As médias foram comparadas utilizando teste *t* bicaudal não pareado. Um valor de *p* menor que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo. Toda a análise estatística e a criação de gráficos foram realizados utilizando o programa Graph Pad Prism® Versão 2.01 for Windows (Graph Pad Software, San Diego, CA).

## 4 RESULTADOS

Não houve mortes durante o estudo. Também nenhum sinal de deiscência de anastomose foi identificado nos segmentos colônicos avaliados. Houve discretas variações na média de perda de peso entre os grupos e também no ganho de peso no dia 14 de pós-operatório, porém estes resultados não mostraram diferenças estatisticamente significantes.

### 4.1 PRESSÃO DE RUPTURA DA ANASTOMOSE

As medidas de pressão de ruptura da anastomose não mostraram diferenças estatisticamente significantes entre os subgrupos 1 e 2 (3 dias), o mesmo ocorreu com os dois subgrupos SHAM 7 e 8, porém nos subgrupos de 7 dias as médias dos subgrupos 3 (normotermia) vs. 4 (hipotermia) foram 171,2 ( $\pm$  11,67) vs. 138,3 ( $\pm$  12,39) mmHg ( $p=0,0008$ ) e nos subgrupos de 14 dias as médias dos subgrupos 5 (normotermia) vs. 6 (hipotermia) foram 185,8 ( $\pm$  26,87) vs. 142,7 ( $\pm$  18,14) mmHg ( $p=0,0085$ ) (Figura 9).

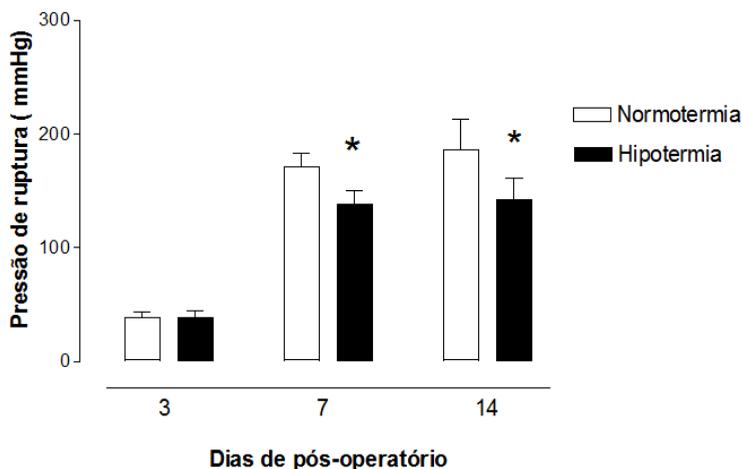


Figura 9- Pressão de ruptura da anastomose em mmHg, conforme os dias de pós-operatório e os subgrupos: subgrupos 1 e 2 (3 dias), subgrupos 3 e 4 (7 dias) e subgrupos 5 e 6 (14 dias). \* $p < 0,05$ .

## 4.2 TEOR DE HIDROXIPROLINA

O conteúdo de hidroxiprolina determinado nos tecidos cicatriciais dos subgrupos 1 e 2, que correspondem a 3 dias do período pós-operatório dos subgrupos normotérmico e hipotérmico foi bastante reduzido, com  $7,693 (\pm 2,956)$  e  $6,875 (\pm 4,142)$  respectivamente, porém sem diferença estatisticamente significativa. Nos subgrupos 3 vs. 4, com 7 dias de pós-operatório, as médias se elevaram para  $235.3 (\pm 14.91)$  and  $254.5 (\pm 6.826)$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  respectivamente, também sem diferenças estatisticamente significante. Contudo, aos 14 dias de operatório os subgrupos normotérmico vs. hipotérmico apresentaram médias bastante distintas, com  $243,6 (\pm 19,26)$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  no subgrupo 5 e apenas  $125,9 (\pm 11,35)$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  no subgrupo 6, determinando o valor de  $p < 0,0001$  (Figura 10). Os subgrupos SHAM 7 com  $100,3 (\pm 13,82)$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  e subgrupo SHAM 8 com  $50,61 (\pm 4,791)$  apresentaram  $p < 0,05$ .

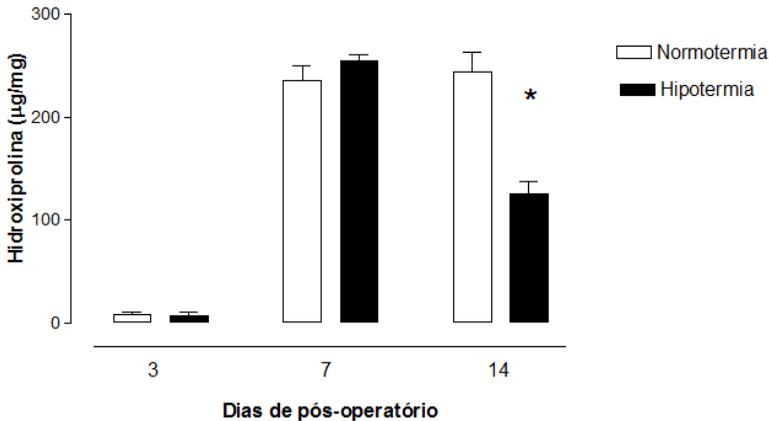


Figura 10 - Teor de hidroxiprolina em  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de tecido, conforme os dias de pós-operatório e os subgrupos: subgrupos 1 e 2 (3 dias), subgrupos 3 e 4 (7 dias) e subgrupos 5 e 6 (14 dias).  $*p < 0,05$ .

## 4.3 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

Os resultados da avaliação histológica foram obtidos com a determinação de escores em cada um dos cinco parâmetros inflamatórios ou cicatriciais adotados. Dois dos parâmetros utilizados, deposição de fibrina e células apoptóticas presentes na amostra, não

mostraram quaisquer diferenças estatisticamente significantes, quando confrontados os subgrupos de normotermia e hipotermia, nos dias 3, 7 e 14 de pós-operatório, o mesmo ocorrendo nos subgrupos SHAM. O parâmetro infiltrado inflamatório, quando comparados os subgrupos 1 vs. 2, apresentou médias de 2,833 ( $\pm$  0,1667) no subgrupo normotérmico e 1,667 ( $\pm$  0,4216), no hipotérmico, com  $p=0,0277$ , porém nos dias 7 e 14 e nos subgrupos SHAM, as diferenças não foram significativas. De maneira similar o parâmetro edema inflamatório, quando comparados os subgrupos 1 vs. 2, apresentou médias de 2,667 ( $\pm$  0,2108) no subgrupo normotérmico e 1,833 ( $\pm$  0,3073) no hipotérmico, com  $p=0,0493$ , mas nos dias 7 e 14 e nos subgrupos SHAM, as diferenças não foram significativas. Entretanto a deposição de colágeno, quando comparados os subgrupos 5 vs. 6, apresentou médias de 2,50 ( $\pm$  0,3416) no subgrupo normotérmico e 1,167 ( $\pm$  0,1667) no hipotérmico, com  $p=0,0056$ , entretanto nos dias 3 e 7 e nos subgrupos SHAM, as diferenças não se mostraram significativas (Tabela 2).

Tabela 2 - Efeitos da hipotermia nos escores de parâmetros inflamatórios, avaliados por estudo histológico, no tecido de anastomose de cólon, em ratos; nos dias 3, 7 e 14 de pós-operatório

Dias de pós-operatório		3 dias	7 dias	14 dias
Parâmetros		Média (dp)	Média (dp)	Média (dp)
<b>inflamatórios</b>				
<b>Infiltrado</b>	<u>Normo</u>	2,833 (0,4082) *	2,833 (0,4082)	2,500 (0,8367)
	Hipo	1,667 (1,033)	2,500 (0,5477)	1,500 (0,8367)
<b>Edema</b>	<u>Normo</u>	2,667 (0,5164) *	2,167 (0,9832)	1,833 (0,7528)
	Hipo	1,833 (0,7528)	2,333 (0,8165)	1,000 (0,6325)
<b>Colágeno</b>	<u>Normo</u>	1,500 (0,8367)	2,667 (0,8165)	2,500 (0,8367) *
	Hipo	1,833 (0,9832)	2,167 (0,7528)	1,167 (0,4082)
<b>Fibrina</b>	<u>Normo</u>	2,667 (0,8165)	2,000 (1,095)	0,8333 (0,4082)
	Hipo	1,667 (1,033)	2,000 (0,6325)	1,000 (0,6325)
<b>Apoptose</b>	<u>Normo</u>	2,167 (0,7528)	1,167 (0,9832)	0,8333 (0,7528)
	Hipo	1,500 (1,225)	1,333 (0,5164)	0,5000 (0,5477)

dp = desvio padrão; Normo = normotermia; Hipo = hipotermia; \* $p < 0.05$ , N = 6 animais em cada grupo

## 4.4 MARCADORES DO ESTRESSE OXIDATIVO

### 4.4.1 Enzima Superóxido Dismutase

As medidas da SOD não mostraram diferenças estatisticamente significantes entre os subgrupos 1 e 2 (3 dias) com médias de 0,4482 ( $\pm$  0,08044) e 0,9604 ( $\pm$  0,1940) U SOD/mg respectivamente, o mesmo ocorreu com os dois subgrupos SHAM, 7 e 8, sem diferenças significativas. Nos subgrupos de 7 dias as médias dos subgrupos 3 e 4 foram estatisticamente diferentes com resultados de 1,374 ( $\pm$  0,2129) e 0,6476 ( $\pm$  0,04539) U SOD/mg ( $p=$  0,0076), respectivamente. Nos subgrupos de 14 dias as diferenças entre as médias dos subgrupos 5 e 6 foram 1,444 ( $\pm$  0,1206) e 1,363 ( $\pm$  0,06365) U SOD/mg, respectivamente, sem significância estatística (Figura 11).

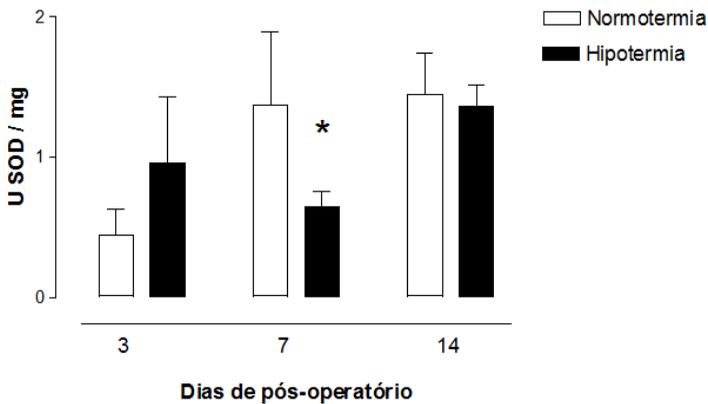


Figura 11 - Atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) no tecido da anastomose colônica em U SOD/mg, conforme os dias de pós-operatório e os subgrupos: subgrupos 1 e 2 (3 dias), subgrupos 3 e 4 (7 dias) e subgrupos 5 e 6 (14 dias). \* $p < 0,05$ .

### 4.4.2 Enzima Catalase

As médias das dosagens teciduais da catalase nas anastomoses colônicas foram similares na comparação entre os subgrupos de 3 dias de pós-operatório, grupos 1 e 2, com resultados de 1,116 ( $\pm$  0,1731) mM/mg no subgrupo normotérmico e 1,163 ( $\pm$  0,1598) mM/mg no

subgrupo hipotérmico, os subgrupos SHAM, 7 e 8, também não mostraram diferenças estatisticamente significantes entre si. Porém, nas comparações entre os subgrupos 3 vs. 4 e 5 vs. 6, as diferenças das médias apresentaram significância estatística. Aos 7 dias de pós-operatório os subgrupos normotérmico e hipotérmico apresentaram médias de 1,485 ( $\pm$  0,1216) e 0,8816 ( $\pm$  0,08559) mM/mg, respectivamente ( $p=$  0,0023). Aos 14 dias de pós-operatório, os subgrupos normotérmico e hipotérmico apresentaram resultados de 2,612 ( $\pm$  0,2186) e 1,439 ( $\pm$  0,07558) mM/mg, respectivamente ( $p=$  0,0005) (Figura 12).

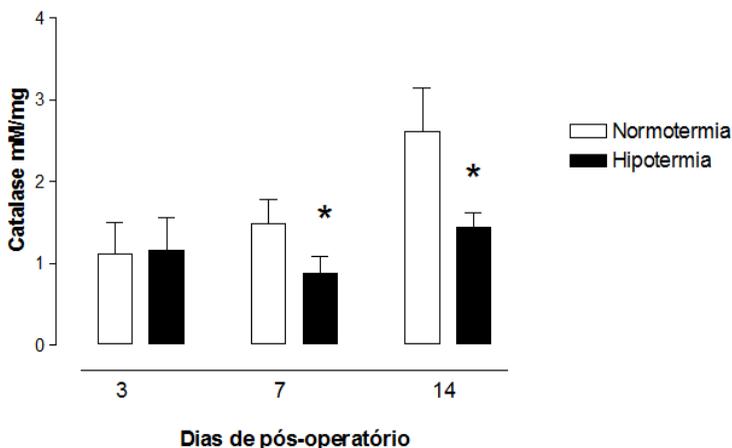


Figura 12 - Atividade enzimática da catalase no tecido da anastomose colônica em mM/mg, conforme os dias de pós-operatório e os subgrupos: subgrupos 1 e 2 (3 dias), subgrupos 3 e 4 (7 dias) e subgrupos 5 e 6 (14 dias). \* $p < 0,05$ .

#### 4.4.3 Glutaciona Reduzida (GSH)

As dosagens de GSH do tecido cicatricial das anastomoses colônicas determinou valores reduzidos no subgrupo hipotérmico em comparação ao normotérmico aos 7 dias de pós-operatório, com diferença estatisticamente significativa, os subgrupos 3 e 4 apresentaram 0,5136 ( $\pm$  0,03523) e 0,3542 ( $\pm$  0,01089) mM/mg, respectivamente ( $p=$  0,0015). As demais comparações não tiveram diferenças estatisticamente significantes entre os subgrupos de 3 dias, 14 dias e

SHAM. Os subgrupos 1 e 2 apresentaram 0,3985 ( $\pm$  0,02151) e 0,4329 ( $\pm$  0,01985) mM/mg, respectivamente; e os subgrupos 5 e 6 apresentaram resultados de 0,4434 ( $\pm$  0,03619) e 0,5092 ( $\pm$  0,06636) mM/mg (Figura 14).

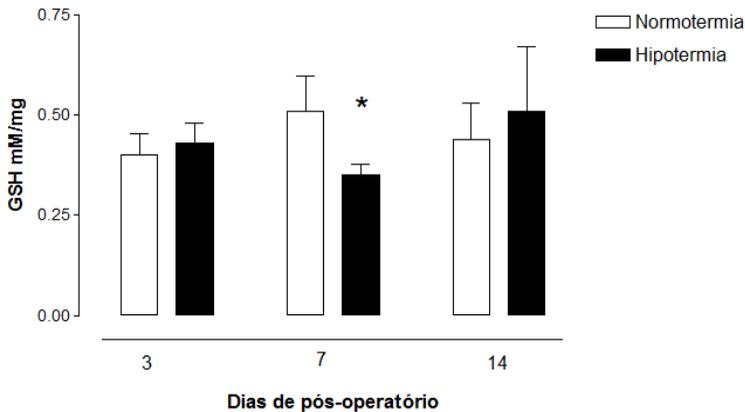


Figura 13 - Níveis da glutatona reduzida (GSH) no tecido da anastomose colônica em mM/mg, conforme os dias de pós-operatório e os subgrupos: subgrupos 1 e 2 (3 dias), subgrupos 3 e 4 (7 dias) e subgrupos 5 e 6 (14 dias). \* $p < 0,05$ .

#### 4.4.4 Nível de Peroxidação Lipídica (TBARS)

A mensuração da peroxidação lipídica pela determinação do TBARS demonstrou níveis maiores nos subgrupos hipotérmicos de 3 e 7 dias em relação aos seus correspondentes normotérmicos, porém aos 14 dias de pós-operatório o nível do grupo hipotérmico reduziu, ficando abaixo do nível do normotérmico. Os subgrupos SHAM 7 e 8 quando comparados não apresentaram diferenças estatisticamente significantes. Os subgrupos de 3 dias, 1 e 2, apresentaram resultados de 44,82 ( $\pm$  4,908) e 50,04 ( $\pm$  3,351) nmol/mg, respectivamente, porém sem diferença estatística. Os subgrupos de 7 dias, 3 e 4, apresentaram 40,07 ( $\pm$  5,320) e 60,54 ( $\pm$  3,587) nmol/mg, respectivamente ( $p = 0,0097$ ). Os subgrupos de 14 dias, 5 e 6, tiveram resultados de 53,24 ( $\pm$  3,784) e 34,24 ( $\pm$  2,541) nmol/mg, respectivamente ( $p = 0,0019$ ) (Figura 15).

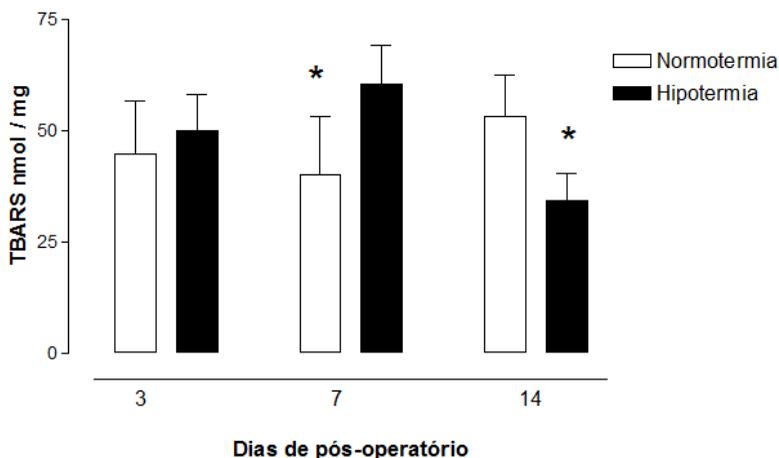
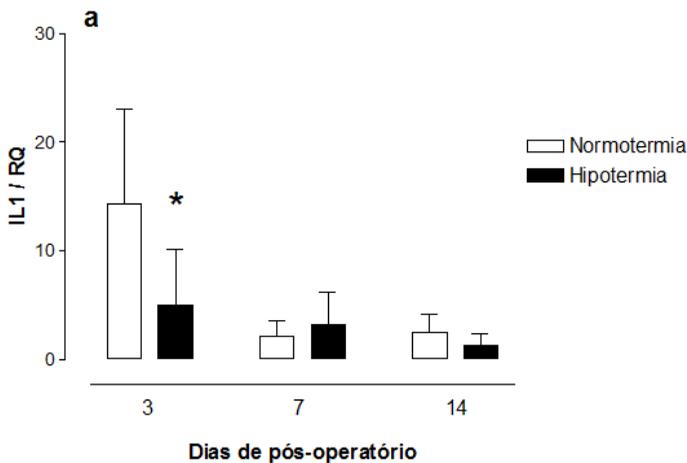


Figura 14 - Níveis das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) tecido da anastomose colônica em nM/mg, conforme os dias de pós-operatório e os subgrupos: subgrupos 1 e 2 (3 dias), subgrupos 3 e 4 (7 dias) e subgrupos 5 e 6 (14 dias). \* $p < 0,05$ .

#### 4.5 CITOCINAS E FATORES DE CRESCIMENTO

A expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias IL-1 e IL-6, da citocina anti-inflamatória IL-10 e os fatores de crescimento VEGF e IGF1 foram mensurados com o uso PCR-RT em tempo real. Os resultados em relação a IL-1 mostraram-se significativos na comparação dos subgrupos 1 e 2, com médias de 14,3 ( $\pm$  8,783) no subgrupo normotérmico vs. 5,002 ( $\pm$  5,073) no subgrupo hipotérmico, com  $p = 0,0486$  (Figura 15), porém nas comparações entre os subgrupos de 7 e 14 dias, além dos subgrupos SHAM não apresentaram médias significativamente diferentes. Os resultados relativos a IL-6 apresentaram médias maiores para os subgrupos normotérmicos em 3, 7 e 14 dias, porém apenas nestes dois últimos as diferenças foram estatisticamente significantes: a comparação dos subgrupos 3 com média de 3,327 ( $\pm$  2,533) vs. subgrupo 4 com 0,6167 ( $\pm$  0,2326) ( $p = 0,027$ ) e a comparação do subgrupo 5 com 3,626 ( $\pm$  2,357) vs. o subgrupo 6 com 0,6363 ( $\pm$  0,7479) ( $p = 0,0142$ ) (Figura 16), os subgrupos SHAM não mostraram diferenças significativas. A citocina IL-10 apresentou valores crescentes na sequência dos dias 3, 7 e 14, ao contrário de IL-1 e IL-6, que foram decrescentes, as médias de IL-10 não apresentaram diferenças estatisticamente significativas para os subgrupos SHAM e na comparação entre os subgrupos 1 e 2, porém nas

comparações nos subgrupos de 7 e 14 dias demonstraram resultados significativos: o subgrupo normotérmico 3 com 1,954 ( $\pm$  1,038) vs. o subgrupo hipotérmico 4 com 0,6094 ( $\pm$  0,3608) resultou em um  $p=0,0087$ , e o subgrupo 5 com 5,001 ( $\pm$  4,205) vs. o subgrupo 6 com 0,7930 ( $\pm$  0,3848) resultou em valor de  $p=0,0348$  (Figura 16). Dois fatores de crescimento foram avaliados, VEGF e IGF1, todas as comparações relativas aos subgrupos pareados em 3, 7, 14 dias e os subgrupos SHAM para VEGF não mostraram diferenças estatisticamente significativas, apesar de tenderem a ser mais elevados para os subgrupos normotérmicos, exceto entre os subgrupos 5 e 6 e com valores crescentes na sequência de dias 3, 7 e 14. As médias das mensurações de IGF1 também não foram significativamente diferentes, exceto nos subgrupos de 7 dias de pós-operatório, 3 vs. 4, com resultados médios de 3,397 ( $\pm$  1,844) no subgrupo normotérmico vs. 1,346 ( $\pm$  0,9514) ( $p=0,036$ ) (Figura 17).



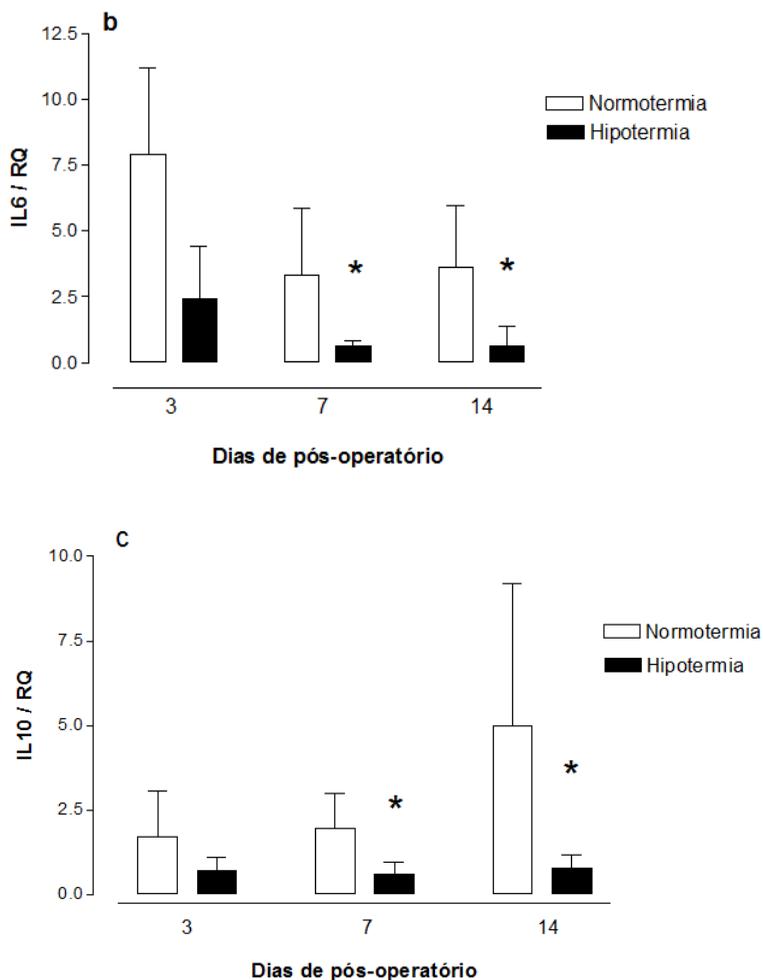


Figura 15 - Expressão de mRNA para citocinas em anastomoses de cólon, em ratos. Os animais foram submetidos à cirurgia sob hipotermia ou normotermia e a expressão relativa do RNAm de IL-1 (a), IL-6 (b), IL-10 (c) foi determinado no tecido do intestino aos 3, 7 e 14 dias após a cirurgia. \* $p < 0,05$ . RQ= Quantificação relativa.

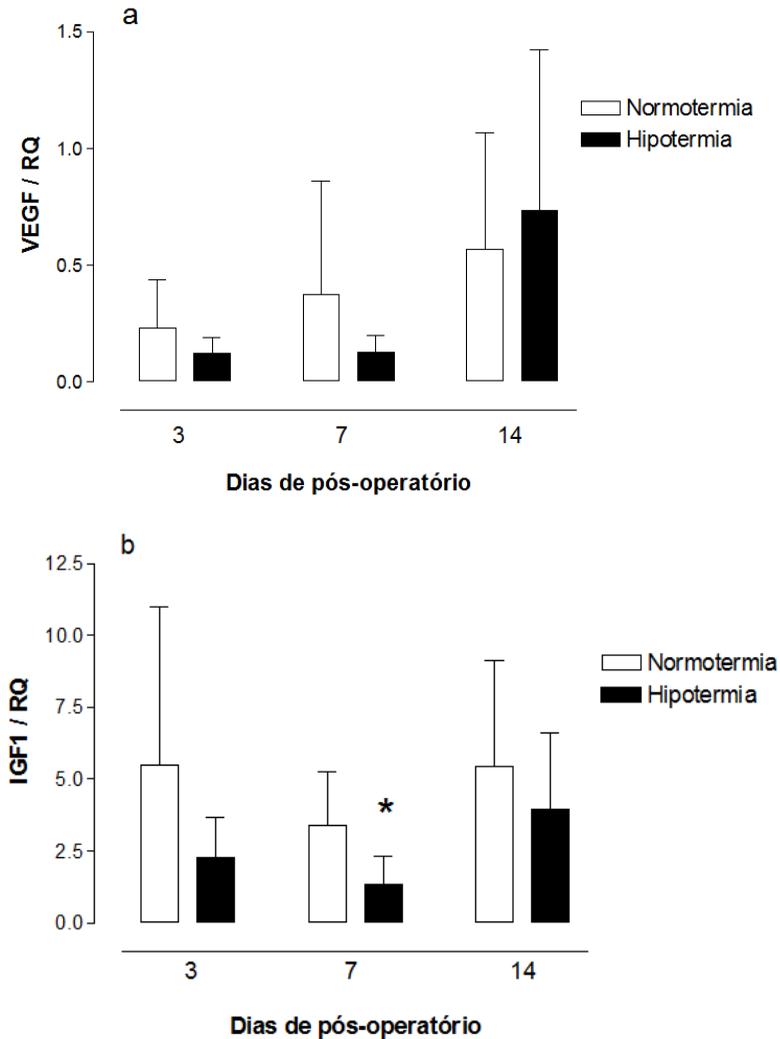


Figura 16 - Expressão de mRNA para fatores de crescimento em anastomoses de cólon, em ratos. Os animais foram submetidos à cirurgia sob hipotermia ou normotermia e a expressão relativa do RNAm de VEGF (a) e IGF1 (b) foi determinado no tecido do intestino aos 3, 7 e 14 dias após a cirurgia. \* $p < 0,05$ . RQ= Quantificação relativa.

## 5 DISCUSSÃO

As fístulas de anastomoses do trato digestivo constituem uma das principais complicações da cirurgia gastrointestinal, apresentam elevados índices de morbidade e mortalidade(78) e no cólon sua incidência é elevada e associada a infecções graves, devido à alta concentração bacteriana de sua luz. Muitas vezes é necessário reoperar pacientes com peritonite e sepsis, decorrentes de deiscência anastomótica, com a realização de estomas como parte do tratamento destas complicações(3, 79).

Este estudo demonstra os efeitos danosos da hipotermia perioperatória na cicatrização das anastomoses colônicas, em ratos, desde a resposta inflamatória inicial, com redução de citocinas e infiltrado inflamatório até as fases finais de cicatrização com deposição de colágeno deficiente e perda de resistência da anastomose à pressão intraluminal induzida.

Estes resultados vem se somar a estudos prévios que apresentam efeitos prejudiciais da hipotermia perioperatória na função imune e resposta inflamatória(43), porém aqui analisando a cicatrização de anastomoses colônicas, processo fundamental para que não ocorram complicações pós-operatórias, especialmente a deiscência anastomótica. A cicatrização, iniciada imediatamente após a lesão tecidual, aqui de caráter cirúrgico, envolve uma complexa série de eventos que inclui o tampão plaquetário inicial, quimiotaxia, proliferação celular, neovascularização, síntese de matiz extracelular, formação e remodelação da cicatriz, quando finalmente a força tênsil da anastomose está reconstituída, ao redor do 14º dia de pós-operatório. Estes eventos são regulados por vários mediadores incluindo plaquetas, células inflamatórias, citocinas e fatores de crescimento(80).

Após a secção cirúrgica do cólon e imediata realização da anastomose é iniciada a reação inflamatória em resposta ao trauma cirúrgico, à exposição da matriz extracelular e à reação ao material de sutura utilizado, gerando o processo inflamatório normal e necessário para a adequada seqüência da cicatrização da parede intestinal(13, 80). A hipotermia perioperatória causa vasoconstricção termorregulatória e consequente redução da tensão de oxigênio nos tecidos, provoca também prejuízo na função imune, reduz o recrutamento e a função dos neutrófilos e a produção das células *natural killer*(48) e de anticorpos mediados por células(47-48) , além de prejudicar a liberação de citocinas e fatores de crescimento, dificultando a progressão do processo

inflamatório e cicatricial(56). A força tênsil da anastomose depende da deposição de colágeno, que necessita de hidroxilação de prolina e lisina, processos que dependem de oxigênio(43).

A pressão de ruptura da anastomose foi consistentemente diminuída nos animais submetidos à hipotermia, nos dias 7 e 14 de pós-operatório, caracterizando maior fragilidade da linha anastomótica quando comparada à anastomose realizada em condições normais de temperatura. Este fato associado a expressiva diminuição no teor de hidroxiprolina no dia 14 de pós-operatório no subgrupo de hipotermia em relação ao de normotermia ( $p < 0,0001$ ) e a redução estatisticamente significativa na deposição de colágeno quando avaliado na histologia, demonstra claramente que a hipotermia perioperatória inibe a formação do colágeno na cicatrização da anastomose, que por sua vez está associada à redução da resistência anastomótica à pressão intraluminal.

A hidroxiprolina é um marcador bioquímico da cicatrização, representando a deposição do colágeno cicatricial. O colágeno é importante em todas as fases de cicatrização e é crítico no retorno da integridade e força tênsil tecidual(81). Por essa razão, o conteúdo de hidroxiprolina é utilizado normalmente como um indicador para determinar o teor de colágeno, uma concentração elevada de hidroxiprolina indica que o conteúdo de colágeno é abundante e que o reparo da lesão ocorreu de maneira mais rápida(72).

A cicatrização requer um fino equilíbrio entre os efeitos positivos e deletérios das ROS, um grupo de moléculas extremamente potentes, com poder limitante na velocidade e qualidade da regeneração tecidual(36), este equilíbrio é conhecido como balanço redox. A produção excessiva de ROS está associada com lesão tecidual, gera muitos processos patológicos e causa destruição do tecido saudável do estroma(36-37). ROS em excesso lesa membranas celulares por peroxidação lipídica e também causa danos no DNA e nas proteínas. O ataque de ROS ao DNA quebra sua fita e altera o processo normal de translação e transcrição, alterando expressão gênica, replicação do DNA e induzindo à apoptose(38). As proteínas também podem ser alvos das ROS, a oxidação de proteínas rompem receptores, prejudicam as funções enzimáticas e interrompem as vias de transduções de sinais(37, 39). A redução da peroxidação lipídica e o aumento do GSH do tecido de anastomose de cólon, em ratos, está relacionada ao aumento do teor de hidroxiprolina tecidual e aumento da pressão de ruptura da anastomose(40), os dados obtidos neste trabalho confirmam esta afirmação, quando foi demonstrado que o aumento da peroxidação lipídica e a redução do GSH que foram detectados nos ratos

hipotérmicos estão relacionados à redução da hidroxiprolina tecidual e da pressão de ruptura da anastomose nas amostras destes animais. O malonaldeído, um produto da peroxidação lipídica, tem seus níveis aumentados em feridas com retardo de cicatrização decorrente do uso de hidrocortisona em ratos, em relação ao grupo ratos controle(41).

Neste estudo, foi observado que a hipotermia perioperatória reduz a atividade das enzimas antioxidantes nos tecidos provenientes de anastomoses de cólon, em ratos. A atividade da enzima SOD reduziu significativamente aos 7 dias de pós-operatório e a atividade da catalase aos 7 e 14 dias. Os níveis de GSH estavam reduzidos significativamente aos 7 dias de pós-operatório. Além disto, a peroxidação lipídica, determinada pelo TBARS, mostrou-se acentuada no tecido proveniente dos animais dos grupos de hipotermia no dia 7 de pós-operatório e os níveis reduziram apenas aos 14 dias de pós-operatório, uma fase já tardia da cicatrização.

Assim sendo, pode-se observar que a hipotermia perioperatória exerceu inibição do processo normal de detoxificação das ROS no sítio de cicatrização da anastomose colônica, prejudicando, por esta via, o processo cicatricial.

Excessiva produção de ROS ou detoxificação deficiente destas moléculas altamente instáveis causa estresse oxidativo, e isto tem sido identificado como um importante fator na patogênese de feridas crônicas não-cicatrizadas(82).

Assim, pode-se afirmar, com este estudo, que a hipotermia perioperatória reduz a atividade das enzimas antioxidantes SOD e catalase, os níveis da glutathione reduzida e aumenta a peroxidação lipídica no tecido cicatricial de anastomoses colônicas, em ratos.

Nas fases iniciais do processo inflamatório decorrente do trauma cirúrgico na parede do cólon ocorre o pico de citocinas pró-inflamatórias, recrutamento celular e aumento da permeabilidade capilar(83), dando início a sequência de eventos que culmina com a adequada cicatrização da anastomose intestinal.

No presente estudo foi observado que a citocina pró-inflamatória IL-1 teve sua expressão gênica reduzida significativamente no subgrupo 2 de hipotermia em relação ao subgrupo 1, estando de acordo com a redução dos parâmetros histológicos edema e infiltrado celular no subgrupo de hipotermia em relação aos normotérmicos, com médias estatisticamente inferiores, observada também no dia 3 de pós-operatório. A citocina pró-inflamatória IL-6 também apresentou um pico aumentado no dia 3 de pós-operatório e foi progressivamente reduzindo nos dias 7 e 14, porém seus níveis estavam diminuídos nos subgrupos

hipotérmicos nos dias 3, 7 e 14, apresentando diferença estatisticamente significativa apenas nos dias 7 e 14. A citocina anti-inflamatória IL-10 mostra um padrão de expressão inverso às pró-inflamatórias, com aumento progressivo no decorrer do tempo, ainda assim os subgrupos hipotérmicos apresentaram reduções significativas nos dias 7 e 14 de pós-operatório. Além das diferenças entre os grupos ressaltadas acima, é interessante observar que os animais dos grupos hipotérmicos apresentaram um achatamento das colunas nos gráficos das citocinas, com níveis muito baixos nas três citocinas estudadas, demonstrando uma inibição acentuada da reação inflamatória por uma reduzidíssima expressão gênica de citocinas do processo inflamatório. Assim foi observado que a hipotermia perioperatória inibe os eventos do processo inflamatório desde do seu início, prejudicando sua evolução e a adequada cicatrização das anastomoses. Por fim demonstramos também que a expressão gênica dos fatores de crescimento analisados VEGF, que estimula a angiogênese e tecido de granulação, e IGF-1, que estimula a proliferação de fibroblastos e a síntese de colágeno(14) e aumento da força tênsil da anastomose(27), tiveram seus níveis reduzidos nos subgrupos hipotérmicos em relação aos seus correspondentes normotérmicos, tendo médias estatisticamente significantes apenas para IGF-1 no dia 7 de pós-operatório. Assim podemos associar a redução destes fatores de crescimento à redução na deposição de colágeno no estudo histológico, à redução do teor de hidroxiprolina e à redução da pressão de ruptura da anastomose.

Neste estudo foram avaliados diversos aspectos da cicatrização das anastomoses de cólon e do estresse oxidativo ocorrido após a lesão tecidual do procedimento cirúrgico, todos os resultados obtidos nestes testes convergem para o fato que a hipotermia perioperatória é deletéria à cicatrização das anastomoses de cólon, com isso é possível aventar que resultados cirúrgicos ruins após ressecção e anastomose de cólon, em parte, estão relacionados à hipotermia a que os pacientes são submetidos inadvertidamente. Pode-se também, conjecturar que outros processos cicatriciais, em cirurgias nas diversas partes do corpo humano, podem ter sua cicatrização prejudicada pela intercorrência da hipotermia perioperatória. Estudos clínicos observacionais podem ser delineados para confirmar estas afirmações.

Além dos diversos efeitos prejudiciais da hipotermia perioperatória já referidos neste trabalho, agora vem a se somar o prejuízo à cicatrização de anastomoses de cólon. Com isto torna-se mandatório o uso de monitorização contínua da temperatura central e o aquecimento ativo dos pacientes cirúrgicos, por métodos já conhecidos.

## 6 CONCLUSÕES

### 6.1 CONCLUSÃO GERAL

Neste estudo, foram obtidos resultados dos diversos parâmetros analisados que permitem concluir que a hipotermia perioperatória ( $\pm 32^{\circ}\text{C}$ ) inibe o processo inflamatório e a cicatrização das anastomoses colônicas em ratos, sendo portanto prejudicial à cicatrização das mesmas.

### 6.2 CONCLUSÕES ESPECÍFICAS

- I. A pressão de ruptura da anastomose colônica foi menor nos animais submetidos à hipotermia perioperatória.
- II. O teor de hidroxiprolina no tecido cicatricial da anastomose colônica foi menor nos animais submetidos à hipotermia perioperatória.
- III. A avaliação histológica das amostras teciduais das anastomoses demonstrou redução do edema, do infiltrado inflamatório e da deposição de colágeno nos subgrupos hipotérmicos.
- IV. A liberação das espécies reativas de oxigênio (ROS) foi maior nos animais submetidos à hipotermia perioperatória, conforme a atividade das enzimas anti-oxidantes SOD e CAT, além do GSH e TBARS.
- V. A avaliação das citocinas e fatores de crescimento por PCR-RT mostraram diferenças significativas entre os grupos de animais submetidos à hipotermia e aqueles mantidos em normotermia, conforme:
  - a. A quantificação relativa de IL1 foi menor nos subgrupos de hipotermia.
  - b. A quantificação relativa de IL6 foi menor nos subgrupos de hipotermia.
  - c. A quantificação relativa de IL10 foi menor nos subgrupos de hipotermia.
  - d. A quantificação relativa de VEGF foi menor nos subgrupos de hipotermia, porém sem significância estatística.
  - e. A quantificação relativa de IGF-1 foi menor nos subgrupos de hipotermia.



## REFERÊNCIAS

1. Rullier E, Laurent C, Garrelon JL, Michel P, Saric J, Parneix M. Risk factors for anastomotic leakage after resection of rectal cancer. *Br J Surg.* 1998 Mar;85(3):355-8.
2. Nesbakken A, Nygaard K, Lunde OC, Blucher J, Gjertsen O, Dullerud R. Anastomotic leak following mesorectal excision for rectal cancer: true incidence and diagnostic challenges. *Colorectal Dis.* 2005 Nov;7(6):576-81.
3. Matthiessen P, Hallbook O, Rutegard J, Simert G, Sjodahl R. Defunctioning stoma reduces symptomatic anastomotic leakage after low anterior resection of the rectum for cancer: a randomized multicenter trial. *Ann Surg.* 2007 Aug;246(2):207-14.
4. Tan WS, Tang CL, Shi L, Eu KW. Meta-analysis of defunctioning stomas in low anterior resection for rectal cancer. *Br J Surg.* 2009 May;96(5):462-72.
5. Alves A, Panis Y, Trancart D, Regimbeau JM, Pocard M, Valleur P. Factors associated with clinically significant anastomotic leakage after large bowel resection: multivariate analysis of 707 patients. *World J Surg.* 2002 Apr;26(4):499-502.
6. Yarimkaya A, Apaydin B, Unal E, Karabicak I, Aydogan F, Uslu E, et al. Effects of recombinant human growth hormone and nandrolone phenylpropionate on the healing of ischemic colon anastomosis in rats. *Dis Colon Rectum.* 2003 Dec;46(12):1690-7.
7. Jiborn H, Ahonen J, Zederfeldt B. Healing of experimental colonic anastomoses. III. Collagen metabolism in the colon after left colon resection. *Am J Surg.* 1980 Mar;139(3):398-405.
8. Dixon CF. Anterior Resection for Malignant Lesions of the Upper Part of the Rectum and Lower Part of the Sigmoid. *Ann Surg.* 1948 Sep;128(3):425-42.
9. Fraser I. An historical perspective on mechanical aids in intestinal anastomosis. *Surg Gynecol Obstet.* 1982 Oct;155(4):566-74.
10. Haley RW, Culver DH, Morgan WM, White JW, Emori TG, Hooton TM. Identifying patients at high risk of surgical wound infection. A simple multivariate index of patient susceptibility and wound contamination. *Am J Epidemiol.* 1985 Feb;121(2):206-15.
11. Golub R, Golub RW, Cantu R, Jr., Stein HD. A multivariate analysis of factors contributing to leakage of intestinal anastomoses. *J Am Coll Surg.* 1997 Apr;184(4):364-72.

12. Vignali A, Fazio VW, Lavery IC, Milsom JW, Church JM, Hull TL, et al. Factors associated with the occurrence of leaks in stapled rectal anastomoses: a review of 1,014 patients. *J Am Coll Surg.* 1997 Aug;185(2):105-13.
13. Thornton FJ, Barbul A. Healing in the gastrointestinal tract. *Surg Clin North Am.* 1997 Jun;77(3):549-73.
14. Barbul A. *Wound Healing.* 8th ed. Brunicaudi FC, Schwartz SI, editors. New York: McGraw-Hill, Health Pub. Division; 2005.
15. Brasken P, Lehto M, Renvall S. Changes in the connective tissue composition of the submucosal layer of colonic anastomosis. An immunohistologic study in rats. *Acta Chir Scand.* 1989 Aug;155(8):413-9.
16. Wise L, McAlister W, Stein T, Schuck P. Studies on the healing of anastomoses of small and large intestines. *Surg Gynecol Obstet.* 1975 Aug;141(2):190-4.
17. Witte MB, Barbul A. Repair of full-thickness bowel injury. *Crit Care Med.* 2003 Aug;31(8 Suppl):S538-46.
18. Nathan C. Immunology. Catalytic antibody bridges innate and adaptive immunity. *Science.* 2002 Dec 13;298(5601):2143-4.
19. Schmid-Schonbein GW. Analysis of inflammation. *Annu Rev Biomed Eng.* 2006;8:93-131.
20. Corsini E, Di Paola R, Viviani B, Genovese T, Mazzon E, Lucchi L, et al. Increased carrageenan-induced acute lung inflammation in old rats. *Immunology.* 2005 Jun;115(2):253-61.
21. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature.* 2008 Jul 24;454(7203):428-35.
22. Kim HS, Kim WD, Lee YH. Production and expression of Gro-alpha and RANTES by peripheral blood mononuclear cells isolated from patients with Kawasaki disease and measles. *J Korean Med Sci.* 2003 Jun;18(3):381-6.
23. Biasi D, Carletto A, Caramaschi P, Bonella F, Bambara V, Pacor ML, et al. [Neutrophils in rheumatoid inflammation]. *Recenti Prog Med.* 2003 Jan;94(1):25-30.
24. Arnhold J. Properties, functions, and secretion of human myeloperoxidase. *Biochemistry (Mosc).* 2004 Jan;69(1):4-9.
25. Budhu A, Wang XW. The role of cytokines in hepatocellular carcinoma. *J Leuk Biol.* 2006 Dec;80(6):1197-213.
26. Orgill D, Demling RH. Current concepts and approaches to wound healing. *Crit Care Med.* 1988 Sep;16(9):899-908.
27. Egger B, Inglin R, Zeeh J, Dirsch O, Huang Y, Buchler MW. Insulin-like growth factor I and truncated keratinocyte growth factor

- accelerate healing of left-sided colonic anastomoses. *Br J Surg*. 2001 Jan;88(1):90-8.
28. Regan MC, Kirk SJ, Hurson M, Sodeyama M, Wasserkrug HL, Barbul A. Tumor necrosis factor-alpha inhibits in vivo collagen synthesis. *Surgery*. 1993 Feb;113(2):173-7.
29. Prockop DJ, Kivirikko KI. Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy. *Annu Rev Biochem*. 1995;64:403-34.
30. Brasken P, Lehto M, Renvall S. Fibronectin, laminin, and collagen types I, III, IV and V in the healing rat colon anastomosis. *Ann Chir Gynaecol*. 1990;79(2):65-71.
31. Chowcat NL, Savage FJ, Hembry RM, Boulos PB. Role of collagenase in colonic anastomoses: a reappraisal. *Br J Surg*. 1988 Apr;75(4):330-4.
32. Houghton PJ, Hylands PJ, Mensah AY, Hensel A, Deters AM. In vitro tests and ethnopharmacological investigations: wound healing as an example. *J Ethnopharmacol*. 2005 Aug 22;100(1-2):100-7.
33. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(1):44-84.
34. Thomas SR, Witting PK, Drummond GR. Redox control of endothelial function and dysfunction: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*. 2008 Oct;10(10):1713-65.
35. Ciencewicki J, Trivedi S, Kleeberger SR. Oxidants and the pathogenesis of lung diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2008 Sep;122(3):456-68; quiz 69-70.
36. Bryan N, Ahswain H, Smart N, Bayon Y, Wohlert S, Hunt JA. Reactive oxygen species (ROS)--a family of fate deciding molecules pivotal in constructive inflammation and wound healing. *Eur Cell Mater*. 2012;24:249-65.
37. Magder S. Reactive oxygen species: toxic molecules or spark of life? *Crit Care*. 2006 Feb;10(1):208.
38. Szabo C, Zingarelli B, O'Connor M, Salzman AL. DNA strand breakage, activation of poly (ADP-ribose) synthetase, and cellular energy depletion are involved in the cytotoxicity of macrophages and smooth muscle cells exposed to peroxynitrite. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Mar 5;93(5):1753-8.
39. Ischiropoulos H, Zhu L, Chen J, Tsai M, Martin JC, Smith CD, et al. Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. *Arch Biochem Biophys*. 1992 Nov 1;298(2):431-7.

40. Aytekin FO, Teke Z, Aydin C, Kabay B, Yenisey C, Sacar S, et al. Effects of a membrane-permeable radical scavenger, Tempol, on healing of colonic anastomoses in the cecal ligation and puncture model of polymicrobial sepsis in rats. *Am J Surg*. 2007 Jun;193(6):723-9.
41. Gupta A, Singh RL, Raghbir R. Antioxidant status during cutaneous wound healing in immunocompromised rats. *Mol Cell Biochem*. 2002 Dec;241(1-2):1-7.
42. Doufas AG. Consequences of inadvertent perioperative hypothermia. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*. 2003 Dec;17(4):535-49.
43. Reynolds L, Beckmann J, Kurz A. Perioperative complications of hypothermia. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*. 2008 Dec;22(4):645-57.
44. Deuel TF, Kawahara RS, Mustoe TA, Pierce AF. Growth factors and wound healing: platelet-derived growth factor as a model cytokine. *Annu Rev Med*. 1991;42:567-84.
45. Kurz A, Sessler DI, Lenhardt R. Perioperative normothermia to reduce the incidence of surgical-wound infection and shorten hospitalization. Study of Wound Infection and Temperature Group. *N Engl J Med*. 1996 May 9;334(19):1209-15.
46. Oliveira J C C BN, Damerau E F. Fatores de risco para infecção de sítio cirúrgico em cirurgia colorretal eletiva. *Rev Bras Coloproct* 2001;21(2):75-83.
47. Beilin B, Shavit Y, Razumovsky J, Wolloch Y, Zeidel A, Bessler H. Effects of mild perioperative hypothermia on cellular immune responses. *Anesthesiology*. 1998 Nov;89(5):1133-40.
48. Cheng YS, Yin FH, Foundling S, Blomstrom D, Kettner CA. Stability and activity of human immunodeficiency virus protease: comparison of the natural dimer with a homologous, single-chain tethered dimer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Dec;87(24):9660-4.
49. Mantz J, Paugam-Burtz C. Hypothermia, sepsis, and the granulocytes: lessons to learn beyond the cytokines. *Crit Care Med*. 2004 Sep;32(9):1974-5.
50. Greif R, Akca O, Horn EP, Kurz A, Sessler DI. Supplemental perioperative oxygen to reduce the incidence of surgical-wound infection. *N Engl J Med*. 2000 Jan 20;342(3):161-7.
51. Sessler DI, Olofsson CI, Rubinstein EH. The thermoregulatory threshold in humans during nitrous oxide-fentanyl anesthesia. *Anesthesiology*. 1988 Sep;69(3):357-64.
52. Sheffield CW, Sessler DI, Hopf HW, Schroeder M, Moayeri A, Hunt TK, et al. Centrally and locally mediated thermoregulatory responses alter subcutaneous oxygen tension. *Wound Repair Regen*. 1996 Jul-Sep;4(3):339-45.

53. Carli F, Emery PW, Freemantle CA. Effect of perioperative normothermia on postoperative protein metabolism in elderly patients undergoing hip arthroplasty. *Br J Anaesth*. 1989 Sep;63(3):276-82.
54. Attard JA, Raval MJ, Martin GR, Kolb J, Afrouzian M, Buie WD, et al. The effects of systemic hypoxia on colon anastomotic healing: an animal model. *Dis Colon Rectum*. 2005 Jul;48(7):1460-70.
55. Torbati D, Camacho MT, Raszynski A, Sussmane JB, Totapally BR, Hultquist K, et al. Effect of hypothermia on ventilation in anesthetized, spontaneously breathing rats: theoretical implications for mechanical ventilation. *Intensive Care Med*. 2000 May;26(5):585-91.
56. Torossian A, Ruehlmann S, Middeke M, Sessler DI, Lorenz W, Wulf HF, et al. Mild pre-septic hypothermia is detrimental in rats. *Crit Care Med*. 2004 Sep;32(9):1899-903.
57. Melling AC, Ali B, Scott EM, Leaper DJ. Effects of preoperative warming on the incidence of wound infection after clean surgery: a randomised controlled trial. *Lancet*. 2001 Sep 15;358(9285):876-80.
58. Pelz JO, Doerfer J, Decker M, Dimmler A, Hohenberger W, Meyer T. Hyperthermic intraperitoneal chemoperfusion (HIPEC) decrease wound strength of colonic anastomosis in a rat model. *Int J Colorectal Dis*. 2007 Aug;22(8):941-7.
59. Frank SM, Cattaneo CG, Wieneke-Brady MB, El-Rahmany H, Gupta N, Lima JA, et al. Threshold for adrenomedullary activation and increased cardiac work during mild core hypothermia. *Clin Sci (Lond)*. 2002 Jan;102(1):119-25.
60. Frank SM, Satitpunwaycha P, Bruce SR, Herscovitch P, Goldstein DS. Increased myocardial perfusion and sympathoadrenal activation during mild core hypothermia in awake humans. *Clin Sci (Lond)*. 2003 May;104(5):503-8.
61. Schmied H, Kurz A, Sessler DI, Kozek S, Reiter A. Mild hypothermia increases blood loss and transfusion requirements during total hip arthroplasty. *Lancet*. 1996 Feb 3;347(8997):289-92.
62. Winkler M, Akca O, Birkenberg B, Hetz H, Scheck T, Arkilic CF, et al. Aggressive warming reduces blood loss during hip arthroplasty. *Anesth Analg*. 2000 Oct;91(4):978-84.
63. Widman J, Hammarqvist F, Sellden E. Amino acid infusion induces thermogenesis and reduces blood loss during hip arthroplasty under spinal anesthesia. *Anesth Analg*. 2002 Dec;95(6):1757-62, table of contents.
64. Johansson T, Lisander B, Ivarsson I. Mild hypothermia does not increase blood loss during total hip arthroplasty. *Acta Anaesthesiol Scand*. 1999 Nov;43(10):1005-10.

65. Gentilello LM, Jurkovich GJ, Stark MS, Hassantash SA, O'Keefe GE. Is hypothermia in the victim of major trauma protective or harmful? A randomized, prospective study. *Ann Surg.* 1997 Oct;226(4):439-47; discussion 47-9.
66. Heier T, Caldwell JE, Sessler DI, Kitts JB, Miller RD. The relationship between adductor pollicis twitch tension and core, skin, and muscle temperature during nitrous oxide-isoflurane anesthesia in humans. *Anesthesiology.* 1989 Sep;71(3):381-4.
67. Leslie K, Sessler DI, Bjorksten AR, Moayeri A. Mild hypothermia alters propofol pharmacokinetics and increases the duration of action of atracurium. *Anesth Analg.* 1995 May;80(5):1007-14.
68. Just B, Delva E, Camus Y, Lienhart A. Oxygen uptake during recovery following naloxone. Relationship with intraoperative heat loss. *Anesthesiology.* 1992 Jan;76(1):60-4.
69. Lenhardt R, Marker E, Goll V, Tschernich H, Kurz A, Sessler DI, et al. Mild intraoperative hypothermia prolongs postanesthetic recovery. *Anesthesiology.* 1997 Dec;87(6):1318-23.
70. Kurz A, Sessler DI, Narzt E, Bekar A, Lenhardt R, Huemer G, et al. Postoperative hemodynamic and thermoregulatory consequences of intraoperative core hypothermia. *J Clin Anesth.* 1995 Aug;7(5):359-66.
71. Christensen H, Langfelt S, Laurberg S. Bursting strength of experimental colonic anastomoses. A methodological study. *Eur Surg Res.* 1993 Jan-Feb;25(1):38-45.
72. Reddy GK, Enwemeka CS. A simplified method for the analysis of hydroxyproline in biological tissues. *Clin Biochem.* 1996 Jun;29(3):225-9.
73. Salm R, Wullich B, Kiefer G, Fiebig HH, Farthmann EH. Effects of a three-drug antineoplastic protocol of wound healing in rats: a biomechanical and histologic study on gastrointestinal anastomoses and laparotomy wounds. *J Surg Oncol.* 1991 May;47(1):5-11.
74. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 1972 May 25;247(10):3170-5.
75. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984;105:121-6.
76. Beutler E, Duron O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med.* 1963 May;61:882-8.
77. Hermes-Lima M, Willmore WG, Storey KB. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III)xylene orange complex formation. *Free Radic Biol Med.* 1995 Sep;19(3):271-80.

78. Gonzalez-Pinto I, Gonzalez EM. Optimising the treatment of upper gastrointestinal fistulae. *Gut*. 2001 Dec;49 Suppl 4:iv22-31.
79. Abbas MA. Anastomotic leak: should we continue to accept the risks? *Dis Colon Rectum*. 2010 Jun;53(6):859-60.
80. Enoch S, Leaper, D. J. Basic Science of Healing. *Surgery*. [review]. 2005 feb 2005;23(2):37-42.
81. Teke Z, AYTEKIN FO, AYDIN C, KABAY B, YENISEY C, SACAR S, et al. Effects of pyrrolidine dithiocarbamate on healing of colonic anastomoses in the cecal ligation and puncture model of intraperitoneal sepsis in rats. *World J Surg*. 2007 Jan;31(1):200-9.
82. Schafer M, Werner S. Oxidative stress in normal and impaired wound repair. *Pharmacol Res*. 2008 Aug;58(2):165-71.
83. Zubaidi A, Buie WD, Hart DA, Sigalet D. Temporal expression of cytokines in rat cutaneous, fascial, and intestinal wounds: a comparative study. *Dig Dis Sci*. 2010 Jun;55(6):1581-8.



**ANEXO A – RESULTADO DE SOLICITAÇÃO DE PROTOCOLO****Protocolo**

PP00461

**Título**

EFEITOS DA HIPOTERMIA PER-OPERATÓRIA NAS ANASTOMOSES DE CÓLON, EM RATOS. AVALIAÇÃO MECÂNICA, CELULAR E BIOQUÍMICA

**Data de Entrada**

24/05/2010

**Resultado:**

Aprovado

**Data/Prazo**

10/09/2010

**Considerações**

Ofício nº 164/CEUA/PRPE/2010

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

Ao(à): Prof(a) Dr(a) João Carlos Costa de Oliveira, Departamento de Cirurgia – CCS

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO ad referendum, por três ano(s), para a utilização de cinquenta e oito ratos (*Rattus Norvegicus*).

Procedência do animal: Biotério Central.

- Processo cadastrado sob o número: 23080.019985/2010-80

Por ocasião do término desse protocolo, DEVERÁ SER APRESENTADO RELATÓRIO detalhado relacionando o uso de animais no Projeto desenvolvido aos resultados obtidos, conforme formulário ON LINE CEUA.

Atenciosamente,

**Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)  
Data 10/12/2013**

Data 10/09/2010

**Parecer(es):**



**Prof. Assoc. Carlos Rogério Tonussi, D.Sc.  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PRPE  
PRESIDENTE**



[Parecer01\\_PP00461.pdf](#)



[Parecer02\\_PP00461.pdf](#)



[Resposta\\_pesquisador\\_PP00461.pdf](#)



[Parecer\\_PP00461.pdf](#)



[Recurso\\_pesquisador\\_PP00461.pdf](#)



[Parecer\\_recurso\\_PP00461.pdf](#)