

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

Humberto Fenner Lyra Júnior

**INFLUÊNCIA DA GRELINA NO PROCESSO CICATRICIAL E
ESTRESSE OXIDATIVO NAS ANASTOMOSES COLÔNICAS**

Tese submetida ao 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

Co-orientador:

Prof. Dr. Leonardo de Lucca Schiavon

Florianópolis

2017

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

Lyra Junior, Humberto Fenner
Influência da grelina no processo cicatricial e
estresse oxidativo nas anastomoses colônicas /
Humberto Fenner Lyra Junior ; orientador, Armando
José d'Acâmpora, coorientador, Leonardo de Lucca
Schiavon, 2017.
145 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Médicas-Novo, Florianópolis,
2017.

Inclui referências.

1. Ciências Médicas-Novo. 2. Grelina. 3.
Estresse oxidativo. 4. Cicatrização. 5. Cirurgia
colorretal. I. d'Acâmpora, Armando José. II.
Schiavon, Leonardo de Lucca. III. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação
em Ciências Médicas-Novo. IV. Título.

Humberto Fenner Lyra Júnior

**INFLUÊNCIA DA GRELINA NO PROCESSO CICATRICIAL E
ESTRESSE OXIDATIVO NAS ANASTOMOSES COLÔNICAS**

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Grau de “Doutor”, e
aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em
Ciências Médicas.

Florianópolis, 01 de dezembro de 2017.

Prof. Dr. Getúlio Rodrigues de Oliveira Filho
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Armando José d’Acâmpora
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Pierre Galvagni Silveira
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. José Mauro dos Santos
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Renato Araújo Bonardi
Universidade Federal do Paraná

Ao meu saudoso, inesquecível e
insubstituível amigo, companheiro,
colega, apoiador e herói, meu pai.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Humberto (in memoriam) e Maria Antonieta, pelo prazer da sua convivência e por todo sacrifício dispendido para minha formação humana, profissional, ética e acadêmica.

Aos professores Armando José d'Acâmpora e Leonardo de Lucca Schiavon, por terem acreditado no meu projeto e me apoiado incondicionalmente desde o mestrado.

Ao professor, colega e amigo José Mauro dos Santos, pelo apoio e incentivo durante todos os anos de convívio.

Aos meus amigos e colegas, Tiago Rafael Onzi e Gilberto Kremer, pelo apoio e ajuda incondicional na escala cirúrgica durante os anos deste doutorado.

Aos profissionais e professores que participaram deste projeto e o tornaram realidade: Daniella Serafin Couto Vieira, Alexandra Susana Latini, Igor Kunze Rodrigues, Tânia Silvia Frode, Bruno Matheus de Campos Facchin, Roberta de Paula Martins, Bruna Lenfers Turnes, Maico Oliveira Buss, Alexandre dos Passos e Graziela Cipriani.

À minha esposa, Daniele, pelo constante incentivo, compreensão e apoio durante a elaboração e execução deste projeto sem os quais seria impossível sua concretização.

Aos meus amados filhos, Guilherme e Júlia, fontes de inspiração e de conforto que permitem minha permanente renovação de espírito e busca pela felicidade.

A você, pai, minha eterna gratidão por todos os momentos que compartilhamos juntos durante nossa convivência. Tua inabalável e incansável busca por nossa segurança, educação e felicidade são qualidades que nunca esquecerei. Finalizo e concretizo aqui o nosso doutorado, que foi incentivado e lembrado por ti mesmo nos dias que antecederam a tua passagem.

“O que sabemos é uma gota, o que
ignoramos é um oceano ”
(Isaac Newton 1643-1727)

RESUMO

Introdução: Os procedimentos cirúrgicos com anastomoses colorretais são largamente realizados na prática médica e indicados para doenças benignas e malignas. A fístula anastomótica é a complicação mais grave e apresenta maior taxa de morbimortalidade, aumento do tempo de internação e dos custos hospitalares e piores resultados oncológicos. Diversos fatores influem na cicatrização da anastomose e são relacionados às técnicas cirúrgicas, às condições clínicas dos pacientes e ao uso de fármacos no período peri-operatório. Recentemente substâncias que liberam fatores do crescimento tem demonstrado melhoria nos parâmetros cicatriciais em diversos tecidos, principalmente no trato gastrointestinal. A grelina é um hormônio orexígeno com potente ação sobre a liberação do hormônio do crescimento (GH) e que também age de maneira benéfica nos processos de crescimento e reparo celular. Atua sobre diversas reações a nível molecular, inclusive sobre o estresse oxidativo que é um dos fatores que influem no processo cicatricial. Recentemente, foi demonstrada melhoria em alguns parâmetros da cicatrização de anastomoses colônicas com administração exógena de grelina. **Objetivos:** Investigar o impacto da administração exógena de grelina na cicatrização de anastomoses colônicas em relação a parâmetros mecânicos, histológicos, bioquímicos e marcadores de estresse oxidativo. **Método:** Estudo analítico experimental do tipo corte transversal com intervenção em sessenta e quatro ratos Wistar machos. Os animais foram distribuídos randomicamente em 8 subgrupos que receberam administração intraperitoneal pós-operatória de grelina (23µg/Kg/dia) ou soro fisiológico, sendo que, o tecido anastomótico cicatricial foi avaliado no 3º, 7º e 14º dias de pós-operatório, respectivamente. A pressão de ruptura, os parâmetros histológicos da cicatrização, o teor de hidroxiprolina, os níveis de Catepsina B e marcadores de estresse oxidativo tecidual foram comparados entre os subgrupos. **Resultados:** Houve aumento estatisticamente significativo nas médias de pressão de ruptura da anastomose no subgrupo grelina no 7º PO (P=0,035). Na avaliação histológica houve diferença significativa no infiltrado neutrofílico (P=0,035) no 3º e 14º PO, também na apoptose (P=0,004), no tecido de granulação (P=0,011) e na inflamação peritoneal (P=0,014) no

14° PO. Houve aumento estatisticamente significativo da concentração de hidroxiprolina no tecido cicatricial do subgrupo grelina no 14° PO (P=0,043). A avaliação de catepsina B não apresentou diferenças significativas. Na comparação dos marcadores de estresse oxidativo houve diferenças nas concentrações teciduais de NO_2^- (P= 0,021) no 3° PO e na produção de EROs (P=0,012) no 14° PO. Conclusão: A administração de grelina no pós-operatório apresentou efeitos benéficos anti-inflamatórios e antioxidantes no 3° e 14° PO e aumentou a resistência da anastomose no 7° PO e a concentração de hidroxiprolina tecidual no 14° PO.

Palavras-chave: Grelina; Cicatrização; Cirurgia Colorretal; Estresse Oxidativo, Fístula Anastomótica, Anastomose Cirúrgica.

ABSTRACT

Introduction: Surgical procedures with colorectal anastomosis are widely performed in medical practice for benign and malignant diseases. Anastomotic leakage is the most deadly complication and presents a higher rate of morbidity and mortality, increased length of hospitalization and costs and worse oncological results. Several factors influence the anastomotic healing process and are associated with surgical techniques, patient's conditions and perioperative drugs administration. Recently, drugs that release growth factors have shown improvement in the healing parameters in several tissues, mainly in the gastrointestinal tract. Ghrelin is an orexigenic hormone with potent action on the growth hormone (GH) releasing and acts in a beneficial way in the processes of growth and tissue repair. It acts on several steps at the molecular level, including oxidative stress, which is one of the factors that influence the healing process. Improvement in some parameters of the healing of colonic anastomosis with exogenous administration of ghrelin has been demonstrated.

Objectives: To investigate the impact of exogenous administration of ghrelin on the colonic anastomosis healing process, evaluating mechanical, histological, biochemical parameters and oxidative stress markers.

Method: Experimental cross-sectional analytical study with intervention in sixty-four male Wistar rats. The animals were randomly assigned to 8 subgroups receiving postoperative intraperitoneal administration of ghrelin (23 µg / kg / day) or saline. The anastomotic tissue was evaluated on the 3rd, 7th and 14th postoperative days, respectively. The anastomotic bursting pressure, histological parameters, hydroxyproline content and tissue oxidative stress markers were compared among the subgroups.

Results: There was a significant increase in the means of anastomotic bursting pressure in the ghrelin subgroup on the 7th postoperative day (P = 0.035). Histological evaluation presented a significant difference in the neutrophilic infiltrate (P = 0.035) at the 3rd and 14th days, and apoptosis (P = 0.004), granulation tissue (P = 0.011) and peritoneal inflammation (P = 0.014) at 14th postoperative days. There was a statistically significant increase in the hydroxyproline content in the ghrelin subgroup at 14th postoperative day (P=0,043). The cathepsin B expression did not has significant differences. In the comparison of the

oxidative stress markers, there were significant differences in the NO₂⁻ levels (P = 0.021) in the 3rd and in ROS levels (P= 0,012) in the 14th postoperative days. Conclusion: The administration of ghrelin had beneficial anti-inflammatory and antioxidant effects in the 3rd and 14th and increased the resistance of the anastomosis in the 7th and the hydroxyproline tissue content in the 14th postoperative days.

Keywords: Ghrelin; Wound Healing; Colorectal Surgery; Oxidative Stress, Anastomotic Leak, Surgical Anastomosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Corte histológico de segmento colônico do rato demonstrando as camadas constituintes da parede intestinal.....	48
Figura 2	Organograma demonstrando a distribuição dos grupos e subgrupos do estudo.....	69
Figura 3	Esquema demonstrando a distribuição dos subgrupos no período pós-operatório em relação a primeira e a segunda operações.....	71
Figura 4	Identificação do cólon sigmoide após laparotomia mediana.....	73
Figura 5	Demonstração do cólon sigmoide seccionado.....	74
Figura 6	Anastomose colônica realizada.....	74
Figura 7	Demonstração da oclusão distal do cólon sigmoide e a fixação proximal do cateter com fio de seda 2.0 em relação a anastomose.....	76
Figura 8	Segmento do cólon sigmoide ressecado e aberto com 2cm de extensão e anastomose no centro.....	77
Figura 9	Sistema em "Y" ligado a bomba de infusão contínua e ao manômetro de mercúrio para medida da pressão de ruptura.....	78
Figura 10	Amostras teciduais em blocos de parafina após preparação macroscópica.....	79
Figura 11	Lâminas preparadas pelas colorações de Hematoxilina-eosina e Tricrômico de Masson para avaliação histopatológica.....	80
Figura 12	Pressões de ruptura de segmento intestinal íntegro em mmHg nos subgrupos SCS (Sham SF) e SGS (Sham grelina).....	87
Figura 13	Gráfico das pressões de ruptura da anastomose em mmHg nos subgrupos SC3 (SF 3° PO) vs. SG3 (grelina 3° PO) e SC14 (SF 14° PO) vs. SG14 (grelina 14° PO).....	89
Figura 14	Gráfico das pressões de ruptura da anastomose em mmHg nos subgrupos SC7 (SF 7° PO) vs. SG7 (grelina 7° PO).....	90
Figura 15	Cortes histológicos da área anastomótica nos diferentes períodos de pós-operatório no subgrupo grelina nas colorações de HE e Tricrômico de Masson em aumento de 40x.....	91

Figura 16	Gráfico demonstrando a ocorrência do aplainamento de criptas no 14° PO nos subgrupos SC14 e SG14.....	94
Figura 17	Gráfico demonstrando a concentração tecidual de Hidroxiprolina nos subgrupos controle (SF) e grelina: 3°, 7° e 14° PO.....	95
Figura 18	Gráfico demonstrando a intensidade relativa tecidual de Pró-Catepsina B nos subgrupos controle (SF) e grelina: Sham, 3°, 7° e 14° PO.....	96
Figura 19	Gráfico demonstrando a intensidade relativa tecidual de Catepsina B Madura nos subgrupos controle (SF) e grelina: Sham, 3°, 7° e 14° PO.....	97
Figura 20	Gráfico demonstrando a produção de EROs nos subgrupos controle (SF) e grelina: Sham, 3°, 7° e 14° PO.....	99
Figura 21	Gráfico demonstrando a concentração tecidual de NO ₂ ⁻ nos subgrupos controle (SF) e grelina: Sham, 3°, 7°, e 14° PO.....	101
Figura 22	Gráfico demonstrando a intensidade relativa tecidual de HO-1 nos subgrupos controle (SF) e grelina: Sham, 3°, 7° e 14° PO.....	102
Figura 23	Gráfico demonstrando a intensidade relativa tecidual de GPx nos subgrupos controle (SF) e grelina: Sham, 3°, 7° e 14° PO.....	103
Figura 24	Gráfico demonstrando a intensidade relativa tecidual de NQO1 nos subgrupos controle (SF) e grelina: Sham, 3°, 7° e 14° PO.....	105
Figura 25	Gráfico demonstrando a intensidade relativa tecidual de p-Nrf2 nos subgrupos controle (SF) e grelina: Sham, 3°, 7° e 14° PO.....	106
Figura 26	Gráfico demonstrando a intensidade relativa tecidual de Nrf2 nos subgrupos controle (SF) e grelina: Sham, 3°, 7° e 14° PO.....	107
Figura 27	Gráfico demonstrando a concentração tecidual de GSH em ng/mg proteína nos subgrupos controle (SF) e grelina: Sham, 3°, 7° e 14° PO.....	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Médias de peso inicial (primeira cirurgia) e final (segunda cirurgia) em gramas e desvio padrão (DP) nos subgrupos sham, controle e grelina no 3º, 7º e 14º PO.....	86
Tabela 2	Médias da pressão de ruptura em mmHg e desvio padrão (DP) nos subgrupos controle e grelina no 3º, 7º, e 14º PO.....	88
Tabela 3	Médias, desvio padrão e valores de P dos escores histológicos avaliados no tecido anastomótico dos subgrupos controle (SC3) e grelina (SG3) reoperados no 3º PO.....	92
Tabela 4	Médias, desvio padrão e valores de P dos escores histológicos avaliados no tecido anastomótico dos subgrupos controle (SC7) e grelina (SG7) reoperados no 7º PO.....	92
Tabela 5	Médias, desvio padrão e valores de P dos escores histológicos avaliados no tecido anastomótico dos subgrupos controle (SC14) e grelina (SG14) reoperados no 14º PO.....	93
Tabela 6	Médias de concentração tecidual de Hidroxiprolina (HP) e desvio padrão (DP) nos subgrupos controle e grelina: 3º, 7º e 14º PO.....	95
Tabela 7	Médias de intensidade relativa tecidual de pró-catepsina B/ β -actina e desvio padrão (DP) nos subgrupos controle e grelina: Sham, 3º, 7º e 14º PO..	98
Tabela 8	Médias de intensidade relativa tecidual de catepsina B madura/ β -actina e desvio padrão (DP) nos subgrupos controle e grelina: Sham, 3º, 7º e 14º PO..	98
Tabela 9	Médias de produção de EROs e desvio padrão (DP) nos subgrupos controle e grelina: Sham, 3º, 7º e 14º PO.....	100
Tabela 10	Médias de concentração tecidual de NO ₂ ⁻ e desvio padrão (DP) nos subgrupos controle e grelina: Sham, 3º, 7º e 14º PO.....	101
Tabela 11	Médias de intensidade relativa tecidual de HO-1/ β -actina e desvio padrão (DP) nos subgrupos controle e grelina: Sham, 3º, 7º e 14º PO.....	103

Tabela 12	Médias de intensidade relativa tecidual de GPx/ β -actina e desvio padrão (DP) nos subgrupos controle e grelina: Sham, 3 ^o , 7 ^o e 14 ^o PO.....	104
Tabela 13	Médias de intensidade relativa tecidual de NQO1/ β -actina e desvio padrão (DP) nos subgrupos controle e grelina: Sham, 3 ^o , 7 ^o e 14 ^o PO.	106
Tabela 14	Médias de intensidade relativa tecidual de p-Nrf2/ β -actina e desvio padrão (DP) nos subgrupos controle e grelina: Sham, 3 ^o , 7 ^o e 14 ^o PO.....	108
Tabela 15	Médias de intensidade relativa tecidual de Nrf2/ β -actina e desvio padrão (DP) nos subgrupos controle e grelina: Sham, 3 ^o , 7 ^o e 14 ^o PO.....	108
Tabela 16	Médias de concentração tecidual de GSH e desvio padrão (DP) nos subgrupos controle e grelina: Sham, 3 ^o , 7 ^o e 14 ^o PO.....	110

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINE	Anti-Inflamatório Não-Esteroidal
AMPc	Adenosina Monofosfato Cíclica
Arg	Arginina
ASA	Escala da Sociedade Americana de Anestesiologistas
bFGF	Fator de Crescimento Básico dos Fibroblastos
CAT	Catalase
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
Co	Cobalto
COX	Ciclooxigenase
Cr	Cromo
Cu	Cobre
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DP	Desvio Padrão
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EGF	Fator de Crescimento Epidérmico
EO	Estresse Oxidativo
ERA	Elemento de Resposta Antioxidante
ERNs	Espécies Reativas de Nitrogênio
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FA	Fístula Anastomótica
FACIT	Colágeno Associado a Fibrilas com Triplas Hélices Interrompidas
Fe	Ferro
FGF	Fator de Crescimento dos Fibroblastos
Fr	French
GH	Hormônio do Crescimento
GHRH	Hormônio Liberador do Hormônio do Crescimento
GHRH-R	Receptor do Hormônio Liberador do Hormônio do Crescimento
GHRP	Peptídeo Liberador do Hormônio do Crescimento
GHS	Secretagogos do Hormônio do Crescimento

GHS-R	Receptor dos Secretagogos do Hormônio do Crescimento
Gly	Glicina
GOAT	Grelina O Acetil Transferase
GPCR	Receptores Acoplados a Proteína G
GPx	Glutationa Peroxidase
GSH	Glutationa
GST	Glutationa S- transferase
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HCl	Ácido Clorídrico
HE	Hematoxilina - Eosina
HO-1	Heme Oxigenase 1
HU	Hospital Universitário
IFN	Interferon
IGF	Fator de Crescimento Insulina- <i>like</i>
IL	Interleucina
IP	Via Intraperitoneal
IP3	Inusitol Trifosfato
IR	Intensidade Relativa
Keap1	<i>Kelch-like ECH-associated protein 1</i>
LABOX	Laboratório de Bioenergética e Estresse Oxidativo
MDA	Malondialdeído
MIA	Morte Indolor Assistida
MMP	Metaloproteinases de Matriz
MPO	Mieloperoxidase
N ₂ O ₃	Óxido Nitroso
NaCl	Cloreto de Sódio
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
NaNO ₂	Nitrito de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
NBT	<i>Nitroblue Tetrazolium</i>
NF-κB	Fator Nuclear kappa B
NO ₂ ⁻	Radical Nitrito
NO ₂ Cl	Cloreto de Nitrila
NOS	Óxido Nítrico Sintetase
NQO1	NADPH Quinona Oxirredutase 1

Nrf2	Fator Nuclear Eritróide 2 – Fator 2 Relacionado
O ₂ ⁻	Radical Superóxido
O ₂ H [•]	Radical Hidroperoxila
OH [•]	Radical Hidroxila
ON	Óxido Nítrico
ONOO ⁻	Peroxinitrito
OTH	Oxigênio Terapia Hiperbática
PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida
PD1	Células Gástricas Endócrinas Produtoras de Grelina em Humanos
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
PGE	Prostaglandinas E
pH	Potencial hidrogênio-iônico
PO	Pós-Operatório
PRA	Pressão de Ruptura da Anastomose
Prdx	Peroxiredoxinas
RNA	Ácido Ribonucleico
SAP	Serviço de Anatomia Patológica
SC14	Subgrupo Controle 14º PO
SC3	Subgrupo Controle 3º PO
SC7	Subgrupo Controle 7º PO
SCS	Subgrupo Controle Sham
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
Ser	Serina
SF	Soro Fisiológico
SG14	Subgrupo Grelina 14º PO
SG3	Subgrupo Grelina 3º PO
SG7	Subgrupo Grelina 7º PO
SGS	Subgrupo Grelina Sham
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SOD	Superóxido Dismutase
TBARS	Substâncias Reativas de Ácido Tiobarbitúrico
TBS	Tris-Tamponada Salina
TF	Fator Tecidual
TGF β	Fator de Crescimento Transformador βeta
TGI	Trato Gastrointestinal

TM	Domínios Trans-membrana
TNBS	Ácido Sulfônico Trinitrobenzeno
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TOCE	Laboratório de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental
Trx	Tioredoxina
TSP	Trombospondinas
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
Val	Valina
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
WAE <i>cells</i>	Células Epiteliais Associadas à Lesão
X/A <i>like</i>	Células Gástricas Endócrinas Produtoras de Grelina em Ratos
α - SMA	Alfa-Actina de Músculo Liso

SUMÁRIO

I. REFERENCIAL TEÓRICO.....	41
1.1 Introdução.....	41
1.1.1 Considerações Gerais.....	41
1.1.2 Fatores de Risco para Fistula Anastomótica Colorretal.....	42
1.1.3 Profilaxia da Fístula Anastomótica	43
1.2 O Processo Cicatricial.....	45
1.2.1 Etapas da Cicatrização.....	45
1.2.2 A Cicatrização no Trato Gastrointestinal.....	47
1.3 O Colágeno.....	50
1.3.1 Estrutura do Colágeno.....	50
1.3.2 Funções e Metabolismo do Colágeno.....	51
1.4 A Grelina.....	51
1.4.1 Purificação da Grelina.....	51
1.4.2 Características Estruturais da Grelina	52
1.4.3 Tipos de Receptores	53
1.4.4 Distribuição da Grelina	54
1.4.5 Fatores Reguladores da Grelina.....	55
1.4.6 Funções Fisiológicas da Grelina.....	56
1.4.7 Grelina nos Processos Inflamatório e Cicatricial do TGI	58
1.5 O Estresse Oxidativo	60
1.5.1 Definição de Radicais Livres.....	60
1.5.2 Formação dos EROs e dos ERNs.....	60
1.5.3 Os Antioxidantes	62
1.5.4 Influência dos Estados de Estresse Oxidativo e Nitro- Oxidativo na Cicatrização.....	63
1.6 Justificativa.....	66
1.7 Hipóteses.....	66
II. OBJETIVOS.....	67
2.1 Objetivo Geral.....	67
2.2 Objetivos Específicos.....	67

III. MÉTODO.....	68
3.1 Delineamento do Estudo.....	68
3.2 Amostra.....	68
3.3 Aspectos Éticos.....	72
3.4 Intervenções.....	72
3.4.1 Procedimento Anestésico.....	72
3.4.2 Procedimentos Cirúrgicos	72
3.4.3 Morte Indolor Assistida.....	77
3.5 Teste de Pressão de Ruptura.....	77
3.6 Avaliação Histológica.....	78
3.7 Avaliação da Hidroxiprolina.....	81
3.8 Avaliação dos Marcadores de Estresse Oxidativo e Catepsina B	81
3.8.1 Análise do conteúdo de proteínas por Western Blot	82
3.8.2 Determinação das Concentrações de Glutathiona Reduzida	83
3.8.3 Determinação das Concentrações de Nitrito (NO ₂ ⁻)	84
3.8.4 Determinação da Produção de Espécies Reativas de Oxigênio.	84
3.9 Cálculo da Amostra e Análise Estatística.....	85
IV. RESULTADOS.....	86
4.1 Valores das médias de peso nos subgrupos.....	86
4.2 Valores das médias de pressão de ruptura nos subgrupos.....	87
4.3 Valores dos escores histopatológicos nos subgrupos.....	90
4.4 Valores das médias das concentrações de Hidroxiprolina tecidual nos subgrupos	94
4.5 Valores das médias de conteúdo proteico de pró-catepsina B e catepsina B madura nos subgrupos.....	96
4.6 Valores das médias de produção de EROs nos subgrupos.....	99
4.7 Valores das médias de concentração tecidual de nitrito (NO ₂ ⁻) nos subgrupos.....	100

4.8 Valores das médias de conteúdo proteico de HO-1, GPx, NQO1, p-Nrf2 e Nrf2 e de concentração tecidual de GSH nos subgrupos.....	102
V. DISCUSSÃO.....	111
VI. CONCLUSÕES.....	123
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	124
ANEXO A - PROTOCOLO APROVADO PELO DEPARTAMENTO DE CIRURGIA / HU-UFSC.....	143
ANEXO B - PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO / CEUA – UFSC	144
ANEXO C - APROVAÇÃO DE SUPLEMENTAÇÃO DE ANIMAIS / CEUA –UFSC	145

I. REFERENCIAL TEÓRICO

1. Introdução

1.1 Considerações Gerais

A cirurgia colorretal incorporou importantes avanços técnicos e conhecimentos científicos nas últimas décadas tais como: a utilização de grampeadores, o uso de antibióticos, o preparo pré-operatório de cólon, o acesso videolaparoscópico, a quimiorradioterapia, a confecção de ostomias, entre outros, que possibilitaram a realização segura e eficaz de intervenções cirúrgicas tanto para as doenças benignas quanto para as malignas (1, 2). Apesar dessa evolução, as cirurgias colorretais ainda apresentam importantes complicações pós-operatórias, sendo a mais grave a fístula anastomótica (FA), que está associada a altas taxas de morbidade e mortalidade, alto custo hospitalar, prolongado tempo de internação nosocomial e a um pior prognóstico no resultado oncológico tardio (3-7).

A prevenção da FA após procedimentos colorretais é um tema em contínua investigação, sendo que, diversos estudos clínicos e experimentais utilizando diferentes tipos de fármacos, técnicas, dispositivos têm sido publicados tentando esclarecer a sua etiopatogenia e diminuir a incidência dessa complicação (2, 4-6, 8-11).

A FA é definida como um vazamento do conteúdo intestinal ou gasoso através da área de conexão cirúrgica realizada entre dois segmentos de vísceras ocas. Esse conteúdo pode extravasar para o abdômen ou pelve, ocasionando coleções em torno do local da anastomose ou intraperitoneais que também podem exteriorizar pela ferida operatória, dreno ou ânus. Ela geralmente causa repercussões clínicas como febre, sepse, peritonite e dor abdominal e seu diagnóstico é feito através de exames clínicos ou de imagem (5, 12, 13). Na maioria das vezes ocorre entre o quarto e o sétimo dias de pós-operatório mas, em alguns casos pode se manifestar após esse período (14).

A incidência de FA pós-resssecções colônicas e retais varia na literatura entre 2% e 16% (3, 5, 15-19), sendo que, essa heterogeneidade

de resultados se deve a diferenças anatômicas, imunológicas e clínicas de cada paciente, e são também influenciados pelas diferentes técnicas cirúrgicas, habilidade e experiência dos cirurgiões, pelos meios utilizados para seu diagnóstico e pelo porte das instituições hospitalares envolvidas (18).

1.1.2 Fatores de Risco para FA Colorretal

Kingham e Pachter dividiram os fatores de risco para FA nos procedimentos colorretais em três categorias principais: paciente-específicos, intra-operatórios e específicos para anastomoses retais baixas. Dentre os fatores analisados fumo, álcool, classificação ASA >3, uso de esteroides, sexo, albumina < 3,5 g/dl, uso de bevacizumabe, transfusões sanguíneas, colocação de drenos e distância da anastomose em relação à margem anal (<5cm) foram as principais variáveis independentes associadas a FA (13).

Fujita et al., em recente revisão abordando estudos prospectivos e retrospectivos publicados sobre ressecções colorretais oncológicas, também identificaram fatores de risco para o desenvolvimento da FA. Dentre os mais significativos para a formação de FA destacaram-se: o uso pré-operatório de esteroides, a perda sanguínea volumosa com múltiplas transfusões e a quimiorradioterapia neoadjuvante. Outros fatores analisados como estomas protetores, tipos de anastomoses (manual/grampeada), ligadura alta da artéria mesentérica inferior, preparo intestinal e via de acesso (aberta/laparoscópica) não demonstraram diferenças significativas (4).

Frasson et al. também publicaram um estudo prospectivo multicêntrico avaliando 3193 pacientes submetidos a ressecções colorretais oncológicas com anastomoses primárias e sem estoma, que demonstrou uma taxa 8,7% de FA e um significativo aumento na mortalidade (15,2% x 1,9% nos pacientes sem FA) e no tempo de hospitalização (23 dias x 7 dias nos pacientes sem FA). Após análise multivariada a obesidade, o valor pré-operatório das proteínas totais no soro, o gênero masculino, o tratamento com anticoagulantes, as complicações intra-operatórias e o número de leitos hospitalares foram definidos como fatores de risco independentes para gênese da FA (5).

Marinello et al. também demonstraram em recente estudo, com 1045 pacientes submetidos à ressecções colônicas oncológicas eletivas, taxas de FA variando entre 5.2% e 12.7% dependendo dos segmentos anastomosados (íleo, cólon e reto) e identificaram como fatores de risco independentes o número de transfusões sanguíneas peri-operatórias e a experiência do cirurgião com procedimentos colorretais (3).

1.1.3 Profilaxia da FA

Apesar dos fatores de risco anteriormente citados, a profilaxia da FA pode ser realizada e otimizada com o uso de substâncias e terapias que melhoram as condições locais e estimulam o processo cicatricial.

Oines et al., em metanálise que avaliou estudos com agentes terapêuticos administrados em humanos e animais com propósito de melhorar o processo cicatricial no cólon e reto, encontraram 56 possíveis substâncias, sendo que em apenas seis os estudos apresentavam critérios para serem exploradas futuramente. Dentre elas, o imunomodulador Iloprost® aumentou a pressão de ruptura da anastomose (PRA) significativamente em relação aos controles nos trabalhos analisados ($P < 0,0001$), também houve aumento significativo na PRA com a administração dos hormônios eritropoietina ($P=0,004$), hormônio do crescimento (GH) ($P=0.004$) e fator do crescimento insulina-like (IGF-1) ($P < 0,00001$) (11).

Boersema et al. demonstraram em um estudo experimental com ratos submetidos a colectomias seguidas de anastomoses isquêmicas, que o tratamento com oxigênio terapia hiperbárica (OTH) no período peri-operatório diminuiu significativamente o índice de FA pelo aumento significativo na expressão de macrófagos tipo 2 no grupo OTH, que poderia explicar maior resistência na linha anastomótica devido a indução do aumento da produção de colágeno local (20).

A hipotermia peri-operatória, também é uma condição que está bem definida na literatura como sendo fator de risco para a formação da FA. Esta condição promove efeitos deletérios locais no tecido anastomótico como diminuição da PRA, decréscimo na expressão de interleucinas (IL-1, IL-6 e IL-10) e de IGF-1 que estimulam a

cicatrização, e também eleva os níveis de estresse oxidativo (EO) local com diminuição de enzimas antioxidantes interferindo no reparo cicatricial (9, 10).

Em humanos os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) tem sido objeto de inúmeros ensaios clínicos na tentativa de demonstrar seus efeitos sobre o processo cicatricial nas anastomoses colorretais.

Paulasir et al., em um recente trabalho retrospectivo comparando 4360 pacientes submetidos a cirurgias colorretais eletivas com e sem administração de AINEs no período pós-operatório, não observaram diferença estatística na taxa de FA entre os dois grupos ($P=0,20$) nem na mortalidade nos primeiros trinta dias ($P=0,14$).

Rushfeldt et al. conduziram um estudo clínico com 428 pacientes submetidos a anastomoses intestinais e também demonstraram não haver relação significativa entre a administração de ceterolaco ($P=0,31$) e diclofenaco ($P=0,41$) e aumento da taxa de FA em comparação com a não utilização desses AINEs no período pós-operatório (21). Esse mesmo autor publicou uma revisão analisando estudos clínicos e experimentais publicados entre 1975 e 2010, comparando a relação entre o uso de diversos AINEs e resultados no processo cicatricial e fistulas de anastomoses intestinais, sugerindo um possível efeito deletério dos inibidores seletivos da ciclooxigenase (COX-2) sobre o processo cicatricial (8). A relação entre o uso dos AINEs e a FA pós-cirurgias colorretais permanece controversa e indefinida, sendo que, novos ensaios multicêntricos randomizados são necessários para esclarecer essa relação e definir condutas, já que, atualmente, esses fármacos são utilizados em larga escala para controle da dor pós-operatória em substituição aos opióides, baseados em parâmetros clínicos do cirurgião (22).

Diversos estudos clínicos e experimentais têm sido publicados utilizando antibióticos no período peri-operatório com objetivo de reduzir o índice de FA pós cirurgias colorretais, porém em sua maioria não demonstraram efeitos significativos relacionados com a melhora nos parâmetros mecânicos nem bioquímicos de avaliação da cicatriz anastomótica, como demonstrado recentemente por Oines et al. em uma metanálise (11), e seu emprego permanece controverso para profilaxia da fistula, necessitando novas pesquisas.

De forma semelhante, o preparo mecânico do cólon também apresenta resultados controversos na literatura em relação as taxas de FA quando comparados com a sua não utilização em pré-operatório de cirurgias colorretais eletivas (23-26). Kiran et al. e Scarborough et al. demonstraram em ensaios clínicos recentes com paciente submetidos a colectomias eletivas que a combinação com antibioticoterapia via oral reduz significativamente os índices de infecção no sítio cirúrgico, de íleo pós-operatório e também de FA (24, 25), mas esses dados necessitam de mais estudos para comprovação científica.

Ceran et al. recentemente demonstraram em um estudo experimental, que a administração exógena de grelina via intraperitoneal no período pós-operatório aumenta significativamente a PRA no sétimo dia no grupo de estudo em relação ao controle ($P < 0,05$), em ratos submetidos a anastomoses colônicas, sugerindo uma possível relação com redução das fístulas (27), porém necessita de mais pesquisas para verificar o real valor desse achado.

Novos fármacos para otimização e melhoria do processo cicatricial das anastomoses intestinais são desenvolvidos e testados constantemente em ensaios clínicos e experimentais na tentativa de reduzir ao máximo as complicações pós-operatórias, principalmente em cirurgias colorretais, e esse desafio resulta na evolução e no aprimoramento dos desfechos cirúrgicos na prática clínica.

1.2 O Processo Cicatricial

1.2.1 Etapas da Cicatrização

A cicatrização é um processo especializado e dinâmico composto por etapas que se sobrepõe e são reguladas por mediadores plasmáticos, células teciduais e matriz extracelular que interagem entre si com o objetivo de reestabelecer a barreira imune e reparar o tecido lesado (28, 29).

O processo cicatricial inicia após a lesão e consiste em três fases bem definidas: inflamatória (*lag phase*), proliferativa ou reepitelização e remodelação ou maturação (28, 30, 31).

- **Fase inflamatória ou *Lag Phase*:** inicia imediatamente após a lesão tecidual. Nessa etapa a ruptura dos vasos sanguíneos locais promove o afluxo de plaquetas que formam um coágulo com função hemostática, e também facilitam a chegada de células inflamatórias e mediadores da cicatrização. As plaquetas secretam principalmente: fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fator de crescimento transformador $-\beta$ (TGF- β). Há também liberação de interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral $-\alpha$ (TNF- α) pré-armazenados nos queratinócitos que sinalizam o dano para as células adjacentes à lesão. Sob a ação desses mediadores há o recrutamento de neutrófilos para o local, que iniciam a limpeza da área removendo bactérias e partículas estranhas, e são as células predominantes nas primeiras 48 horas. Após esse período há a quimiotaxia de monócitos que se diferenciam em macrófagos e potencializam o desbridamento tecidual e o processo inflamatório local, com a liberação de citocinas como IL-1 e IL-6 e fator de crescimento dos fibroblastos (FGF), entre outros. Quando há deficiência na produção de macrófagos existe falha no processo de reparo tecidual, e acredita-se que eles têm papel fundamental na transição da fase inflamatória para a proliferativa.
- **Fase Proliferativa ou Reepitelização:** a fase de proliferação inicia subsequentemente a inflamatória e nela ocorre a substituição da matriz provisória, formada anteriormente, por uma nova matriz extracelular composta pelo tecido de granulação que preenche a ferida no quarto dia e é formada por colágeno tipos I e III, sob a ação do fator de crescimento transformador $\beta 1$ (TGF $\beta 1$). Nesta etapa os fibroblastos predominam no local, e juntamente com os macrófagos mantém a produção de fatores de crescimento, inclusive do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e do fator de crescimento básico do fibroblasto (bFGF), que estimulam a angiogênese e neovascularização locais, permitindo a chegada de cofatores como ferro, vitamina C e oxigênio molecular,

indispensáveis para hidroxilação da prolina e lisina no processo de síntese do colágeno. Baixas tensões de oxigênio tecidual e altas concentrações de ácido láctico e óxido nítrico também estimulam a angiogênese. A neovascularização é regulada por fatores inibidores como: trombospondinas (TSP-1), interferon γ (IFN- γ), angiostatinas e endostatinas que interrompem sua formação mantendo o equilíbrio local. Ao final dessa fase, com a ferida repleta pela matriz extracelular recém-formada rica em colágeno e neovasos, se inicia o processo de apoptose e substituição por uma escara acelular.

- **Fase de remodelação ou maturação:** durante a segunda semana da cicatrização ocorre a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos, caracterizados por possuírem fibras de α -actina de músculo liso (α -SMA) no citoplasma para sustentação e interligação entre as células e consequentemente compactação e contração da ferida induzidas pelos fatores TGF β 1, TGF β 2 e PDGF. Nessa última etapa, ocorre a completa formação do tecido cicatricial e remodelação do colágeno sob efeito de enzimas proteolíticas produzidas no plasma, nos fibroblastos, nos macrófagos e nas células epiteliais e endoteliais como: colagenase, gelatinase A, estromelisina, ativador de plasminogênio e as metaloproteinases de matriz (MMPs). Finalmente, após equilíbrio no processo entre a síntese e a degradação, há espessamento e deposição das bandas de colágeno e contração local com término do processo cicatricial e formação completa da cicatriz geralmente até a terceira semana.

1.2.2 A Cicatrização no Trato Gastrointestinal (TGI)

A estrutura da parede dos segmentos do TGI, excetuando-se o esôfago e o terço distal do reto, é composta por quatro camadas distintas denominadas: mucosa, submucosa, muscular própria e serosa. A mucosa é constituída por epitélio colunar, lâmina própria e uma fina camada muscular. Lesões dessa camada apenas são reparadas por hiperplasia epitelial. Na camada submucosa se localizam a maior parte dos depósitos

de colágeno tipos I, III e V, dos vasos sanguíneos, dos linfáticos e das fibras nervosas, sendo ela, a principal estrutura envolvida na reparação da parede intestinal e onde ocorrem as principais interações inibitórias e excitatórias, desempenhando um importante papel na sustentação final da anastomose. A muscular própria é composta por musculatura lisa entremeadada por fibras de colágeno, e a camada serosa representa tecido conjuntivo que recobre a muscular (28, 32) (Figura 1).



Figura 1. Corte histológico de segmento colônico do rato demonstrando as camadas constituintes da parede intestinal: **a** – mucosa, **b** – submucosa, **c** – muscular própria e **d** - serosa (aumento 40X)

As etapas da cicatrização descritas acima são comuns a todos os tipos de tecidos, sendo que, a cicatrização da pele é a mais amplamente conhecida e estudada. Muitos componentes presentes na cicatrização da pele são encontrados em outros tipos de tecidos, porém existem variações específicas entre eles que influem nos parâmetros cicatriciais e nos resultados da formação da cicatriz final.

Com relação ao TGI há diferenças no meio de exposição da lesão, na duração das fases, na composição do colágeno, nas estruturas e nos fatores reguladores que são significativas e necessitam discussão (32-34). A produção de colágeno no tecido do TGI difere da que acontece na pele, pois além de ser realizada pelos fibroblastos também é feita nas células

da musculatura lisa que produzem o colágeno tipos I e III, como acontece no processo cicatricial da pele, e adicionalmente o tipo V encontrado apenas no processo intestinal (35). Outra diferença significativa diz respeito ao ambiente de exposição (conteúdo intestinal) e à flora bacteriana que no TGI é composta por bactérias aeróbicas e anaeróbicas. Também há diferença na perfusão vascular dos tecidos que é muito influenciada e diminuída no TGI nas situações de choque hipovolêmico, enquanto que na pele se mantém constante (28). Outra importante particularidade no processo cicatricial intestinal é a atividade da colagenase que é muito aumentada nos primeiros três dias de cicatrização e no processo da pele é linear (35). Essa intensa atividade resulta em um desequilíbrio entre síntese e degradação, levando a pronunciada fraqueza no tecido anastomótico cicatricial intestinal durante esse período, e está associada a deficiência na cicatrização e fistulas quando se prolonga além desse tempo. A camada serosa, que é exclusiva da parede intestinal, também oferece uma impermeabilização extra para a linha de sutura sendo um fator adicional na cicatrização intestinal não tendo estrutura correspondente na pele (28, 32).

Em suma, no processo cicatricial intestinal, a reepitelização da camada mucosa ocorre em 48 horas pós-trauma refazendo a barreira epitelial, porém, essa camada não participa da sustentação da cicatriz final. No período compreendido entre o quarto e sétimo dia, há maior chance de ruptura e falhas na cicatrização da linha anastomótica devido a maior atividade da colagenase na camada submucosa. A completa reestruturação e impermeabilização da anastomose ocorre após o sétimo dia, e com 14 dias a cicatriz alcança índices de resistência quase próximos ao tecido normal, sendo que, o processo de maturação persiste por vários meses (31, 33, 34). Mesmo a luz desse conhecimento, ainda hoje os cirurgiões têm dificuldades em predizer o resultado de uma anastomose intestinal e constantes pesquisas são realizadas para elucidar e melhorar o processo cicatricial no intestino (36).

1.3 O Colágeno

O colágeno é a principal proteína estrutural dos animais descoberta e descrita na década de 50 (37, 38), sendo que, é a proteína mais abundante nos mamíferos. Em humanos corresponde a um terço da massa proteica total e é o principal componente do tecido conjuntivo da matriz extracelular. A superfamília do colágeno compreende 28 diferentes tipos que são identificados por algarismos romanos (I- XXVIII) (39).

1.3.1 Estrutura do colágeno

Sua estrutura é formada por uma tripla hélice composta pela união três cadeias de polipeptídios (cadeias- α) ligadas por pontes de hidrogênio com conformação helicoidal orientada para direita. As cadeias- α são identificadas por numerais arábicos e compõe de 10% (tipo XII) a 96% (tipo I) do total da molécula dependendo do tipo de colágeno e podem variar em tamanho de acordo com o número de aminoácidos (662 até 3152). O colágeno também pode ser denominado homotrimérico, quando todas as cadeias- α são idênticas, e heterotrimérico, quando elas diferem entre si (40). A tripla hélice é estabilizada pela presença do aminoácido glicina (Gly) a cada três resíduos, pelo alto conteúdo de prolina e hidroxiprolina, pelas pontes de hidrogênio e pelas interações eletrostáticas envolvendo lisina e aspartato (41). A sequência de aminoácidos mais frequente nas cadeias- α é formada por Gly-X-Y, sendo que, a posição X geralmente é ocupada por prolina e a Y por 4-hidroxiprolina (40).

De acordo com a disposição supramolecular das fibras dos diferentes tipos de colágenos eles podem ser divididos em subfamílias denominadas: colágeno fibrilar, colágeno associado a bandas de fibrilas ou FACITs (*fibril-associated collagens with interrupted triple hélices*), colágeno formador de redes e colágeno trans-membrana (39, 42).

1.3.2 Funções e metabolismo do colágeno

Devido as suas características de estabilidade térmica, força mecânica, flexibilidade e capacidade de interação com outras biomoléculas, o colágeno tem papel importante na arquitetura e função de diversos sistemas como pele, tendões, cartilagens, córneas, ossos, músculos, entre outros (40).

Além das propriedades biológicas que conferem força, resistência e elasticidade, o colágeno também interage com receptores celulares que regulam mecanismos de crescimento, diferenciação e migração celular atuando em processos de reparo e cicatrização, doenças neurológicas, neoplasias, doenças alérgicas, etc. (39, 43).

A degradação dos diferentes tipos de colágeno é realizada pelas endopeptidases denominadas metaloproteinases de matriz (MMPs) pertencentes a família das metcizinas zinco-dependentes(39), e principalmente, pela catepsina B, uma típica cisteíno protease lisossomal, que em situações de inflamação crônica e de estresse oxidativo elevado, têm sua expressão e ativação aumentadas (44, 45).

1.4 A Grelina

1.4.1 Purificação da Grelina

Isolada e identificada no estômago de ratos por Kojima et al. em 1999 (46) a grelina é um hormônio orexígeno com capacidade de liberar o GH tanto *in vivo* quanto *in vitro* (47) e sua estrutura gramatical deriva da fusão da raiz protoindu-europeia *ghre* (crescimento) com a palavra inglesa *release* (liberação).

Os hormônios que influem na liberação do GH pelos somatotrofos, localizados na adenohipófise, foram identificados e denominados como: Hormônio Liberador do GH (GHRH) e Secretagogos do GH (GHS) (48, 49). O GHRH se liga a receptores específicos, denominados GHRH-R, e promove a secreção de GH induzindo aumento de AMPc intracelular, que atua como segundo mensageiro e induz a secreção. Durante anos o ligante endógeno dos receptores dos GHS

(GHS-R) ficou desconhecido, apenas existiam substâncias sintéticas (opióides, GHRP-2, GHRP-6) que induziam fracamente a liberação de GH (50-52). A liberação via GHS-R ocorria pela sinalização de inositol trifosfato (IP₃) com consequente aumento do cálcio intracelular. Os GHS-R foram descobertos por Howard et al. em 1996 (53) e, por não possuírem um ligante natural, eram conhecidos como “receptores órfãos”. Em 1999, utilizando estratégias específicas de “receptor órfão” em diferentes amostras teciduais de ratos que expressavam os GHS-R (cérebro, pulmão, rins, intestinos), Kojima et al. detectaram alterações na concentração intracelular de cálcio, e finalmente, após etapas de cromatografia, identificaram a grelina como sendo o ligante natural dos GHS-R responsável por essas ações (46).

1.4.2 Características Estruturais da Grelina

A grelina é um peptídeo composto por 28 aminoácidos com a peculiaridade de ser modificada na posição serina 3 (Ser³) por um ácido n-octanoíde. Essa modificação é essencial para sua atividade e é um caso inédito entre os mamíferos de modificação por ácido graxo e liberação hormonal de GH. O gene humano da grelina está localizado no cromossomo 3p25-26, sendo que, a grelina humana tem estrutura semelhante à de ratos excetuando-se nos aminoácidos de duas posições Arg¹¹ e Val¹² (46, 47, 54).

Hosoda et al. identificaram e purificaram no estômago de ratos um segundo tipo de grelina denominada *Rat des-Gln¹⁴-ghrelin*, que difere da original apenas pela deleção do aminoácido glutamina na posição 14, mas mantém a mesma atividade e potência da grelina, apesar de baixos níveis teciduais gástricos (55). Esses autores também identificaram peptídeos derivados da molécula precursora de grelina em tecidos humanos e os classificaram de acordo com a acetilação na posição Ser³ em: não-acetilados, octanoacetilados (C8:0), decanoacetilados (C10:0) e decenoacetilados (C10:1). Adicionalmente também encontraram peptídeos formados por 27 ou 28 aminoácidos e concluíram que a formas com 28 aminoácidos e as octanoacetiladas são as mais abundantes no plasma e tecidos na relação 3:1 e as mais ativas (56).

Existe ainda, a forma não-acetilada que não tem a modificação na posição Ser³, denominada *des-acyl-ghrelin*. Apresenta significantes níveis plasmáticos e teciduais gástricos, porém não se liga aos receptores GHS-R nem exibe atividade de liberação do GH tanto *in vitro* quanto *in vivo* (57) e seu papel fisiológico ainda necessita ser elucidado.

A enzima responsável pela reação de catalisação e acetilação da forma ativa da grelina foi identificada em 2008 por Yang et al. (58) e denominada *Ghrelin O-acyltransferase* (GOAT). Sua expressão periférica se limita ao trato gastrointestinal e aos testículos, tendo ação ótima em temperaturas entre 37-50°C e faixas de pH ideal entre 7 -8 (59). Recentemente foi descoberto um peptídeo que potencialmente inibe a GOAT *in vitro*, denominado GO-CoA-TAT, seus efeitos e futuras aplicações ainda são objetos de estudos nas pesquisas no controle da obesidade e distúrbios metabólicos (60, 61).

1.4.3 Tipos de Receptores

O gene relacionado aos receptores de grelina (GHS-Rs) está localizado no cromossomo 3 na posição q26-27. Tratam-se de receptores pertencentes a família dos “receptores acoplados a proteína G” (GPCR) formados por sete domínios trans-membrana (7TM) e expressos em dois diferentes tipos de RNAm (47, 53).

O primeiro é denominado GHS-R tipo 1a, que apresenta os sete domínios trans-membrana (TM1-TM7), e onde ocorre ligação da grelina resultando nos efeitos conhecidos. O segundo é o GHS-R tipo 1b, formado apenas por cinco domínios trans-membrana (TM1-TM5), e que até o momento é considerado fisiologicamente inativo por não haver ligação com a grelina e não produzir nenhum efeito documentado (62).

O GHS-Rs e a grelina são estruturas moleculares bem conservadas e identificadas em inúmeras espécies de animais vertebrados sugerindo uma estreita relação entre o hormônio e a evolução e perpetuação das espécies.

1.4.4 Distribuição da Grelina

A grelina está presente tanto no plasma quanto nos órgãos e tecidos periféricos. Células imunorreativas de grelina e expressão de RNAm dos GHS-Rs foram identificados no duodeno, intestino delgado, cólons, reto, pâncreas, cérebro, placenta, rins, entre outros (62-68).

A principal fonte de produção da grelina circulante é o TGI, especialmente na mucosa oxíntica do estômago. Em humanos ela ocorre nas células enteroendócrinas PD1 e nos ratos acontece nas células *X/A-like*, que correspondem a cerca de 20% da população celular endócrina gástrica (69, 70). Nos humanos a concentração plasmática total de grelina incluindo as formas n-acetiladas e não-acetiladas é de 100-150 fmol/ml, e desse montante apenas 10-20 fmol/ml correspondem a grelina ativa n-acetilada. Em ratos a concentração total é de 1779 fmol/mg no tecido gástrico, sendo que, destes somente 377 fmol/mg de grelina n-acetilada. Em ambas as situações a concentração de grelina ativa corresponde a 10-20% da concentração total do peptídeo (47, 57).

Estudos clínicos e experimentais comprovaram a hipótese de que o estômago é a maior fonte produtora de grelina. Humanos gastrectomizados apresentaram redução de 65% na concentração plasmática de grelina, enquanto que, ratos submetidos ao mesmo tipo de ressecção ou tratamento com bloqueadores de bomba (omeprazol) tiveram redução de cerca de 80% na concentração plasmática (71, 72). Aparentemente não há aumento compensatório da população das células produtoras de grelina em outros órgãos após ressecção parcial do estômago como foi demonstrado recentemente por Teive et al. em estudo experimental com ratos submetidos a cirurgia de *sleeve* gástrico e avaliação imunohistoquímica da mucosa duodenal (65).

Morfologicamente existem dois tipos distintos de células produtoras de grelina denominadas: tipo “aberto” e tipo “fechado”. Eles se distribuem ao longo dos segmentos do TGI em diferentes concentrações. Enquanto que no estômago existem apenas as do tipo “fechado”, à medida que se progride em direção distal células do tipo “aberto” surgem e aparecem associadas as primeiras (64, 73). As abertas estão em contato com o lúmen e especula-se que sejam reguladas por

alterações nutricionais e do pH do conteúdo intestinal, enquanto que as fechadas por estímulos hormonais, neuronais ou mecânicos (distensão) (74).

Células produtoras de grelina também foram demonstradas em culturas de linhagens celulares como: adenocarcinoma de cólon, carcinoma medular da tireoide, carcinoides gástricos, linfomas, entre outros, sugerindo que a associação entre linhagem celular e grelina possa ser uma ferramenta útil no tratamento futuro dessas neoplasias (75-80).

1.4.5 Fatores Reguladores da Grelina

O principal fator que regula a secreção de grelina é a alimentação, as concentrações séricas aumentam no jejum e diminuem após a ingestão de alimentos. Cummings et al. demonstraram um aumento significativo de até duas vezes nos níveis plasmáticos pré-prandiais de grelina com rápido decréscimo na primeira hora pós-alimentação em indivíduos voluntários submetidos a dosagens periódicas (81, 82).

A administração oral ou venosa de glicose também diminui a concentração sérica de grelina como foi demonstrado por Shiiya et al.(83), assim como o exercício físico também reduz significativamente a concentração total de grelina pela inibição da atividade da GOAT em homens (84). Já a distensão gástrica induzida pela ingestão hídrica não apresentou influência nos níveis séricos demonstrando não haver relação entre estímulo mecânico gástrico e a secreção de grelina, muito embora ela atue importantemente no aumento da motilidade gástrica (85, 86).

Com relação as técnicas utilizadas na cirurgia bariátrica, inicialmente foram publicados diversos resultados demonstrando diminuição significativa nos níveis séricos de grelina após cirurgias de *by-pass* gástrico e *sleeve*, largamente realizadas para tratamento da obesidade mórbida. Entretanto, dados recentes mostram que os níveis plasmáticos retornam ao normal após 12 meses de pós-operatório em humanos, e após 6 semanas em ratos (87, 88).

Distúrbios psiquiátricos relacionados a alimentação estão associados a aumento dos níveis plasmáticos de grelina, como a bulimia e a anorexia nervosa. Em contrapartida, estados de privação da

alimentação, como no uso de anorexígenos orais e em pacientes submetidos a grandes ressecções intestinais, há diminuição importante na sua concentração sérica (89, 90).

A secreção de grelina também sofre influência do ritmo circadiano, sendo maior durante a noite e retornando a níveis basais pela manhã. E de maneira geral apresenta maiores concentrações plasmáticas em pessoas magras quando comparadas às obesas (83, 91).

1.4.6 Funções Fisiológicas da Grelina

Dentre as mais variadas funções conhecidas da grelina, a estimulação da secreção do GH é considerada a principal, sendo que esse estímulo é 2-3 vezes mais potente que o produzido pela influência do GHRH na adenohipófise de humanos e ratos (46, 92).

Existem diferentes modelos que explicam a secreção do GH mediada pela grelina. Já foi demonstrado por Nakazato et al. que injeções intracerebroventriculares aumentam a concentração plasmática de GH, sugerindo efeito primário direto sobre as células hipofisárias (46, 93). Outra via que foi descoberta é a mediada pelo nervo vago, que estimula áreas do núcleo arqueado no hipotálamo e consequente secreção do GH após administração periférica de grelina, secreção que apresenta importante diminuição após secções do vago, indicando participação fundamental dele para que se atinja o máximo efeito estimulante da grelina (94, 95).

A associação entre o GHRH e a grelina também produz um efeito sinérgico na estimulação da secreção de GH, visto que, a administração conjunta de ambos causa maior liberação do hormônio quanto comparada a administração isolada (96).

A grelina exerce forte efeito orexígeno e aumenta a ingestão alimentar após sua administração. Acredita-se que esses efeitos são mediados por estimulação vagal aferente até o hipotálamo pelas células produtoras de grelina localizadas no estômago. Em contrapartida, ocorre abolição da elevação plasmática de grelina em estados de jejum naqueles indivíduos submetidos à vagotomia e em tratamento com atropina (95).

Em suma, ela é secretada primariamente no estômago em resposta ao jejum ou fome, e sua elevação plasmática serve como sinal periférico para informar ao sistema nervoso central via nervo vago e estimular a ingestão alimentar.

Além do estímulo do apetite, a grelina tem efeito comprovado sobre diversos órgãos e sistemas em humanos e ratos (87). Já foi demonstrado que ela estimula a secreção ácida e motilidade do estômago, acelerando o esvaziamento gástrico, e participa do processo de substituição das células da mucosa estomacal (97, 98).

No sistema cardiovascular a administração intravenosa de grelina promove aumento do débito cardíaco e diminuição da pressão arterial média em humanos (99, 100) e em ratos (101). Também melhorou sintomas de caquexia e função ventilatória associada a doença pulmonar obstrutiva crônica nos pacientes tratados por três semanas quanto comparados aos controles (102).

Efeitos sobre a secreção e regulação de insulina nas ilhotas pancreáticas e o metabolismo da glicose foram descritos, mostrando que em estados hiperglicêmicos a grelina estimula secreção de insulina, muito embora ela não produza o mesmo resultado com níveis glicêmicos normais. Controversamente já foi demonstrado que a grelina reduz a secreção de insulina em humanos (67, 103, 104). As discrepâncias entre os resultados continuam sendo investigadas para definir o real papel da grelina na função pancreática.

O metabolismo ósseo também sofre ação da grelina que, em ratos, age aumentando a diferenciação dos osteoblastos e, conseqüentemente, a densidade de mineralização óssea através de receptores GHS-R 1a identificados por imunohistoquímica no tecido ósseo. Em humanos submetidos a cirurgia bariátrica também há diminuição da massa óssea após 12 meses que é atribuído, entre outros fatores, à diminuição da grelina circulante nesses pacientes (105-107). No tecido adiposo ela diminui importantemente a oxidação lipídica, aumenta a lipogênese e diminui o estado inflamatório induzido pela adiposidade (87, 108).

Outros efeitos da grelina também têm sido relatados no sistema imunológico após comprovação da expressão de GHS-Rs nos neutrófilos,

linfócitos e macrófagos, sugerindo sua participação na resposta imune nos mecanismos de inflamação crônica induzido pela idade e obesidade, e nas doenças que levam a desordens na imunidade como por exemplo na Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) (109, 110). Além disso, já foi demonstrado também em estudos experimentais a influência da grelina no processo inflamatório e de reparo tecidual, com importantes efeitos anti-inflamatórios e anti-fibróticos pela modulação de citocinas que atuam na cascata da inflamação, sugerindo seu emprego no tratamento de doenças respiratórias, hepáticas, inflamatórias intestinais e na cicatrização (111-116).

Ainda foram descobertos efeitos sobre áreas cerebrais não-hipotalâmicas responsáveis pelo ritmo sono/vigília, pelo olfato, pela memória e aprendizado, pela gustação e por estados de depressão e sensação de prazer (87).

Tendo em vista a grande abrangência da influência da grelina nos mais diversos tipos de sistemas e tecidos, constantes pesquisas são realizadas e permitem a possibilidade de ampliação do seu emprego na prática clínica futura.

1.4.7 Grelina nos Processos Inflamatório e Cicatricial do TGI

A administração grelina tem efeitos protetores comprovados sobre o TGI atuando no estômago, pâncreas, intestino delgado, cólons e fígado (117).

Foi demonstrado, em estudos experimentais, que a administração tanto intracerebral quanto intraperitoneal ou subcutânea de grelina evita dano na mucosa gástrica e acelera a cicatrização em lesões induzidas por etanol, isquemia/reperfusão, alendronato, ácido clorídrico, entre outros. Os mecanismos pelos quais ocorre esse efeito protetor são variados. Envolvem aumento da liberação de óxido nítrico (ON) local, como demonstrado por Sibila et al. em animais com nervo vago íntegro (118), diminuição plasmática de TNF- α e do fator nuclear NF-kB, que ativam e liberam citocinas pró inflamatórias teciduais(119), redução da atividade da mieloperoxidase e do malonaldeído (MDA), que são produtos da

peroxidação lipídica reduzindo o estado de estresse oxidativo (EO) local (120) e diminuição da apoptose celular, da liberação de citocromo P e de caspase 3, que também estão relacionados ao estado de EO e dificultam a cicatrização (121). Outros modelos e substâncias têm sido descritos confirmando os efeitos gastro-protetores da grelina com diferentes vias de ação independentemente do agente causal.

No pâncreas e no fígado a administração de grelina diminuiu a ocorrência de pancreatite aguda induzida por isquemia/reperfusão e por drogas em animais, assim como reduz o dano hepático induzido por acetaminofen, entre outros (122, 123). Também protege as células β pancreáticas contra a lesão crônica induzida por peroxidação no diabetes tipo 2. De um modo geral promove redução nos parâmetros de inflamação sistêmica como: diminuição do sequestro neutrofílico, da apoptose celular, da liberação de NF- κ B e de citocinas pró inflamatórias, com consequente decréscimo nos níveis de estado oxidante (117, 124).

No intestino já foi comprovado que, a grelina administrada por via endovenosa ou intracerebroventricular, possui importante efeito protetor pós-operatório contra lesões induzidas por isquemia e reperfusão após clampeamento da artéria mesentérica em ratos. Ela induz a redução da liberação de citocinas inflamatórias (TNF- α e IL-6) e do infiltrado neutrofílico pela diminuição da atividade da mieloperoxidase (MPO) diminuindo a disfunção da barreira intestinal (125). Esses achados também foram descritos recentemente por Sen et al. que identificaram diminuição significativa nos níveis de NF- κ B e inibição da depleção da glutatona oxidase nos segmentos ileais de ratos submetidos a lesão por isquemia/reperfusão, sugerindo efeito protetor antioxidante (126). Essa inibição do NF- κ B, e consequente melhoria na integridade da barreira intestinal, também foi descrita por Cheng et al. (127).

Konturek et al. demonstraram um aumento na expressão de RNA mensageiro para receptores de grelina em pacientes com colite ulcerativa, sugerindo ser um gatilho para desencadear a resposta protetora em cólons inflamados. Simultaneamente também observaram aceleração na cicatrização da mucosa colônica de ratos submetidos a colite induzida por ácido sulfônico trinitrobenzeno (TNBS) com aumento da liberação de ON e prostaglandinas E_2 (PGE $_2$) (128).

Também foi demonstrado recentemente que a administração de grelina em ratos submetidos a colite induzida por ácido acético aumenta o fluxo sanguíneo na mucosa colônica inflamada, assim como também a síntese de DNA local, apresentando potente ação anti-inflamatória, inclusive com redução significativa nos níveis de TNF- α , IL-1 β e da atividade da MPO e acelerando o processo de regeneração celular (114).

Todos esses dados demonstram que a grelina exerce influência e melhora o processo de reparo e cicatrização intestinal, seja agindo como anti-inflamatório, ou como antioxidante, abrindo um horizonte para pesquisas futuras e determinação de sua aplicabilidade clínica.

1.5 O Estresse Oxidativo

1.5.1 Definição de Radicais Livres

A estrutura de um elemento químico pode ser formada por quatro camadas eletrônicas denominadas **K**, **L**, **M** e **N** que por sua vez podem ter quatro subníveis denominados **s**, **p**, **d** e **f** que são ocupados por elétrons pareados. Os radicais livres são átomos ou moléculas altamente reativos devido ao não-pareamento de elétrons em sua última camada. A maioria dos radicais livres é derivada de reações de óxido-redução do metabolismo celular do oxigênio e, portanto, são denominadas espécies reativas de oxigênio (EROs). As reações de oxidação implicam em perda de elétrons, enquanto que as de redução, em ganho. Juntamente com as espécies reativas de nitrogênio (ERNs), que também são produzidas pelas reações celulares, as EROs são responsáveis por efeitos deletérios e benéficos encontrados nas inúmeras funções e processos metabólicos celulares (129, 130).

1.5.2 Formação de EROs e ERNs

Diariamente, dos 250g de oxigênio usados por humanos em reações metabólicas de óxido-redução cerca de 2-5% são convertidos em EROs. Essa produção é aumentada em estados inflamatórios ou infecciosos e conhecida como “*burst* respiratório”, as principais EROs

produzidos são: o radical superóxido (O_2^-), o radical hidroxila (OH^\bullet), o oxigênio *singlet* (1O_2), o radical hidroperoxila (O_2H^\bullet) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2)(131). A produção de EROs ocorre durante o metabolismo do oxigênio na cadeia respiratória, cujos produtos finais são a água e o H_2O_2 . Durante esse processo as reações são catalisadas por enzimas citoplasmáticas, como a xantina oxidase, a lipooxygenase, a ciclooxigenase, a óxido nítrico sintetase e, principalmente, pela enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase que é responsável pela produção do principal componente de EROs, o radical O_2^- . Na sequência o O_2^- é rapidamente dismutado pela enzima superóxido dismutase (SOD) originando o H_2O_2 , que embora não tenha propriedades reativas, apresenta grande capacidade de se ligar a metais como ferro (Fe), cobre (Cu), cromo (Cr) e cobalto (Co) nas reações de Fenton e de Harber-Weiss, formando alternativamente os radicais OH^\bullet que são altamente reativos, conferindo a esta molécula status de EROs. As reações induzidas por metais, além de agirem sobre o ácido desoxirribonucleico (DNA), também afetam outros elementos como os fosfolipídios de membrana, que são extremamente sensíveis a oxidação, e que após processo de peroxidação lipídica resultam na formação de malonaldeído (MDA) e de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), que tem importantes propriedades mutagênicas (132).

Existem ainda espécies reativas derivados das vias de nitro-oxidação, denominadas de ERNs, que têm alto potencial reativo e deletério semelhantes às EROs. Esses radicais são produzidos pelas plaquetas, macrófagos, células endoteliais e queratinócitos em resposta a inflamação ou lesão tecidual através da conversão enzimática de L-arginina em L-citrulina. As duas principais formas de ERNs são o óxido nítrico (ON^\bullet) e o peroxinitrito ($ONOO^-$), formados pela ação da enzima óxido nítrico sintetase (NOS) e suas três isoformas: constitucional (endotelial (eNOS) / neuronal (nNOS)) e induzível (iNOS) cuja atividade é regulada pelo fluxo intracelular de cálcio e a calmodulina. O ON^\bullet é um gás difusível responsável por sinalização intercelular com inúmeros efeitos biológicos, e possuiu meia-vida curta, durando cerca de 4 a 6 segundos no plasma e de 10 a 60 segundos nos tecidos (131, 133, 134).

1.5.3 Os Antioxidantes

Devido a constante exposição à EROs e ERNs que ocorre no organismo resultante dos processos metabólicos celulares, mecanismos de defesa foram desenvolvidos para neutralizar suas ações deletérias, atuando na prevenção da formação e no reparo das lesões induzidas por esses radicais (135, 136).

Existem defesas antioxidantes não-enzimáticas e enzimáticas. Dentre as não-enzimáticas destacam-se o ácido ascórbico (vitamina C), o α -tocoferol (vitamina E), a glutathiona reduzida (GSH), os carotenoides e os flavonoides. As enzimáticas são representadas pela superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPx), glutathiona S transferase (GST), catalase (CAT), peroxirredoxinas (Prdx), heme-oxigenase 1 (HO-1) e NADPH quinona oxirredutase 1 (NQO1) (137).

Atualmente, a via denominada Nrf2/Keap1, que é formada pela ligação do fator nuclear eritróide 2 - fator 2 relacionado (Nrf2) com sua proteína repressora citosólica Keap1, tem sido reconhecida como uma das principais vias de defesa antioxidante. O Nrf2 é um fator de transcrição nuclear localizado no citoplasma que é inativado e impedido de migrar para o núcleo pela Keap1. O aumento intracelular da concentração de EROs e ERNs promove a perda dessa ligação Nrf2/Keap1 que resulta em ativação e translocação do Nrf2 para o núcleo, onde ele se liga ao componente de ativação da resposta antioxidante (ERA) localizado nos genes que codificam enzimas detoxificantes e antioxidantes como: SOD, CAT, NQO1, HO-1, GPx (138).

O ON também age detoxificando radical O_2^- e reduzindo o estresse oxidativo, porém as substâncias resultantes dessa reação ($NO_2Cl/NO_2O_3/ONOO^-$) promovem aumento do estado de estresse nitro-oxidativo (131).

Nos estados de estresse oxidativo e nitro-oxidativo há desequilíbrio entre a produção e a inativação/detoxificação das substâncias reativas (Homeostase Redox), causando danos na estrutura celular, nos ácidos nucleicos, nos lipídios e nas proteínas que estão implicadas na gênese de doenças cardiovasculares, neoplasias, desordens

neurológicas, diabetes, obesidade, retardo na cicatrização, envelhecimento, entre outras (139-145).

1.5.4 Influência dos estados de estresse oxidativo e nitro-oxidativo na cicatrização

Durante as fases iniciais do processo cicatricial há um aumento temporário nos níveis de EROs e ERNs. Estudos demonstram que feridas crônicas apresentam desequilíbrio na produção/inativação desses radicais dificultando o retorno ao estado de homeostase redox pré-lesional, impedindo a completa cicatrização (146).

A formação de EROs e ERNs é importante no processo inicial da cicatrização pois aumenta a expressão de fator tecidual (TF-RNA_m) na ferida, potencializando a formação do coágulo pelas plaquetas, causando hemostasia pela indução de vasoconstrição local e sinalizando as células para a formação do trombo. O H₂O₂ tem efeitos quimiotáticos para neutrófilos e macrófagos, que promovem a destruição local de bactérias e fungos, além de facilitar a adesão dessas células na matriz extracelular e no endotélio. Também atua como segundo mensageiro de fatores do crescimento como PDGF e TGF, indispensáveis para a resposta inflamatória (147). A angiogênese e a deposição da matriz extracelular também sofrem influências de EROs. O H₂O₂ amplifica a expressão de FGF e VEGF nos queratinócitos e induz a formação de colágeno tipos I, III e IV pelos fibroblastos atuando nos processos de substituição da matriz provisória e de contração da ferida (131). Adicionalmente, as EROs ativam a expressão de collagenase que degrada a matriz extracelular e EGF que promove a proliferação de queratinócitos na fase de reepitelização (148).

O ON também tem papel importante na cicatrização pois age como pró-inflamatório atraindo citocinas como IL-1 e TGF-β1 e também monócitos e neutrófilos. Participa na formação neovascular ativando os fatores VEGF, bFGF e TGF-β que induzem migração, adesão e proliferação no endotélio. O ON atua na reepitelização protegendo os queratinócitos da apoptose e aumentando a deposição do colágeno ativando os fibroblastos através da TGF-β1(134).

Por outro lado, impactos negativos sobre o processo cicatricial têm sido relacionados a níveis elevados e permanentes de estresse oxidativo e nitro-oxidativo nas feridas crônicas. A deposição excessiva de ferro, que ocorre na pele de pacientes com úlceras varicosas crônicas, induz a um aumento na formação de radicais livres através da reação de Fenton (149). Da mesma maneira, pacientes com úlceras orais recorrentes apresentaram índices de EO medido por dosagens de glutathiona, MDA, TNF- α , entre outros, significativamente mais elevados que indivíduos saudáveis (150).

Em estados de hiperglicemia altos níveis de EO induzem apoptose e necrose em culturas celulares, inibem a migração dos queratinócitos e prejudicam a contração dos fibroblastos (151). Recentemente foi demonstrado que o tratamento com OTH induz a elevação plasmática da enzima CAT e redução dos níveis de MDA, diminuindo o EO e estimulando a cicatrização em pacientes com lesões crônicas (152).

Altos níveis de EO, medidos por aumento do TBARS e redução da atividade da CAT, da SOD e da GSH, influenciaram significativamente a cicatrização de anastomoses colônicas em ratos submetidos a hipotermia quando comparados aos controles (10). El Eter et al. também demonstraram redução no TBARS e aumento de glutathiona em ratos submetidos a lesão gástrica por reperfusão e isquemia, sugerindo importante efeito na diminuição dos níveis de EO e melhora na cicatrização (153).

Jo et al. demonstraram importantes efeitos protetores antioxidantes da NQO1 nas células neuronais de ratos submetidos a lesão induzida por H₂O₂ pela inibição da expressão de caspase 3 e consequente redução da lesão isquêmica tecidual induzida por EO (154). Em condições de elevados níveis de EO induzidos por sobrecarga de colesterol foi demonstrado diminuição da lesão tecidual em células endoteliais pela estimulação da expressão de HO-1 via ativação da Nrf2 (155).

Todas essas evidências demonstram estreita relação entre os níveis de EO e o processo de cicatricial, e abrem importante perspectiva para tratamentos baseados na modulação dos níveis de EROs e de ERNs,

mantendo estes em concentrações locais não-tóxicas e não deletérias para o processo cicatricial.

1.6 Justificativa

A principal complicação nas cirurgias colorretais é a deiscência de anastomose e formação de fístulas, que tem graves repercussões com altas taxas de morbimortalidade e altos custos de internação hospitalar. A busca pela redução da incidência desta complicação tem elevada relevância na prática médica. Atualmente inúmeros procedimentos cirúrgicos colorretais são realizados rotineiramente para tratamento de doenças benignas e principalmente do câncer colorretal.

A grelina é um hormônio orexígeno potente e atua principalmente na regulação do apetite. Porém, vários trabalhos foram publicados demonstrando sua influência em outros processos metabólicos e sistemas orgânicos, incluindo o processo cicatricial do intestino. Também age sobre as etapas do estado de estresse oxidativo, que é resultado um processo do metabolismo celular básico.

Já foi comprovado que o estado de estresse oxidativo em níveis muito elevados causa danos celulares importantes e é coparticipante em diversas doenças, distúrbios metabólicos, sendo também prejudicial ao processo cicatricial.

A literatura atual ainda não apresentou estudos que esclareçam os aspectos específicos sobre a relação entre esse hormônio e a cicatrização da anastomose colônica. Algumas das referências encontradas nas diversas revisões realizadas sugerem esta possibilidade, mas necessitam comprovação clínica.

Se comprovada esta hipótese será dado um passo importante para que essa terapia hormonal peri-operatória possa ser adotada rotineiramente, com conseqüente redução das taxas de deiscência e fístulas das anastomoses de cólon.

1.7 Hipóteses

H₁: A administração de grelina no período pós-operatório tem efeito benéfico no processo cicatricial das anastomoses colônicas, em ratos.

H₀: A administração de grelina no período pós-operatório não tem efeito benéfico no processo cicatricial das anastomoses colônicas, em ratos.

II. OBJETIVOS

2. Objetivo geral

- ✓ Estudar os efeitos da administração de grelina exógena na cicatrização das anastomoses colônicas em ratos.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar e estudar os efeitos da administração de grelina sobre a pressão de ruptura das anastomoses colônicas, e também sobre os parâmetros histopatológicos, os níveis de hidroxiprolina, os de catepsina B e de estresse oxidativo no tecido cicatricial.

III. MÉTODO

3.1 Delineamento do Estudo

Trata-se de um estudo analítico experimental, controlado, transversal e com intervenção em animais, desenvolvido no Laboratório da Disciplina de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental (TOCE) do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) em conjunto com o Serviço de Anatomia Patológica (SAP) do Hospital Universitário da UFSC (HU-UFSC) e com o Laboratório de Bioenergética e Estresse Oxidativo (LABOX) do Departamento de Bioquímica da UFSC.

3.2 Amostra

Foram estudados 64 ratos (*Rattus norvegicus albinus*) da linhagem Wistar, adultos, machos, com 120 dias de vida e com peso médio variando entre 300 g e 350 g. Os animais eram oriundos do biotério central da UFSC e foram alojados em grupos de quatro ratos em dezesseis gaiolas forradas com maravalha, próprias para o tamanho, número e espécie. Os ratos permaneceram sob regime de adaptação no laboratório da TOCE/UFSC durante um período prévio de sete dias, submetidos a níveis de ruído, luz e temperatura ambientes com foto período de 12 horas determinando o ciclo dia e noite. A ração utilizada foi Nuvilab Cr-1®, específica para ratos e camundongos, administrada *ad libitum* para todos os subgrupos e foi suspensa 8 horas antes das cirurgias no período pré-operatório e nas primeiras 24 horas de pós-operatório (PO). A água foi administrada *ad libitum* durante todo o tempo (156).

Os animais foram pesados previamente no dia do primeiro procedimento cirúrgico, e após, diariamente até o dia da segunda intervenção cirúrgica utilizando-se balança digital Precision PR 1000 (Núcleo Equipamentos Ltda., São Paulo, Brasil).

A distribuição da amostra foi realizada aleatoriamente, por sorteio simples, em dois grupos, denominados: **Grupo Grelina** que recebeu administração de 1ml de solução de grelina (Tocris *Bioscience*,

Bristol, UK) na dose de 23 μ g/kg/dia via intraperitoneal (IP) no PO, e **Grupo Controle** que recebeu 1ml de soro fisiológico (SF) 0,9% via IP diariamente no PO.

Cada grupo foi subdividido randomicamente em quatro subgrupos com oito animais em cada que foram identificados e codificados com números arábicos em ordem crescente de 1 a 64 (Figura 2). Em todas as avaliações, com exceção da medida da pressão de ruptura da anastomose (PRA), os examinadores desconheciam a que subgrupos as amostras estudadas pertenciam.

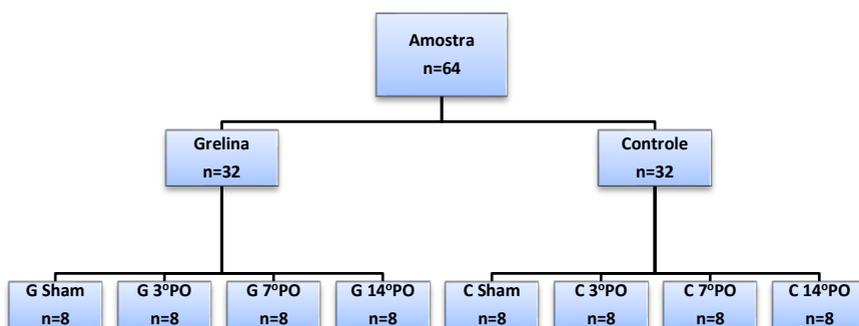


Figura 2. Organograma demonstrando a distribuição dos grupos e subgrupos do estudo.

Os subgrupos foram identificados de acordo com o período de intervalo em dias entre os procedimentos cirúrgicos (anastomose e reoperação), e quanto a administração IP de grelina ou soro fisiológico 0,9% no PO (Figura 3), como descrito a seguir:

- **Subgrupo Sham Grelina (SGS):** ratos codificados com números 1 ao 8. Nesse subgrupo foi realizada laparotomia mediana de 4 cm seguida de manipulação das alças intestinais e de fechamento da parede abdominal. Foram realizadas administrações IP de 1ml de solução de grelina no transoperatório e diariamente até o 3º dia PO, quando os animais

foram reoperados e realizada ressecção de 2 cm do cólon sigmoide para os testes.

- **Subgrupo Sham SF (SCS):** ratos codificados com números 9 ao 16. Nesse subgrupo foi realizada laparotomia mediana de 4 cm seguida de manipulação das alças intestinais e de fechamento da parede abdominal. Foram realizadas administrações IP de 1ml de SF 0,9% no transoperatório e diariamente até o 3º dia PO, quando os animais foram reoperados e realizada ressecção de 2cm do cólon sigmoide para os testes.
- **Subgrupo Grelina 14º PO (SG14):** ratos codificados com os números 17 ao 24. Nesse subgrupo foi realizada laparotomia mediana de 4 cm seguida de secção e anastomose do cólon sigmoide. Foram realizadas administrações IP de 1ml de solução de grelina no transoperatório e diariamente até o 14º dia PO, quando os animais foram reoperados e realizada ressecção de 2 cm do cólon sigmoide para os testes.
- **Subgrupo SF 14º PO (SC14):** ratos codificados com os números 25 ao 32. Nesse subgrupo foi realizada laparotomia mediana de 4 cm seguida de secção e anastomose do cólon sigmoide. Foram realizadas administrações IP de 1ml de SF no transoperatório e diariamente até o 14º dia PO, quando os animais foram reoperados e realizada ressecção de 2 cm do cólon sigmoide para os testes.
- **Subgrupo Grelina 7º PO (SG7):** ratos codificados com os números 33 ao 40. Nesse subgrupo foi realizada laparotomia mediana de 4 cm seguida de secção e anastomose do cólon sigmoide. Foram realizadas administrações IP de 1ml de solução de grelina no transoperatório e diariamente até o 7º dia PO, quando os animais foram reoperados e realizada ressecção de 2 cm do cólon sigmoide para os testes.
- **Subgrupo SF 7º PO (SC7):** ratos codificados com os números 41 ao 48. Nesse subgrupo foi realizada laparotomia mediana de 4 cm seguida de secção e anastomose do cólon sigmoide. Foram realizadas administrações IP de 1ml de SF no transoperatório e

diariamente até o 7º dia PO, quando os animais foram reoperados e realizada ressecção de 2 cm do cólon sigmoide para os testes.

- **Subgrupo Grelina 3º PO (SG3):** ratos codificados com os números 49 ao 56. Nesse subgrupo foi realizada laparotomia mediana de 4 cm seguida de secção e anastomose do cólon sigmoide. Foram realizadas administrações IP de 1ml de solução de grelina no transoperatório e diariamente até o 3º dia PO, quando os animais foram reoperados e realizada ressecção de 2 cm do cólon sigmoide para os testes.
- **Subgrupo SF 3º PO (SC3):** ratos codificados com os números 57 ao 64. Nesse subgrupo foi realizada laparotomia mediana de 4 cm seguida de secção e anastomose do cólon sigmoide. Foram realizadas administrações IP de 1ml de SF no transoperatório e diariamente até o 3º dia PO, quando os animais foram reoperados e realizada ressecção de 2 cm do cólon sigmoide para os testes.

Todos os animais foram submetidos a morte indolor assistida (MIA) após a reoperação.

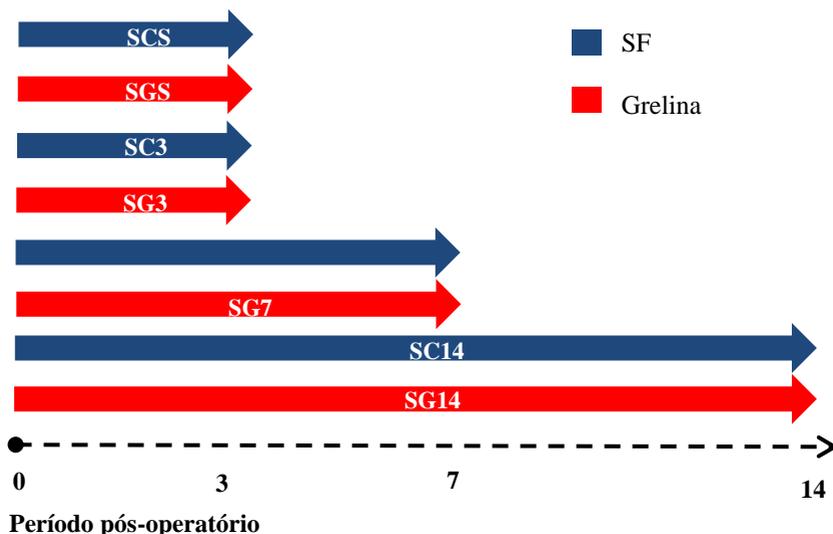


Figura 3. Esquema demonstrando a distribuição dos subgrupos no período pós-operatório em relação a primeira e a segunda operações em dias. SGS (subgrupo grelina Sham), SCS (subgrupo controle Sham), SG (subgrupo grelina anastomose), SC (subgrupo controle anastomose).

3.3 Aspectos Éticos

O experimento foi aprovado pelo Departamento de Cirurgia da UFSC em 14 de fevereiro de 2014 memorando 003/CLC/14 e pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFSC em 29 de maio de 2014 sob o protocolo PP00915, ofício nº 146/CEUA/PROPESQ/2014. Também foram aprovados dois adendos para suplementação de animais na pesquisa (Anexos A, B e C).

3.4 Intervenções

3.4.1 Procedimento Anestésico

Os animais foram submetidos a um período de 8 horas de jejum no pré-operatório. A indução e a manutenção anestésicas foram realizadas com solução de ketamina 75 mg/kg associada à xilazina 10 mg/kg, administrada por via intramuscular na face interna de uma das patas traseiras (156).

O efeito anestésico foi avaliado pela ausência de reflexo corneopalpebral e de reação motora após prensão do coxim adiposo de uma pata dianteira, com pinça.

Após a confirmação da indução anestésica, os animais foram codificados e pesados na balança digital Precision PR 1000 (Núcleo Equipamentos Ltda., São Paulo, Brasil).

3.4.2 Procedimentos Cirúrgicos

Depois de anestesiados, os animais foram posicionados em decúbito dorsal, com os membros torácicos e pelvianos fixados em extensão. Realizou-se tricotomia abdominal e antisepsia local com solução de iodopovidona tópica a 10%. Após isso foi realizada laparotomia mediana com 4 cm de extensão e em seguida feita a identificação e isolamento do cólon sigmoide. (Figura 4)



Figura 4. Identificação do cólon sigmoide após laparotomia mediana.

No grupo **Sham**, procedeu-se a manipulação instrumental do segmento do sigmoide isolado e em seguida a instilação de 1ml de solução de grelina na dosagem de 23 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ou de 1 ml de soro fisiológico na cavidade peritoneal de acordo com a randomização prévia. A síntese da parede abdominal foi realizada em dois planos, aponeurose e pele, com suturas contínuas de mononylon 4.0 (Ethicon®, São Paulo, Brasil).

Nos grupos **Grelina** e **Controle**, o sigmoide foi seccionado com tesoura reta a 2cm da junção retossigmoideana (Figura 5) e logo após confeccionada anastomose término-terminal com oito pontos separados utilizando fio de polipropileno 6.0 (Ethicon®, São Paulo, Brasil) em plano único extra-mucoso (Figura 6). Na sequência foi instilado 1ml de solução de grelina na dosagem de 23 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ou 1 ml de soro fisiológico na cavidade peritoneal de acordo com a randomização prévia. A síntese da parede abdominal obedeceu a mesma técnica descrita previamente para o grupo Sham.

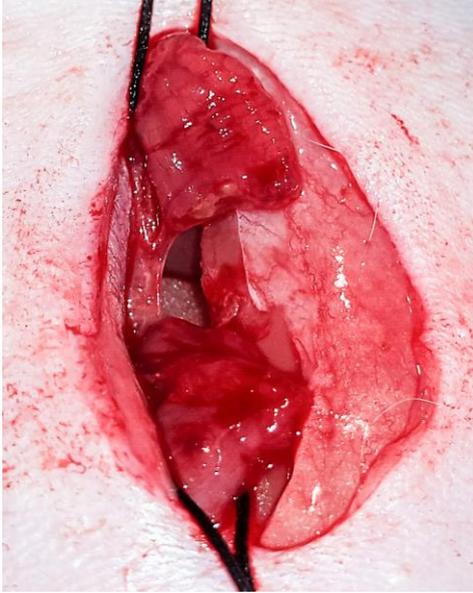


Figura 5. Demonstração do cólon sigmoide seccionado.

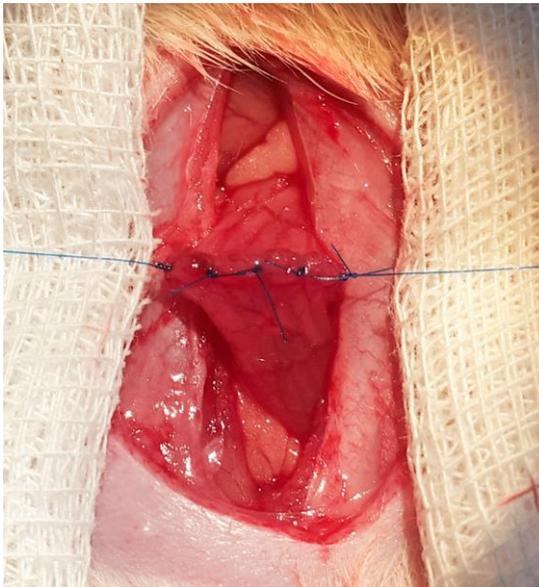


Figura 6. Anastomose colônica realizada.

As reoperações foram realizadas no 3º, 7º e 14º dias de PO, de acordo com o subgrupo ao qual o animal pertencia, definido pela randomização inicial, e nas mesmas condições das cirurgias iniciais.

No grupo **Sham**, após a laparotomia o segmento do sigmoide foi identificado e isolado e sua porção distal ocluída com fio de seda 2.0 (Ethicon®, São Paulo, Brasil). Em seguida, fez-se uma secção parcial do intestino 2 cm proximalmente para introdução de cateter de polivinil 6 Fr (Mark Med®, São Paulo, Brasil) que foi fixado hermeticamente com fio de seda 2.0 (Ethicon®, São Paulo, Brasil), para posterior análise da pressão de ruptura da parede.

Nos grupos **Grelina** e **Controle**, após a laparotomia identificou-se o segmento do sigmoide com a anastomose intestinal. Realizou-se a oclusão do intestino 1 cm distalmente a anastomose com fio de seda 2.0 (Ethicon®, São Paulo, Brasil) e uma secção parcial 1cm proximalmente a ela para introdução de cateter de polivinil 6 Fr (Mark Med®, São Paulo, Brasil), que foi fixado hermeticamente com fio de seda 2.0 (Ethicon®, São Paulo, Brasil) para posterior análise da PRA (Figura 7).

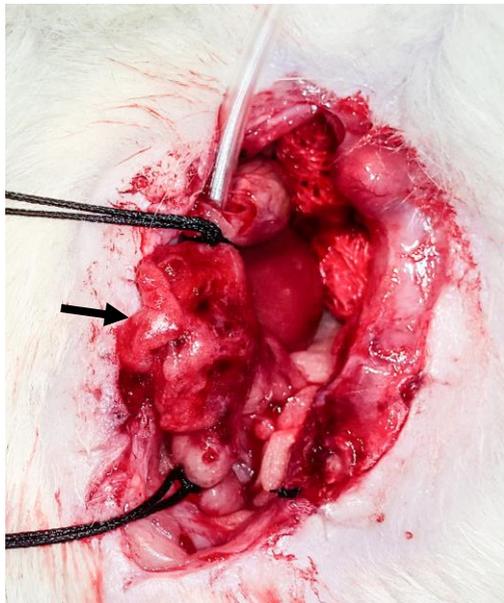


Figura 7. Demonstração da oclusão distal do cólon sigmoide e a fixação proximal do cateter com fios de seda em relação a anastomose (seta) para realização do teste de pressão de ruptura.

Após a análise das pressões de ruptura foi realizada ressecção de 2 cm do sigmoide que, no caso dos subgrupos grelina e controle, continha a anastomose intestinal ao centro equidistante das extremidades.

Esses segmentos tubulares ressecados foram abertos longitudinalmente e divididos em três tiras de tecido iguais com 2 cm de extensão cada (incluindo a anastomose nos subgrupos grelina e controle), sendo que, dois fragmentos foram colocados em criotubos separados e identificados por etiquetas amarelas e brancas (totalizando 128 amostras), que imediatamente foram submersos e congelados em nitrogênio líquido e armazenados no freezer a -80°C para posteriores análises do teor de hidroxiprolina e dos marcadores de EO. O terceiro fragmento foi colocado em frasco com formol tamponado a 10% para os estudos histopatológicos totalizando 64 amostras (Figura 8).

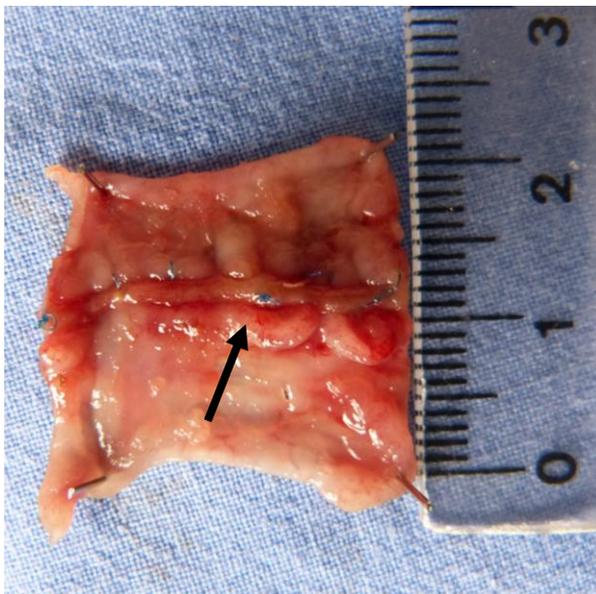


Figura 8. Segmento do cólon sigmoide ressecado e aberto com 2cm de extensão e anastomose no centro (seta), que foi posteriormente dividido em três tiras iguais.

Em seguida foi feita a síntese da parede abdominal conforme descrito para as intervenções iniciais e os animais foram submetidos a MIA.

3.4.3 Morte Indolor Assistida

A MIA foi realizada com solução de ketamina 300 mg/kg associada à xilazina 30 mg/kg, administrada por via intramuscular. A indicação da morte foi feita pela constatação de ausência de batimentos cardíacos, movimentos respiratórios e reflexos (156).

3.5 Teste de Pressão de Ruptura

Após a oclusão distal e a fixação do cateter de polivinil 6 Fr (Mark Med®, São Paulo, Brasil) no segmento do sigmoide como descrito anteriormente, ele foi conectado a um sistema fechado tipo “Y” a uma

seringa de 20ml (BD Plastipak™, Curitiba, Brasil) acoplada a uma bomba de infusão contínua (Samtronic®, São Paulo, Brasil) de um lado, e a um manômetro de coluna de mercúrio (Unitec®, São Paulo, Brasil) do outro (157). A cavidade abdominal foi preenchida com SF 0,9% e o segmento contendo a anastomose foi submerso nela. Na sequência o ar foi continuamente insuflado através do cateter na vazão de 2 ml/minuto. Dois observadores registraram o valor da pressão em mmHg no momento exato da ruptura da anastomose através do escape de ar no líquido abdominal (Figura 9).



Figura 9. Sistema em "Y" ligado a bomba de infusão contínua e ao manômetro de mercúrio para medida da pressão de ruptura.

3.6 Avaliação Histológica

As 64 amostras obtidas pela divisão do segmento intestinal após o teste de pressão de ruptura e armazenadas em formol tamponado 10%

foram codificadas e enviadas para o SAP do HU/UFSC e avaliadas ao final da preparação técnica por um único médico patologista experiente, independente que desconhecia a qual subgrupo pertencia cada amostra.

Na macroscopia as peças foram posicionadas longitudinalmente e seccionadas no eixo em duas partes com 2mm de espessura, incluídas e numeradas conforme enviado pelo pesquisador de 1 a 64. Todas as amostras foram processadas em aparelho histotécnico LUPE PT 05® (São Paulo, Brasil) e, posteriormente, os fragmentos foram incluídos em cassetes, previamente codificados, segundo o protocolo de pesquisa. Os cassetes, após congelados, foram submetidos a cortes com espessura de 2 micra em micrótomo rotativo Leica 2040 Autocut® (Wetzlar, Alemanha) (Figura 10).

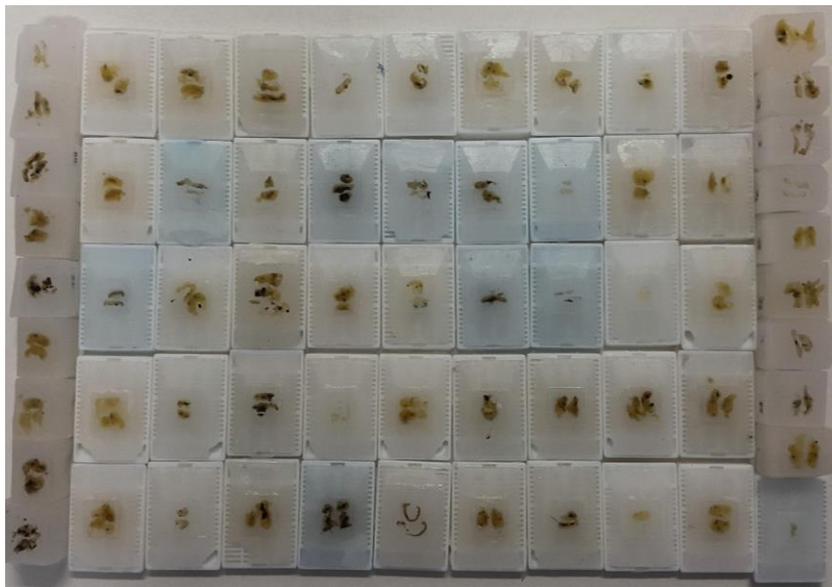


Figura 10. Amostras teciduais em blocos de parafina após preparação macroscópica.

Lâminas de histologia foram confeccionadas a partir dos cortes, seguindo a codificação pré-estabelecida, e posteriormente foram coradas em hematoxilina-eosina (HE) e pela técnica histoquímica do Tricrômico de Masson (9) (Figura 11).

Na análise microscópica as lâminas foram sequencialmente analisadas ao microscópio óptico Nikon Eclipse Ni (Sendai, Japão) por um único patologista sem conhecimento das codificações e com aumento de 400X.

As avaliações foram feitas por um método de escore semiquantitativo após seleção e mensuração microscópica da área de anastomose em campo de 40X de dois cortes consecutivos. Foram aferidos morfologicamente os parâmetros histológicos e identificados como: infiltrado de neutrófilos, edema, tecido de granulação, depósito colágeno, fibrina, fibroblastos, apoptose, aplainamento de criptas e inflamação do peritônio (158). Os resultados de cada parâmetro foram categorizados pelo método de escores em cruces: 0 = ausente, 1+ = discreto, 2+ = moderado e 3+ = acentuado (9), excetuando-se o aplainamento de criptas que foi classificado dicotomicamente em ausente ou presente.

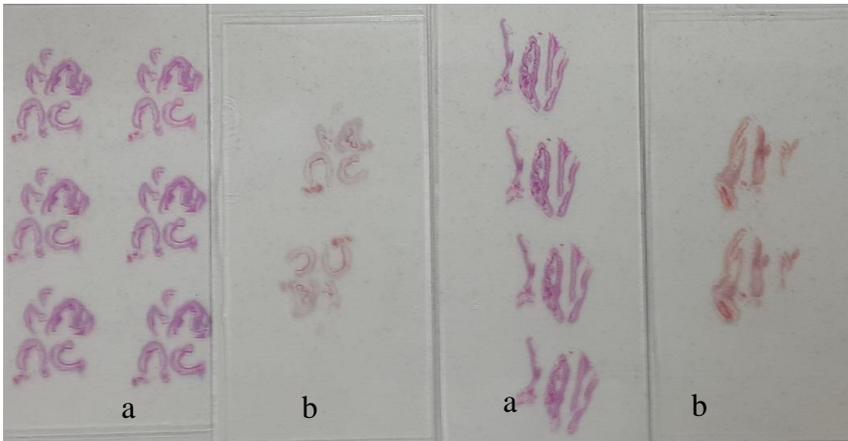


Figura 11. Lâminas preparadas pelas colorações de Hematoxilina-eosina (a) e Tricrômico de Masson (b) para avaliação histopatológica.

3.7 Avaliação da Hidroxiprolina

Uma das baterias de 64 criotubos contendo fragmentos dos segmentos intestinais congelados e armazenadas no freezer -80°C foi submetida a análise do teor de hidroxiprolina pelo LABOX – UFSC sem que os participantes soubessem a qual subgrupo pertenciam as amostras numeradas.

O método consistiu em misturar amostras de tecido hidrolisado da anastomose colônica com hidróxido de sódio. As amostras foram hidrolisadas em 500 µL de solução de NaOH 2N, submetidas à autoclavagem a 120 °C por 40 minutos e centrifugadas a 10.000 rpm durante 5 min. Em seguida, 20 µL do sobrenadante do conteúdo hidrolisado foi coletado e, juntamente, com alíquotas da solução padrão foram adicionados 30 µL de solução de NaOH 2N e 450 µL do reagente cloramina T que oxidaram durante 25 minutos a temperatura ambiente.

Logo em seguida, foram adicionados 500 µL do reagente de Ehrlich sendo as amostras e as soluções padrão incubadas em banho-maria a 65° C por 40 minutos. Como a absorbância do cromóforo formado é instável em temperatura elevada, na sequência, foi realizado um ciclo de resfriamento gradual durante 10, 15 e 10 minutos, intercalando temperatura ambiente / 4 °C / temperatura ambiente, respectivamente, para estabilizar a solução para leitura no cromóforo.

A absorbância foi determinada em espectrofotômetro em 550 nm. Para a quantificação da hidroxiprolina foi construída uma curva padrão externa compreendendo concentrações entre 1 - 400 µg/mL. Foi utilizada como amostra padrão a trans-4-Hydroxy-L-proline, Sigma-Aldrich 41875. Os resultados corresponderam à média ± desvio padrão de amostras de tecido hidrolisado a partir de análises realizadas em triplicata (159).

3.8 Avaliação dos Marcadores de Estresse Oxidativo e Catepsina B

A segunda bateria de 64 criotubos contendo fragmentos dos segmentos intestinais que foram congelados e armazenados no freezer -

80°C, também foi encaminhada para o LABOX-UFSC e as amostras teciduais submetidas às análises de marcadores enzimáticos e não-enzimáticos de estresse oxidativo tecidual e níveis de catepsina b, sendo que, os pesquisadores também desconheciam a qual subgrupo elas pertenciam.

3.8.1 Análise do conteúdo de proteínas por Western Blot

Analisou-se o conteúdo proteico de **GPx, NQO1, HO-1, Catepsina B madura, pró-Catepsina B, Nrf2 e p-Nrf2**. Para isso, as amostras do tecido foram homogeneizadas em cinco volumes (1:5, v/v) de tampão de homogeneização Tris 50 mM pH 7,0 contendo EDTA 1 mM, NaF 100 mM, PMSF 0,1 mM, Na₃VO₄ 2 mM, Triton X-100 1%, glicerol 10% e coquetel inibidor de protease (Roche, Mannheim, Alemanha). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 x g, durante 10 min, a 4°C e o sobrenadante foi coletado e diluído em 1 volume (1:1, v/v) de tampão Tris 100 mM, pH 6,8 contendo EDTA 4 mM e SDS 8%. Após isso, as amostras foram aquecidas a 100°C durante 5 minutos e o tampão de diluição (Tris 100 mM, com 40% de glicerol e azul de bromofenol, pH 6,8), numa proporção 25:100 (v/v), e β-mercaptoetanol (concentração final de 8%), foram adicionados nas amostras. As proteínas foram isoladas através de SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio [SDS]) utilizando gel de separação de acrilamida com concentração de 16% para o anticorpo GPx-1 e 14% para os demais anticorpos e gel de entrada de 4%.

A eletroforese foi realizada com corrente fixa de 20 mA e voltagem máxima de 110 mV durante aproximadamente duas horas. Após a corrida os géis foram submetidos à eletrotransferência úmida. As proteínas foram transferidas do gel de eletroforese para uma membrana de nitrocelulose (poro 0,45 µm) em tampão Tris-glicina contendo Tris / HCl 25 mM pH 7,0; glicina 192mM e 20% de metanol, com corrente fixa de 350 mA, por 1 hora.

Após a eletrotransferência, as membranas foram bloqueadas por 1 hora com leite desnatado 5% em tampão TBS (Tris 10 mM, pH 7,5 contendo NaCl 150 mM) e a seguir lavadas com tampão TBS-T (Tween-

20 0,05%, Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5). As membranas foram incubadas overnight (4°C) em TBS-T contendo 2% de albumina sérica bovina (BSA) com os anticorpos específicos Glutathione Peroxidase 1 (GPx-1, 22 kDa, diluição 1:5000, *rabbit polyclonal*, Abcam, Cambridge, EUA), NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1, 29 kDa, diluição 1:1000, *mouse IgG1, Cell Signaling*, Danvers, EUA), Heme Oxygenase 1 (HO1, 33 kDa, diluição 1:500, *rabbit polyclonal*, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), Catepsina B (pró-forma 44 kDa e forma madura 24 e 27 kDa, diluição 1:1000, *rabbit polyclonal*, Millipore, Danvers, EUA), Fator nuclear eritróide tipo 2 (Nrf2, 97-100 kDa, diluição 1:1000, *rabbit IgG, Cell Signaling*, Danvers, EUA) e Nrf2 fosfo S40 (p-Nrf2, 100 kDa, diluição 1:1000, *rabbit monoclonal*, Abcam, Cambridge, EUA). Para detecção dos complexos imunes, as membranas foram incubadas por 1 hora com o anticorpo secundário específico conjugado à peroxidase. Após lavagens com TBS-T e TBS, as imunodeteções foram visualizadas usando o sistema de detecção por quimioluminescência ECL (GE Healthcare, São Paulo, SP, Brazil), de acordo com as recomendações do fabricante, no fotodocumentador ChemiDoc™ MP Imaging System (Bio – Rad, Hercules, CA, EUA).

As membranas foram incubadas com o anticorpo β -actina (*β -actin*, 43 KDa, diluição 1:2000, *mouse monoclonal*, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) para verificar se a mesma quantidade de proteínas foi aplicada no gel. Todos os passos de bloqueio e incubação foram seguidos por três lavagens (5 minutos) com TBS-T. A

As bandas imunorreativas foram quantificadas usando o *software* ImageLab® e os resultados expressos como intensidade relativa (IR) que é a intensidade da banda da proteína de interesse dividido pela intensidade da banda de proteína controle (160).

3.8.2 Determinação das concentrações de glutathione reduzida (GSH)

As concentrações teciduais de GSH foram determinadas por meio de ensaio fluorimétrico conforme previamente descrito por Hissin et al (161), empregando o-ftaldialdeído (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) como derivatizante. O conteúdo de GSH presente nas amostras foi

calculado a partir de uma curva padrão de GSH (Sigma Aldrich) e as concentrações foram expressas em μmol de GSH/mg proteína.

3.8.3 Determinação das concentrações de nitrito (NO_2^-)

As concentrações teciduais de nitrito, um metabolito estável do óxido nítrico (ON), foram determinadas por meio do método baseado na reação de Griess. Volumes iguais do reagente de Griess (dicloridrato de N-(1-naftil)-etilenodiamina 0,1%, sulfanilamida 1%, e ácido fosfórico 2,5%, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e de amostra foram misturados, incubados durante 10 minutos a 22°C e a absorbância lida a 550 nm.

O conteúdo de nitrito presentes na amostras foi calculado a partir de uma curva padrão de nitrito de sódio (NaNO_2 , Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e as concentrações foram expressas em μmol nitrito/mg proteína (162).

3.8.4 Determinação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)

A técnica se baseia na reação do *nitroblue tetrazolium* (NBT) com EROs. O corante NBT é reduzido pelo radical superóxido (O_2^-) a um composto azul, o formazan, o qual é medido espectrofotometricamente a 630nm. A produção de EROs nas amostras foi expressa em μg de formazan/mg de proteína (163).

Dosagem de proteína

O conteúdo proteico das amostras foi mensurado empregando o método de Lowry et al. (164), utilizando albumina sérica bovina como padrão.

3.9 Cálculo da Amostra e Análise Estatística

O cálculo da amostra foi feito com o *software* OpenEpi versão 3.01 baseado no desfecho de pressão de ruptura da anastomose. Foi estabelecido um aumento mínimo estimado de 20mmHg na pressão de ruptura do grupo de estudo com significância estatística de $p < 0,05$ e poder de 80%, resultando em 8 animais por subgrupo.

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão, sendo a distribuição da amostra avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Nos subgrupos com distribuição normal a comparação das médias foi realizada pelo teste T para amostras independentes, e naqueles com distribuição não-normal (pró-catepsina B e Nrf2) foi feita pelo teste de Mann-Whitney. Para comparação das médias dos pesos inicial e final dos subgrupos foi utilizada a análise de variância (ANOVA) com correção de Bonferroni. Os testes qui-quadrado (χ^2) ou exato de Fisher foram utilizados para comparar o parâmetro histológico dicotomizado (aplainamento de criptas).

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando-se o *software* SPSS versão 22, e valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

IV. RESULTADOS

4.1 Valores das médias de peso nos subgrupos

Não houve nenhum sinal de deiscência ou fístula anastomótica nos animais avaliados durante o período do estudo, assim como não ocorreu nenhum óbito nos períodos trans e pós-operatório da pesquisa. Houve discretas variações na média do peso inicial dos animais nos diferentes subgrupos na primeira cirurgia, que não demonstraram significância estatística ($P = 0,184$). A comparação do peso final na segunda intervenção entre os subgrupos também não apresentou diferença significativa na maioria dos subgrupos, exceto entre SGS vs. SC14 ($P = 0,018$) (Tabela 1).

Tabela 1. Médias em gramas do peso inicial (primeira cirurgia) e do final (segunda cirurgia) e desvio padrão (DP) nos subgrupos sham, controle e grelina no 3º, 7º e 14º PO.

Subgrupos §	Média Peso Inicial g (\pm DP)	Média Peso Final g (\pm DP)
SCS	327,25 (\pm 22,34)	316,25 (\pm 13,10)
SGS	331,88 (\pm 13,26)	313,75 (\pm 11,28)
SC3	328,00 (\pm 17,59)	322,50 (\pm 16,67)
SG3	326,25 (\pm 13,41)	316,38 (\pm 13,71)
SC7	331,88 (\pm 6,66)	333,63 (\pm 13,96)
SG7	313,00 (\pm 8,78)	326,50 (\pm 9,48)
SC14	329,38 (\pm 15,00)	337,25 (\pm 13,47)
SG14	320,88 (\pm 14,01)	330,88 (\pm 11,06)

§SCS= subgrupo controle sham, SGS= subgrupo grelina sham, SC3= subgrupo controle 3º PO, SG3= subgrupo grelina 3º PO, SC7= subgrupo controle 7º PO, SG7= subgrupo grelina 7º PO, SC14= subgrupo controle 14º PO, SG14= subgrupo grelina 14º PO

4.2 Valores das médias das pressões de ruptura nos subgrupos

As medidas das médias das pressões de ruptura do segmento de intestino íntegro foram semelhantes quando o SGS foi comparado ao SCG ($141,38 \pm 20,70$ mmHg vs. $137,13 \pm 21,79$ mmHg; $P = 0,695$) (Figura 12).

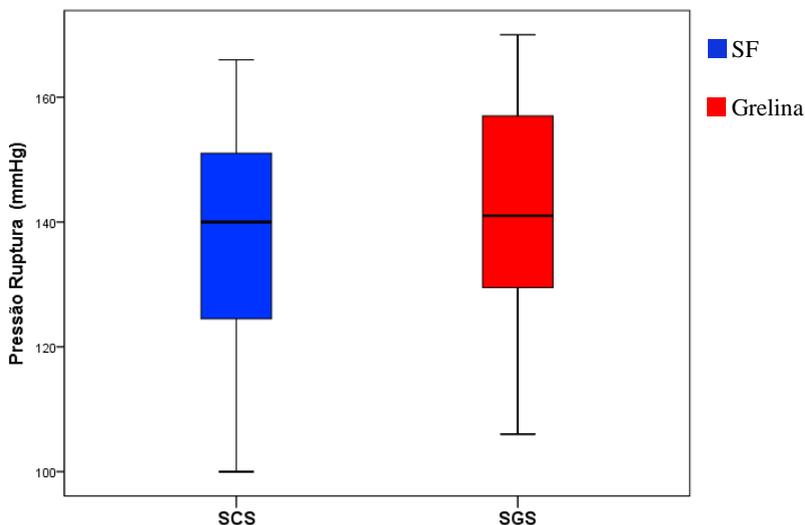


Figura 12. Gráfico demonstrando as médias das pressões de ruptura do segmento intestinal íntegro em mmHg nos subgrupos **Sham** SCS e SGS, $P = 0,695$.

Os valores das médias das pressões de ruptura da anastomose dos subgrupos controle e grelina nos dias de pós-operatório estão demonstrados na tabela 2.

Tabela 2. Médias das pressões de ruptura da anastomose em mmHg e desvio padrão (DP) nos subgrupos controle e grelina no 3º, 7º e 14º PO.

Dias de PO §	Controle	Grelina	P
	Média mmHg (\pm DP)	Média mmHg (\pm DP)	
3º	36,75 (\pm 13,00)	38,75 (\pm 10,30)	0,738
7º	100,25 (\pm 48,94)	147,00 (\pm 22,90)	0,035
14º	261,00 (\pm 47,72)	272,88 (\pm 29,52)	0,559

§PO: pós-operatório

As médias das pressões de ruptura da anastomose nos subgrupos grelina (SG3) no 3º PO foram numericamente maiores quando comparados aos controles (SC3), mas sem significância estatística (38,75 \pm 10,30 mmHg vs. 36,75 \pm 13,00 mmHg; P =0,738). No 14º PO o subgrupo grelina (SG14) também apresentou médias superiores ao controle (SC14) que da mesma forma não foram estatisticamente significantes (272,89 \pm 29,52 mmHg vs. 261,00 \pm 47,72 mmHg; P= 0,559) (Figura 13).

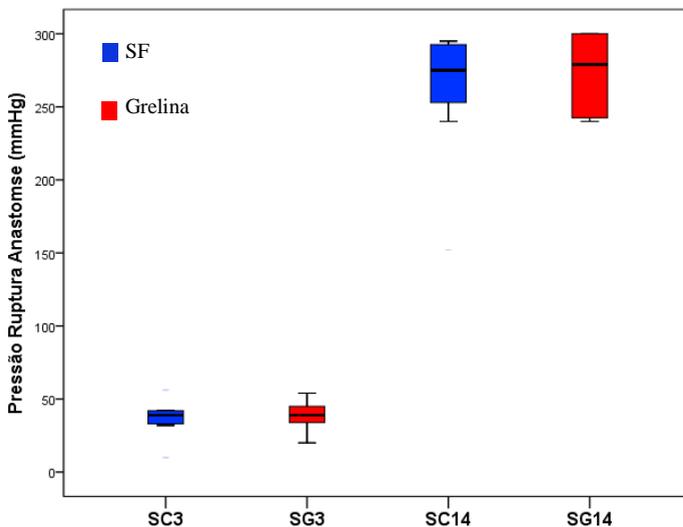


Figura 13. Gráfico demonstrando as médias das pressões de ruptura da anastomose em mmHg nos subgrupos no **3° PO**: SC3 vs. SG3; $P = 0,738$ e **14° PO**: SC14 vs. SG14; $P = 0,559$.

No 7° PO as médias de pressão de ruptura do subgrupo grelina (SG7) foram maiores na comparação com o controle (SC7), e nesse período apresentaram significância estatística ($147,00 \pm 29,52$ mmHg vs. $100,25 \pm 48,94$ mmHg; $P = 0,035$) (Figura 14).

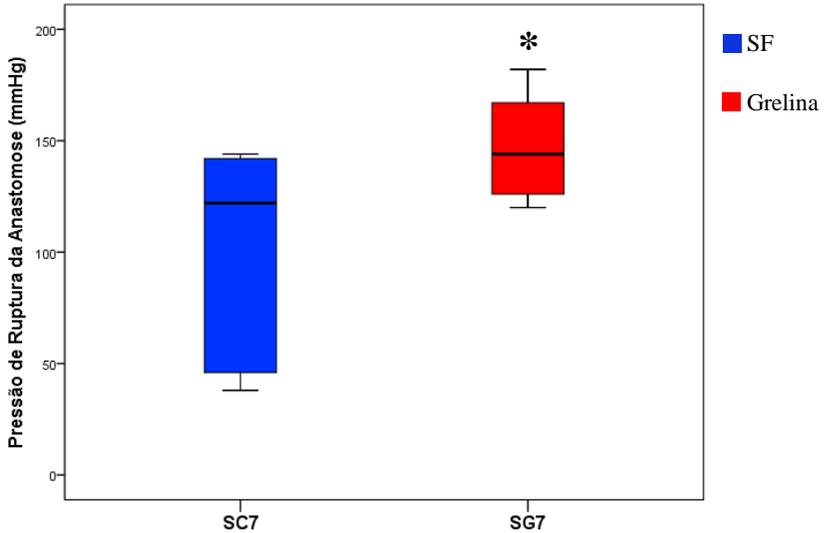


Figura 14. Gráfico demonstrando as pressões de ruptura da anastomose em mmHg no 7º PO nos subgrupos SC7 vs. SG7; *P = 0,035.

4.3 Valores das médias dos escores histopatológicos nos subgrupos

A avaliação histopatológica teve os resultados obtidos a partir da determinação de escores semiquantitativos em oito parâmetros e através da dicotomização (ausente/presente) em um, totalizando nove parâmetros inflamatórios e cicatriciais avaliados (Figura 15). Os subgrupos *sham* demonstraram resultados idênticos em todos os parâmetros e não houve nenhuma diferença significativa entre eles.

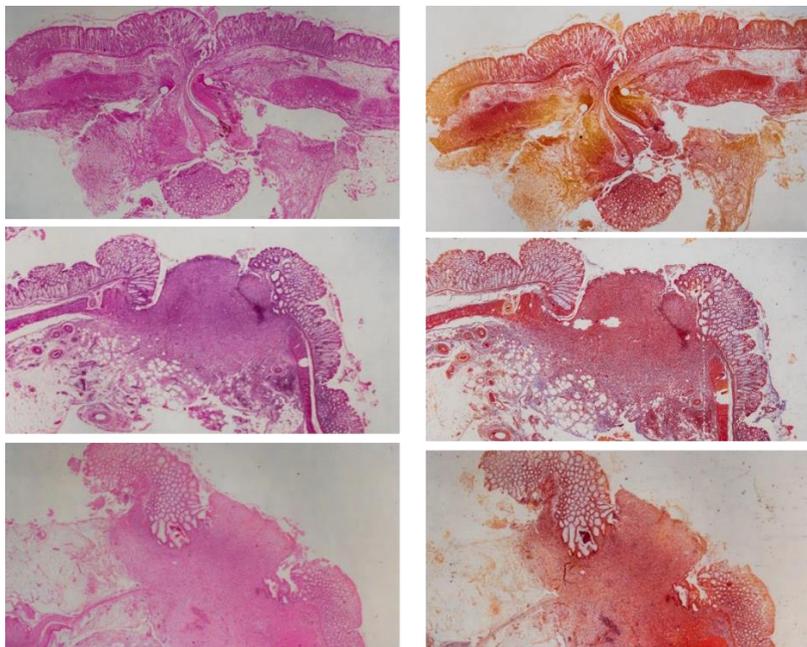


Figura 15. Cortes histológicas da área anastomótica nos diferentes períodos de pós-operatório no subgrupo grelina nas colorações de HE (coluna esquerda) e Tricrômico de Masson (coluna direita) em aumento de 40x.

Em relação aos subgrupos onde foi realizada anastomose e posterior avaliação histopatológica do tecido cicatricial, houve diferenças estatisticamente significativas entre subgrupos reoperados no 3º dia e no 14º dia de PO.

Na comparação entre os subgrupos SC3 (SF) e SG3 (grelina) no 3º dia de PO houve diminuição significativa da média dos escores do infiltrado de neutrófilos no SG3 ($2,75 \pm 0,46$ vs. $2,00 \pm 0,75$; $P = 0,035$), sendo que, nos demais parâmetros avaliados não houve diferença significativa (Tabela 3).

Tabela 3. Médias, desvio padrão e valores de P dos escores histológicos avaliados no tecido anastomótico dos subgrupos controle (SC3) e grelina (SG3) reoperados no 3º PO.

Subgrupos *	SC3	SG3	P
Parâmetros	Média (±DP)	Média (±DP)	
Histológicos			
Neutrófilos	2,75 (±0,46)	2,00 (±0,75)	0,035
Fibrina	2,63 (±0,51)	2,38 (±0,51)	0,350
Fibroblastos	1,25 (±0,46)	1,25 (±0,46)	1,000
Colágeno	1,13 (±0,35)	1,13 (±0,35)	1,000
Tecido Granulação	1,75 (±0,48)	1,88 (±0,83)	0,717
Edema	2,25 (± 0,46)	2,00 (± 0,75)	0,438
Apoptose	2,38 (±0,51)	1,88 (±0,64)	0,108
Inflamação Peritônio	2,38 (±0,74)	2,75 (±0,46)	0,246

* SC3 = subgrupo controle 3º PO e SG3 = subgrupo grelina 3º PO

A comparação das médias dos escores histopatológicos entre os subgrupos do 7º PO não apresentou diferença estatisticamente significante em nenhum dos parâmetros avaliados (Tabela 4).

Tabela 4. Médias, desvio padrão e valores de P dos escores histológicos avaliados no tecido anastomótico dos subgrupos controle (SC7) e grelina (SG7) reoperados no 7º PO.

Subgrupos *	SC7	SG7	P
Parâmetros	Média (±DP)	Média (±DP)	
Histológicos			
Neutrófilos	2,75 (±0,46)	2,38 (±0,46)	0,325
Fibrina	1,13 (±0,35)	1,50 (±0,53)	0,124
Fibroblastos	2,75 (±0,53)	2,50 (±0,46)	0,335
Colágeno	2,13 (±0,64)	2,25 (±0,46)	0,662
Tecido Granulação	2,13 (±0,83)	2,00 (±0,92)	0,781
Edema	1,00 (±0,75)	1,00 (0,53)	1,000
Apoptose	2,50 (±0,75)	2,13 (±0,75)	0,233
Inflamação Peritônio	2,13 (±0,83)	2,13 (±0,64)	1,000

* SC7 = subgrupo controle 7º PO e SG7 = subgrupo grelina 7º PO

Na comparação dos escores histológicos entre os subgrupos do 14º dia de PO houve diferenças significantes em quatro dos oito parâmetros avaliados, com menores médias no subgrupo SG14. A comparação dos escores entre SC14 e SG14 teve os respectivos resultados descritos a seguir: infiltrado neutrofílico ($2,00 \pm 0,75$ vs. $1,25 \pm 0,43$; $P = 0,035$); tecido de granulação ($2,38 \pm 0,91$ vs. $1,25 \pm 0,46$; $P = 0,011$); apoptose ($2,00 \pm 0,75$ vs. $0,75 \pm 0,70$; $P = 0,004$) e inflamação peritoneal ($1,88 \pm 0,35$ vs. $1,00 \pm 0,75$; $P = 0,014$). Os demais parâmetros não apresentaram diferenças significativas nesse período (Tabela 5).

Tabela 5. Médias, desvio padrão e valores de P dos escores histológicos avaliados no tecido anastomótico dos subgrupos controle (SC14) e grelina (SG14) reoperados no 14º PO.

Subgrupos *	SC14	SG14	P
Parâmetros	Média (±DP)	Média (±DP)	
Histológicos			
Neutrófilos	2,00 (±0,75)	1,25 (±0,46)	0,035
Fibrina	1,50 (±0,92)	1,00 (±0,53)	0,212
Fibroblastos	2,25 (±0,70)	1,75 (±0,46)	0,120
Colágeno	2,38 (±0,51)	2,38 (±0,74)	1,000
Tecido Granulação	2,38 (±0,91)	1,25 (±0,46)	0,011
Edema	0,00 (±0,00)	0,25 (±0,46)	1,000
Apoptose	2,00 (±0,75)	0,75 (±0,70)	0,004
Inflamação Peritônio	1,88 (±0,35)	1,25 (±0,46)	0,011

*SC14 = subgrupo controle 14º PO e SG14 = subgrupo grelina 14º PO.

A variável aplainamento de criptas que foi dicotomizada, não apresentou diferença significativa entre os subgrupos em nenhum período de avaliação, porém no 14º dia de PO essa alteração foi detectada em todas amostras do SC14 e em apenas 50% nas do SG14 apresentando uma tendência para significância com $P = 0,077$ (Figura 16).

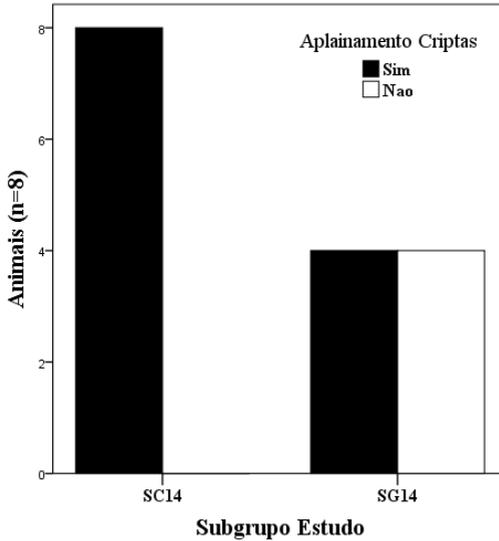


Figura 16. Gráfico demonstrando a ocorrência do aplainamento de criptas no 14º PO nos subgrupos SC14 e SG14 ($P = 0,077$).

4.4 Valores das médias das concentrações Hidroxirolina tecidual nos subgrupos

As concentrações médias hidroxirolina determinadas no tecido cicatricial em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína, foram reduzidas em ambos os subgrupos controle e grelina no 3º PO ($2,16 \pm 2,45$ vs. $2,26 \pm 1,55$) e não apresentaram diferenças estatisticamente significantes. No 7º PO houve elevação das médias em ambos subgrupos para $6,23 \pm 6,18$ e $6,39 \pm 12,16$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína respectivamente, também sem diferenças significantes ($P = 0,976$) (Tabela 6).

Entretanto, no 14º PO os subgrupos controle e grelina apresentaram médias bastante distintas, com $3,46 \pm 2,95$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína no controle e $9,86 \pm 6,46$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína no grelina, sendo essa diferença estatisticamente significativa com valor de $P = 0,043$ (Figura 17).

Tabela 6. Médias de concentração tecidual de Hidroxirolina (HP) e desvio padrão (DP) nos subgrupos controle e grelina: 3^o, 7^o e 14^o PO.

Dias de PO §	Controle (SF)	Grelina	P
	Média HP # (±DP)	Média HP # (±DP)	
3 ^o	2,16 (± 2,45)	2,26 (± 1,55)	0,925
7 ^o	6,23 (± 6,18)	6,39 (± 12,16)	0,976
14 ^o	3,46 (± 2,95)	9,86 (± 6,46)	0,043

§PO: pós-operatório, # Média HP em µg/ mg de proteína.

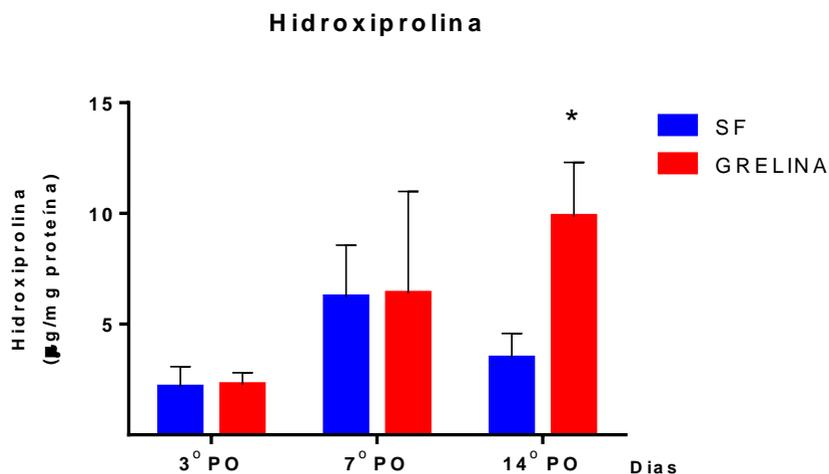


Figura 17. Gráfico demonstrando a concentração tecidual de Hidroxirolina nos subgrupos controle (SF) e grelina: 3^o, 7^o e 14^o PO. * P = 0,043

4.5 Valores das médias de conteúdo proteico de Pró-Catepsina B e Catepsina B Madura teciduais nos subgrupos

As médias de intensidade relativa (IR) tecidual de pró-catepsina B e de catepsina B madura apresentaram elevações nos subgrupos submetidos à anastomose, quando comparados aos sham (Figuras 18 e 19).

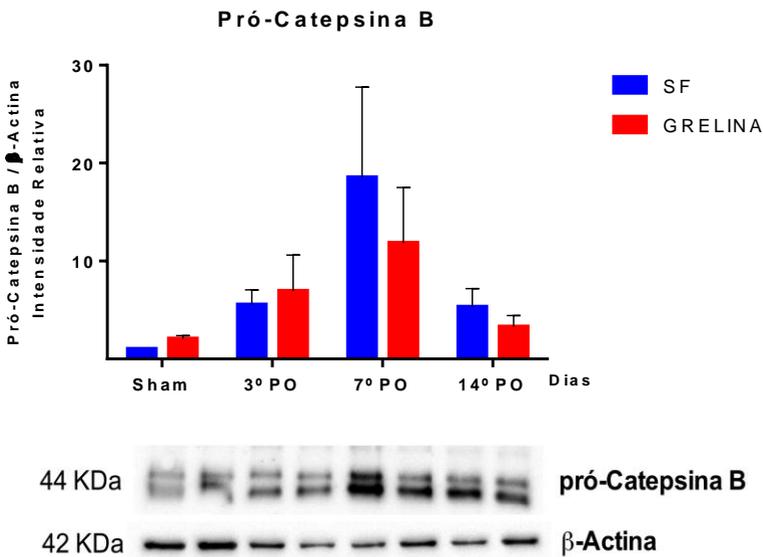


Figura 18. Gráfico demonstrando intensidade relativa tecidual de Pró-Catepsina B nos subgrupos controle (SF) e grelina: Sham, 3°, 7° e 14° PO.

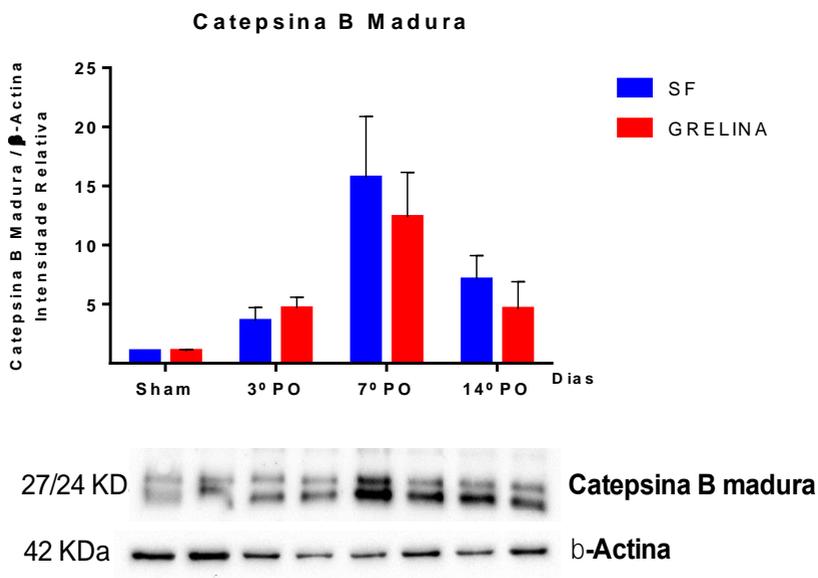


Figura 19. Gráfico demonstrando intensidade relativa tecidual de Catepsina B Madura nos subgrupos controle (SF) e grelina: Sham, 3°, 7° e 14° PO.

No 7° e 14° PO as médias de intensidade relativa de pró-catepsina B tecidual foram maiores nos subgrupos controle do que nos que receberam grelina ($18,54 \pm 20,63$ vs. $11,84 \pm 12,67$; $P = 0,310$ e $5,31 \pm 4,17$ vs. $3,29 \pm 2,53$; $P = 0,690$), entretanto, na comparação entre eles essas diferenças não foram estatisticamente significantes (Tabela 7).

Tabela 7. Médias de intensidade relativa tecidual de pró-catepsina B/ β -actina e desvio padrão (DP) nos subgrupos controle e grelina: Sham, 3^o, 7^o e 14^o PO.

Dias de PO [§]	Controle (SF) IR# (\pmDP)	Grelina IR# (\pmDP)	P
Sham	1,00 (\pm 0,00)	2,06 (\pm 0,73)	0,151
3^o	5,52 (\pm 3,41)	6,94 (\pm 8,21)	0,690
7^o	18,54 (\pm 20,63)	11,84 (\pm 12,67)	0,310
14^o	5,31 (\pm 4,17)	3,29 (\pm 2,53)	0,690

[§]PO: pós-operatório, # Média de Intensidade Relativa de pró-catepsina B / β - Actina.

Semelhantemente, as médias de IR de catepsina B madura analisadas no 7^o e 14^o PO, também foram maiores nos subgrupos controle quando comparadas aos que receberam grelina (15,70 \pm 11,60 vs. 12,37 \pm 8,44; P = 0,619 e 7,07 \pm 4,55 vs. 4,58 \pm 5,19; P = 0,444), e nessa comparação também não foram estatisticamente significantes (Tabela 8).

Tabela 8. Médias de intensidade relativa tecidual de catepsina B madura/ β -actina e desvio padrão (DP) nos subgrupos controle e grelina: Sham, 3^o, 7^o e 14^o PO.

Dias de PO [§]	Controle (SF) IR# (\pmDP)	Grelina IR# (\pmDP)	P
Sham	1,00 (\pm 0,00)	1,03 (\pm 0,28)	0,810
3^o	3,56 (\pm 2,58)	4,63 (\pm 2,14)	0,498
7^o	15,70 (\pm 11,60)	12,37 (\pm 8,44)	0,619
14^o	7,07 (\pm 4,55)	4,58 (\pm 5,19)	0,444

[§]PO: pós-operatório, # Média de Intensidade Relativa de Catepsina B Madura / β - Actina.

4.6 Valores das médias de produção de EROs nos subgrupos

Os valores das médias de produção de EROs nos subgrupos Sham controle e grelina foram de $100,00 \pm 52,52$ e $80,38 \pm 24,18$, respectivamente. Houve aumento na média dos valores de EROS em todos os subgrupos submetidos a anastomose colônica quando comparados aos Sham. Nos subgrupos com anastomose, os controles apresentaram maiores médias de EROS quando comparados aos que receberam grelina no 3º e 14º dias de PO (Figura 20).

Essas diferenças foram estatisticamente significantes na comparação das médias entre os subgrupos no 14º dia de PO ($163,19 \pm 48,61$ vs. $98,93 \pm 19,46$; $P=0,012$) (Figura 20).

No 7º PO a média de produção de EROS, nos subgrupos com anastomose, foi discretamente maior naqueles onde foi administrada grelina, entretanto, não apresentou significância estatística com $P=0,820$ (Tabela 9).

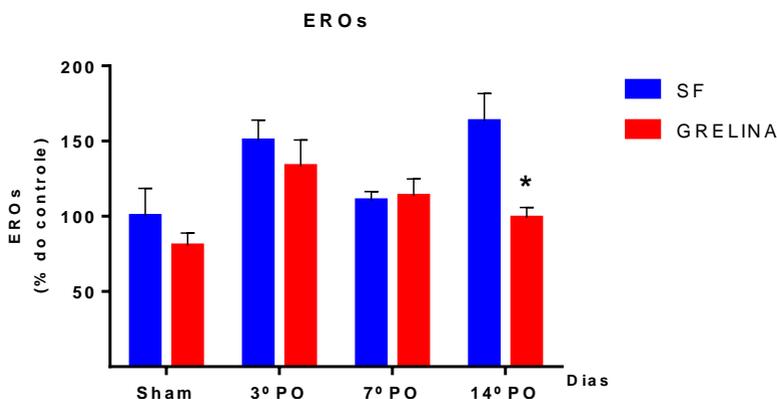


Figura 20. Gráfico demonstrando a produção de EROs nos subgrupos controle (SF) e grelina: Sham, 3º, 7º, e 14º PO. * $P=0,012$.

Tabela 9. Médias de produção de EROs e desvio padrão (DP) nos subgrupos controle e grelina: Sham, 3º, 7º e 14º PO.

Dias de PO §	Controle (SF) Média EROs# (\pm DP)	Grelina Média EROs# (\pm DP)	P
Sham	100,00 (\pm 52,62)	80,38 (\pm 24,18)	0,361
3º	150,18 (\pm 39,02)	133,31 (\pm 45,97)	0,761
7º	110,50 (\pm 15,74)	113,50 (\pm 29,91)	0,820
14º	163,19 (\pm 48,61)	98,93 (\pm 19,46)	0,012

§PO: pós-operatório, # Média EROs em ng de formazan / mg de proteína.

4.7 Valores das médias de concentração tecidual de Nitrito (NO₂) nos subgrupos

As concentrações teciduais de NO₂⁻ nos subgrupos sham controle e grelina foram de 100,00 (\pm 52,62) e 80,38 (\pm 24,18) μ mol de nitrito/mg de proteína, respectivamente. Naqueles submetidos à anastomose colônica houve diminuição dessa concentração em todos os períodos de PO avaliados em ambos subgrupos (Figura 21).

Na comparação entre os subgrupos submetidos à anastomose as concentrações médias de NO₂⁻ foram menores naqueles que receberam grelina no 3º e 14º PO, sendo estatisticamente significante no 3º PO (3,91 \pm 0,85 vs. 5,04 \pm 0,88; P = 0,021) e não apresentando significância no 14º PO (4,80 \pm 1,08 vs. 5,04 \pm 0,75; P = 0,612) (Tabela 10). No 7º PO o subgrupo grelina apresentou maior concentração tecidual de NO₂⁻ quando comprado ao controle, entretanto sem significância estatística P = 0,116 (Figura 21).

Tabela 10. Médias de concentração tecidual de NO_2^- e desvio padrão (DP) nos subgrupos controle e grelina: Sham, 3°, 7° e 14° PO.

Dias de PO [§]	Controle (SF) Média NO_2^- [#] (\pm DP)	Grelina Média NO_2^- [#] (\pm DP)	P
Sham	5,29 (\pm 1,96)	5,27 (\pm 2,29)	0,985
3°	5,04 (\pm 0,88)	3,91 (\pm 0,85)	0,021
7°	3,52 (\pm 0,77)	4,44 (\pm 1,31)	0,116
14°	5,04 (\pm 0,75)	4,80 (\pm 1,08)	0,612

[§]PO: pós-operatório, [#] Média NO_2^- em μmol de nitrito/ mg de proteína.

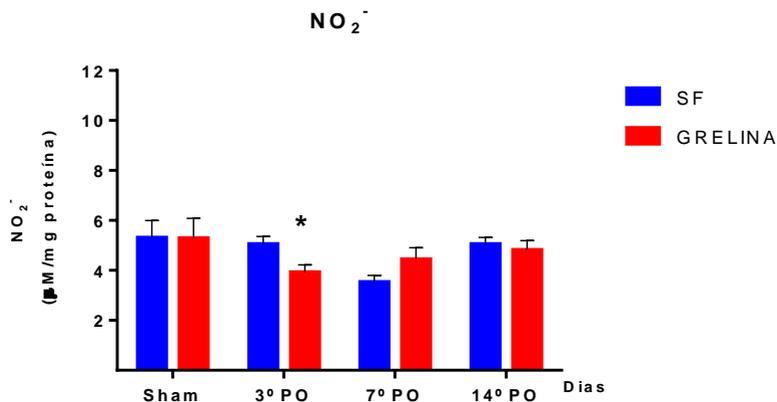


Figura 21. Gráfico demonstrando a concentração tecidual de NO_2^- nos subgrupos controle (SF) e grelina: Sham, 3°, 7° e 14° PO. * P = 0,021.

4.8 Valores das médias de conteúdo proteico de HO-1, GPx, NQO1, p-Nrf2 e Nrf2 e de concentração tecidual de GSH nos subgrupos

Houve aumento das médias de intensidade relativa teciduais de **HO-1** nos subgrupos submetidos à anastomose colônica em relação aos subgrupos Sham (Figura 22).

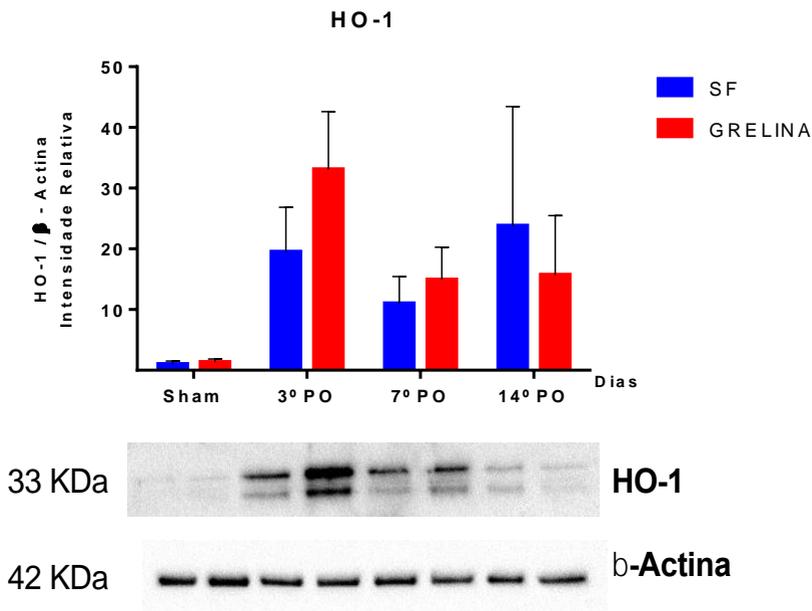


Figura 22. Gráfico demonstrando intensidade relativa tecidual de HO-1 nos subgrupos controle (SF) e grelina: Sham, 3°, 7° e 14° PO.

Na comparação das médias de IR de HO-1 realizada entre os subgrupos controle e grelina no 3° PO ($19,48 \pm 18,09$ vs. $33,04 \pm 23,37$; $P=0,289$), no 7° PO ($10,99 \pm 10,87$ vs. $14,91 \pm 13,15$; $P = 0,587$) e no 14° PO ($23,75 \pm 48,19$ vs. $15,66 \pm 24,07$; $P = 0,723$) não houve diferenças estatisticamente significantes (Tabela 11).

Tabela 11. Médias de intensidade relativa tecidual de HO-1/ β -actina e desvio padrão (DP) nos subgrupos controle e grelina: Sham, 3^o, 7^o e 14^o PO.

Dias de PO [§]	Controle (SF) IR [#] (\pm DP)	Grelina IR [#] (\pm DP)	P
Sham	0,98 (\pm 1,32)	1,32 (\pm 1,33)	0,669
3^o	19,48 (\pm 18,09)	33,04 (\pm 23,37)	0,289
7^o	10,99 (\pm 10,87)	14,91 (\pm 13,15)	0,587
14^o	23,75 (\pm 48,19)	15,66 (\pm 24,07)	0,723

[§]PO: pós-operatório, [#] Média de Intensidade Relativa de HO-1 / β - Actina.

Também houve aumento das médias de intensidade relativa teciduais de **GPx** nos subgrupos submetidos à anastomose colônica em relação aos subgrupos Sham (Figura 23).

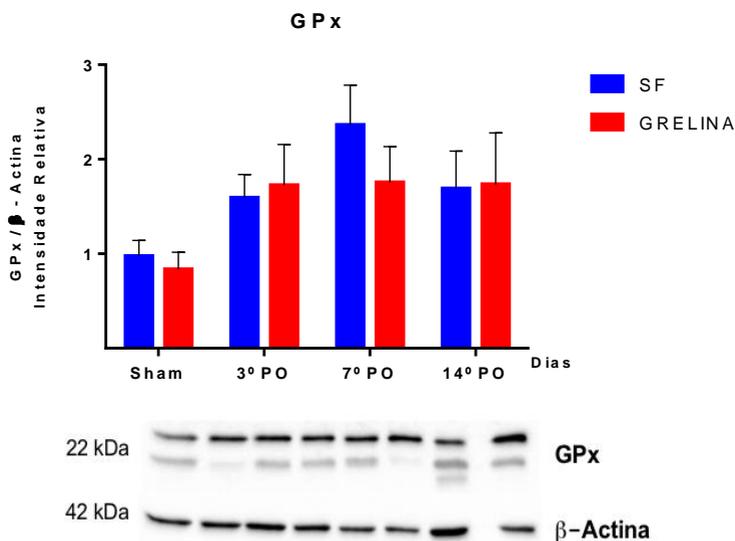


Figura 23. Gráfico demonstrando intensidade relativa tecidual de GPx nos subgrupos controle (SF) e grelina: Sham, 3^o, 7^o e 14^o PO.

As médias de IR de GPx foram similares e tiveram pouca variação nos subgrupos grelina em todos os períodos de pós-operatório avaliados, sendo discretamente maiores quando comparadas aos controles no 3° e 14° PO não apresentando significância estatística com $P = 0,795$ e $0,950$, respectivamente. No 7° PO o subgrupo controle apresentou médias maiores em relação ao grelina ($2,36 \pm 1,11$ vs. $1,75 \pm 1,00$; $P = 0,306$), porém também sem significância (Tabela 12).

Tabela 12. Médias de intensidade relativa tecidual de GPx/ β -actina e desvio padrão (DP) nos subgrupos controle e grelina: Sham, 3°, 7° e 14° PO.

Dias de PO §	Controle (SF) IR# (\pm DP)	Grelina IR# (\pm DP)	P
Sham	0,97 (\pm 0,44)	0,83 (\pm 0,48)	0,587
3°	1,59 (\pm 0,65)	1,72 (\pm 1,14)	0,795
7°	2,36 (\pm 1,11)	1,75 (\pm 1,00)	0,306
14°	1,68 (\pm 1,04)	1,73 (\pm 1,44)	0,950

§PO: pós-operatório, # Média de Intensidade Relativa de GPx / β – Actina.

Os subgrupos Sham controle e grelina apresentaram médias de IR tecidual de **NQO1** ($1,00 \pm 0,00$ e $0,95 \pm 0,14$) maiores do que os subgrupos controle e grelina submetidos à anastomose colônica em todos os períodos de pós-operatório avaliados (Figura 24).

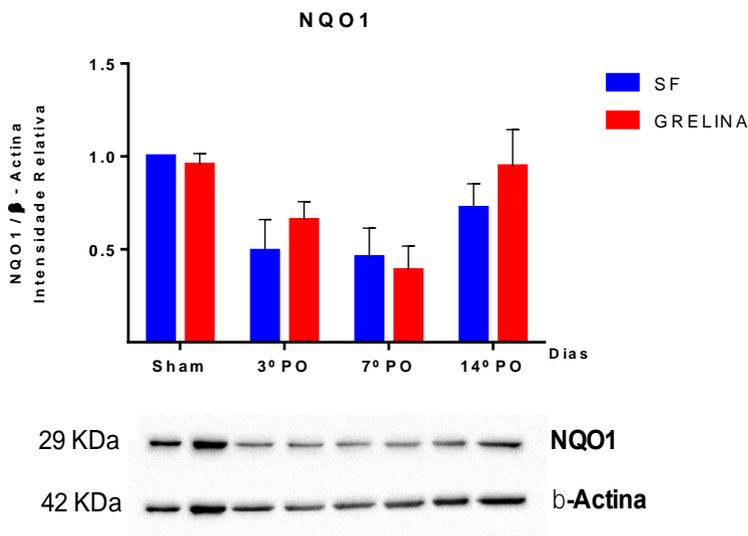


Figura 24. Gráfico demonstrando intensidade relativa tecidual de NQO1 nos subgrupos controle (SF) e grelina: Sham, 3°, 7° e 14° PO.

Nos 3° e 14° dias de PO os subgrupos controle apresentaram médias menores de IR de NQO1 quando comparados aos subgrupos grelina ($0,49 \pm 0,41$ vs. $0,65 \pm 0,24$; $P = 0,419$ e $0,72 \pm 0,31$ vs. $0,94 \pm 0,48$; $P = 0,368$). Na comparação realizada no 7° PO a média de NQO1 foi maior no subgrupo controle ($0,45 \pm 0,38$ vs. $0,38 \pm 0,31$; $P = 0,737$), mas em nenhum período houve diferença estatisticamente significativa (Tabela 13).

Tabela 13. Médias de intensidade relativa tecidual de NQO1/ β -actina e desvio padrão (DP) nos subgrupos controle e grelina: Sham, 3^o, 7^o e 14^o PO.

Dias de PO [§]	Controle (SF) IR [#] (\pm DP)	Grelina IR [#] (\pm DP)	P
Sham	1,00 (\pm 0,00)	0,95 (\pm 0,14)	0,490
3^o	0,49 (\pm 0,41)	0,65 (\pm 0,24)	0,419
7^o	0,45 (\pm 0,38)	0,38 (\pm 0,31)	0,737
14^o	0,72 (\pm 0,31)	0,94 (\pm 0,48)	0,368

[§]PO: pós-operatório, [#] Média de Intensidade Relativa de NQO1 / β – Actina.

As médias de IR tecidual de **p-Nrf2** e **Nrf2** foram maiores em todos os subgrupos submetidos à anastomose colônica em relação aos subgrupos Sham. As maiores médias de p-Nrf2 foram observadas no 7^o PO (SC7), enquanto que as de Nrf2, aconteceram no 14^o PO (SC14), sendo ambas nos subgrupos controle (Figuras 25 e 26).

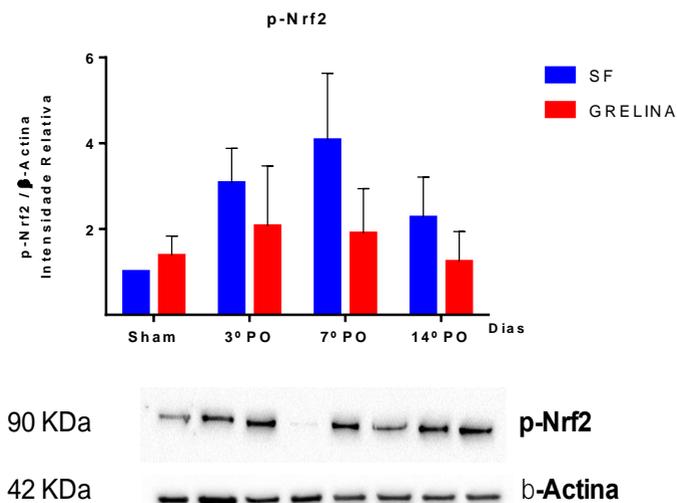


Figura 25. Gráfico demonstrando intensidade relativa tecidual de p-Nrf2 nos subgrupos controle (SF) e grelina: Sham, 3^o, 7^o e 14^o PO.

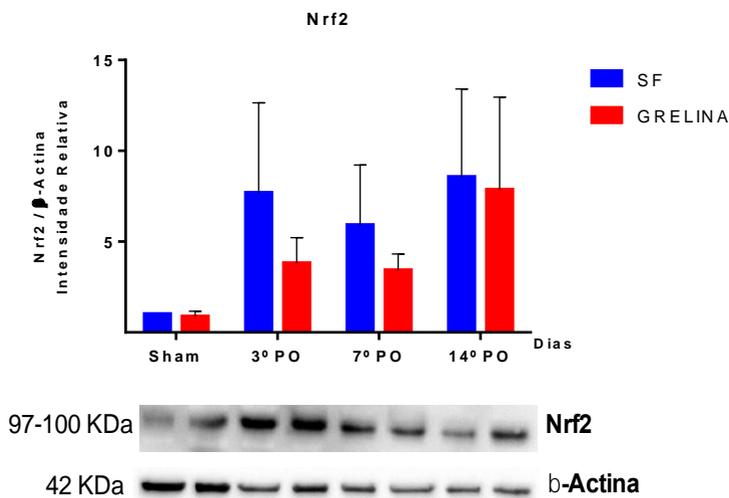


Figura 26. Gráfico demonstrando intensidade relativa tecidual de Nrf2 nos subgrupos controle (SF) e grelina: Sham, 3°, 7° e 14° PO.

As médias de IR de p-Nrf2 observadas no 3°, 7° e 14° PO foram maiores nos subgrupos controle quando comparados aqueles que receberam grelina ($3,07 \pm 1,80$ vs. $2,06 \pm 3,13$; $P = 0,556$ / $4,07 \pm 3,48$ vs. $1,89 \pm 2,33$; $P = 0,284$ / $2,26 \pm 2,11$ vs. $1,24 \pm 1,57$; $P = 0,410$), mas não apresentaram significância estatística em nenhuma das comparações (Tabela 14).

Tabela 14. Médias de intensidade relativa tecidual de p-Nrf2/ β -actina e desvio padrão (DP) nos subgrupos controle e grelina: Sham, 3^o, 7^o e 14^o PO.

Dias de PO §	Controle (SF) IR# (\pmDP)	Grelina IR# (\pmDP)	P
Sham	1,00 (\pm 0,00)	1,37 (\pm 1,03)	0,461
3^o	3,07 (\pm 1,80)	2,06 (\pm 3,13)	0,556
7^o	4,07 (\pm 3,48)	1,89 (\pm 2,33)	0,284
14^o	2,26 (\pm 2,11)	1,24 (\pm 1,57)	0,410

§PO: pós-operatório, # Média de Intensidade Relativa de p-Nrf2 / β – Actina.

As médias de IR de Nrf2 medidas no 3^o, 7^o e 14^o PO também foram maiores nos subgrupos controle quando comparados àqueles que receberam grelina, e da mesma forma não apresentaram diferenças estatisticamente significantes (7,68 \pm 13,10 vs. 3,80 \pm 3,74; P = 0,902 / 5,90 \pm 8,75 vs. 3,41 \pm 2,37; P = 1,000 / 8,55 \pm 12,83 vs. 7,85 \pm 13,49; P = 0,805) (Tabela 15).

Tabela 15. Médias de intensidade relativa tecidual de Nrf2/ β -actina e desvio padrão (DP) nos subgrupos controle e grelina: Sham, 3^o, 7^o e 14^o PO.

Dias de PO §	Controle (SF) IR# (\pmDP)	Grelina IR# (\pmDP)	P
Sham	1,00 (\pm 0,00)	0,86 (\pm 0,80)	0,189
3^o	7,68 (\pm 13,10)	3,80 (\pm 3,74)	0,902
7^o	5,90 (\pm 8,75)	3,41 (\pm 2,37)	1,000
14^o	8,55 (\pm 12,83)	7,85 (\pm 13,49)	0,805

§PO: pós-operatório, # Média de Intensidade Relativa de Nrf2 / β – Actina.

As médias de concentração tecidual de **GSH** foram mais elevadas em ambos os subgrupos Sham ($1467,96 \pm 541,31$ e $1099,48 \pm 216,02$) quando comparadas aos subgrupos controle e grelina submetidos à anastomose colônica em todos os dias de PO avaliados (Figura 27).

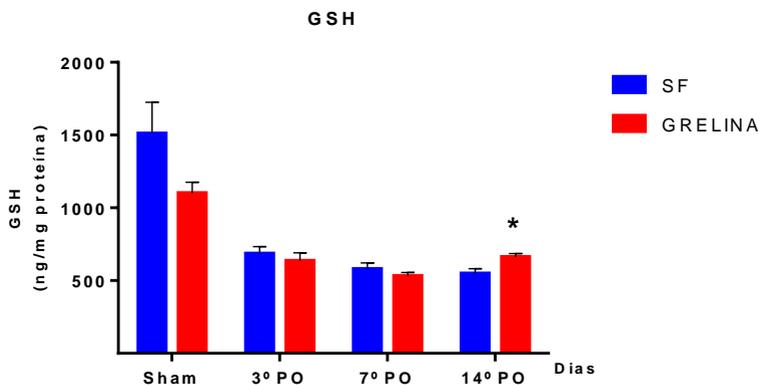


Figura 27. Gráfico demonstrando a concentração tecidual de GSH em ng/mg proteína nos subgrupos controle (SF) e grelina: Sham, 3°, 7° e 14° PO. *P = 0,073.

Nos subgrupos submetidos à anastomose colônica as médias de concentração tecidual de GSH foram maiores nos controles quando comparados àqueles que receberam grelina no 3° e 7° dias de PO ($683,96 \pm 137,89$ vs. $634,58 \pm 158,69$; $P = 0,517$ e $578,97 \pm 117,47$ vs. $530,95 \pm 69,68$; $P = 0,341$, respectivamente), entretanto, não apresentaram significância estatística. Na comparação no 14° PO a média do subgrupo grelina foi maior que a do controle ($661,43 \pm 75,58$ vs. $560,34 \pm 121,06$), demonstrando uma tendência a significância com valor de P igual a 0,073 (Tabela 16).

Tabela 16. Médias de concentração tecidual de GSH e desvio padrão (DP) nos subgrupos controle e grelina: Sham, 3^o, 7^o e 14^o PO.

Dias de PO §	Controle (SF) Média GSH[#] (±DP)	Grelina Média GSH[#] (±DP)	P
Sham	1467,96 (± 541,32)	1099,48 (± 216,02)	0,107
3^o	683,96 (± 137,89)	634,58 (± 158,69)	0,517
7^o	578,97 (± 117,47)	530,95 (± 69,68)	0,341
14^o	560,34 (± 121,06)	661,43 (± 75,58)	0,073

§PO: pós-operatório, # Média GSH em ng / mg de proteína.

V. DISCUSSÃO

A diminuição da incidência de deiscências e de fistulas anastomóticas no pós-operatório de cirurgias colorretais e a identificação dos seus fatores de risco têm sido objeto de inúmeros estudos clínicos e experimentais. Diferentes estratégias têm sido testadas com o objetivo de reduzir suas graves repercussões clínicas e elevados custos de tratamento, que por muitas vezes, envolvem múltiplas reintervenções cirúrgicas, confecções de estomas, prolongamento no tempo de internação hospitalar e um pior prognóstico oncológico (4, 6, 7, 13).

Uma das opções terapêuticas avaliadas na tentativa de reduzir os riscos de falha no processo cicatricial das anastomoses intestinais é a administração de hormônios e de fatores de crescimento (31).

A grelina é um hormônio orexígeno com potente ação central induzindo a liberação de GH, regulando inúmeros fatores do crescimento e atuando nos mecanismos de migração, angiogênese e proliferação celulares indispensáveis para a cicatrização (46).

Também apresenta potentes efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes com impacto sobre a homeostase redox acelerando o processo cicatricial em diversos tecidos (165-169).

A grelina possui peso molecular igual a 3314,83/mol, sendo que, 1nmol equivale a 3,314 µg. Os estudos publicados apresentam diferentes dosagens de administração de grelina que variam entre 20 e 30µg/Kg/dia e não apresentam padronização de unidades de medida, sendo os resultados expressos em nmol/Kg/dia, ng/Kg/dia ou µg/Kg/ dia.

Ceran et al. observaram aumento na pressão de ruptura e da concentração de hidroxiprolina tecidual no 7º PO nas anastomoses colônicas em ratos com administração IP de 10 ng/Kg/dia de grelina (27). Warzecha et al. demonstraram efeitos cicatrizantes sobre úlceras da mucosa oral com doses de 4, 8 e 16 nmol/kg /dia (169). Konturek et al. utilizando 20µg/Kg/dia via IP concluíram que houve melhora na cicatrização colônica com colite induzida por TNBS, em ratos (128).

Igualmente, Sen et al. demonstraram efeitos protetores contra isquemia/reperfusão ileal em ratos quando administraram por via endovenosa 10ng/kg/dose de grelina (126).

Recentemente, Matuszyk et al. também demonstraram efeitos protetores da administração de grelina IP na dose de 8nmol/Kg/dose na mucosa colônica de ratos submetidos a colite induzida por ácido acético (114).

Considerando esse mosaico de dosagens e vias de administração que, aparentemente, apresentaram influência no mecanismo de cicatrização em diferentes tecidos, foi adotada neste estudo a dose 23µg/Kg/dia, por estar dentro da faixa de concentração frequentemente utilizada nas pesquisas publicadas, e que sugere influência na cicatrização da mucosa colônica e sobre os processos de estresse oxidativo e de liberação de citocinas inflamatórias relacionados ao processo cicatricial.

A comparação da média de peso inicial na primeira cirurgia entre os animais dos diferentes subgrupos não apresentou diferença estatisticamente significativa, o que demonstra ser uma amostra homogênea quanto ao peso, não havendo necessidade de variações consideráveis na dosagem de aplicação da grelina nos diferentes subgrupos.

Houve diferença significativa, comprovada estatisticamente, na comparação entre as médias de peso final antes da segunda intervenção nos subgrupos SGS e SC14 ($P=0,018$), que se devem à diferença entre o número de dias de pós-operatório e que não interferiram nos resultados do estudo.

Quando observadas as médias de pressão de ruptura das anastomoses, estas se mostraram significativamente maiores no grupo que recebeu grelina no 7º dia de PO ($P=0,035$), período que corresponde à fase de reepitelização. Também foram maiores naqueles que receberam grelina no 3º e 14º dias de pós-operatório, entretanto, nesses períodos não apresentaram diferenças estatisticamente significantes. Esse resultado, parece demonstrar uma maior resistência na linha de anastomose a fatores pressóricos induzidos intraluminais que simulam a fisiologia intestinal (secreção e fezes) e também o peristaltismo, principalmente, no 7º PO nos animais que receberam grelina.

Esses achados são similares a estudos experimentais que avaliaram a influência da administração IP de grelina sobre as pressões de ruptura de anastomoses colônicas e gástricas no 7º PO, e que demonstraram aumento estatisticamente significativo das médias das PRA naqueles subgrupos que receberam grelina em doses de 10ng/Kg/dia e 10nmol/Kg/dia, respectivamente (27, 170).

Esse resultado sugere que os efeitos anti-inflamatórios da grelina possam atuar acelerando a fase inflamatória inicial e antecipando a fase proliferativa, levando a uma maior deposição de colágeno e a um aumento significativo na força tênsil da linha anastomótica no 7º PO como demonstrado neste estudo.

A cicatrização da anastomose intestinal é afetada diretamente pela intensidade e duração da resposta inflamatória que ocorre nos três primeiros dias pós-trauma, e quanto mais longa ela é, menos resistente será a anastomose, pois nessa etapa há diminuição da formação de colágeno e intensa collagenólise. A fase inflamatória serve como ponte para a fase de reepitelização, que é considerada o período crítico de menor resistência da cicatriz onde ocorre a maioria das deiscências e fístulas (31, 32).

Houve, nesta pesquisa, a necessidade de avaliação histopatológica por dois métodos distintos de coloração: o primeiro, hematoxilina-eosina, para determinação dos componentes celulares e o segundo, Tricrômico de Masson, para avaliação do tecido conjuntivo e muscular.

Observaram-se diferenças na comparação das médias dos escores dos parâmetros histológicos entre os subgrupos grelina e controle, em todos os períodos de pós-operatório avaliados, porém, elas apresentaram significância estatística naqueles reoperados no 3º e 14º PO.

Essas diferenças sugerem indiretamente possíveis efeitos anti-inflamatórios nos subgrupos que receberam grelina, relacionados a diminuição do recrutamento neutrofílico na fase inflamatória do processo cicatricial (3º PO) com valor de $P = 0,035$. Esse efeito, ao que tudo indica, impede que haja uma resposta inflamatória exacerbada e duradoura nesta fase inflamatória, que é prejudicial no processo de transição para a fase

proliferativa, interferindo na produção de colágeno, que ocorre por volta do 3º PO e é responsável pela sustentação do tecido cicatricial.

A partir do 4º PO, que é denominado período crítico da cicatrização anastomótica, essa produção de colágeno é fundamental, pois é nele que ocorrem a maioria das deiscências e fístulas intestinais pós-operatórias.

Sen et al. demonstraram efeito protetor semelhante com a administração de grelina na mucosa ileal de ratos após indução de lesão por isquemia/reperfusão mesentérica, sugerindo que essa ação anti-inflamatória diminuiria o tempo necessário para a recuperação do tecido lesado (126). A ação anti-inflamatória da administração de grelina também foi demonstrada em células endoteliais humanas e em estados de sepse induzida em ratos, pela supressão da liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6 e TNF- α (171-173).

No 14º PO diferenças significativas foram detectadas na avaliação das médias de infiltrado neutrofílico ($P = 0,035$), tecido de granulação ($P = 0,011$), apoptose ($P = 0,004$) e inflamação peritoneal ($P = 0,011$), sendo que, em todas elas houve diminuição das médias dos escores nos subgrupos grelina quando comparados aos controles.

Novamente, esses resultados sugerem que a grelina atue como regulador da inflamação e promotor da cicatrização tecidual final. Nesse último período do processo cicatricial, que corresponde a maturação da ferida, houve redução do tecido de granulação, que, caso seja abundante, tem efeito prejudicial e impacta negativamente na força tênsil da linha anastomótica impedindo a deposição de colágeno (28).

A redução da apoptose que foi observada também no 14º PO, por sua vez, também sugere menor lesão e melhor regeneração tecidual nessa fase, influenciando diretamente no resultado final da cicatrização da anastomose. Já foi demonstrado que a administração de grelina diminui a apoptose tecidual e protege contra lesão hepática em ratos (174) e também suprime a apoptose no tecido ósseo após indução de lesão por depleção de urânio, através da diminuição do estresse oxidativo tecidual e indicando seu potencial uso em situações de intoxicação (175).

Recentemente, Taati et al. demonstraram, em ratos, diminuição da apoptose e dos níveis de TNF- α e IL-6 no tecido germinativo testicular,

após indução de isquemia/reperfusão com conseqüente melhoria no processo de reparo tecidual, no grupo que recebeu administração de grelina via IP (176).

Todos esses estudos corroboram os achados desta pesquisa, que sugere efeitos idênticos da grelina sobre as mesmas fases do processo cicatricial no período estudado, impedindo a exacerbação da fase inflamatória.

A inflamação peritoneal foi outro parâmetro histológico analisado e teve escores significativamente menores no subgrupo grelina no 14º PO ($P=0,011$). Essa diferença provavelmente resultou da diminuição do infiltrado neutrofílico tecidual gerando menor reação nesse componente da parede celular (camada serosa), que no intestino serve como elemento extra de sustentação. Esse achado poderia explicar a menor incidência de aderências intraperitoneais pós-operatórias no grupo grelina, relatadas no trabalho de Ceran et al. (27), porém, essa análise não foi o objetivo deste estudo.

A avaliação dos parâmetros histopatológicos no 7º PO não demonstrou diferenças estatísticas significantes entre os subgrupos, entretanto, esses resultados não implicam que não haja melhoria nos parâmetros bioquímicos teciduais, que necessitam ser avaliados por pesquisas futuras.

Ceran et al. avaliaram anastomoses colônicas no mesmo período de PO e também não demonstraram diferenças significativas na maioria dos parâmetros histopatológicos teciduais entre o grupo que recebeu grelina via IP e os controles, exceto no infiltrado inflamatório celular que foi maior no segundo grupo ($P < 0,05$), demonstrando mesma ação anti-inflamatória da grelina na fase proliferativa do processo cicatricial (27). Diferentemente, neste estudo não houve impacto sobre as médias dos escores da avaliação histopatológica nesse mesmo período de PO, não sendo possível atribuir tal ação à grelina.

Em resumo, esses achados histopatológicos corroboram estudos prévios que demonstraram que a administração de grelina tem impacto positivo sobre o processo cicatricial, acelerando a cicatrização das lesões gástricas induzidas por metabilsulfato de sódio em ratos (121), otimizando a cicatrização de úlceras duodenais pela indução do aumento

de liberação de GH e IGF-1(168), e da cicatrização de úlceras orais pelo aumento do fluxo sanguíneo na mucosa permitindo a chegada de mais células e fatores para cicatrização (169).

A ocorrência do aplainamento de criptas foi numericamente menor no subgrupo grelina no 14º PO, porém, sem significância estatística ($P=0,077$). Todos os animais do subgrupo controle apresentaram essa alteração, enquanto que, apenas 50% deles apresentaram no subgrupo grelina nesse período. Geralmente, essa reação fisiológica ocorre logo nos primeiros quatro dias após a lesão tecidual intestinal e não está presente na fase final do processo cicatricial. Ela consiste na proliferação de células de forma achatada denominadas células epiteliais associadas a lesão (WAE *cells*), que são originadas nas criptas adjacentes à ferida e que migram para o leito lesional com objetivo de realizar hemostasia e criar uma barreira provisória contra microrganismos e agentes externos (177, 178). Os resultados sugerem que a administração de grelina poderia otimizar a reorganização celular das criptas da mucosa colônica mais eficazmente e conseqüentemente sua função estrutural na parede intestinal, porém novas pesquisas são necessárias para avaliar tal ação.

A hidroxiprolina é um aminoácido exclusivo do colágeno e é utilizada como um marcador bioquímico da cicatrização. Ela representa a deposição do colágeno cicatricial que está diretamente relacionada a integridade e força tênsil na linha anastomótica (9, 40). Já foi demonstrado experimentalmente, que a administração intraperitoneal de grelina aumenta significativamente o teor de hidroxiprolina tecidual nas anastomoses colônicas em ratos no 7º PO, sugerindo que ela tenha efeito benéfico para a cicatrização anastomótica (27). Da mesma forma, demonstrou-se que elevados níveis de EROs teciduais induzem ao aumento de lesão tecidual e impedem a correta deposição de colágeno na cicatriz causando retardo na cicatrização (10, 179, 180).

Nesta pesquisa as concentrações teciduais de hidroxiprolina foram expressivamente mais elevadas no subgrupo grelina no 14º PO ($P=0,043$), período em que também houve menor produção de EROs e menor apoptose nesse subgrupo, sugerindo que a grelina atue estimulando

a deposição de colágeno e acelerando a regeneração cicatricial que são influenciadas pelo estresse oxidativo nessa fase da cicatrização.

As médias de pressão de ruptura das anastomoses e os níveis de hidroxiprolina teciduais foram mais elevados nos subgrupos grelina quando comparados aos controles em todos os períodos de PO. Apesar de não ter havido associação estatisticamente significativa entre esses dois parâmetros, os resultados sugerem que a administração de grelina atue estimulando o metabolismo do colágeno no período pós-operatório. Esse estímulo pode ter efeito benéfico sobre a cicatriz, entretanto, novas pesquisas são necessárias para confirmar essa hipótese.

A catepsina B é uma típica protease cisteíno lisossomal que têm importante papel na indução da degradação e da inibição da biossíntese do colágeno tipos I e III nos fibroblastos pela ativação do NF- κ B. Sua expressão está aumentada em estados de estresse oxidativo e de inflamação crônica levando a maior destruição do tecido conjuntivo nessas situações (44).

Neste estudo foram realizadas medições de pró- catepsina B e catepsina B maduras teciduais nos três períodos de PO, que correspondem as formas inativa e ativa dessa protease, respectivamente (181). Foi demonstrado um aumento da expressão de ambas as formas nos subgrupos, principalmente no 7º PO, que corresponde ao período crítico para o diagnóstico de fístulas anastomóticas e onde houve diferença significativa nas PRA entre os subgrupos. Entretanto, apesar dos subgrupos controles apresentarem maior expressão de catepsina B madura e pró-catepsina B essa diferença não foi significativa ($P= 0,619$ e $0,310$).

No período que compreende o 7º PO a formação de colágeno é necessária para evitar a falha da linha anastomótica que é inversamente proporcional a expressão de catepsina B (28, 181). Já foi demonstrado que a inibição dessa protease aumenta a capacidade de migração de queratinócitos e acelera a recuperação da camada epitelial no processo cicatricial da pele (45).

Nesta pesquisa os subgrupos grelina apresentaram menor expressão dessa protease a partir do 7º PO, e mesmo que as diferenças não tenham apresentado significância estatística abre-se um campo de

estudo que pode sugerir um efeito inibitório da grelina sobre a catepsina B, sendo necessárias novas pesquisas com um número maior de animais para determinar o verdadeiro impacto da grelina sobre essa protease.

A cicatrização é um processo coordenado, composto por fases que se superpõem orquestradamente e que são mediadas por citocinas e fatores presentes nos meios intra e extracelulares (30). Os processos redox regulados influenciam na cicatrização, e a manutenção da homeostasia redox é importante para evitar os efeitos deletérios causados pelo excesso de produção de EROs resultante do metabolismo aeróbico celular (131).

Nas feridas observa-se um aumento temporário de EROs na fase inflamatória (*burst* respiratório) que atuam como linha de defesa contra patógenos invasores e como mediadores de sinalização celular para angiogênese (135). Entretanto, a manutenção de altos níveis de EROs no sítio cicatricial são responsáveis pela ativação de proteínas pró-apoptóticas, morte e necrose celular (146).

Nesta pesquisa foram aferidas as concentrações teciduais de EROs pela determinação do radical O_2^- que é o principal componente resultante da oxidação do oxigênio molecular e que origina todos os demais radicais reativos envolvidos nas reações de oxirredução (131). Aqui, observaram-se no 3º PO aumento das concentrações teciduais de EROs em ambos os subgrupos, caracterizando o *burst* respiratório inicial. As concentrações nesse período foram maiores no subgrupo controle, porém essa diferença não teve significância estatística ($P = 0,458$), mas pode ter influenciado na quimiotaxia de neutrófilos, já que, nesse período foi constatado aumento significativo desse tipo celular no subgrupo controle o que levaria a uma maior intensidade de inflamação como discutido anteriormente.

As concentrações de EROs nos subgrupos que receberam grelina foram decrescendo gradativamente no 7º e retornaram a níveis basais no 14º PO, demonstrando uma atuação eficaz dos sistemas antioxidantes e manutenção da homeostase redox que é essencial para o resultado final da cicatrização. Diferentemente, esse comportamento foi observado nos subgrupos controle apenas no 7º PO, já que, no 14º PO houve um aumento acentuado das concentrações EROs em relação aos subgrupos grelina e que apresentou significância estatística ($P = 0,012$).

Esses achados sugerem possíveis efeitos benéficos da grelina na recuperação e na manutenção da homeostasia redox, otimizando o processo cicatricial tecidual, e corroboram os achados histopatológicos deste estudo onde houve diminuição significativa dos escores de neutrófilos, tecido de granulação e apoptose no 14° PO nos subgrupos que receberam essa substância, sugerindo um efeito protetor da grelina contra a formação de EROs na fase final de maturação da ferida.

Esses efeitos anti-inflamatórios e anti-apoptóticos da administração de grelina contra lesões induzidas por EO, já foram demonstrados na doença esteatótica hepática (174), na lesão intestinal por isquemia-reperfusão (126), nos osteoblastos (182), em células cardíacas (183) e na mucosa gástrica (121), reforçando os achados da presente pesquisa.

O estresse nitro-oxidativo é gerado após a oxidação do **ON** pelo **O₂⁻**, e tem impacto negativo sobre o processo cicatricial quando há desequilíbrio entre formação e detoxificação dos radicais formados, cujos resultantes, são o peroxinitrito (**ONOO⁻**) e o nitrito **NO₂⁻**, entre outros. (131).

A produção excessiva de **NO₂⁻** ativa a forma latente da protease neutrofílica humana causando maior degradação dos componentes da matriz extracelular representados principalmente pelo colágeno impactando negativamente no resultado final da cicatrização (184).

Nesta pesquisa também foram mensuradas as concentrações teciduais de **NO₂⁻** no 3°, 7° e 14° PO, que apresentaram reduções em todos os subgrupos operados em relação aos subgrupos Sham. Esse achado sugere uma diminuição na concentração tecidual de ON comum em tecidos submetidos a ressecções e suturas devido à isquemia local produzida pelo procedimento cirúrgico.

No 3° PO houve diferença estatisticamente significativa nas médias de concentrações teciduais de **NO₂⁻** na comparação entre os subgrupos, sendo que naqueles que receberam grelina elas foram menores. Esse resultado pode indicar uma diminuição na produção de radicais reativos resultantes da oxidação do **ON** induzida pela grelina, com consequente diminuição do estresse nitro-oxidativo nesse período, o que resultaria em menor ativação das proteases neutrofílicas e melhora do

resultado cicatricial na linha de anastomose em formação, como foi demonstrado pelo aumento dos níveis de PRA no 7º PO no subgrupo grelina. Somando-se a isso o fato de haver menor mobilização de neutrófilos para a ferida no 3º PO, como também foi demonstrado neste estudo no grupo grelina e que apresentou significância estatística. Nos demais períodos avaliados as diferenças não foram estatisticamente significativas, com as concentrações de NO_2^- retornando aos níveis basais no 14º PO em ambos os subgrupos, sugerindo que não haja efeitos da grelina sobre o estresse nitro-oxidativo nas fases tardias da cicatrização colônica.

O Nrf2 é um fator de transcrição nuclear encontrado no citoplasma ligado à proteína inibidora Keap 1 que impede sua translocação para o núcleo. Em estados onde há elevação da tensão oxidativa, ou seja, quebra da homeostase redox, a Keap 1 perde a capacidade de ligação ao Nrf2 promovendo aumento nas suas concentrações citoplasmáticas e conseqüentemente sua migração para o núcleo, onde ele induz a expressão dos seus genes-alvo. Atualmente, a via Nrf2/Keap 1 tem sido reconhecida como uma das principais linhas de defesa contra estados de estresse oxidativo, pois ativa os genes que codificam as principais enzimas antioxidantes como SOD, CAT, NQO1, Tioredoxina (Trx), HO-1, e GPx (185, 186).

Neste estudo foram mensurados os níveis de intensidade relativa teciduais de Nrf2 total e de p-Nrf2, que é a forma fosforilada ativa que migra para o núcleo e atua sobre os genes induzido a expressão enzimática(137). Em ambos os subgrupos e em todos os períodos de pós-operatório avaliados, houve ativação do sistema Nrf2/Keap 1 comprovada pelo aumento da intensidade relativa de p-Nrf2 induzida provavelmente pelo aumento da concentração tecidual de EROs que foi descrita anteriormente.

As intensidades de Nrf2 total e de p-Nrf2 foram maiores nos subgrupos controle, entretanto essas diferenças não foram significativas sugerindo que a grelina não atue estimulando diretamente essa via de proteção antioxidante, apesar de ter efeitos comprovados na diminuição do EO intestinal (117). Novas pesquisas analisando outras vias de proteção contra a lesão por estresse oxidativo intestinal devem ser

estudadas para elucidar por quais mecanismos a grelina atue na manutenção da homeostasia redox.

A avaliação da atividade enzimática antioxidante aqui estudada, apresentou resultados contraditórios em relação a resposta da ativação do sistema Nrf2/Keap 1. Os efeitos protetores com aumento da atividade da HO-1 e da NQO1, via sistema Nrf2/Keap 1 contra lesão antioxidante, já foram demonstrados em células endoteliais (155) e em células neurológicas (154).

Nesta pesquisa foram observados aumentos da intensidade relativa pós-operatória na expressão da GPx e da HO-1 condizentes com o aumento da p-Nrf2 e diminuição na expressão da NQO1. Apesar de diferentes, esses resultados não apresentaram significância estatística sugerindo que, os efeitos antioxidantes benéficos da grelina não estejam relacionados a estimulação dessas enzimas especificamente. Estudos futuros ampliando o leque de enzimas antioxidantes analisadas são necessários para definir qual é o nível de atuação da grelina na cascata de defesa antioxidante.

A GSH é um tiol que está presente na maioria das células principalmente no meio intracelular. É considerada um dos agentes mais importantes no mecanismo de proteção celular e sua capacidade redutora é dada pelo grupamento -SH. Ela interage com as enzimas GPx e GSH redutase detoxificando principalmente o H_2O_2 (136).

A GSH apresenta efeitos antioxidantes (187) e anti-apoptóticos (188, 189) e seus níveis teciduais e plasmáticos são inversamente proporcionais ao estado de estresse oxidativo indicando o balanço redox (190). Neste estudo os níveis de GSH tecidual caíram em ambos os subgrupos no decorrer dos períodos de pós-operatório avaliados, indicando consumo dessa substância pelas defesas enzimáticas para manutenção da homeostasia redox e coincidindo com as elevações de EROs demonstradas anteriormente. No 14º PO houve um maior aumento na concentração de GSH no subgrupo grelina que apresentou uma tendência a significância ($P= 0,073$) quando comparado ao controle nesse período. Esse resultado coincide com a diminuição da concentração de EROs e com o menor escore histopatológico de apoptose encontrados também no mesmo subgrupo nesse mesmo período. Uma futura análise

com maior número de animais poderia comprovar essa hipótese. Esses dados juntos sugerem fortemente que a administração de grelina possa atuar de forma benéfica na fase de remodelação do processo cicatricial nas anastomoses colônicas evitando a lesão celular com diminuição apoptose pela otimização da hemostasia redox nesse período.

Devido aos benefícios já demonstrados na literatura e aos significativos achados descritos neste trabalho, futuras pesquisas são necessárias para definir, ampliar e se possível comprovar a hipótese de que a administração de grelina atue de forma benéfica sobre a cicatrização das anastomoses colônicas.

VI. CONCLUSÕES

A administração de grelina no período pós-operatório foi associada a aumento na pressão de ruptura da anastomose no 7º PO, redução no infiltrado inflamatório neutrofílico no 3º e 14º PO, bem como redução no tecido de granulação, apoptose e inflamação peritoneal no 14º PO.

Houve aumento na concentração de hidroxiprolina tecidual e menor produção de EROs no 14º PO, assim como também ocorreu menor produção de NO_2^- no 3º PO.

Houve aumento nas concentrações de GSH no 14º PO com tendência a significância.

Não foi observada influência na expressão tecidual de pró-catepsina B, catepsina B, NOQ1, OH-1, GPx, Nrf2 e p-Nrf2.

Esses resultados sugerem que a administração de grelina pode exercer efeitos benéficos sobre a cicatrização de anastomoses colônicas em ratos, e representa estratégia promissora na prevenção de complicações cirúrgicas como deiscências e fístulas anastomóticas, necessitando de estudos futuros com amostras maiores para comprovação desses resultados.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lange MM, Rutten HJ, van de Velde CJ. One hundred years of curative surgery for rectal cancer: 1908-2008. *Eur J Surg Oncol.* 2009;35(5):456-63.
2. Sliker JC, Daams F, Mulder IM, Jeekel J, Lange JF. Systematic review of the technique of colorectal anastomosis. *JAMA Surg.* 2013;148(2):190-201.
3. Marinello FG, Baguena G, Lucas E, Frasson M, Hervas D, Flor-Lorente B, et al. Anastomotic leakage after colon cancer resection: does the individual surgeon matter? *Colorectal Dis.* 2016;18(6):562-9.
4. Fujita F, Torashima Y, Kuroki T, Eguchi S. Risk factors and predictive factors for anastomotic leakage after resection for colorectal cancer: reappraisal of the literature. *Surg Today.* 2014;44(9):1595-602.
5. Frasson M, Flor-Lorente B, Rodriguez JL, Granero-Castro P, Hervas D, Alvarez Rico MA, et al. Risk Factors for Anastomotic Leak After Colon Resection for Cancer: Multivariate Analysis and Nomogram From a Multicentric, Prospective, National Study With 3193 Patients. *Ann Surg.* 2015;262(2):321-30.
6. Krarup PM, Nordholm-Carstensen A, Jorgensen LN, Harling H. Association of Comorbidity with Anastomotic Leak, 30-day Mortality, and Length of Stay in Elective Surgery for Colonic Cancer: A Nationwide Cohort Study. *Dis Colon Rectum.* 2015;58(7):668-76.
7. Krarup PM, Nordholm-Carstensen A, Jorgensen LN, Harling H. Anastomotic leak increases distant recurrence and long-term mortality after curative resection for colonic cancer: a nationwide cohort study. *Ann Surg.* 2014;259(5):930-8.
8. Rushfeldt CF, Sveinbjornsson B, Soreide K, Vonen B. Risk of anastomotic leakage with use of NSAIDs after gastrointestinal surgery. *Int J Colorectal Dis.* 2011;26(12):1501-9.
9. de Oliveira JC, de Oliveira CH, de Oliveira HE, Colombeli GL, De Bona Heck N, Pereira A, et al. Effects of perioperative hypothermia on healing of anastomosis of the colon in rats. *Int J Colorectal Dis.* 2013;28(5):705-12.

10. Oliveira JC, Oliveira CH, Oliveira HE, Pereira A, Maraschin M, d'Acampora AJ. Effects of perioperative hypothermia and reactive oxygen species in the healing of colonic anastomosis in rats. *Acta Cir Bras.* 2014;29(11):742-7.
11. Oines MN, Krarup PM, Jorgensen LN, Agren MS. Pharmacological interventions for improved colonic anastomotic healing: a meta-analysis. *World J Gastroenterol.* 2014;20(35):12637-48.
12. Trencheva K, Morrissey KP, Wells M, Mancuso CA, Lee SW, Sonoda T, et al. Identifying important predictors for anastomotic leak after colon and rectal resection: prospective study on 616 patients. *Ann Surg.* 2013;257(1):108-13.
13. Kingham TP, Pachter HL. Colonic anastomotic leak: risk factors, diagnosis, and treatment. *J Am Coll Surg.* 2009;208(2):269-78.
14. Hyman N, Manchester TL, Osler T, Burns B, Cataldo PA. Anastomotic leaks after intestinal anastomosis: it's later than you think. *Ann Surg.* 2007;245(2):254-8.
15. Lim M, Akhtar S, Sasapu K, Harris K, Burke D, Sagar P, et al. Clinical and subclinical leaks after low colorectal anastomosis: a clinical and radiologic study. *Dis Colon Rectum.* 2006;49(10):1611-9.
16. Krarup PM, Jorgensen LN, Andreassen AH, Harling H, Danish Colorectal Cancer G. A nationwide study on anastomotic leakage after colonic cancer surgery. *Colorectal Dis.* 2012;14(10):e661-7.
17. Elnahas A, Urbach D, Lebovic G, Mamdani M, Okrainec A, Queresby FA, et al. The effect of mechanical bowel preparation on anastomotic leaks in elective left-sided colorectal resections. *Am J Surg.* 2015;210(5):793-8.
18. Shogan BD, Carlisle EM, Alverdy JC, Umanskiy K. Do we really know why colorectal anastomoses leak? *J Gastrointest Surg.* 2013;17(9):1698-707.
19. Nikolian VC, Kamdar NS, Regenbogen SE, Morris AM, Byrn JC, Suwanabol PA, et al. Anastomotic leak after colorectal resection: A population-based study of risk factors and hospital variation. *Surgery.* 2017.

20. Boersema GS, Wu Z, Kroese LF, Vennix S, Bastiaansen-Jenniskens YM, van Neck JW, et al. Hyperbaric oxygen therapy improves colorectal anastomotic healing. *Int J Colorectal Dis.* 2016;31(5):1031-8.
21. Rushfeldt CF, Agledahl UC, Sveinbjornsson B, Soreide K, Wilsgaard T. Effect of Perioperative Dexamethasone and Different NSAIDs on Anastomotic Leak Risk: A Propensity Score Analysis. *World J Surg.* 2016;40(11):2782-9.
22. Van Koughnett JA, Wexner SD. Surgery. NSAIDs and risk of anastomotic leaks after colorectal surgery. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2014;11(9):523-4.
23. Harris LJ, Moudgill N, Hager E, Abdollahi H, Goldstein S. Incidence of anastomotic leak in patients undergoing elective colon resection without mechanical bowel preparation: our updated experience and two-year review. *Am Surg.* 2009;75(9):828-33.
24. Kiran RP, Murray AC, Chiuzan C, Estrada D, Forde K. Combined preoperative mechanical bowel preparation with oral antibiotics significantly reduces surgical site infection, anastomotic leak, and ileus after colorectal surgery. *Ann Surg.* 2015;262(3):416-25; discussion 23-5.
25. Scarborough JE, Mantyh CR, Sun Z, Migaly J. Combined Mechanical and Oral Antibiotic Bowel Preparation Reduces Incisional Surgical Site Infection and Anastomotic Leak Rates After Elective Colorectal Resection: An Analysis of Colectomy-Targeted ACS NSQIP. *Ann Surg.* 2015;262(2):331-7.
26. Haskins IN, Fleshman JW, Amdur RL, Agarwal S. The impact of bowel preparation on the severity of anastomotic leak in colon cancer patients. *J Surg Oncol.* 2016;114(7):810-3.
27. Ceran C, Aksoy RT, Gulbahar O, Ozturk F. The effects of ghrelin on colonic anastomosis healing in rats. *Clinics (Sao Paulo).* 2013;68(2):239-44.
28. Thompson SK, Chang EY, Jobe BA. Clinical review: Healing in gastrointestinal anastomoses, part I. *Microsurgery.* 2006;26(3):131-6.
29. Kondo T, Ishida Y. Molecular pathology of wound healing. *Forensic Sci Int.* 2010;203(1-3):93-8.

30. Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med.* 1999;341(10):738-46.
31. Rijcken E, Sachs L, Fuchs T, Spiegel HU, Neumann PA. Growth factors and gastrointestinal anastomotic healing. *J Surg Res.* 2014;187(1):202-10.
32. Thornton FJ, Barbul A. Healing in the gastrointestinal tract. *Surg Clin North Am.* 1997;77(3):549-73.
33. Iizuka M, Konno S. Wound healing of intestinal epithelial cells. *World J Gastroenterol.* 2011;17(17):2161-71.
34. Kosmidis C, Efthimiadis C, Anthimidis G, Basdanis G, Apostolidis S, Hytioglou P, et al. Myofibroblasts and colonic anastomosis healing in Wistar rats. *BMC Surg.* 2011;11:6.
35. Martens MF, Hendriks T. Postoperative changes in collagen synthesis in intestinal anastomoses of the rat: differences between small and large bowel. *Gut.* 1991;32(12):1482-7.
36. Bosmans JW, Jongen AC, Bouvy ND, Derikx JP. Colorectal anastomotic healing: why the biological processes that lead to anastomotic leakage should be revealed prior to conducting intervention studies. *BMC Gastroenterol.* 2015;15:180.
37. Rich A, Crick FH. The structure of collagen. *Nature.* 1955;176(4489):915-6.
38. Ramachandran GN, Kartha G. Structure of collagen. *Nature.* 1955;176(4482):593-5.
39. Ricard-Blum S. The collagen family. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011;3(1):a004978.
40. Bella J. Collagen structure: new tricks from a very old dog. *Biochem J.* 2016;473(8):1001-25.
41. Fallas JA, Gauba V, Hartgerink JD. Solution structure of an ABC collagen heterotrimer reveals a single-register helix stabilized by electrostatic interactions. *J Biol Chem.* 2009;284(39):26851-9.
42. Gordon MK, Hahn RA. Collagens. *Cell Tissue Res.* 2010;339(1):247-57.
43. Trackman PC. Diverse biological functions of extracellular collagen processing enzymes. *J Cell Biochem.* 2005;96(5):927-37.

44. Li X, Wu Z, Ni J, Liu Y, Meng J, Yu W, et al. Cathepsin B Regulates Collagen Expression by Fibroblasts via Prolonging TLR2/NF-kappaB Activation. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:7894247.
45. Buth H, Luigi Buttigieg P, Ostafe R, Rehders M, Dannenmann SR, Schaschke N, et al. Cathepsin B is essential for regeneration of scratch-wounded normal human epidermal keratinocytes. *Eur J Cell Biol*. 2007;86(11-12):747-61.
46. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*. 1999;402(6762):656-60.
47. Sato T, Nakamura Y, Shiimura Y, Ohgusu H, Kangawa K, Kojima M. Structure, regulation and function of ghrelin. *J Biochem*. 2012;151(2):119-28.
48. Kineman RD, Kamegai J, Frohman LA. Growth hormone (GH)-releasing hormone (GHRH) and the GH secretagogue (GHS), L692,585, differentially modulate rat pituitary GHS receptor and GHRH receptor messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology*. 1999;140(8):3581-6.
49. Bowers CY. Growth hormone-releasing peptide (GHRP). *Cell Mol Life Sci*. 1998;54(12):1316-29.
50. Bowers CY, Reynolds GA, Momany FA. New advances on the regulation of growth hormone (GH) secretion. *Int J Neurol*. 1984;18:188-205.
51. Bowers CY, Momany FA, Reynolds GA, Hong A. On the in vitro and in vivo activity of a new synthetic hexapeptide that acts on the pituitary to specifically release growth hormone. *Endocrinology*. 1984;114(5):1537-45.
52. Laferrere B, Abraham C, Russell CD, Bowers CY. Growth hormone releasing peptide-2 (GHRP-2), like ghrelin, increases food intake in healthy men. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(2):611-4.
53. Howard AD, Feighner SD, Cully DF, Arena JP, Liberatore PA, Rosenblum CI, et al. A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science*. 1996;273(5277):974-7.
54. Kojima M, Kangawa K. [Structure and function of ghrelin]. *Seikagaku*. 2007;79(9):853-67.

55. Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K. Purification and characterization of rat des-Gln14-Ghrelin, a second endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. *J Biol Chem.* 2000;275(29):21995-2000.
56. Hosoda H, Kojima M, Mizushima T, Shimizu S, Kangawa K. Structural divergence of human ghrelin. Identification of multiple ghrelin-derived molecules produced by post-translational processing. *J Biol Chem.* 2003;278(1):64-70.
57. Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin and des-acyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;279(3):909-13.
58. Yang J, Brown MS, Liang G, Grishin NV, Goldstein JL. Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone. *Cell.* 2008;132(3):387-96.
59. Ohgusu H, Shirouzu K, Nakamura Y, Nakashima Y, Ida T, Sato T, et al. Ghrelin O-acyltransferase (GOAT) has a preference for n-hexanoyl-CoA over n-octanoyl-CoA as an acyl donor. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;386(1):153-8.
60. Barnett BP, Hwang Y, Taylor MS, Kirchner H, Pfluger PT, Bernard V, et al. Glucose and weight control in mice with a designed ghrelin O-acyltransferase inhibitor. *Science.* 2010;330(6011):1689-92.
61. Teuffel P, Wang L, Prinz P, Goebel-Stengel M, Scharner S, Kobelt P, et al. Treatment with the ghrelin-O-acyltransferase (GOAT) inhibitor GO-CoA-Tat reduces food intake by reducing meal frequency in rats. *J Physiol Pharmacol.* 2015;66(4):493-503.
62. Gnanapavan S, Kola B, Bustin SA, Morris DG, McGee P, Fairclough P, et al. The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(6):2988.
63. Gronberg M, Tsolakis AV, Magnusson L, Janson ET, Saras J. Distribution of obestatin and ghrelin in human tissues: immunoreactive cells in the gastrointestinal tract, pancreas, and mammary glands. *J Histochem Cytochem.* 2008;56(9):793-801.
64. Lyra HF, Jr., Schiavon Lde L, Vieira DS, Teive AM, Costa A, Onzi TR, et al. Evaluation of immunohistochemical expression of

ghrelin-producing rectal cells in Wistar rats receiving the cafeteria diet. *Acta Cir Bras.* 2013;28(8):614-8.

65. Teive MB, Russi RF, Vieira DS, Teive AM, Costa A, d'Acampora AJ. Quantitative immunohistochemical analysis of duodenal ghrelin cells after sleeve gastrectomy in Wistar rats. *Acta Cir Bras.* 2012;27(9):595-9.

66. Guan XM, Yu H, Palyha OC, McKee KK, Feighner SD, Sirinathsinghji DJ, et al. Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. *Brain Res Mol Brain Res.* 1997;48(1):23-9.

67. Date Y, Nakazato M, Hashiguchi S, Dezaki K, Mondal MS, Hosoda H, et al. Ghrelin is present in pancreatic alpha-cells of humans and rats and stimulates insulin secretion. *Diabetes.* 2002;51(1):124-9.

68. Janiuk I, Kaleczyc J, Kasacka I. Ghrelin-immunoreactive cells in the gastrointestinal tract of hypertensive rats. *Folia Histochem Cytobiol.* 2016;54(4):181-5.

69. Date Y, Kojima M, Hosoda H, Sawaguchi A, Mondal MS, Suganuma T, et al. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology.* 2000;141(11):4255-61.

70. Rindi G, Necchi V, Savio A, Torsello A, Zoli M, Locatelli V, et al. Characterisation of gastric ghrelin cells in man and other mammals: studies in adult and fetal tissues. *Histochem Cell Biol.* 2002;117(6):511-9.

71. Ariyasu H, Takaya K, Tagami T, Ogawa Y, Hosoda K, Akamizu T, et al. Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(10):4753-8.

72. Dornonville de la Cour C, Bjorkqvist M, Sandvik AK, Bakke I, Zhao CM, Chen D, et al. A-like cells in the rat stomach contain ghrelin and do not operate under gastrin control. *Regul Pept.* 2001;99(2-3):141-50.

73. Sakata I, Nakamura K, Yamazaki M, Matsubara M, Hayashi Y, Kangawa K, et al. Ghrelin-producing cells exist as two types of cells,

- closed- and opened-type cells, in the rat gastrointestinal tract. *Peptides*. 2002;23(3):531-6.
74. Sakata I, Sakai T. Ghrelin cells in the gastrointestinal tract. *Int J Pept*. 2010;2010.
75. Venables G, Hunne B, Bron R, Cho HJ, Brock JA, Furness JB. Ghrelin receptors are expressed by distal tubules of the mouse kidney. *Cell Tissue Res*. 2011;346(1):135-9.
76. Nikolopoulos D, Theocharis S, Moutsios-Rentzos A, Kouraklis G, Kostakis A. The role of serum total ghrelin level elevation in colon cancer patients. *J BUON*. 2014;19(2):388-93.
77. Lien GS, Lin CH, Yang YL, Wu MS, Chen BC. Ghrelin induces colon cancer cell proliferation through the GHS-R, Ras, PI3K, Akt, and mTOR signaling pathways. *Eur J Pharmacol*. 2016;776:124-31.
78. Tian C, Zhang L, Hu D, Ji J. Ghrelin induces gastric cancer cell proliferation, migration, and invasion through GHS-R/NF-kappaB signaling pathway. *Mol Cell Biochem*. 2013;382(1-2):163-72.
79. Gurgul E, Kasprzak A, Blaszczyk A, Biczysko M, Surdyk-Zasada J, Seraszek-Jaros A, et al. Ghrelin and obestatin in thyroid gland - immunohistochemical expression in nodular goiter, papillary and medullary cancer. *Folia Histochem Cytobiol*. 2015;53(1):19-25.
80. Skibola DR, Smith MT, Bracci PM, Hubbard AE, Agana L, Chi S, et al. Polymorphisms in ghrelin and neuropeptide Y genes are associated with non-Hodgkin lymphoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005;14(5):1251-6.
81. Cummings DE, Frayo RS, Marmonier C, Aubert R, Chapelot D. Plasma ghrelin levels and hunger scores in humans initiating meals voluntarily without time- and food-related cues. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2004;287(2):E297-304.
82. Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes*. 2001;50(8):1714-9.
83. Shiiya T, Nakazato M, Mizuta M, Date Y, Mondal MS, Tanaka M, et al. Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(1):240-4.

84. Shiiya T, Ueno H, Toshinai K, Kawagoe T, Naito S, Tobina T, et al. Significant lowering of plasma ghrelin but not des-acyl ghrelin in response to acute exercise in men. *Endocr J*. 2011;58(5):335-42.
85. Xu L, Gong Y, Wang H, Sun X, Guo F, Gao S, et al. The stimulating effect of ghrelin on gastric motility and firing activity of gastric-distension-sensitive hippocampal neurons and its underlying regulation by the hypothalamus. *Exp Physiol*. 2014;99(1):123-35.
86. Erdmann J, Lippl F, Schusdziarra V. Differential effect of protein and fat on plasma ghrelin levels in man. *Regul Pept*. 2003;116(1-3):101-7.
87. Muller TD, Nogueiras R, Andermann ML, Andrews ZB, Anker SD, Argente J, et al. Ghrelin. *Mol Metab*. 2015;4(6):437-60.
88. Tamboli RA, Antoun J, Sidani RM, Clements BA, Eckert EA, Marks-Shulman P, et al. Metabolic responses to exogenous ghrelin in obesity and early after Roux-en-Y gastric bypass in humans. *Diabetes Obes Metab*. 2017.
89. Krsek M, Rosicka M, Haluzik M, Svobodova J, Kotrlikova E, Justova V, et al. Plasma ghrelin levels in patients with short bowel syndrome. *Endocr Res*. 2002;28(1-2):27-33.
90. Yi CX, Heppner K, Tschop MH. Ghrelin in eating disorders. *Mol Cell Endocrinol*. 2011;340(1):29-34.
91. Dzaja A, Dalal MA, Himmerich H, Uhr M, Pollmacher T, Schuld A. Sleep enhances nocturnal plasma ghrelin levels in healthy subjects. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2004;286(6):E963-7.
92. Takaya K, Ariyasu H, Kanamoto N, Iwakura H, Yoshimoto A, Harada M, et al. Ghrelin strongly stimulates growth hormone release in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85(12):4908-11.
93. Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K, et al. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature*. 2001;409(6817):194-8.
94. Date Y, Nakazato M, Murakami N, Kojima M, Kangawa K, Matsukura S. Ghrelin acts in the central nervous system to stimulate gastric acid secretion. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;280(3):904-7.

95. Williams DL, Grill HJ, Cummings DE, Kaplan JM. Vagotomy dissociates short- and long-term controls of circulating ghrelin. *Endocrinology*. 2003;144(12):5184-7.
96. Hataya Y, Akamizu T, Takaya K, Kanamoto N, Ariyasu H, Saijo M, et al. A low dose of ghrelin stimulates growth hormone (GH) release synergistically with GH-releasing hormone in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(9):4552.
97. Masuda Y, Tanaka T, Inomata N, Ohnuma N, Tanaka S, Itoh Z, et al. Ghrelin stimulates gastric acid secretion and motility in rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;276(3):905-8.
98. Yakabi K, Kawashima J, Kato S. Ghrelin and gastric acid secretion. *World J Gastroenterol*. 2008;14(41):6334-8.
99. Miki K, Maekura R, Nagaya N, Kitada S, Miki M, Yoshimura K, et al. Effects of ghrelin treatment on exercise capacity in underweight COPD patients: a substudy of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial of ghrelin treatment. *BMC Pulm Med*. 2013;13:37.
100. Nagaya N, Kojima M, Uematsu M, Yamagishi M, Hosoda H, Oya H, et al. Hemodynamic and hormonal effects of human ghrelin in healthy volunteers. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2001;280(5):R1483-7.
101. Lin Y, Matsumura K, Fukuhara M, Kagiya S, Fujii K, Iida M. Ghrelin acts at the nucleus of the solitary tract to decrease arterial pressure in rats. *Hypertension*. 2004;43(5):977-82.
102. Miki K, Maekura R, Nagaya N, Nakazato M, Kimura H, Murakami S, et al. Ghrelin treatment of cachectic patients with chronic obstructive pulmonary disease: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *PLoS One*. 2012;7(5):e35708.
103. Gasco V, Beccuti G, Marotta F, Benso A, Granata R, Broglio F, et al. Endocrine and metabolic actions of ghrelin. *Endocr Dev*. 2010;17:86-95.
104. Broglio F, Arvat E, Benso A, Gottero C, Muccioli G, Papotti M, et al. Ghrelin, a natural GH secretagogue produced by the stomach, induces hyperglycemia and reduces insulin secretion in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(10):5083-6.

105. Fukushima N, Hanada R, Teranishi H, Fukue Y, Tachibana T, Ishikawa H, et al. Ghrelin directly regulates bone formation. *J Bone Miner Res.* 2005;20(5):790-8.
106. Delhanty PJ, van der Eerden BC, van Leeuwen JP. Ghrelin and bone. *Biofactors.* 2014;40(1):41-8.
107. Carrasco F, Basfi-Fer K, Rojas P, Valencia A, Csendes A, Codoceo J, et al. Changes in bone mineral density after sleeve gastrectomy or gastric bypass: relationships with variations in vitamin D, ghrelin, and adiponectin levels. *Obes Surg.* 2014;24(6):877-84.
108. Lin L, Lee JH, Buras ED, Yu K, Wang R, Smith CW, et al. Ghrelin receptor regulates adipose tissue inflammation in aging. *Aging (Albany NY).* 2016;8(1):178-91.
109. Hattori N. Expression, regulation and biological actions of growth hormone (GH) and ghrelin in the immune system. *Growth Horm IGF Res.* 2009;19(3):187-97.
110. Hattori N, Saito T, Yagyu T, Jiang BH, Kitagawa K, Inagaki C. GH, GH receptor, GH secretagogue receptor, and ghrelin expression in human T cells, B cells, and neutrophils. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(9):4284-91.
111. Otero M, Nogueiras R, Lago F, Dieguez C, Gomez-Reino JJ, Gualillo O. Chronic inflammation modulates ghrelin levels in humans and rats. *Rheumatology (Oxford).* 2004;43(3):306-10.
112. Kodama T, Ashitani J, Matsumoto N, Kangawa K, Nakazato M. Ghrelin treatment suppresses neutrophil-dominant inflammation in airways of patients with chronic respiratory infection. *Pulm Pharmacol Ther.* 2008;21(5):774-9.
113. Waseem T, Duxbury M, Ito H, Ashley SW, Robinson MK. Exogenous ghrelin modulates release of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in LPS-stimulated macrophages through distinct signaling pathways. *Surgery.* 2008;143(3):334-42.
114. Matuszyk A, Ceranowicz P, Warzecha Z, Cieszkowski J, Ceranowicz D, Galazka K, et al. Exogenous Ghrelin Accelerates the Healing of Acetic Acid-Induced Colitis in Rats. *Int J Mol Sci.* 2016;17(9).
115. Onishi S, Kaji T, Yamada W, Nakame K, Moriguchi T, Sugita K, et al. The administration of ghrelin improved hepatocellular injury

following parenteral feeding in a rat model of short bowel syndrome. *Pediatr Surg Int.* 2016;32(12):1165-71.

116. Qin Y, Li Z, Wang Z, Li Y, Zhao J, Mulholland M, et al. Ghrelin contributes to protection of hepatocellular injury induced by ischaemia/reperfusion. *Liver Int.* 2014;34(4):567-75.

117. Warzecha Z, Dembinski A. Protective and therapeutic effects of ghrelin in the gut. *Curr Med Chem.* 2012;19(1):118-25.

118. Sibilina V, Rindi G, Pagani F, Rapetti D, Locatelli V, Torsello A, et al. Ghrelin protects against ethanol-induced gastric ulcers in rats: studies on the mechanisms of action. *Endocrinology.* 2003;144(1):353-9.

119. Konturek PC, Brzozowski T, Walter B, Burnat G, Hess T, Hahn EG, et al. Ghrelin-induced gastroprotection against ischemia-reperfusion injury involves an activation of sensory afferent nerves and hyperemia mediated by nitric oxide. *Eur J Pharmacol.* 2006;536(1-2):171-81.

120. Brzozowski T, Konturek PC, Sliwowski Z, Pajdo R, Drozdowicz D, Kwiecien S, et al. Prostaglandin/cyclooxygenase pathway in ghrelin-induced gastroprotection against ischemia-reperfusion injury. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006;319(1):477-87.

121. Ercan S, Basaranlar G, Gungor NE, Kencebay C, Sahin P, Celik-Ozenci C, et al. Ghrelin inhibits sodium metabisulfite induced oxidative stress and apoptosis in rat gastric mucosa. *Food Chem Toxicol.* 2013;56:154-61.

122. Bukowczan J, Warzecha Z, Ceranowicz P, Kusnierz-Cabala B, Tomaszewska R, Dembinski A. Therapeutic effect of ghrelin in the course of ischemia/reperfusion-induced acute pancreatitis. *Curr Pharm Des.* 2015;21(17):2284-90.

123. Golestan Jahromi M, Nabavizadeh F, Vahedian J, Nahrevanian H, Dehpour AR, Zare-Mehrjardi A. Protective effect of ghrelin on acetaminophen-induced liver injury in rat. *Peptides.* 2010;31(11):2114-7.

124. Jaworek J, Konturek SJ. Hormonal protection in acute pancreatitis by ghrelin, leptin and melatonin. *World J Gastroenterol.* 2014;20(45):16902-12.

125. Wu R, Dong W, Ji Y, Zhou M, Marini CP, Ravikumar TS, et al. Orexigenic hormone ghrelin attenuates local and remote organ injury after intestinal ischemia-reperfusion. *PLoS One.* 2008;3(4):e2026.

126. Sen LS, Karakoyun B, Yegen C, Akkiprik M, Yuksel M, Ercan F, et al. Treatment with either obestatin or ghrelin attenuates mesenteric ischemia-reperfusion-induced oxidative injury of the ileum and the remote organ lung. *Peptides*. 2015;71:8-19.
127. Cheng J, Zhang L, Dai W, Mao Y, Li S, Wang J, et al. Ghrelin ameliorates intestinal barrier dysfunction in experimental colitis by inhibiting the activation of nuclear factor-kappa B. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;458(1):140-7.
128. Konturek PC, Brzozowski T, Engel M, Burnat G, Gaca P, Kwiecien S, et al. Ghrelin ameliorates colonic inflammation. Role of nitric oxide and sensory nerves. *J Physiol Pharmacol*. 2009;60(2):41-7.
129. Giustarini D, Dalle-Donne I, Tsikas D, Rossi R. Oxidative stress and human diseases: Origin, link, measurement, mechanisms, and biomarkers. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2009;46(5-6):241-81.
130. Valko M, Jomova K, Rhodes CJ, Kuca K, Musilek K. Redox- and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease. *Arch Toxicol*. 2016;90(1):1-37.
131. Soneja A, Drews M, Malinski T. Role of nitric oxide, nitroxidative and oxidative stress in wound healing. *Pharmacol Rep*. 2005;57 Suppl:108-19.
132. Jomova K, Valko M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*. 2011;283(2-3):65-87.
133. Maia LB, Moura JJ. Detection of Nitric Oxide by Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy: Spin-Trapping with Iron-Dithiocarbamates. *Methods Mol Biol*. 2016;1424:81-102.
134. Luo JD, Chen AF. Nitric oxide: a newly discovered function on wound healing. *Acta Pharmacol Sin*. 2005;26(3):259-64.
135. Schafer M, Werner S. Oxidative stress in normal and impaired wound repair. *Pharmacol Res*. 2008;58(2):165-71.
136. 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.
137. Limon-Pacheco J, Gonsebatt ME. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutat Res*. 2009;674(1-2):137-47.

138. Nguyen T, Nioi P, Pickett CB. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *J Biol Chem.* 2009;284(20):13291-5.
139. Niedzielska E, Smaga I, Gawlik M, Moniczewski A, Stankowicz P, Pera J, et al. Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol.* 2016;53(6):4094-125.
140. Loperena R, Harrison DG. Oxidative Stress and Hypertensive Diseases. *Med Clin North Am.* 2017;101(1):169-93.
141. Umeno A, Biju V, Yoshida Y. In vivo ROS production and use of oxidative stress-derived biomarkers to detect the onset of diseases such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and diabetes. *Free Radic Res.* 2017:1-41.
142. Sallam N, Laher I. Exercise Modulates Oxidative Stress and Inflammation in Aging and Cardiovascular Diseases. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:7239639.
143. Toyokuni S. Oxidative stress as an iceberg in carcinogenesis and cancer biology. *Arch Biochem Biophys.* 2016;595:46-9.
144. Ojalvo AG, Acosta JB, Mari YM, Mayola MF, Perez CV, Gutierrez WS, et al. Healing enhancement of diabetic wounds by locally infiltrated epidermal growth factor is associated with systemic oxidative stress reduction. *Int Wound J.* 2017;14(1):214-25.
145. Gill JG, Piskounova E, Morrison SJ. Cancer, Oxidative Stress, and Metastasis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2017.
146. Dunnill C, Patton T, Brennan J, Barrett J, Dryden M, Cooke J, et al. Reactive oxygen species (ROS) and wound healing: the functional role of ROS and emerging ROS-modulating technologies for augmentation of the healing process. *Int Wound J.* 2017;14(1):89-96.
147. Sen CK, Roy S. Redox signals in wound healing. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1780(11):1348-61.
148. Sen CK. The general case for redox control of wound repair. *Wound Repair Regen.* 2003;11(6):431-8.
149. Wlaschek M, Scharffetter-Kochanek K. Oxidative stress in chronic venous leg ulcers. *Wound Repair Regen.* 2005;13(5):452-61.

150. Avci E, Akarslan ZZ, Erten H, Coskun-Cevher S. Oxidative stress and cellular immunity in patients with recurrent aphthous ulcers. *Braz J Med Biol Res.* 2014;47(5):355-60.
151. Deveci M, Gilmont RR, Dunham WR, Mudge BP, Smith DJ, Marcelo CL. Glutathione enhances fibroblast collagen contraction and protects keratinocytes from apoptosis in hyperglycaemic culture. *Br J Dermatol.* 2005;152(2):217-24.
152. Sureda A, Batle JM, Martorell M, Capo X, Tejada S, Tur JA, et al. Antioxidant Response of Chronic Wounds to Hyperbaric Oxygen Therapy. *PLoS One.* 2016;11(9):e0163371.
153. El Eter E, Al Tuwaijiri A, Hagar H, Arafa M. In vivo and in vitro antioxidant activity of ghrelin: Attenuation of gastric ischemic injury in the rat. *J Gastroenterol Hepatol.* 2007;22(11):1791-9.
154. Jo HS, Kim DS, Ahn EH, Kim DW, Shin MJ, Cho SB, et al. Protective effects of Tat-NQO1 against oxidative stress-induced HT-22 cell damage, and ischemic injury in animals. *BMB Rep.* 2016;49(11):617-22.
155. Jin X, Xu Z, Fan R, Wang C, Ji W, Ma Y, et al. HO1 alleviates cholesterolinduced oxidative stress through activation of Nrf2/ERK and inhibition of PI3K/AKT pathways in endothelial cells. *Mol Med Rep.* 2017;16(3):3519-27.
156. Paiva FP, Mafilli VV, Santos ACS. *Curso de Manipulação de Animais de Laboratório.* FIOCRUZ, editor. Salvador- BA: FIOCRUZ; 2005.
157. Duraes Lde C, Duraes EF, Lobato LF, Oliveira PG, Sousa JB. Correlation between bursting pressure and breaking strength in colonic anastomosis. *Acta Cir Bras.* 2013;28(6):447-52.
158. Biert J, Seifert WF, Verhofstad AA, Wobbes T, de Man BM, Hoogenhout J, et al. A semiquantitative histological analysis of repair of anastomoses in the rat colon after combined preoperative irradiation and local hyperthermia. *Radiat Res.* 1998;149(4):372-7.
159. Cissell DD, Link JM, Hu JC, Athanasiou KA. A Modified Hydroxyproline Assay Based on Hydrochloric Acid in Ehrlich's Solution Accurately Measures Tissue Collagen Content. *Tissue Eng Part C Methods.* 2017;23(4):243-50.

160. Shacter E, Williams JA, Lim M, Levine RL. Differential susceptibility of plasma proteins to oxidative modification: examination by western blot immunoassay. *Free Radic Biol Med.* 1994;17(5):429-37.
161. Hissin PJ, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem.* 1976;74(1):214-26.
162. Chae SY, Lee M, Kim SW, Bae YH. Protection of insulin secreting cells from nitric oxide induced cellular damage by crosslinked hemoglobin. *Biomaterials.* 2004;25(5):843-50.
163. Choi HS, Kim JW, Cha YN, Kim C. A quantitative nitroblue tetrazolium assay for determining intracellular superoxide anion production in phagocytic cells. *J Immunoassay Immunochem.* 2006;27(1):31-44.
164. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265-75.
165. Liu C, Hao Y, Huang J, Li H, Yang Z, Zeng Y, et al. Ghrelin accelerates wound healing in combined radiation and wound injury in mice. *Exp Dermatol.* 2016.
166. Ersahin M, Toklu HZ, Erzik C, Cetinel S, Akakin D, Velioglu-Ogunc A, et al. The anti-inflammatory and neuroprotective effects of ghrelin in subarachnoid hemorrhage-induced oxidative brain damage in rats. *J Neurotrauma.* 2010;27(6):1143-55.
167. Warzecha Z, Ceranowicz D, Dembinski A, Ceranowicz P, Cieszkowski J, Kuwahara A, et al. Ghrelin accelerates the healing of cysteamine-induced duodenal ulcers in rats. *Med Sci Monit.* 2012;18(5):BR181-7.
168. Ceranowicz P, Warzecha Z, Dembinski A, Sendur R, Cieszkowski J, Ceranowicz D, et al. Treatment with ghrelin accelerates the healing of acetic acid-induced gastric and duodenal ulcers in rats. *J Physiol Pharmacol.* 2009;60(1):87-98.
169. Warzecha Z, Kownacki P, Ceranowicz P, Dembinski M, Cieszkowski J, Dembinski A. Ghrelin accelerates the healing of oral ulcers in non-sialoadenectomized and sialoadenectomized rats. *J Physiol Pharmacol.* 2013;64(5):657-68.

170. Yu S, Wang S, Wang C, Yan J, Qiu WC, Zheng Q. Ghrelin promote partial the early recovery of rats after subtotal gastrectomy. *Afr J Pharm Pharmacol*. 2011;5(5):658-63.
171. Dixit VD, Schaffer EM, Pyle RS, Collins GD, Sakthivel SK, Palaniappan R, et al. Ghrelin inhibits leptin- and activation-induced proinflammatory cytokine expression by human monocytes and T cells. *J Clin Invest*. 2004;114(1):57-66.
172. Wu R, Dong W, Cui X, Zhou M, Simms HH, Ravikumar TS, et al. Ghrelin down-regulates proinflammatory cytokines in sepsis through activation of the vagus nerve. *Ann Surg*. 2007;245(3):480-6.
173. Wei H, Cao X, Zeng Q, Zhang F, Xue Q, Luo Y, et al. Ghrelin inhibits proinflammatory responses and prevents cognitive impairment in septic rats. *Crit Care Med*. 2015;43(5):e143-50.
174. Li Y, Hai J, Li L, Chen X, Peng H, Cao M, et al. Administration of ghrelin improves inflammation, oxidative stress, and apoptosis during and after non-alcoholic fatty liver disease development. *Endocrine*. 2013;43(2):376-86.
175. Hao Y, Liu C, Huang J, Gu Y, Li H, Yang Z, et al. Ghrelin protects against depleted uranium-induced apoptosis of MC3T3-E1 cells through oxidative stress-mediated p38-mitogen-activated protein kinase pathway. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2016;290:116-25.
176. Taati M, Moghadasi M, Dezfoulian O, Asadian P, Zendehtdel M. Effects of Ghrelin on germ cell apoptosis and proinflammatory cytokines production in Ischemia-reperfusion of the rat testis. *Iran J Reprod Med*. 2015;13(2):85-92.
177. Miyoshi H. Wnt-expressing cells in the intestines: guides for tissue remodeling. *J Biochem*. 2017;161(1):19-25.
178. Miyoshi H, Ajima R, Luo CT, Yamaguchi TP, Stappenbeck TS. Wnt5a potentiates TGF-beta signaling to promote colonic crypt regeneration after tissue injury. *Science*. 2012;338(6103):108-13.
179. Janda J, Nfonsam V, Calienes F, Sligh JE, Jandova J. Modulation of ROS levels in fibroblasts by altering mitochondria regulates the process of wound healing. *Arch Dermatol Res*. 2016;308(4):239-48.
180. Bryan N, Ahswin H, Smart N, Bayon Y, Wohler 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.
181. Mitrovic A, Mirkovic B, Sosic I, Gobec S, Kos J. Inhibition of endopeptidase and exopeptidase activity of cathepsin B impairs extracellular matrix degradation and tumour invasion. *Biol Chem.* 2016;397(2):165-74.
182. Dieci E, Casati L, Pagani F, Celotti F, Sibilina V. Acylated and unacylated ghrelin protect MC3T3-E1 cells against tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative injury: pharmacological characterization of ghrelin receptor and possible epigenetic involvement. *Amino Acids.* 2014;46(7):1715-25.
183. Tong XX, Wu D, Wang X, Chen HL, Chen JX, Wang XX, et al. Ghrelin protects against cobalt chloride-induced hypoxic injury in cardiac H9c2 cells by inhibiting oxidative stress and inducing autophagy. *Peptides.* 2012;38(2):217-27.
184. Okamoto T, Akaike T, Nagano T, Miyajima S, Suga M, Ando M, et al. Activation of human neutrophil procollagenase by nitrogen dioxide and peroxynitrite: a novel mechanism for procollagenase activation involving nitric oxide. *Arch Biochem Biophys.* 1997;342(2):261-74.
185. Chen XL, Kunsch C. Induction of cytoprotective genes through Nrf2/antioxidant response element pathway: a new therapeutic approach for the treatment of inflammatory diseases. *Curr Pharm Des.* 2004;10(8):879-91.
186. Hosur V, Burzenski LM, Stearns TM, Farley ML, Sundberg JP, Wiles MV, et al. Early induction of NRF2 antioxidant pathway by RHBDF2 mediates rapid cutaneous wound healing. *Exp Mol Pathol.* 2017;102(2):337-46.
187. Zou X, Feng Z, Li Y, Wang Y, Wertz K, Weber P, et al. Stimulation of GSH synthesis to prevent oxidative stress-induced apoptosis by hydroxytyrosol in human retinal pigment epithelial cells: activation of Nrf2 and JNK-p62/SQSTM1 pathways. *J Nutr Biochem.* 2012;23(8):994-1006.
188. Park WH. Antiapoptotic effects of caspase inhibitors on H₂O₂-treated lung cancer cells concerning oxidative stress and GSH. *Mol Cell Biochem.* 2017.

189. Laberge RM, Karwatsky J, Lincoln MC, Leimanis ML, Georges E. Modulation of GSH levels in ABCC1 expressing tumor cells triggers apoptosis through oxidative stress. *Biochem Pharmacol.* 2007;73(11):1727-37.
190. Sentellas S, Morales-Ibanez O, Zanuy M, Alberti JJ. GSSG/GSH ratios in cryopreserved rat and human hepatocytes as a biomarker for drug induced oxidative stress. *Toxicol In Vitro.* 2014;28(5):1006-15.

**ANEXO A – PROTOCOLO APROVADO PELO
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA - UFSC**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA

Florianópolis, 14 de fevereiro de 2014.

Memorando nº 003/CLC/14.

Do: Departamento de Cirurgia

Ao: Comitê de Ética em Pesquisa com Animais

Vimos pelo presente, informar que o projeto de pesquisa intitulado "Estudo da influência da grelina no processo cicatricial e estresse oxidativo nas anastomoses colônicas em ratos" do médico Humberto Fenner Lyra Junior, com a finalidade de elaborar tese de doutorado no Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas/UFSC, tendo como orientador o Prof. Dr. Armando José d'Acampora, foi **aprovado** em reunião do Colegiado do Departamento de Cirurgia, realizada no dia 05/12/2013.

Atenciosamente,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'marcelo teive', is written over the typed name.

Prof. Dr. Marcelo Bianchini Teive
Subchefe do Departamento de Cirurgia

Prof. Marcelo Bianchini Teive
Subchefe do Departamento de Cirurgia
CLC/CCS/UFSC
Portaria nº 799/GR/2012

ANEXO B – PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO PELA CEUA – UFSC

Resultado de Solicitação de Protocolo

Protocolo

PP00915

Título

ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA GRELINA NO PROCESSO CICATRICIAL E ESTRESSE OXIDATIVO NAS ANASTOMOSES COLÔNICAS EM RATOS.

Data de Entrada

15/02/2014

Resultado:

Aprovado

Data/Prazo

29/05/2014

Considerações

Ofício nº 146/CEUA/PROPESQ/2014

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

Ao(à): Prof(a) Dr(a) Armando José d'Acampora - Departamento de Clínica Cirúrgica - CCS

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao projeto de pesquisa sob sua responsabilidade o presidente da CEUA deliberou segundo o parecer de dois relatores, pela:

- APROVAÇÃO para a utilização de 36 ratos (*Rattus norvegicus*) pelo período de 4 anos a contar da data deste credenciamento.

- vide pareceres em anexo;

Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)

Data 29/08/2018

Data 29/05/2014

Parecer(es):



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

ANEXO C – APROVAÇÃO DE SUPLEMENTAÇÃO DE ANIMAIS PELA CEUA - UFSC

Resultado de Solicitação de Protocolo

Protocolo

PP00915

Título

ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA GRELINA NO PROCESSO CICATRICIAL E ESTRESSE OXIDATIVO NAS ANASTOMOSES COLÔNICAS EM RATOS.

Data de Entrada

15/02/2014

Resultado:

Aprovado

Data/Prazo

10/04/2015

Considerações

Ofício nº 021/CEUA/PROPESQ/2015

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

Ao(à): Prof(a) Dr(a) , Armando José d'Acampora - Departamento de Clínica Cirúrgica – CCS

Prezado(a) Professor(a),

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

- APROVADO adendo de suplementação de dezesseis ratos (*Rattus Norvegicus*).

Adita-se o Ofício nº 208/CEUA/PROPESQ/2014

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

Ao(à): Prof(a) Dr(a), Armando José d'Acampora - Departamento de Clínica Cirúrgica - CCS

Prezado(a) Professor(a),

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

- APROVADO o adendo de suplementação de dezoito ratos (*Rattus Norvegicus*).

Adita-se o Ofício nº 146/CEUA/PROPESQ/2014

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

Ao(à): Prof(a) Dr(a) Armando José d'Acampora - Departamento de Clínica Cirúrgica - CCS

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao projeto de pesquisa sob sua responsabilidade o presidente da CEUA deliberou segundo o parecer de dois relatores, pela:

- APROVAÇÃO para a utilização de 36 ratos (*Rattus norvegicus*) pelo período de 4 anos a contar da data deste credenciamento.

Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)

Data 29/08/2015

Data 13/04/2015

Parecer(es):

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