Mônica Mazzurana

**Avaliação da expressão da HSP70, da deposição do
colágeno e das células inflamatórias nas anastomoses
intestinais de ratos hipovolêmicos**

Tese apresentada ao Departamento de Clínica
Médica da Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para a obtenção do
título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Emergências Clínicas
Orientador: Prof. Dr. Fábio Pinatel Lopasso

São Paulo

2007

DEDICATÓRIAS

A Deus,

Por mostrar-me o caminho das realizações
mais íntimas, por conceder-me uma
família maravilhosa e amigos sinceros.

Ao Gustavo, de compreensão imensurável,

Por me oferecer
o prazer de conhecer o
verdadeiro amor.

Ao meu pai e à minha mãe,

Pelo exemplo de família
que souberam construir;
por se amarem tanto e
pelos valores que me ensinaram.

À Elisa e ao Pedro,

Por serem meus irmãos amados,
exemplos de vida, amor e carinho.

Aos meus amigos,

Parte fundamental da minha vida,
pela paciência nas horas difíceis.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Fábio Pinatel Lopasso, orientador desta tese, pelo incansável auxílio na elaboração e melhor condução deste estudo, bem como por sua atenção, compreensão e amizade.

Ao Prof. Kiyoshi Irya pelo carinho, disponibilidade, atenção e auxílio nas decisões importantes sobre a metodologia deste estudo.

À Profa. Dra. Maria Teresa de Seixas Alves, pela ajuda nas avaliações do colágeno e por aceitar-me de braços abertos, proporcionando a resolução de um problema.

Ao Prof. Dr. Irineu Tadeu Velasco, pela oportunidade de realizar esta tese na Disciplina de Emergências Clínicas.

Ao Prof. Dr. Flair José Carillo, pela oportunidade de utilizar o LIM 07 (Gastroenterologia Clínica) na realização dos procedimentos cirúrgicos.

Ao Sr. Edson Pereira da Costa, pelo auxílio incansável em todos os procedimentos realizados nesta tese.

À Sra. Vicência Mara Rodrigues de Lima, pela colaboração nos procedimentos cirúrgicos.

À Dra. Adriana Bruscatto Bortoluzzo, pela acessibilidade e competência na análise estatística desta tese.

As Sras. Angélica Belem de Souza e Rose Cler Ferreira pela atenção oferecida durante todo o período de pós-graduação.

As Sras. Suely Kinimi Kuebo Ariga e Fátima Abatepaulo pela atenção e auxílio na leitura das lâminas da HSP70.

À Maria Nilce Pereira, pela carinhosa colaboração na redação final do texto.

À Edileuza da Silva Cunha e Rosely Domingues Barboza pela formação deste trabalho.

“Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, é porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra. Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha, e não nos deixa só, porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso”.

Charles Chaplin

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddt, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas	
Lista de tabelas	
Lista de figuras	
Lista de gráficos	
Resumo	
Summary	
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Anastomoses intestinais.....	3
1.1.1 Histórico.....	3
1.1.2 Deiscências das anastomoses colorretais.....	4
1.1.3 Influência da hipovolemia na cicatrização das anastomoses intestinais.....	7
1.1.4 Cicatrização das anastomoses intestinais.....	9
1.2 Colágeno.....	13
1.2.1 Síntese do colágeno.....	17
1.2.2 Método de Picrossírius-polarização.....	20
1.3 “Heat Shock Response”, expressão da HSP70 e anastomoses intestinais.....	22
2.OBJETIVOS.....	36
3.MÉTODOS.....	38
3.1 Animais.....	39
3.2 Local.....	39
3.3 Modelos experimentais.....	40
3.4 Delineamento experimental.....	42
3.4.1 Grupo branco – cólon direito e esquerdo.....	42
3.4.2 Grupo controle – cólons direito e esquerdo.....	43
3.4.3 Grupo desafio – cólon direito e esquerdo.....	44
3.5 Esquematização da coleta dos dados conforme o tempo.....	45
3.6 Esquematização da coleta dos dados nas reoperações.....	46

3.7 Estudo histológico.....	47
3.7.1 Processamento do material.....	47
3.7.2 Avaliação das células inflamatórias e necrose tecidual das anastomoses intestinais.....	48
3.7.3 Avaliação do colágeno nas anastomoses intestinais.....	49
3.7.4 Avaliação da expressão da HSP70.....	53
3.8 Análise estatística.....	56
4. RESULTADOS.....	57
4.1 Complicações cirúrgicas.....	58
4.2 Aderências pós-operatórias.....	59
4.3 Peso dos animais.....	61
4.4 Estudo histológico.....	63
4.3.1 Aspectos histológicos qualitativos das células inflamatórias e da necrose perianastomótica.....	64
4.3.2 Avaliação quantitativa do colágeno total (tipo I e tipo III) nas anastomoses intestinais.....	65
4.3.3 Avaliação geral da expressão da HSP70.....	71
4.3.3.1 Avaliação da expressão da HSP70 no intestino <u>sem</u> anastomose.....	73
4.3.3.2 Avaliação da expressão da HSP70 no intestino <u>com</u> anastomose.....	76
4.3.3.3 Avaliação da expressão da HSP70 no <u>intestino sem x com</u> anastomose.....	79
4.4 Correlação entre a expressão da HSP70 e a quantidade de colágeno.....	81
4. DISCUSSÃO.....	83
5.1 Complicações cirúrgicas e avaliação macroscópica das anastomoses intestinais.....	87
5.2 Peso dos animais.....	91
5.3 Avaliação histológica das células inflamatórias.....	92
5.4 Avaliação quantitativa do colágeno tipo I e tipo III.....	94
5.5 Avaliação da expressão da HSP70 no intestino grosso de animais submetidos e não submetidos a sangramento pré-operatório.....	98
5.6 Avaliação da expressão da HSP70 nas anastomoses intestinais.....	99
5.7 Avaliação quantitativa da expressão da HSP70 no intestino grosso com e sem anastomoses intestinais.....	101

5.8 Considerações finais.....	102
6. CONCLUSÕES.....	104
7. REFERÊNCIAS.....	106
Apêndice	

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	Adenosina difosfato
APR	Resposta de Fase Aguda
ATP	Adenosina trifosfato
DLN	Domínio de ligação do nucleotídeo
DSN	Domínio de ligação do nucleosídeo
HHA	Eixo Hipotálamo – Hipófise – Adrenal
HSP	“Heat Shock Protein” ou Proteína do Choque Térmico
HSP40	“Heat Shock Protein” 40
HSP70	“Heat Shock Protein” 70
HSPs	“Heat Shock Proteins” ou Proteínas do Choque Térmico
HSR	“Heat Shock Response” ou Resposta ao Choque Térmico
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral α

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema representativo da síntese de colágeno tipo I....	18
Figura 2 - Modelo para o ciclo de ação das “chaperonas” moleculares do sistema HSP70.....	28
Figura 3 - Fotografias da técnica utilizada na cateterização da artéria carótida direita, seguida da retirada de 20% da volemia do animal.....	42
Figura 4 - Fotografias da reoperação no 14º PO do animal do grupo controle. Observaram-se as aderências intestinais na anastomose realizada no cólon direito, seguida da análise macroscópica da anastomose coletada após abertura do cólon direito pelo lado antimesentérico.....	46
Figura 5 - Fotografias da reoperação no 14º PO do animal do grupo controle. Observaram-se as aderências intestinais na anastomose realizada no cólon direito, seguida da análise macroscópica da anastomose coletada após abertura do cólon direito pelo lado antimesentérico.....	46
Figura 6 - Fotografia de peças dos cólons esquerdo e direito fixadas em placas de isopor obtidas de um animal submetido à hipovolemia, laparotomia e laparorrafia, tendo as peças coletadas na reoperação sete dias após a primeira cirurgia.....	47
Figura 7 - Fotomicrografia da região estudada da anastomose de caso do grupo controle no 14º pós-operatório antes de submetê-la a polarização.....	50
Figura 8 - Fotomicrografia da região estudada da anastomose de caso do grupo controle no 14º pós-operatório após submetê-la a polarização.....	51
Figura 9 - Fotomicrografia de caso do grupo controle avaliado no 7º pós-operatório, mostrando a seqüência de tratamento da imagem utilizada no programa Image Tool: coloração de Picrossírius, escala de cinza, escala de preto e branco e faixa dos valores obtidos copiados do programa.....	51

Figura 10 - Fotomicrografia de caso do grupo desafio avaliado no 7º pós-operatório, mostrando a seqüência de tratamento da imagem utilizada no programa Image Tool.....	52
Figura 11 - Fotomicrografia de caso do grupo controle avaliado no 14º pós-operatório, mostrando a seqüência de tratamento da imagem utilizada no programa Image Tool.....	52
Figura 12 - Fotomicrografia de caso do grupo desafio avaliado no 14º pós-operatório, mostrando a seqüência de tratamento da imagem utilizada no programa Image Tool.....	53
Figura 13 - Fotomicrografia de caso do grupo controle no 7º pós-operatório, mostrando a coloração acastanhada e a contagem do percentual em relação à área total e os valores obtidos mostrados na faixa copiada do programa Quantimet 520.....	55
Figura 14 - Fotografia de animal do grupo controle, reoperado no 7º PO, que apresentou fístula bloqueada por aderências (à esquerda) que pode ser visibilizada na foto à direita.....	58
Figura 15 - Fotografias mostrando aderências pós-operatórias nos seguintes animais. Acima, animais submetidos à colectomia direita. À esquerda demonstração do único caso que apresentou fístula anastomótica bloqueada. À direita aderências do cólon direito com outras alças intestinais. Abaixo o mesmo caso de colectomia esquerda: à esquerda mostrando as aderências com tecido testicular e à direita após liberação das aderências para coleta da peça.....	60
Figura 16 - Demonstração representativa da camada submucosa normal do intestino grosso observada pelo microscópio de luz polarizada dos espécimes corados por Picrossirius red. As fibras estão ordenadamente dispostas, em orientação paralela, além de demonstrar a birrefringência - característica clássica das fibras colagênicas avaliadas nessa coloração.....	66

Figura 17 - Avaliação histológica pela coloração de Picrossirius. Pode-se observar que a quantidade de fibras colágenas é menor no sétimo dia pós-operatório que no décimo-quarto, tanto no grupo controle quanto no desafio. Observa-se também que as fibras inicialmente estão desordenadas, e retornam à sua orientação normal em torno do final da segunda semana de cicatrização.....	68
Figura 18 - Avaliação da expressão da HSP70 nas anastomoses intestinais por imuno-histoquímica. A coloração acastanhada demonstra a área marcada pela HSP70..	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análise estatística (teste Mann-Whitney) do índice total de aderências encontradas nos Grupos Desafio x Controle em cada lado.....	61
Tabela 2 - Análise estatística (teste Mann-Whitney) da variação de peso (peso do dia da re-operação – peso do dia da cirurgia) entre os grupos: Desafio, Controle e Branco.....	62
Tabela 3 - Análise estatística (teste Qui-quadrado) do escore das células inflamatórias encontradas nas anastomoses intestinais do grupo Desafio x Controle no sétimo e no décimo-quarto dias pós-operatórios.....	64
Tabela 4 - Necrose encontrada na mucosa dos espécimes de anastomoses intestinais estudados. Os dados foram obtidos pela avaliação realizada à coloração de HE e os valores numéricos representam o número de animais que apresentou esse aspecto ou não.....	65
Tabela 5 - Resultados da análise estatística (teste Mann-Whitney) da comparação entre os lados direito e esquerdo da variável colágeno, nos diferentes grupos e tempos pós-operatórios.....	67
Tabela 6 - Análise estatística (teste Mann-Whitney) da comparação entre os lados direito e esquerdo da variável expressão da HSP70 nos diferentes grupos e tempos pós-operatórios.....	72
Tabela 7 - Análise estatística (teste Mann-Whitney) da comparação entre os tempos pós-operatórios: zero x 7º PO e zero x 14º PO, para o mesmo grupo e mesmo lado.....	75
Tabela 8 - Resultados da análise estatística (teste t-student) da comparação entre o 7º e 14º dias pós-operatórios, em relação à variável expressão da HSP70.....	79

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Número de animais com aderências a órgãos intra-abdominais em todos os grupos, conforme os órgãos acometidos.....	59
Gráfico 2 - Comparação dos valores da variação de peso (peso final – peso inicial) entre os grupos Controle, Desafio e Branco. Os resultados são estatisticamente significativos estão assinalados com asterisco.....	62
Gráfico 3 - Comparação dos valores da variação de peso encontrada entre os grupos Desafio e Controle nos dois tempos cirúrgicos (sete e 14 dias).....	63
Gráfico 4 - Variação da quantidade total de colágeno avaliada pela coloração de Picrossirius, comparando os grupos Controle e Desafio, no 7º e 14º dias pós-operatórios.....	69
Gráfico 5 - Valores percentuais médios da área contendo Colágeno Total (Tipo I + Tipo III), no 7º e 14º dias pós-operatórios nos grupos Desafio e Controle com relação à área total do compartimento de referência.....	70
Gráfico 6 - Valores percentuais médios da área demarcada pela HSP70 nos diferentes grupos estudados. Os valores são dados em porcentagem da área total do compartimento de referência.....	71
Gráfico 7 - Demonstração da média da área demarcada pela HSP70 no intestino do grupo Branco, no zero, no 7º e 14º dias pós-operatórios. Os valores são dados em porcentagem da área total do compartimento de referência.....	73
Gráfico 8 - Demonstração do resultado do estudo estatístico (teste t-student) da avaliação da variável expressão da HSP70 no intestino grosso de animais normovolêmicos (grupo Controle) e hipovolêmicos (grupo Desafio) de espécimes coletadas no dia zero. Os valores foram obtidos pela média da porcentagem de área demarcada pela HSP70 em relação ao compartimento de referência.....	74

Gráfico 9 - Demonstração dos resultados do estudo estatístico (teste t-student) da comparação entre os grupos Controle e Desafio, no 7º e 14º dias pós-operatórios. Os valores foram obtidos pela média da porcentagem de área demarcada pela HSP70 em relação ao compartimento de referência.....	77
Gráfico 10 - Demonstração da análise estatística (teste t-student) entre o 7º e 14º dias pós-operatórios, tanto para o grupo Desafio quanto para o Controle. A expressão da HSP70 foi estatisticamente maior no 14º do que no 7º dia PO. Os valores foram obtidos pela porcentagem da área demarcada pela HSP70 em relação ao compartimento de referência.....	78
Gráfico 11 - Demonstração dos resultados (teste t-student) da comparação da expressão da HSP70 entre o intestino com anastomose e sem anastomose, do dia zero para o 7º dia pós-operatório, tanto para o grupo Controle quanto para o grupo Desafio.....	80
Gráfico 12 - Demonstração dos resultados (teste t-student) da comparação da expressão da HSP70 entre o intestino com anastomose e sem anastomose, do zero para o 14º dia pós-operatório, tanto para o grupo Controle quanto para o grupo Desafio.....	81
Gráfico 13 - Correlação entre os dados gerais da expressão da HSP70 e da quantidade do colágeno total.....	82

RESUMO

Mazzurana M. *Avaliação da expressão da HSP70, da deposição do colágeno e das células inflamatórias nas anastomoses intestinais de ratos hipovolêmicos* (tese). São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007.

INTRODUÇÃO: A deiscência das anastomoses colorretais continua uma grave complicação da cirurgia colorretal. Pouco se sabe sobre as alterações moleculares que podem influenciar esse processo, mas entende-se que a síntese do colágeno é fundamental para uma adequada cicatrização. As Heat Shock Proteins (HSP) estão expressas em situações de estresse, tais como a hipovolemia, além de participarem da síntese do colágeno. Além disso, há poucas informações sobre a expressão da HSP70 nos processos cicatriciais. **OBJETIVOS:** Determinar a expressão da HSP70 no intestino grosso e nas anastomoses intestinais de ratos normo e hipovolêmicos, bem como a quantidade do colágeno total e a qualidade das células inflamatórias envolvidas nesse processo, além de correlacioná-las. **MÉTODOS:** Utilizaram-se 40 ratos Wistar que foram divididos em seis grupos. Submeteram-se 24 animais a cateterização da artéria carótida, seguida de sangramento (20% da volemia); destes, 8 foram submetidos somente à hipovolemia e, os outros 16, à hipovolemia seguida de colectomia (direita e esquerda). Dividiram-se os outros 16 animais em dois grupos: em oito realizou-se colectomia direita e nos outros oito, esquerda. Os espécimes foram avaliados no 7º e no 14º dia de pós-operatório (PO). Pela coloração de Hematoxilina-eosina, avaliaram-se as células inflamatórias e a presença de necrose nas anastomoses, pelo método de Picrossírius, a quantidade de colágeno e por imunohistoquímica, a expressão da HSP70. **RESULTADOS:** A expressão da HSP70 no intestino grosso diminuiu com a hipovolemia ($p < 0,05$). Não houve diferença estatística entre as células inflamatórias encontradas nas anastomoses dos grupos estudados. A quantidade de colágeno foi menor no 7º que no 14º dia de pós-operatório ($p < 0,05$), diferentemente da expressão da HSP70, que foi maior no 14º que no 7º dia ($p < 0,05$). No 7º dia, a quantidade de colágeno estava menor no grupo desafio que no grupo controle ($p < 0,05$), fato que não se repetiu no 14º dia de pós-operatório. Em relação à expressão da HSP70 nas anastomoses intestinais, não houve diferença estatística entre o grupo desafio e o controle, mas no à direita, tanto no 7º quanto no 14º dia houve tendência à diferença significativa. **CONCLUSÕES:** A expressão da HSP70 no intestino grosso é afetada pela hipovolemia, aumenta na cicatrização das anastomoses e é mais evidente quando a quantidade de colágeno é menor. A expressão da HSP70 pode ser um potencial marcador biológico das complicações das anastomoses intestinais.

Descritores: 1. Proteínas de choque térmico HSP70 2. Intestino grosso 3. Inflamação 4. Imunohistoquímica 5. Colágeno 6. Ratos Wistar

ABSTRACT

Mazzurana M. *The evaluation of the HSP70 expression, the collagen deposition and the inflammatory cellularity on the intestinal anastomoses in hypovolemic rats.* (thesis). São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007.

INTRODUCTION: The anastomotic leakage remains a serious complication in surgery of large bowel. The influence about the molecular mechanisms involved at this process is barely known, but its well known that collagen synthesis is essential for good healing. The Heat Shock Proteins (HSP) are expressed at stress situations, such as hypovolemia, also they are involved at the process of collagen synthesis. Besides, there are a few information about HSP70 expression at the healing process. **OBJECTIVES:** To determine the HSP70 expression at large bowel and intestinal anastomoses in normal and hypovolemic rats, as well as the amount of collagen and the quality of the inflammatory cells involved at this process, and correlate them. **METHODS:** It was used forty Wistar rats divided into six groups. Twenty-four rats were submitted to catheterization of carotida artery followed by withdraw of 20% of their blood volume; eight of them were underwent just to hypovolemia and the others sixteen to hypovolemia followed by colectomy (right and left). The remaining sixteen rats were divided into two groups: eight of them were underwent to right colectomy and eight to the left. The specimens were analyzed at the seventh and fourteenth postoperative (PO) days. The inflammatory cells were assessed by Hematoxilin-eosin, the amount of collagen was stained by red Picrossirius and the HSP70 expression was determined by immunohistochemical study. **RESULTS:** The HSP70 expression at the large bowel gets lower when there is hypovolemia ($p < 0.05$). There was no statistic difference on the inflammatory cells found in the groups. The amount of collagen was lower at the seventh than the fourteenth day ($p < 0.05$), unlikely the HSP70 expression, which was the opposite ($p < 0.05$). At the seventh day, the amount of collagen was lower at the study group than at the control group ($p < 0.05$), otherwise at the fourteenth postoperative day. There was no statistic difference in HSP70 expression at the anastomoses of the groups, but at the right colon, there was disposition to significative difference at both days. **CONCLUSION:** The HSP70 expression at the large bowel is modified by hypovolemia, increases at the anastomoses healing and is more evident when the amount of collagen is lower. The HSP70 expression can be a potential biological marker of the complication of these anastomoses.

Descriptors: 1.HSP70 Heat Shock Proteins 2.Intestin, Large 3.Inflammation 4.Immunohistochemistry 5.Collagen 6.Rats, Wistar

1. INTRODUÇÃO

A anastomose intestinal é um tópico raramente discutido na literatura, porém de suma importância para os cirurgiões, já que suas falhas acarretam complicações, aumentam o risco de vida, geram procedimentos cirúrgicos subseqüentes, prolongam o tempo de internação hospitalar, além de elevar custos e afetar a qualidade de vida dos doentes (Thompson et al, 2006).

Os estudos experimentais sobre anastomoses intestinais normalmente analisam diferentes variáveis em relação à etiopatogenia das deiscências e suas alterações histopatológicas. No entanto a avaliação do colágeno, em comparação com a expressão das “Heat Shock Proteins” (HSPs), ainda não foi suficientemente estudada.

Na atualidade, muitos trabalhos científicos estão sendo publicados a respeito das “Heat Shock Proteins” ou proteínas do choque térmico, cuja síntese é estimulada quando a célula é submetida a algum estresse, inclusive inflamação e isquemia. Sabe-se também que são proteínas envolvidas no controle e síntese protéica. Por isso entendeu-se interessante o estudo da expressão da HSP70 nas anastomoses intestinais de ratos hipovolêmicos, com o intuito de melhor compreender o processo molecular de cicatrização dessas anastomoses.

1.1 ANASTOMOSES INTESTINAIS

1.1.1 Histórico

A história das anastomoses intestinais teve início com Benjamin Travers e Antonie Lembert, em 1812 e 1826, com estudos experimentais em animais e análise de necropsias. Evidenciaram a necessidade da união das bordas intestinais em toda sua circunferência para obter sucesso no procedimento, o que determinou a importância da impermeabilidade das anastomoses. Contudo, foi Dieffenbach, em 1836, utilizando a técnica de Lembert, quem realizou a primeira anastomose intestinal no homem, tratando um doente com estrangulamento intestinal (Fraser, Condon, 1980).

Halsted, em 1887, mencionou pela primeira vez um dos fundamentos mais respeitados na realização das anastomoses: a importância da inclusão da submucosa na sutura. Murphy (1892) desenhou o primeiro esboço do “*botão anastomótico*” que facilitava a realização de “*suturas em bolsa*”. Estas suturas ficaram no esquecimento por um período, já que os procedimentos de ressecção-exteriorização ganhavam força naquela época; fato esse que tornou ainda mais lenta a compreensão sobre anastomoses e suas complicações. Essas suturas só retornaram ao escopo cirúrgico com Parlavecchio, em 1897 e Parker e Kerr, em 1908 (Fraser, Condon, 1980).

Em 1970, com Goligher, todos esses preceitos foram firmados e reelaborados, culminando na atualidade com o desenvolvimento da tecnologia dos grampeadores intestinais.

Nota-se, portanto, que a preocupação com as anastomoses tem mais de duzentos anos e que a cada período fatos novos são discutidos. Na atualidade, os principais pontos de divergência são preparo de cólon, hipovolemia e transfusão e antibioticoterapia, além de a técnica de realização das anastomoses - suturas contínuas ou pontos separados.

1.1.2 Deiscências das anastomoses colorretais

Não obstante o desenvolvimento científico e tecnológico, as deiscências das anastomoses colorretais continuam o grande desafio dos cirurgiões. São responsáveis por índice elevado de morbidade e por um terço dos óbitos nas ressecções anteriores do reto. Não fossem esses tipos de falhas, as referidas intervenções seriam mais seguras (Hendriks, Mastboon, 1990; Mossa, 1994; Santos, 1998).

A ruptura das anastomoses intestinais, um dos mais graves riscos da cirurgia do intestino grosso, pode ocorrer precocemente no pós-operatório, com conseqüentes deiscência e sepse. Na prática clínica, é um distúrbio pouco freqüente, mas que ocasiona sérias complicações. Os

índices de fístulas colônicas descritos na literatura há alguns anos eram bastante conflitantes e variavam de 4,5% a 30% (Goligher et al, 1970; Schrock et al, 1973). Porém Fielding et al, 1980; Beart, Kelly, 1981; McGinn et al, 1985 e Fingerhut et al, 1994 dão resultados mais satisfatórios com taxas entre 5% e 10%. A mortalidade varia entre 2% e 4% (Irvin, Goligher, 1973; Schrock et al, 1973; Fielding et al, 1980).

Koruda, Rolandelli (1990) e Brasken (1991) lembraram que a cicatrização do intestino grosso é mais lenta e acompanhada por maior número de complicações quando comparada a qualquer outra do aparelho digestório, já que acarreta contaminação da cavidade peritoneal, com conseqüente peritonite estercoral, que é uma complicação cirúrgica potencialmente fatal.

As complicações e as fístulas das anastomoses realizadas no intestino delgado são menos freqüentes quando comparadas às anastomoses colônicas; do mesmo modo, as do lado direito do cólon quando comparadas às do lado esquerdo (Hesp et al, 1986; Greca et al, em 2000).

Hawley (1973) e Stumpf et al (2004), afirmaram que essa complicação deve-se principalmente a dois grandes fatores: os de risco circunstanciais do paciente e aqueles inerentes à técnica cirúrgica. Isso corrobora a afirmação de que, mesmo realizando anastomoses com todo rigor técnico ainda pode haver deiscência.

Do ponto de vista prático, as anastomoses intestinais devem ser realizadas sem tensão na linha de sutura, em bordas bem vascularizadas e com a intenção de obter uma anastomose totalmente impermeável.

Circunstâncias clínicas variadas podem prejudicar o processo de cicatrização como: hipovolemia, hipotensão arterial, isquemia intestinal, baixa tensão de oxigênio, neoplasia maligna avançada, desnutrição, desidratação, uremia, infecção e idade avançada do paciente (Hunt, Hawley, 1969; Cohen et al, 1985; Koruda, Rolandelli, 1990; Santos, 1998; Witte, Barbul; 2003).

Em particular, muita atenção é dada ao preparo intestinal, à antibioticoterapia profilática e às técnicas anastomóticas, mas são raros os trabalhos que envolvem a análise histológica do processo cicatricial dessas anastomoses.

A natureza multifatorial do processo de cicatrização dos cólons dificulta a investigação dos mecanismos de ocorrência e de prevenção das deiscências das anastomoses colônicas, a não ser que algumas dessas variáveis possam estar controladas experimentalmente.

Portanto as falhas na cicatrização das feridas são um problema clínico significativo e, ainda obscuro, que leva a muitas discussões, interrogações e, conseqüentemente, gera um grande impacto sobre os custos da assistência à saúde (Laund et al, 2004).

1.1.3 Influência da hipovolemia na cicatrização das anastomoses intestinais

Em estudos experimentais, a hemorragia aguda é responsabilizada pela diminuição da deposição de colágeno, o que pode prejudicar a cicatrização das anastomoses. (Buchmiller-Crair et al, 2001; Greca et al, 2000). Laund et al, 2004 verificaram que a hipovolemia, comum nas cirurgias de emergência, é fator prejudicial ao metabolismo do colágeno em lesões de pele e abdome.

Também tem sido apontada como causa importante do aumento da susceptibilidade às infecções (Greca et al, 2000). Em estudo experimental em ratos, após indução de hemorragia, os índices de mortalidade por pneumonia por *Pseudomonas aeruginosa* aumentam significativamente (Abraham, Stevens, 1992). Outros estudos revelaram que a diminuição do fluxo sangüíneo a um determinado órgão após o choque hemorrágico acarreta diminuição de oxigênio nos tecidos. Esse fato leva ao aumento do metabolismo anaeróbico e redução dos níveis de adenosina trifosfato (ATP) e de cálcio intracelulares. A redução do ATP, por sua vez, acarreta profunda imunossupressão, pois as alterações da função celular induzidas pela hipóxia atuam como estimulante direto ou indireto para a produção de citocinas inflamatórias como a TNF, IL-1 e IL-6, e aumento das prostaglandinas E2. Seu aumento diminui as funções imunológicas dos

macrófagos e linfócitos, que é causa de imunodepressão e do aumento do risco de infecção (Chaudry IH, 1983; Chaudry, Ayala, 1993).

Diversos estudos mostraram que há translocação bacteriana durante a lesão isquêmica do intestino (Deitch et al, 1989). Então Greca et al (2000) concluíram que as alterações do processo cicatricial, encontradas em seu estudo experimental em cães, foram decorrentes de complicações sépticas; mas que a diminuição do fluxo por si só, acarretada pela hipovolemia, talvez seja um fator relevante na fibroplasia e no processo cicatricial como um todo, uma vez que os animais que não apresentaram complicações sépticas na anastomose, tiveram índices de cicatrização e fibroplasia inferiores aos do grupo controle.

Face a evidências conflitantes sobre a transmissão de hepatites e HIV, tem-se aceito que o hematócrito fique entre 20 e 25%, evitando-se as transfusões (Terry et al, 2001). Schrock et al (1973) evidenciaram que em pacientes com hematócrito abaixo de 35%, o índice de fístulas era de 7% contra 3,7% nos pacientes não anêmicos; assim como a hipotensão intra-operatória produziu fístulas em 10,7% dos casos contra 3,7% quando não havia hipotensão.

Buchmiller-Crair et al (2001) concluíram que a cicatrização das anastomoses colônicas está alterada em modelo experimental de hemorragia aguda seguida de ressuscitação volêmica, sugerindo que as transfusões poderiam melhorar esse aspecto, fato corroborado por Witte e Barbul (2003).

Segundo estes autores, a anemia aguda experimental pode influenciar a cicatrização. Por isso, há necessidade, aparentemente consensual, da manutenção do hematócrito acima de 30%. Fato esse que foi o racional para transfusões nos pacientes com concentração de hemoglobina < 100g/dl (Mandai et al, 2001).

No entanto, conforme Buchmiller-Crair et al em 2001, entre as causas das deiscências estão as razões técnicas e as que se devem às respostas inflamatórias e teciduais e, por isso, devem ser motivo de pesquisa sistemática.

1.1.4 Cicatrização das anastomoses intestinais

A anatomia da parede do cólon consiste em uma camada interna de epitélio, que é essencialmente igual em todo o cólon, seguida de uma lâmina própria da mucosa que contém vasos sangüíneos e linfáticos bem como um grande número de células mesenquimais e inflamatórias, tais como macrófagos, linfócitos e mastócitos. Essa camada também contém as terminações nervosas. A submucosa é a camada mais importante do trato gastrointestinal para o suporte das suturas realizadas nesses órgãos (Halsted, 1887). É composta por tecido conjuntivo frouxo e contém a maioria das proteínas da matriz celular. Essa composição é diferente da pele, pois contém maior quantidade de colágeno tipo I e tipo III e, em menor

quantidade, o tipo IV, além de ter apenas um décimo do colágeno presente na pele (Klein et al, 1977; Gottrup, 1980; Brasken et al, 1989). É ricamente vascularizada e contém um plexo venoso e outro arterial, bem como os linfáticos. A muscular própria consiste em duas camadas de músculos; uma interna e circular e outra longitudinal. A serosa ou peritônio visceral contém células mesoteliais numa fina camada de matriz, que é ricamente vascularizada e apresenta linfáticos. As mesmas quatro camadas formam a parede de todo o trato gastrointestinal, com exceção do esôfago e do reto (Witte, Barbul; 2003).

A cicatrização de feridas é um fenômeno complexo, porém ordenado, que envolve vários processos: indução do processo inflamatório agudo pelo ferimento; regeneração de células parenquimatosas; migração e proliferação de células teciduais parenquimatosas e conjuntivas; síntese de proteínas da matriz extracelular; remodelamento do tecido conjuntivo e dos componentes parenquimatosos; colagenização e aquisição de força pela ferida. A deposição da matriz de tecido conjuntivo (em especial do colágeno), seu remodelamento na cicatriz e a aquisição de força por parte da ferida são os efeitos finais da reparação ordenada da ferida (Cotran et al, 1996).

A própria ferida operatória estimula a ação de vários fatores sintetizados por macrófagos, plaquetas, células endoteliais e linfócitos T que desencadeiam uma cascata organizada e complexa de eventos celulares e bioquímicos que resultam na reparação do tecido lesado. O processo cicatricial é similar em todos os tecidos e, didaticamente, envolve três fases distintas, porém, sincrônicas: (1) hemostasia e inflamação, (2) fibroplasia, (3) maturação e remodelagem (Eclersley, Dudley, 1988). Observações histológicas

confirmam que esta seqüência também ocorre na parede intestinal (Hermann et al, 1964; Houdart et al, 1983).

A ferida é o estímulo inicial para a fase inflamatória. Caracteriza-se pela infiltração e edema local. O edema ocorre principalmente na submucosa. Os granulócitos são as células que predominam nas primeiras 24 horas e os macrófagos após 48 horas. A angiogênese começa no 2º ou 3º dia após o trauma (Wise et al, 1975; Brasken et al, 1989). Os fibroblastos e as células musculares são recrutados e produzem a matriz celular, primeiramente na submucosa e na subserosa (Hermann et al, 1964). A continuidade da mucosa é rapidamente restabelecida no trato gastrointestinal. Em condições clínicas ideais ocorre na primeira semana. Se o trauma foi grave, acompanhado de destruição tecidual e contaminação por bactérias, esses eventos podem se tornar mais evidentes e se sucederem de modo mais lento. Após uma ou duas semanas a camada epitelial está totalmente restabelecida sobre um molde de células inflamatórias, de fibroblastos e miócitos em proliferação (Brasken, 1991). A reconstituição da camada submucosa é importante para a regeneração epitelial (Podolsky, 2000). O processo cicatricial caracteriza-se por desorganização das camadas musculares (própria e da mucosa) e permanece, histologicamente evidente, até um ano após a realização da anastomose (Hermann et al, 1964).

Halsted (1887) mostrou que a submucosa é a camada intestinal mais importante a ser incluída na sutura, pois possui o maior potencial de produção de colágeno. Proteína essa que confere sustentação à parede intestinal e é fundamental no processo cicatricial. Sabe-se que a força ou a resistência da secção da parede intestinal incluída na anastomose é devida basicamente aos colágenos fibrilares que estão localizados predominantemente na submucosa, formando telas de resistência estrutural do intestino (Thomson et al, 1987; Graham et al, 1988). Estes autores também demonstraram pela análise da parede intestinal normal que 68% deste colágeno é do tipo I, 20% do tipo III e 12% do tipo V (Ahrendt et al, 1996).

Durante os primeiros dias pós-operatórios a resistência da anastomose é baixa e a produção de colágeno é grande, portanto a força tênsil é mantida fundamentalmente pela sutura, motivo pelo qual as deiscências das anastomoses intestinais são mais comuns na primeira semana.

É aceito que ocorre uma variação na concentração do colágeno durante a cicatrização normal e que isso deve-se a uma degradação limitada, porém considerável do colágeno produzido inicialmente. Enquanto a resistência anastomótica depende da sutura na sua fase precoce, a formação do novo colágeno é necessária para preencher lacunas e reconstituir a estrutura inicial da parede intestinal. Portanto o processo que envolve a síntese de colágeno é a situação chave para uma boa cicatrização

e os seus distúrbios certamente levam à diminuição de sua resistência e facilitam o aparecimento da deiscência anastomótica.

Existe o conceito, geralmente aceito, de que a diminuição da resistência está relacionada à diminuição da concentração de colágeno (Cronin et al, 1968; Berman et al, 1974; e Minossi et al, 1994). Contudo alguns pesquisadores argumentam que esta concentração pode não ser tão importante quanto a organização do colágeno (Ryan, 1970; Hendriks, Mastboon, 1990; Minossi et al, 1994).

1.2 COLÁGENO

O colágeno é a maior classe de proteína fibrosa insolúvel encontrada na matriz extracelular e nos tecidos conjuntivos, sendo o produto essencial do fibroblasto. É uma família de proteínas relacionadas, geneticamente diferentes, cuja principal função é estrutural (Vargas et al, 1997). É a proteína mais comum do mundo animal e corresponde a 30% das proteínas encontradas nos mamíferos. Proporciona, em última instância, a força de estiramento das feridas em cicatrização (Junqueira, Montes, 1983).

Apresenta basicamente dois tipos de estruturas: tripla hélice e globular; sendo constituído, na maioria das vezes, por duas cadeias alfa-1 e uma cadeia alfa-2, ou seja, três cadeias polipeptídicas em conformação de tripla hélice. A característica estrutural de ambas as cadeias é a repetição de

três aminoácidos, sendo que 1/3 de todos os aminoácidos em cada cadeia de colágeno é de glicina, prolina e hidroxiprolina. A polihidroxilase transforma a prolina em hidroxiprolina, que passa a ser um aminoácido exclusivo do colágeno. A hidroxiprolina está presente em concentrações elevadas no colágeno para que haja estabilidade da tripla hélice da proteína (Forrest, 1983).

A molécula típica de colágeno é representada por um filamento protéico longo, no qual três cadeias polipeptídicas alinhadas em paralelo são enroladas umas às outras, formando uma estrutura única em tripla hélice (Piez, 1984). Essa estrutura protéica justifica as propriedades físicas e biológicas do colágeno: rigidez, solidez e estabilidade (Brown, Timpl, 1995; Vargas et al, 1997).

De acordo com a estrutura primária das cadeias e sua polimerização 19 tipos distintos geneticamente e referidos como tipos I a XIX (de acordo com a seqüência cronológica de caracterização) foram identificados até o momento (Brown, Timpl, 1995). Os vários tipos de colágeno diferem em sua estrutura modular, em sua organização supramolecular e função (Junqueira, Carneiro, 2004).

O colágeno pode ser classificado conforme sua estrutura supramolecular em dois grandes grupos: fibrilares e não-fibrilares (Brown, Timpl, 1995). Os colágenos envolvidos no processo de cicatrização das anastomoses intestinais fazem parte da família dos colágenos fibrilares. Este

grupo contém os tipos de colágeno I, II, III, V e IX. Formam uma estrutura organizada de fibras e fibrilas e produzem uma estrutura de suporte para tecidos como: esquelético, pele, vasos sanguíneos, nervos, intestinos e cápsulas fibrosas de alguns órgãos (Junqueira, Carneiro, 2004).

O colágeno tipo I é o mais abundante de todos os tipos de colágeno, representa 80% a 99% de todo o colágeno e é encontrado em todos os tecidos conjuntivos, exceto em membranas basais e na cartilagem hialina. É também o principal tipo de colágeno envolvido nas doenças fibróticas e nos tecidos de cicatrização. Constitui-se em duas cadeias alfa-1 e uma cadeia alfa-2; forma fibrilas grossas com 70 a 100nm de diâmetro. Estas fibrilas associam-se formando fibras de 2 a 10µm de diâmetro, correspondentes às clássicas fibras colágenas reconhecidas nos cortes histológicos observados à microscopia de luz. Estas fibras estão presentes em grande quantidade na matriz extracelular de ossos, ligamentos, tendões, fáscias, cápsulas, adventícias, derme reticular etc, ou seja, nos compartimentos orgânicos com grande capacidade de resistência à tração (Junqueira, Carneiro, 2004).

Por sua vez, o colágeno tipo III é constituído por três cadeias alfa-1, contendo uma grande quantidade de hidroxiprolina e baixa de hidroxilisina, que formam uma delicada trama de fibras finas presentes no estroma de órgãos que possuem um arcabouço estrutural flexível de órgãos parenquimatosos, tais como: fígado, rim, baço, pâncreas etc. Esse tipo de colágeno forma fibrilas mais finas de 35 a 55nm de diâmetro que se associam para formar fibras de 0,5 a 1,5µm (mais delicadas do que aquelas

formadas por colágeno I). Estas fibras têm afinidade pela prata e podem ser reconhecidas como fibras reticulares nos cortes histológicos examinados ao microscópio de luz.

Nas cicatrizações de feridas, os tipos mais importantes de colágeno são o I e o III, sendo que nos processos de reparo e nas fibroses em geral, o colágeno tipo III é o primeiro colágeno a ser depositado, sendo mais tarde substituído pelo tipo I (Martinez-Hernandez, 1988). Nas anastomoses colônicas a continuidade do cólon é restabelecida por uma nova matriz de colágeno que representa um balanço entre o colágeno sintetizado e o colágeno degradado. Os principais tipos de colágeno envolvidos nesse processo são os tipos I, III e V, sendo o tipo I predominante (Witte, Barbul, 2003).

As características mecânicas do tecido conjuntivo são principalmente determinadas pela quantidade proporcional dos colágenos tipos I e III. O colágeno tipo I é responsável pela resistência à tensão, enquanto o colágeno III confere maior flexibilidade à matriz, sendo encontrado nas fases iniciais da cicatrização. É importante lembrar que na fase de colagenização torna-se extremamente difícil diferenciar os colágenos tipo I e tipo III porque as fibras do colágeno tipo III são muito finas e nesta fase estão sendo progressivamente recobertas pelas fibras tipo I (Junqueira, Montes, 1983; Stadelmann et al, 1998).

1.2.1 Síntese do colágeno

Após a síntese dos ribossomos, as cadeias alfa sofrem várias modificações por ação enzimática, inclusive a hidroxilação da prolina na posição alfa, fornecendo colágeno com alto teor de prolina (cerca de 10%). Essa hidroxilação é importante porque é necessário agregar três cadeias alfa, sendo que esse processo depende de ácido ascórbico.

Nessa fase a molécula de procolágeno ainda é solúvel e contém uma extensão suplementar de polipeptídeos. Durante ou logo após sua excreção da célula, as procologenopeptidases clivam as cadeias terminais peptídicas e promovem a formação de fibrilas. Fibrilas verdadeiras formam-se no espaço extracelular e conferem resistência ao tecido conjuntivo; além disso, formam-se ligações cruzadas que são importantes para acrescer o potencial de estiramento do colágeno (Figura 1).

Figura 1 - Esquema representativo da síntese de colágeno tipo I. Adaptado de Darnell et al, Molecular Cell Biology, 1990

A síntese do colágeno por fibroblastos inicia-se precocemente na cicatrização das feridas (do terceiro ao quinto dia) e continua por várias semanas, dependendo do tamanho da ferida. A acumulação final do colágeno, contudo, depende não apenas da síntese, mas também da degradação do colágeno.

A degradação do colágeno e de outras proteínas da matriz extracelular é realizada por uma família de metaloproteinases. Essas proteínas consistem em colagenases intersticiais que clivam os colágenos fibrilares dos tipos I, II e III; gelatinases (ou colagenases do tipo IV) que

degradam tanto o colágeno amorfo quanto a fibronectina, e as estromelisinases que degradam outros componentes da matriz extracelular. Essas enzimas são produzidas por diversos tipos celulares, entre eles, os fibroblastos e os macrófagos. Entre os estímulos para sua produção estão os fatores de crescimento (PDGF e FGF), as citocinas (IL-1 e TNF- α) e os estímulos fagocitários. Elas clivam o colágeno sob condições fisiológicas, cortam a tripla hélice em dois fragmentos desiguais, e os tornam suscetíveis à digestão por outras proteases. Esse processo poderia ser nocivo para os organismos, mas essas enzimas são produzidas na sua forma latente e podem ser ativadas por agentes químicos ou proteases e serem inibidas por inibidores teciduais de metaloproteínas. Portanto existe um mecanismo de controle para que isso não ocorra desordenadamente. Não obstante acredita-se que as collagenases desempenham um papel importante na degradação do colágeno na inflamação e cicatrização de feridas.

Logo, a cicatrização de feridas é um processo dinâmico e em constante transformação. A fase inicial é inflamatória, seguida de fibroplasia, remodelamento tecidual e formação de cicatriz (Cotran, 1995).

O colágeno preexistente diminui durante os primeiros dois dias, e retornam aos valores pré-operatórios ou, além disso, em uma semana. O colágeno tipo IV é sintetizado na lâmina basal e formado durante a revascularização e reepitelização. A ativação dos genes dos colágenos tipos I e III são visibilizados na camada submucosa e na superfície serosa no primeiro dia e no tecido de reparo anastomótico a partir do segundo dia.

Enfim, os estudos sugerem que os eventos genéticos que levam à síntese de colágeno na área anastomótica iniciam-se imediatamente após a cirurgia, mas o mais elevado nível de expressão do colágeno não é visto antes de uma semana da cirurgia (Martens, Hendriks, 1991; Brasken, 1991; Brasken et al, 1991).

1.2.2 Método de Picrossírius-polarização

Sweat et al (1964) procurando um substituto para o método de Van Gieson que pudesse corar permanentemente o colágeno introduziram o Sirius Red como técnica histológica. Constantine, Mowry, (1970) observaram que essa coloração aumentou a birrefringência das fibras do colágeno quando estudadas com microscópio de luz polarizada. Junqueira et al, (1978) demonstraram que essa coloração observada pela microscopia de polarização permitia distinguir os colágenos tipos I, II e III em diferentes órgãos e tecidos dos vertebrados.

O Sirius Red é um corante azóico com quatro grupamentos cromofóricos e, por isso, apresenta um alto coeficiente de extinção e permite a detecção de pequenas quantidades de colágeno em cortes de tecidos (Montes, Junqueira, 1991). Possui grupamentos ácidos que reagem com os grupamentos básicos presentes nas moléculas de colágeno (Junqueira et al, 1979).

O colágeno intersticial apresenta suas moléculas dispostas ordenadamente em uma orientação paralela, sendo a birrefringência uma das características clássicas dessas estruturas. As moléculas são ricas em aminoácidos básicos e reagem fortemente com corantes ácidos. Quando o Sirius Red reage com o colágeno, sua birrefringência aumenta porque as moléculas do corante aderem às fibrilas do colágeno de tal forma que seus maiores eixos ficam paralelos. Apesar de esse corante ligar-se inespecificamente aos componentes básicos dos tecidos, o fenômeno de aumento da birrefringência ocorre exclusivamente com o colágeno (Junqueira et al, 1982). O fato de que a cor e a intensidade da birrefringência dependem da espessura da fibra de colágeno também foi relatado por Pérez-Tamayo, Monffort, (1980).

A caracterização precisa do colágeno tipo III é mais difícil de obter porque normalmente o colágeno tipo III acontece nos tecidos em associação com o colágeno tipo I. Nos casos descritos na literatura, onde o colágeno tipo III coexiste com o colágeno tipo I, como na aorta (Trelstad, 1974), na derme fetal (Epstein, 1974), no leiomioma (Chung, Miller, 1974), e nos nervos periféricos (Seyer et al, 1977), a presença de fibras alaranjadas ou vermelhas foi observada em associação com fibras finas e verdes. Ou seja, havia coincidência de fibras esverdeadas e colágeno tipo I. Essas fibrilas finas não são adequadamente visibilizadas em tecidos que contêm basicamente colágeno tipo I (Junqueira et al, 1978).

Os colágenos tipos I, II e III mostram diferentes cores e intensidades de birrefringência em um mesmo corte histológico. Isso pode ser explicado pelo fato amplamente conhecido de que esses diferentes colágenos intersticiais apresentam padrões distintos de agregação física (Junqueira et al, 1978).

Rabau, Dayan, (1994) relataram que a observação das lâminas coradas com Picrossirius Red por microscópio de luz polarizada é adequada para avaliar espécimes que contêm anastomoses intestinais em cicatrização tanto quanto para avaliar diferentes situações patológicas e fisiológicas da parede intestinal.

1.3 “HEAT SHOCK RESPONSE”, EXPRESSÃO DA HSP70 E ANASTOMOSES INTESTINAIS

A “Heat Shock Response” é a mais antiga e conservada forma de reagir ao estresse. É, praticamente, universal em todos os organismos vivos. Ocorre em resposta a várias situações metabólicas e as proteínas envolvidas nesse processo são chamadas de “Heat Shock Proteins” e atuam como “chaperonas” moleculares (Craig, 1985; Lindquist, 1986; Ellis, 1987; Jaattela, 1993; Feige, Polla, 1994).

Ritossa (1962) descobriu que a exposição de células de glândulas salivares de *Drosophila busckii* a calor, dinitrofenol ou salicilatos causam o

surgimento de um novo padrão de espessamento em cromossomos que representam sítios específicos de transcrição para a síntese de proteínas. O estresse térmico ou químico induz a expressão de genes, até então quiescentes, que fazem com que as células estressadas fabriquem grande quantidade de determinada classe de proteínas, chamadas de “Heat Shock Proteins”, ou proteínas do choque térmico. O processo pelo qual essas células respondem ao estresse ficou conhecido como “Heat Shock Response” (HSR), ou resposta ao choque térmico.

Conforme Morimoto, Fodor, 1984, em todos os tecidos dos animais vivos são sintetizadas proteínas de baixo peso molecular que possuem funções específicas no crescimento celular e na reversão ou prevenção de danos causados por um estresse. Essas proteínas, cuja síntese é aumentada quando a célula é submetida a uma condição estressante, são denominadas proteína do choque térmico, “Heat Shock Protein” (HSP), em língua inglesa. Apesar de seu nome, vários outros fatores, além do calor, podem levar ao aumento da síntese de HSP, tais como o frio, os indutores de natureza química, física e biológica (metais pesados, inibidores do metabolismo, agentes quimioterápicos, febre, inflamação, infecções virais, isquemia), incluindo o ciclo de divisão celular e fatores de crescimento, que são mecanismos normais das células (Erata et al, 2005; Nefti et al, 2005).

As Heat Shock Proteins (HSPs) são uma classe de proteínas altamente conservadas, desde seres primitivos (procariotas) até o homem, o que é um indício de seu grande valor evolutivo (Peetermans, 1995).

Conforme seu peso molecular (em kD – kilodaltons), podem ser divididas em famílias: HSP27, HSP47, HSP60, HSP70, HSP90 and HSP110. As mais estudadas dessas proteínas têm pesos moleculares de aproximadamente 90, 70 e 27 kDa e, por isso, são denominadas, respectivamente, Hsp90, Hsp70 e Hsp27 (Guerriero, Raynes, 1990).

A família HSP70 é a mais conservada filogeneticamente; sua estrutura no homem é 72% homóloga em relação às HSP70 de *Drosófilas* (Hunt, Morimoto 1985). Os membros da família HSP70 estão sendo exaustivamente estudados já que são as mais freqüentes proteínas entre as "Heat Shock Proteins" conhecidas, sendo encontradas tanto em seres eucariotes quanto procariotes. (Kaufmann, 1990; Moseley, 2000). O sistema HSP70 e suas cochaperonas HSP40 e GrpE são considerados uma das mais importantes famílias de chaperonas moleculares (Borges, 2004).

"Chaperona" é uma palavra inexistente em português e serve para designar substâncias que, sem fazer parte da estrutura final das proteínas, evitam interações incorretas entre estas, auxiliam em sua montagem final, bem como na sua síntese, dobramento e degradação (Ellis, 1987; Georgopoulos, Welck, 1993; Hendrik, Hartl, 1993; Hightower et al, 1994). O dobramento de proteínas, processo onde são convertidas cadeias lineares de polipeptídeos em estruturas tridimensionais, é muito importante em biologia, pois possibilita que as proteínas exerçam todas as suas atividades vitais (Peetermans, 1995).

As proteínas funcionais intracelulares estão normalmente presentes em suas formas nativas, completamente dobradas. Entretanto processos vitais da biogênese protéica, tais como a sua síntese e translocação para os compartimentos intracelulares, requerem que a proteína exista, temporariamente, em conformação desdobrada ou parcialmente dobrada. Regiões ocultas quando um polipeptídeo está em sua conformação nativa tornam-se expostas e interagem com outras proteínas, causando agregação nociva para a célula. Em condições normais, os polipeptídeos corretamente dobrados têm as porções hidrofóbicas de seus aminoácidos voltadas para o interior da molécula, ao passo que os componentes hidrofílicos se voltam para o exterior. Isto possibilita solubilidade em meio aquoso e impede agregação, que de outro modo ocorreria pela interação das áreas hidrofóbicas com aquelas de outras moléculas. Se a proteína estivesse desdobrada (o que ocorre em determinadas fases de sua síntese e transporte entre organelas), agregações indevidas poderiam existir, levando à perda destes polipeptídeos (Borges, 2004).

As HSPs atuam evitando tais interações aleatórias - como "protetoras moleculares", ou "chaperonas" - até que o término do processo de dobramento ocorra e a proteína adquira resistência (Wynn et al,1994). A fim de evitar esta agregação quando as proteínas estão desdobradas, as HSPs protegem as superfícies interativas ligando-se a elas e facilitando o dobramento de polipeptídeos nascentes ou desdobrados. Em outros casos,

sua ligação a superfícies interativas de proteínas completamente dobradas é parte crucial de sua regulação.

O sistema HSP70 e suas “cochaperonas” estão envolvidos em uma série de funções do metabolismo protéico, tais como: enovelamento protéico, prevenção da agregação induzida por diferentes tipos de estresses e recuperação de agregados de proteínas (Mayer et al, 2001). Também participam do transporte de proteínas por membranas e da degradação protéica, estabilizando fatores de transcrição celular (Mayer et al, 2001). No meio intracelular exercem funções de controle de qualidade de proteínas recém-sintetizadas (Hendrick, Hartl, 1993; Mayer et al, 2001) além de evitar o enovelamento incorreto (Lindquist, Craig 1988).

Conforme Borges (2004) o sistema HSP70 funciona como um pivô capaz de receber e distribuir proteínas instáveis e ou parcialmente enoveladas entre as demais famílias de chaperonas moleculares.

Duas hipóteses são consideradas para definir o mecanismo pelo qual as HSPs70 exercem sua função. O modo passivo em que agiriam por meio de múltiplos ciclos de associação e dissociação com o substrato e este se enovelaria espontaneamente. O modo ativo, onde a liberação de energia pela hidrólise de adenosina trifosfato (ATP) no ciclo das HSP70 provocaria mudanças conformacionais no substrato, rompendo algumas barreiras energéticas na via de enovelamento (Mayer et al, 2001).

A partir disso, as HSPs70 podem ser divididas em dois domínios: o domínio de ligação de nucleotídeos adenosina (DLN), que possui atividade

de hidrólise do ATP e o domínio de ligação de substratos (DSN) capaz de ligar seqüências de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos. Ou seja, a afinidade pelos substratos é regulada pela presença do nucleotídeo adenosina no DLN. Quando o DLS apresenta alta afinidade por substratos, o nucleotídeo 5 difosfato (ADP) está ligado ao DLN e apresenta baixa taxa de ligação de substratos. Há baixa afinidade do DLS pelo substrato quando o ATP está ligado ao DLN, tornando, assim, alta a taxa de ligação de substratos nesta condição. Existem no interior do DLN, que funciona como uma “concha”, dois subdomínios DLN1 e DLN2. O DLS também pode ser subdividido em dois subdomínios: o DLS1 que funciona como uma “cama para o substrato” e outro que pode funcionar como uma “tampa”, o DLS2. Esta “tampa” possuiria a capacidade de fechar sobre a “cama” e, por conseguinte, sobre o substrato.

Portanto duas conformações das HSPs70 poderiam ser descritas: uma aberta e outra fechada em relação ao substrato. A ligação de ADP levaria a mudanças conformacionais no DLN que seriam transmitidas aos DLS, deslocando o equilíbrio para a conformação fechada. No entanto a ligação de ATP causaria o efeito oposto, deslocando o equilíbrio para a conformação aberta. Esse ciclo de ligação do ATP na HSP70 e suas fases são auxiliados pelas “cochaperonas”, HSP40 e o GrpE. Com isso conclui-se que a ligação de ATP ou de ADP ao DLN é um fator importante para a ação da HSP70. A etapa de transição das HSPs70 da forma de baixa afinidade pelo substrato (HSP70-ATP) para a forma de alta afinidade (HSP70-ADP) é

dependente da hidrólise do ATP, sendo este o fator limitante do ciclo, devido à baixa capacidade das HSPs70 em realizar essa hidrólise. A hidrólise do ATP é estimulada pela ligação do substrato ao DLS e também pela interação com as HSPs40. Entretanto, alguns autores relatam que algumas HSPs70 apresentam constantes de dissociação pelos nucleotídeos adenosina (ATP e ADP) na ordem de micromolar (Borges, 2004).

Figura 2 - Modelo para o ciclo de ação das “chaperonas” moleculares do sistema HSP70 (Borges, 2004)

Resumindo, as HSPs 70 podem ser divididas em dois domínios principais: o domínio de ligação dos nucleotídeos (DLN) que possui uma forma de concha e o domínio de ligação de substratos (DLS). Na presença de ATP ligado no interior da fenda da concha do DLN, a HSP70 sofre pequenas mudanças conformacionais, as quais transmitem ao DLS, deslocando o equilíbrio do subdomínio DLS2 para uma conformação aberta. Nesta conformação, a HSP70 apresenta alto fluxo de associação e dissociação pelo substrato. O substrato livre pode se ligar à HSP70, a partir do meio, ou pode ser transportado pela HSP40 para a HSP70. Através de um estímulo concomitante do substrato e da HSP40, a HSP70 hidrolisa a ATP em ADP+ Pi. Na presença de ADP ligado na fenda do DLN, o equilíbrio conformacional do subdomínio DLS2 seria deslocado para uma conformação fechada sobre o DLS1, retendo o substrato ligado à HSP70 e prevenindo a agregação. Algumas HSP70 necessitariam da ação das “cochaperonas” GrpE para auxiliar na dissociação da molécula de ADP ligada no DLN, possibilitando a ligação de ATP ao sítio, que deslocaria o equilíbrio conformacional do subdomínio DSL2 para a conformação aberta. Assim, o substrato pode ser liberado para o meio para se enovelar, ou repetir o ciclo com a HSP70 ou com outra “chaperona” molecular. (Borges, 2004).

Portanto as HSPs são uma família de proteínas altamente conservadas e estão envolvidas na maioria dos mecanismos básicos de proteção celular. Por outro lado, sua expressão também ocorre após um insulto potencialmente fatal e pode induzir “tolerância ao estresse” e, assim, gerar proteção contra um estresse subsequente que poderia ser fatal. (Pelham, 1986).

Conforme Meyer, Silva (1999), muitos trabalhos científicos estão sendo publicados sobre a resposta ao choque térmico; por isso muitos outros vieram à luz, focalizando outras respostas celulares ao estresse. Sabe-se que existem várias formas de resposta ao estresse e que um determinado tipo de estresse pode gerar duas ou três modalidades de respostas. Entende-se que a HSR e a APR (Resposta de Fase Aguda) não compartilham fatores nem genes ativadores. Na verdade, a HSR que é mais primitiva, precede, extingue ou reduz a APR (Cabin, Buchman 1990).

Em relação à resposta ao trauma e à cirurgia, entende-se que a cicatrização das feridas pode ter relações próximas com as HSPs. Durante o estresse cirúrgico ocorre uma série de respostas adaptativas e os principais eixos envolvidos são Hipotálamo-Hipófise-Adrenais (HHA), Sistema Nervoso Autônomo (SNA) e a Resposta da Fase Aguda (APR). Os estímulos aferentes, vindos dos tecidos traumatizados e dos baro-receptores, fazem com que o sistema nervoso central ative tanto o eixo HHA quanto o SNA. A lesão dos tecidos resulta na produção de citocinas que penetram na circulação, interagem com receptores teciduais específicos e suscitam a APR. As HSPs têm papel importante nestas respostas fundamentais, pois esse mecanismo envolve vários hormônios que têm efeito global na homeostase, influenciando vias metabólicas, níveis de citocinas e de receptores hormonais. Esses últimos estão em estado inativo e são mantidos em interação com as HSPs. (Udelsman, Holbrook, 1994). No nível celular a expressão da HSP é marcadamente induzida após estresse cirúrgico experimental e tal indução parece estar sob controle endócrino (Udelsman et al, 1991).

As HSPs apresentam efeitos protetores e papéis fisiopatológicos. Existem observações de que protegem células e tecidos dos efeitos deletérios da inflamação por meio da quebra de cadeias de DNA induzida por ROM (“Reactive Oxygen Metabolites”) e peroxidase lipídica, bem como pela proteção da estrutura de mitocôndrias. *In vivo*, o choque térmico protege órgãos contra diversas lesões associadas com o aumento da produção de citocinas ou ROM. A superexpressão das HSP70 pode também proteger a célula contra necrose induzida por TNF- α (Jaattela, 1993; Jacquier-Sarlim et al, 1992).

No câncer as HSPs estão envolvidas em vários aspectos como interação com a proteína p53 mutante e estabilização de proto-oncogenes (Fuller et al, 1994); podem ser antígenos tumorais e há chances de que se possam elaborar vacinas com base nessas proteínas. Por outro lado, verificou-se o aumento da expressão da HSP27 e HSP70 relacionado à maior sobrevivência de células neoplásicas submetidas a alguns agentes quimioterápicos (Minowada, Welch, 1995). Recentemente, o papel da HSP70 foi investigado em relação a vários tipos de câncer: mama por Jaattela (1999), pulmão por Volm et al (1995), fígado por Santarosa et al (1997), ovário por Athanassiadou et al (1998) e osteossarcomas por Uozaki et al (2000). No câncer de cólon há poucos estudos disponíveis que são controversos (Erata et al, 2005).

Alguns estudos demonstraram que a resposta ao estresse pode proteger as proteínas contra o dano, por meio de restauração da função das proteínas lesadas, diminuindo o estresse relacionado com o aumento da permeabilidade intestinal e prevenindo a disfunção metabólica (Moseley et al, 1994; Benjamin, McMillan, 1998). Esses efeitos podem gerar um efeito protetor

contra muitas formas de trauma celular, como isquemia e reperfusão, sepse e choque (Lappas et al, 1994; Villar et al, 1994; Marber et al, 1995).

;Adicionalmente, a expressão das HSPs parece atenuar a liberação das citocinas pró-inflamatórias tanto *in vitro* quanto em alguns estudos *in vivo* e essa diminuição parece aumentar a sobrevida na sepse (Ribeiro et al, 1995; Ribeiro et al, 1996; Chu et al, 1997) e especificamente falando de sepse relataram que o aumento da expressão da HSP70 parece melhorar a sobrevida em modelos experimentais de choque e sepse. Pittet et al (2002) relataram que provavelmente níveis elevados de HSP70 no plasma estejam relacionados com aumento da sobrevida em pacientes que sofreram traumas graves. Portanto até o presente momento entende-se que as HSPs têm papel importante na proteção contra agressões celulares (Kiang, Tsokos, 1998; De Maio, 1999), diminuindo morbidade e mortalidade em alguns modelos experimentais (Wischmeyer, 2006).

A expressão da HSP é um tópico altamente discutido na literatura, sob os mais variados aspectos e, a partir do estudo de suas funções, pressupõe-se que essas proteínas podem estar intimamente ligadas à cicatrização das feridas porque estão relacionadas à síntese protéica e sua modulação, com a função de evitar interações incorretas e, assim, proporcionar que as proteínas exerçam adequadamente suas funções específicas.

Existem poucos estudos sobre a expressão da HSP70 no intestino e no trato gastrointestinal (David et al, 2001, David et al, 2002 e Tallot et al, 2003), porém há algumas evidências que correlacionam a expressão das HSPs com situações fisiopatológicas do trato gastrointestinal (Tsukimi et al, 2001; Petrof et al, 2004). Wischmeyer (2006), por exemplo, estudou a utilização da glutamina

com intenção de estimular a expressão das HSPs no intestino de ratos submetidos a danos e concluiu que a glutamina age contra as agressões e estimula sua cicatrização, por meio da indução de HSP70.

Estudos que correlacionassem a expressão da HSP70 com a cicatrização intestinal não foram encontrados. Porém ao observar a expressão das HSPs nos processos cicatriciais da pele, Laplante et al (1998) sugeriram que esta expressão está relacionada com a proliferação, migração e diferenciação do estado dos queratinócitos na cicatriz e que a HSP72 é rapidamente induzida em locais de cicatrização e pode exercer importantes funções nesse processo. Outros estudos demonstraram que a indução de HSP72 na ferida de pele melhorou a cicatrização (Simon et al, 1995; Vigh et al, 1997). Shukla et al (1998) analisaram as HSPs no 7º e 14º dias após a injúria tecidual e concluíram que em tecidos normais a síntese de HSP iniciou 24 horas após a lesão e declinou para níveis normais em uma ou duas semanas, coincidindo com a boa cicatrização das feridas. Nesse estudo, as HSPs estiveram diminuídas nas cicatrizes crônicas e, a partir disso, estes autores inferiram que o manejo de sua produção poderá ser utilizado como terapêutico. Oberringer et al (1995) preocuparam-se em descobrir se as HSPs também estariam envolvidas em cicatrização de feridas, considerando que também é uma situação de estresse celular, e encontraram uma forte correlação entre feridas bem cicatrizadas e altos níveis de HSP70, que contrastou com a expressão ausente ou reduzida nas feridas crônicas.

Há poucas informações sobre a expressão da HSP70 no intestino e no trato gastrointestinal (David et al, 2001; David et al, 2002; Tallot et al, 2003; Petrof et al, 2004) e, aparentemente nenhuma sobre o processo cicatricial das

anastomoses intestinais realizadas em situações de hipovolemia; por isso a análise da expressão da HSP70 no intestino normal, no intestino de animais submetidos à hipovolemia, nas anastomoses intestinais neles realizadas em situações normo e hipovolêmicas pode gerar correlações com a quantidade total de colágeno dessas anastomoses e com as células inflamatórias envolvidas nessa cicatrização.

Na revisão investigativa da literatura ora realizada há espaço para análise da expressão da HSP70 no intestino normal e no intestino de animais submetidos à hipovolemia, da expressão nas anastomoses intestinais realizadas em ratos normovolêmicos e hipovolêmicos e para o estabelecimento de correlações entre esses parâmetros; com a quantidade total de colágeno dessas anastomoses e com as células inflamatórias envolvidas na cicatrização.

2. OBJETIVOS

Determinar em ratos normovolêmicos e em ratos submetidos à hipovolemia aguda:

- A expressão da HSP70 no intestino grosso;
- A expressão da HSP70, a quantidade do colágeno total e a qualidade das células inflamatórias envolvidas em anastomoses do intestino grosso;
- As correlações entre as variáveis: expressão da HSP70, quantidade do colágeno e qualidade das células inflamatórias.

3. MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Utilizaram-se 40 ratos albinos da linhagem Wistar, machos com 16 semanas de idade, pesando entre 290 e 400g, provenientes do Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os animais foram albergados em número de quatro a seis por gaiola, alimentados com ração comercial e água *ad libitum* e mantidos sob regime de ciclos luz/escuro a cada 12 horas. Um período de aclimação de pelo menos uma semana ao ambiente do Biotério do Laboratório de Investigação Médica (LIM 07 – Gastroenterologia Clínica) foi adotado. O alimento sólido foi retirado da dieta 12 horas antes da cirurgia.

O estudo foi realizado conforme as normas publicadas pelo “Institute of Laboratory Animal Resources” (1996) e aprovado pela comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesp) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo com o nº 685/ 05.

3.2 LOCAL

Os procedimentos foram realizados nas dependências do Complexo Hospital das Clínicas e Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; as cirurgias e a eutanásia, no laboratório de Investigação Médica Lim 07, Gastroenterologia Clínica - Prof. Dr. Flair José Carrilho. Os estudos

histológicos foram realizados tanto no LIM 51, Emergências Médicas - Prof. Dr. Irineu Tadeu Velasco quanto na Disciplina de Patologia Geral, Forense e Bioética da UNIFESP-EPM chefiado pela Profa. Dra. Maria Teresa de Seixas Alves.

3.3 MODELOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram anestesiados com cloridrato de quetamina a 10% intraperitoneal (IP) na dose de 0,1ml/100g e xilazina a 2% na dose de 0,1ml/100g. Foram obedecidos critérios de assepsia das áreas dos campos operatórios que incluíram a anti-sepsia da pele com iodopovidina após tricotomia regional do aspecto cervical anterior e abdome superior. Utilizaram-se máscaras, gorros e luvas esterilizados; houve colocação de campos cirúrgicos esterilizados e proteção secundária com campos cirúrgicos durante a abertura e anastomoses de alças do intestino grosso nas áreas de interesse das suturas. Logo após abertura das alças intestinais retiraram-se gentilmente os fecalitos que se encontravam na região. O albergue dos animais foi realizado em gaiolas ventiladas com ar ambiente e assoalhadas com maravalha esterilizada. Não se administraram antibióticos. Os procedimentos cirúrgicos foram executados por um único operador.

O jejum para ração sólida foi instituído por 12 horas nos períodos noturnos imediatamente precedentes ao procedimento, garantido o livre

acesso à água filtrada “*ad libitum*”. Após 24 horas do procedimento, ração sólida comercial (Nurvibal®) foi acrescida também “*ad libitum*”. Nestas primeiras 24 horas cada animal permaneceu em gaiolas individuais. Observada a recuperação da atividade motora habitual após estas primeiras 24 horas, os animais foram transferidos para gaiolas coletivas com seis por unidade. Aqueles com sinais de hipomotilidade, sangramento por orifícios naturais ou das incisões, desidratação não compensada pela ingestão oral da água oferecida ou expressão corporal de dor foram excluídos destas gaiolas até a normalização desses sinais clínicos. Os que apresentaram agravamento destes sinais ou que morreram em qualquer tempo do delineamento experimental foram submetidos à eutanásia e necropsia.

A eutanásia foi realizada com administração de sobredose de cloridrato de quetamina e xilazina via intraperitoneal no 7º e no 14º dias pós-operatórios.

A hipovolemia foi conduzida segundo Terry et al (2001), onde sangramento de 30% da volemia foi igual à retirada de 20ml/Kg. Neste estudo retirou-se 20% do volemia, assim sendo:

a) o cálculo do volume a ser extraído baseou-se na seguinte fórmula:

$$V_{ml} = 4 \times P_g / 3 \times 100$$

onde V_{ml} é o volume em ml a ser extraído e P_g é o peso em gramas dos animais.

b) dissecação e canulação da artéria carótida direita por meio de cânula de polietileno 10p heparinizada com solução decimal de heparina regular sobre solução fisiológica 0,9% no volume total de 1ml máximo durante todo o procedimento (Figura 3)

Figura 3 - Fotografias da técnica utilizada na cateterização da artéria carótida direita, seguida da retirada de 20% da volemia do animal

3.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

3.4.1 Grupo branco – cólon direito e esquerdo

Para o estudo das variáveis teciduais, oito animais foram submetidos à hipovolemia padrão seguida de laparotomia e laparorrafia padronizadas. No 7º e 14º dias pós-operatórios estes animais foram reoperados e os seguimentos dos cólons direito e esquerdo foram coletados.

Procedimento cirúrgico (dia zero):

- a) Incisão cervical com 2cm de extensão, interessando a pele e os músculos cervicais; b) cateterização da artéria carótida com cânula de silicone fina; c) retirada de 20% da volemia do animal em cinco minutos; d) ligadura deste vaso; e) fechamento da pele com nylon 4-0; f) laparotomia com incisão mediana de 4cm interessando a pele e a parede abdominal; g) fechamento da parede abdominal com sutura contínua de náilon nº4-0 e da pele com náilon 5-0.

Procedimento cirúrgico (sétimo e décimo-quarto dias pós-operatórios)

- a) Laparotomia com incisão mediana de 4cm, interessando a pele e a parede abdominal; b) coleta de 2cm do segmento do cólon direito situado a 2cm da válvula ileocecal; c) coleta de 2 cm do segmento do cólon esquerdo situado na região do promontório; d) eutanásia.

3.4.2 Grupo controle – cólons direito e esquerdo

Para o estudo da resposta tissular das anastomoses dos cólons direito e esquerdo utilizaram-se oito animais em que se procedeu laparotomia mediana seguida de colectomia direita e oito animais, nos quais se procedeu colectomia esquerda. No 7º e 14º dias pós-operatórios, separadamente, oito destes animais foram reoperados para coleta das peças – quatro segmentos do cólon direito e quatro segmentos de cólon esquerdo contendo a anastomose. A padronização desses procedimentos está descrita abaixo.

Procedimento cirúrgico (dia zero)

- a) Laparotomia com incisão mediana de 4cm, interessando a pele e a parede abdominal; b) LADO DIREITO: colectomia segmentar direita de 2cm a aproximadamente 2cm da válvula ileocecal e LADO ESQUERDO: colectomia segmentar esquerda de aproximadamente 2cm na região do promontório c) anastomose com sutura contínua de náilon nº6-0; d) fechamento da parede abdominal com sutura contínua de náilon nº4-0 e da pele com náilon nº5-0; e) fixação da peça cirúrgica.

Procedimento cirúrgico (sétimo e décimo-quarto dias pós-operatórios)

- a) Laparotomia com incisão mediana de 4cm, interessando a pele e a parede abdominal; b) coleta do segmento de cólon contendo a anastomose c) fechamento por planos; d) eutanásia; e) fixação da peça cirúrgica.

3.4.3 Grupo desafio – cólon direito e esquerdo

No grupo desafio estudou-se a resposta tissular das anastomoses do cólons direito e esquerdo de 16 animais que foram submetidos à perda aguda de 20% de sua volemia. Procedeu-se a cervicotomia conforme realizada no grupo branco e a laparotomia, colectomia e coleta das peças conforme realizada no grupo controle, tanto à direita quanto à esquerda.

3.5 ESQUEMATIZAÇÃO DA COLETA DOS DADOS CONFORME O TEMPO

3.6 ESQUEMATIZAÇÃO DA COLETA DOS DADOS NAS REOPERAÇÕES

Figura 4 - Fotografias da reoperação no 14º PO do animal do grupo controle. Observaram-se as aderências intestinais na anastomose realizada no cólon direito, seguida da análise macroscópica da anastomose coletada após abertura do cólon direito pelo lado antimesentérico

Figura 5 - Fotografias da reoperação no 14º PO do animal do grupo controle. Observaram-se as aderências intestinais na anastomose realizada no cólon esquerdo, seguida da análise macroscópica da anastomose coletada após abertura do cólon esquerdo pelo lado antimesentérico

3.7 ESTUDO HISTOLÓGICO

3.7.1 Processamento do material

As peças foram irrigadas com soro fisiológico e, após avaliação macroscópica, foram fixadas em pequenas placas de isopor para manter o tecido estendido para fixação em paraformaldeído a 4% (Figura 6). A seguir foram desidratadas em séries alcoólicas com concentração crescente, clarificadas em xilol e incluídas em parafina a 57°C. Cortes de 3 μ de espessura foram distendidos em lâminas de vidro.

Figura 6 - Fotografia de peças dos cólons esquerdo e direito fixadas em placas de isopor obtidas de um animal submetido à hipovolemia, laparotomia e laparorráfia, tendo as peças coletadas na reoperação sete dias após a primeira cirurgia.

3.7.2 Avaliação das células inflamatórias e necrose tecidual das anastomoses intestinais

A coloração de Hematoxilina-eosina (HE) foi utilizada para avaliar a presença das células inflamatórias envolvidas na cicatrização das anastomoses intestinais, ou seja, macrófagos, linfócitos, polimorfonucleares; a seguir, leitura histológica geral.

Essa avaliação foi realizada no microscópio de luz em aumento de 400x (objetiva 40X e ocular 10X). O campo utilizado nesta análise foi o segmento central das anastomoses. Durante a leitura com aumento menor (40X), analisou-se o aspecto necrose tecidual que avaliou a anastomose como um todo.

Foi determinado o número de células encontradas em cada campo e especificado um escore para avaliação. Os critérios do escore para avaliar macrófagos, linfócitos e polimorfonucleares foram:

LEVE – 0-5 células/ campo 400X

MODERADO – até 20 células/ campo 400x

INTENSO – mais 20 células/ campo 400x

Na avaliação da necrose, os critérios observados foram os seguintes:

AUSENTE – nenhum sinal histológico de necrose

FOCAL - pontos específicos de necrose

MACIÇA – presença maciça de necrose no local da inflamação

3.7.3 Avaliação do colágeno nas anastomoses intestinais

Nesta avaliação foi utilizada a Picrossírius-polarização. Os cortes histológicos foram desparafinados, hidratados e corados durante uma hora em solução de Sirius Red 0,1% (Sirius Red F 3 B 200, Mobay Chemical Co. Union, New Jersey, EUA) e dissolvidos em ácido pícrico aquoso saturado. Em seguida foram rapidamente lavados em água corrente e contracorados com hematoxilina de Harris por cinco minutos.

As lâminas coradas com Hematoxilina-eosina e com Picrossírius-hematoxilina foram avaliadas por uma patologista e lidas com o auxílio de sistema digital de imagens que se constituiu de microscópio Olympus BX51 acoplado a uma câmara de marca Oly e adaptado a duas lentes de polarização e um microcomputador Pentium com um giga de memória RAM, com placa digitalizadora de imagens contendo o programa Image Tool versão 3.00, trabalhando em ambiente Windows. Utilizou-se o aumento de 400X e a área observada foi determinada como o primeiro campo encontrado abaixo da mucosa e acima da muscular, na região da anastomose (Figuras 7 e 8). Pelo programa Image Tool as imagens foram tratadas obtendo-se a percentagem de área de colágeno total em relação à área total avaliada. Conforme mostrado nas figuras que seguem, o processamento das imagens, no programa Image Tool, seguiu esta seqüência: a) transformação da imagem para escala de cinza; b) "threshold" da imagem; c) transformação para escala de preto e branco e d) contagem em percentual da área em branco em relação ao preto,

porque o branco correspondia à área corada pelo Picrossírius na imagem inicial.

Figura 7 - Fotomicrografia da região estudada da anastomose de caso do grupo controle no 14^o pós-operatório antes de submetê-la a polarização

Figura 8 - Fotomicrografia da região estudada da anastomose de caso do grupo controle no 14º pós-operatório após submetê-la a polarização

	Black Count	White Count	Black %	White %
Mean	298708,00	8492,00	97,24	2,76
Std. Dev.	0,00	0,00	0,00	0,00
1	298708	8492	97,24	2,76

Figura 9 - Fotomicrografia de caso do grupo controle avaliado no 7º pós-operatório, mostrando a sequência de tratamento da imagem utilizada no programa Image Tool: coloração de Picrossírius, escala de cinza, escala de preto e branco e faixa dos valores obtidos copiados do programa

	Black Count	White Count	Black %	White %
Mean	305078,00	2122,00	99,31	0,69
Std. Dev.	0,00	0,00	0,00	0,00
1	305078	2122	99,31	0,69

Figura 10 - Fotomicrografia de caso do grupo desafio avaliado no 7º pós-operatório, mostrando a sequência de tratamento da imagem utilizada no programa Image Tool

	Black Count	White Count	Black %	White %
Mean	292510,00	14690,00	95,22	4,78
Std. Dev.	0,00	0,00	0,00	0,00
1	292510	14690	95,22	4,78

Figura 11 - Fotomicrografia de caso do grupo controle avaliado no 14º pós-operatório, mostrando a sequência de tratamento da imagem utilizada no programa Image Tool

	Black Count	White Count	Black %	White %
Mean	268655,00	38545,00	87,45	12,55
Std. Dev.	0,00	0,00	0,00	0,00
1	268655	38545	87,45	12,55

Figura 12 - Fotomicrografia de caso do grupo desafio avaliado no 14º pós-operatório, mostrando a seqüência de tratamento da imagem utilizada no programa Image Tool

3.7.4 Avaliação da expressão da HSP70

Imuno-Histoquímica

Os cortes de 3µm de espessura foram fixados em lâminas silanizadas (Sigma, A-3648). A seguir sofreram desparafinização e hidratação através das seguintes fases: a) xilol pré-aquecido a 60°C (1X) 15 minutos; b) xilol à temperatura ambiente (3X) – 30 segundos cada; c) álcool absoluto (3X); álcool 95% (2X); álcool 70% (1X) – 30 segundos cada. Após estas fases foram lavadas em H₂O corrente e H₂O destilada e, para obter o bloqueio da peroxidase endógena foram submetidas à Peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3% (10X) – cinco minutos cada. A recuperação

antigênica foi realizada em alta temperatura: a) panela à vapor (Steamer- pv): citrato 10mM pH 6.0 por 40 minutos. Esfriar por 20 minutos à temperatura ambiente; b) PBS (3X) de 3-5 minutos. Depois disto, realizou-se o bloqueio de biotinas com leite desnatado 2% - 30 minutos a uma hora. O processo de incubação seguiu as seguintes fases: a) incubação das lâminas com anticorpo policlonal específico (HSP70 (K-20), Santa Cruz) 1:200, diluído em tampão PBS/albumina a 1% (Sigma, A9647), por 16-18 horas a 4°C, em câmara úmida; b) PBS (3X) de 3-5 minutos; c) incubação com anticorpo secundário (VECTASTAIN Elite ABC Kit (Goat IgG Vector PK-6105) durante uma hora em temperatura ambiente em câmara úmida; d) PBS (3X) de 3-5 minutos após cada passagem; e) incubação com o complexo ABC (VECTASTAIN Elite ABC Kit (Goat IgG Vector PK-6105) durante 30 min em temperatura ambiente em câmara úmida; f) PBS (3X) de 3-5 minutos após cada passagem. A revelação e a montagem sofreram as seguintes etapas: a) incubação das lâminas no substrato DAB (3, 3'Diaminobenzidine Tetrahydrochloride, Sigma, D-5637) 1mg/ml PBS, adicionar 25µl de H₂O₂ 3%/ml. Revelação por 3-10 minutos, controlando ao microscópio a positividade acastanhada; b) lavagem em H₂O por 10 minutos; c) contracoloração com Hematoxilina de Harris por 20 segundos - 1 minuto; d) lavagem em H₂O; e) desidratação em álcool 70% (1X), 95% (2X), 100% (3X) e xilol (4X) 30 segundos cada; f) montagem com Entellan (Merck, 1.07961).

Análise Imuno-Histoquímica

Analisaram-se as lâminas de imuno-histoquímica para HSP70 por um sistema de análise de imagens (QUANTIMET 520 - Leica). A quantificação da expressão de HSP-70 foi feita pela detecção da coloração acastanhada (indica a expressão da proteína de interesse) em uma área de análise da região epitelial no grupo branco e da junção da anastomose nos grupos controle e desafio (conforme realizado na avaliação do colágeno). No entanto, para avaliação da HSP70, as regiões analisadas foram divididas em quatro campos de contagens. Os resultados foram expressos em média da porcentagem da área detectada em relação à área total de análise para cada animal.

Figura 13 - Fotomicrografia de caso do grupo controle no 7º pós-operatório, mostrando a coloração acastanhada e a contagem do percentual em relação à área total e os valores obtidos mostrados na faixa copiada do programa Quantimet 520

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizado o teste t – Student para a comparação entre os grupos, nos diferentes tempos, para as variáveis expressão da HSP70 e quantidade de colágeno total. Para determinar se havia diferença estatística entre os lados (direito e esquerdo) do mesmo grupo utilizou-se o teste Mann-Whitney.

O teste Mann-Whitney também foi utilizado para avaliar as seguintes variáveis: aderências pós-operatórias e a variação de peso dos animais.

Para avaliar a qualidade das células inflamatórias e a presença de necrose nas anastomoses utilizou-se o teste qui-quadrado de Pearson.

Todos os testes realizados foram bicaudais, sendo utilizado nível de significância de 5% ($\alpha=0.05$). Dessa forma, foram considerados estatisticamente significativos os testes com nível descritivo menor que 5% ($p<0,05$), assinalado nas tabelas e gráficos com a anotação de um asterisco (*). Tendência à diferença estatística foi definida quando o valor de p esteve entre 0,05 e 0,1 e representada nas tabelas e gráficos por dois asteriscos (**) (Armitage et al, 1994; Soares, Siqueira, 2002).

4. RESULTADOS

4.1 COMPLICAÇÕES CIRÚRGICAS

Não ocorreram óbitos durante as intervenções; dois animais morreram no 2º pós-operatório por complicações pulmonares e foram substituídos no estudo. Três animais, dois do grupo controle do lado esquerdo e um do grupo desafio do lado direito evoluíram com diarreia transitória e autolimitada.

Houve uma fístula entre as 32 anastomoses realizadas (3,12%), que ocorreu em uma anastomose realizada no cólon direito, em animal do grupo controle. Na reoperação deste animal evidenciou-se fístula intestinal bloqueada por aderências intestinais e ausência de líquido livre intraperitoneal e ou abscessos intracavitários.

Figura 14 – Fotografia de animal do grupo controle, reoperado no 7º PO, que apresentou fístula bloqueada por aderências (à esquerda) que pode ser visibilizada na foto à direita

Não se observou infecção nas feridas operatórias e houve um caso de granuloma de corpo estranho na sutura da pele.

4.2 ADERÊNCIAS PÓS-OPERATÓRIAS

As aderências pós-operatórias ocorreram em 93,7% dos animais e os principais órgãos envolvidos foram as alças do intestino delgado (62,5%) e o mesocólon (50%), conforme Gráfico 1.

Gráfico 1 – Número de animais com aderências a órgãos intra-abdominais em todos os grupos, conforme os órgãos acometidos

Figura 15 - Fotografias mostrando aderências pós-operatórias nos seguintes animais. Acima, animais submetidos à colectomia direita. À esquerda demonstração do único caso que apresentou fístula anastomótica bloqueada. À direita aderências do cólon direito com outras alças intestinais. Abaixo o mesmo caso de colectomia esquerda: à esquerda mostrando as aderências com tecido testicular e à direita após liberação das aderências para coleta da peça

Os dados sobre aderências intestinais submetidos à comparação (Tabela 1) não mostraram diferença estatística entre os grupos Desafio e Controle. No grupo Branco não se observaram aderências pós-operatórias.

Tabela 1 – Análise estatística (teste Mann-Whitney) do índice total de aderências encontradas nos Grupos Desafio x Controle em cada lado

CÓLONS	7º PO	14º PO
DESAFIO X CONTROLE	<i>p</i>	<i>p</i>
Direito	0,096**	0,536
Esquerdo	0,096**	0,549

** $p > 0,05$ e $p < 0,1$

4.3 PESO DOS ANIMAIS

Os animais submetidos às anastomoses intestinais (Controle e Desafio) perderam mais peso do que aqueles não submetidos (Branco). As diferenças estatísticas ocorreram somente no 7º dia pós-operatório. O valor analisado estatisticamente foi a variação de peso entre o dia da cirurgia e o dia da reoperação (peso final – peso inicial) e pode ser verificado na Tabela 2.

Tabela 2 – Análise estatística (teste Mann-Whitney) da variação de peso (peso do dia da re-operação – peso do dia da cirurgia) entre os grupos: Desafio, Controle e Branco

GRUPOS COMPARADOS	VALOR ENTRE ZERO E 7 DIAS	VALOR ENTRE ZERO E 14 DIAS
	<i>p</i>	<i>p</i>
Branco x Controle	0,027*	0,173
Controle x Desafio	0,208	0,792
Desafio X Branco	0,050*	0,126

* $p < 0,05$

Gráfico 2 – Comparação dos valores da variação de peso (peso final – peso inicial) entre os grupos Controle, Desafio e Branco. Os resultados estatisticamente significativos estão assinalados com asterisco

Gráfico 3 – Comparação dos valores da variação de peso encontrada entre os grupos Desafio e Controle nos dois tempos cirúrgicos (sete e 14 dias)

4.4 ESTUDO HISTOLÓGICO

Foram avaliadas 32 peças contendo anastomoses intestinais, nas quais observamos a expressão da HSP70, a quantidade de colágeno total (colágeno tipo I + colágeno tipo III) e a presença das células inflamatórias. Outras 48 peças contendo intestino (cólon esquerdo ou cólon direito) foram observadas somente em relação à expressão das HSPs70.

4.3.1 Aspectos histológicos qualitativos das células inflamatórias e da necrose perianastomótica

No campo que correspondia ao centro da anastomose havia um processo inflamatório crônico intenso que comprometeu toda a espessura da parede intestinal e se estendeu até o tecido adiposo perianastomótico. As células inflamatórias mais observadas foram os macrófagos, linfócitos e polimorfonucleares, os quais foram submetidos à avaliação por escore. Os macrófagos foram as células mais visibilizados em todas as espécimes de anastomoses avaliadas e, em todos os casos foram encontrados mais de 20 células/campo, correspondendo ao escore 3. Os resultados da comparação estatística dessa avaliação encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3 - Análise estatística (teste Qui-quadrado) do escore das células inflamatórias encontradas nas anastomoses intestinais do grupo Desafio x Controle no sétimo e no décimo-quarto dias pós-operatórios

ESCORE		CONTROLE			DESAFIO			p
		1	2	3	1	2	3	
7º PO	PMN	25%	50%	25%	50%		50%	0,264
	LIN		75%	25%		50%	50%	0,465
14º PO	PMN	50%		50%	50%	50%		0,135
	LIN	25%	50%	25%	50%	25%	25%	0,717

A necrose tecidual perianastomótica foi raramente encontrada e quando ocorreu esteve relacionada à presença dos fios de sutura.

Tabela 4 - Necrose encontrada na mucosa dos espécimes de anastomoses intestinais estudados. Os dados foram obtidos pela avaliação realizada à coloração de HE e os valores numéricos representam o número de animais que apresentou ou não esse aspecto

NECROSES	GRUPOS	
	CONTROLE	DESAFIO
AUSENTE	14	13
FOCAL	2	1
MACIÇA	0	2

4.3.2 Avaliação quantitativa do colágeno total (tipo I e tipo III) nas anastomoses intestinais

A deposição de colágeno foi fácil e evidentemente observada na camada submucosa do intestino grosso. Fato esse ilustrado na figura 16.

Figura 16 - Demonstração representativa da camada submucosa normal do intestino grosso observada pelo microscópio de luz polarizada dos espécimes corados por Picrossirius red. As fibras estão ordenadamente dispostas, em orientação paralela, além de demonstrar a birrefringência - característica clássica das fibras colagênicas avaliadas nessa coloração

Na avaliação da variável colágeno não houve diferença estatística entre os lados direito e esquerdo pelo teste Mann-Whitney (Tabela 5). A partir disso, utilizou-se o teste t-student para avaliação das diferenças estatísticas entre os grupos Desafio e Controle.

Tabela 5 - Resultados da análise estatística (teste Mann-Whitney) da comparação entre os lados direito e esquerdo da variável colágeno, nos diferentes grupos e tempos pós-operatórios

GRUPOS	CÓLON	TEMPO	MÉDIA	DESVIO-PADRÃO	<i>p</i>
Controle	Dir	7º PO	2,1925	1,5122	0,149
	Esq		1,6575	1,0374	
	Dir	14º PO	7,6475	6,0423	0,248
	Esq		7,6825	3,2943	
Desafio	Dir	7º PO	0,9325	0,8469	0,772
	Esq		0,7850	0,5980	
	Dir	14º PO	5,7100	4,6371	0,564
	Esq		8,0225	5,1697	

O colágeno, observado pela coloração de Picrossírius, esteve mais evidente no 14º dia PO que no 7º dia PO em todos os grupos, como mostrado na figura 17.

Controle 7 dias

Controle 14 dias

Desafio 7 dias

Desafio 14 dias

Figura 17 - Avaliação histológica pela coloração de Picrosirius. Pode-se observar que a quantidade de fibras colágenas é menor no sétimo dia pós-operatório que no décimo-quarto, tanto no grupo controle quanto no desafio. Observa-se também que as fibras inicialmente estão desordenadas, e retornam à sua orientação normal em torno do final da segunda semana de cicatrização.

Com o tratamento estatístico realizado pelo teste t-student verificou-se que houve diferença estatística entre a quantidade de colágeno que esteve maior no 14º dia pós-operatório, comparativamente ao 7º dia pós-operatório; tanto para o grupo Controle quanto para o grupo Desafio. Pode-se observar esse fato no Gráfico 4.

Gráfico 4 - Variação da quantidade total de colágeno avaliada pela coloração de Picrossirius, comparando os grupos Controle e Desafio, no 7º e 14º dias pós-operatórios

Ao se comparar os grupos Desafio e Controle, na variável quantidade de colágeno, encontrou-se diferença estatística no 7º dia pós-operatório, conforme demonstrado no Gráfico 5.

Gráfico 5 - Valores percentuais médios da área contendo Colágeno Total (Tipo I + Tipo III), no 7º e 14º dias pós-operatórios nos grupos Desafio e Controle com relação à área total do compartimento de referência

*p < 0,05

4.3.3 Avaliação geral da expressão da HSP70

O gráfico a seguir demonstra a análise geral da expressão da HSP70 nos diferentes grupos. Nos grupos Controle e Desafio (com anastomose) a expressão da HSP70 foi significativamente maior do que no grupo sem anastomose (grupo Branco), além de ser também mais intensa no sétimo do que no décimo-quarto dia pós-operatório.

Gráfico 6 - Valores percentuais médios da área marcada pela HSP70 nos diferentes grupos estudados. Os valores são dados em porcentagem da área total do compartimento de referência

A análise estatística, realizada pelo teste de Mann-Whitney, da comparação da variável HSP70 entre os lados direito e esquerdo, no 7º e 14º dias pós-operatórios, nos diferentes grupos, não demonstrou diferenças estatísticas (Tabela 6).

Tabela 6 - Análise estatística (teste Mann-Whitney) da comparação entre os lados direito e esquerdo da variável expressão da HSP70 nos diferentes grupos e tempos pós-operatórios

GRUPOS	CÓLON	TEMPO	MÉDIA	DESVIO-PADRÃO	<i>p</i>
Controle	Dir	7ºPO	15,9775	8,5041	0,786
	Esq		17,7300	8,9221	
	Dir	14ºPO	10,1250	5,4833	0,109
	Esq		4,0150	2,3171	
Desafio	Dir	7ºPO	6,7400	0,9103	0,002*
	Esq		20,6600	3,2931	
	Dir	14ºPO	6,2500	0,4837	0,765
	Esq		5,5725	4,1239	
Branco	Dir	7ºPO	0,1650	7,767E-02	0,690
	Esq		0,1375	0,1053	
	Dir	14ºPO	1,7750	2,9947	0,325
	Esq		0,1325	0,1271	

* $p < 0,05$

4.3.3.1 Avaliação da expressão da HSP70 no intestino sem anastomose

Houve expressão da HSP70 no intestino grosso. Quando se observou a expressão da HSP70 no grupo Branco (com sangramento), nos tempos zero, sete e 14 dias pós-operatórios, não se verificou diferença estatística na comparação entre os lados, esquerdo e direito, conforme o gráfico abaixo.

Gráfico 7 - Demonstração da média da área demarcada pela HSP70 no intestino do grupo Branco, no zero, no 7º e 14º dias pós-operatórios. Os valores são dados em porcentagem da área total do compartimento de referência

No entanto, quando se comparou a expressão da HSP70 no intestino grosso nos grupos com e sem sangramento, no tempo zero, tanto à esquerda quanto à direita, houve diferença estatística, conforme se observa no Gráfico 8.

Gráfico 8 - Demonstração do resultado do estudo estatístico (teste t-student) da avaliação da variável expressão da HSP70 no intestino grosso de animais normovolêmicos (grupo Controle) e hipovolêmicos (grupo Desafio) de espécimes coletadas no dia zero. Os valores foram obtidos pela média da porcentagem de área demarcada pela HSP70 em relação ao compartimento de referência

A comparação entre a expressão da HSP70 no intestino sem anastomose nos grupos e variados tempos: zero, sete e 14 dias pós-operatórios verificou que a diferença se manteve no lado esquerdo, mas não à direita. Os dados aqui descritos estão demonstrados na tabela 7.

Tabela 7 - Análise estatística (teste Mann-Whitney) da comparação entre os tempos pós-operatórios: zero x 7º PO e zero x 14º PO, para o mesmo grupo e mesmo lado

GRUPOS	LADOS	TEMPO	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	<i>p</i>
Desafio	Direito	Zero	0,5983	0,9023	0,394
Branco	Direito	7	0,1650	7,767E-0	
Desafio	Esquerdo	Zero	0,5543	0,5219	0,038**
Branco	Esquerdo	7	0,1375	0,1053	
Desafio	Direito	Zero	0,5983	0,9023	0,748
Branco	Direito	14	1,7750	2,9947	
Desafio	Esquerdo	Zero	0,5543	0,5219	0,038**
Branco	Esquerdo	14	0,1325	0,1271	

** $p > 0,05$ e $p < 0,1$

4.3.3.2 Avaliação da expressão da hsp70 no intestino com anastomose

A expressão da HSP70, observada por imuno-histoquímica, foi mais evidente no 7º dia PO do que no 14º dia PO, tanto no grupo Desafio quanto no Controle, como mostra a figura 18.

Grupo Controle 7º PO

Grupo Controle 14º PO

Grupo Desafio 7º PO

Grupo Desafio 14º PO

Figura 18 - Avaliação da expressão da HSP70 nas anastomoses intestinais por imuno-histoquímica. A coloração acastanhada demonstra a área marcada pela HSP70

A comparação estatística sobre a variável expressão da HSP70 entre os grupos Desafio e Controle (com anastomoses intestinais), nos dois tempos (sete e 14 dias pós-operatórios), não mostrou diferença estatística. Houve tendência à diferença estatística no sétimo e décimo-quarto dias pós-operatórios, à direita (Gráfico 9).

Gráfico 9 - Demonstração dos resultados do estudo estatístico (teste t-student) da comparação entre os grupos Controle e Desafio, no 7º e 14º dias pós-operatórios. Os valores foram obtidos pela média da porcentagem de área demarcada pela HSP70 em relação ao compartimento de referência

** $p > 0,05$ e $< 0,1$

Também se avaliou a expressão da HSP70 nos grupos Controle e Desafio (com anastomoses), comparando-se o sétimo e o décimo - quarto dias pós-operatórios. Houve diferença estatística em ambos os grupos. (Gráfico 10 e Tabela 8).

Gráfico 10 – Demonstração da análise estatística (teste t-student) entre o 7º e 14º dias pós-operatórios, tanto para o grupo Desafio quanto para o Controle. A expressão da HSP70 foi estatisticamente maior no 14º do que no 7º dia PO. Os valores foram obtidos pela porcentagem da área demarcada pela HSP70 em relação ao compartimento de referência

Tabela 8 - Resultados da análise estatística (teste t-student) da comparação entre o 7º e 14º dias pós-operatórios, em relação à variável expressão da HSP70

GRUPOS	TEMPO (DIAS)	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	p
Desafio	7º PO	13,7000	7,7695	0,026*
	14º PO	5,9113	2,7422	
Controle	7º PO	16,8538	8,1232	0,014*
	14º PO	7,0700	5,0846	

* p < 0,05

4.3.3.3 Avaliação da expressão da HSP70 no intestino sem x com anastomose

Na comparação da expressão da HSP70 no intestino normal (sem anastomose) e no intestino submetido à anastomose, observou-se que houve diferença significativa, mesmo quando essa comparação foi separada por lados, cólons direito e esquerdo (Gráficos 11 e 12).

Gráfico 11 – Demonstração dos resultados (teste t-student) da comparação da expressão da HSP70 entre o intestino com anastomose e sem anastomose, do dia zero para o 7º dia pós-operatório, tanto para o grupo Controle quanto para o grupo Desafio

* $p < 0,05$

Gráfico 12 – Demonstração dos resultados (teste t-student) da comparação da expressão da HSP70 entre o intestino com anastomose e sem anastomose, do zero para o 14º dia pós-operatório, tanto para o grupo Controle quanto para o grupo Desafio

* p < 0,05

4.4 Correlação entre a expressão da HSP70 e a quantidade de colágeno

A co-relação observada entre a expressão da HSP70 e a quantidade de colágeno foi inversa, mas não estatisticamente significativa. Na figura 11, pode-se observar que tanto no grupo Controle quanto no grupo Desafio a expressão da HSP70 foi maior no sétimo dia pós-operatório, diferentemente da quantidade de colágeno total que esteve maior no décimo-quarto dia,

momento em que a expressão da HSP70 e a quantidade de colágeno foram aparentemente iguais.

Gráfico 13 - Correlação entre os dados gerais da expressão da HSP70 e da quantidade do colágeno total

5. DISCUSSÃO

A cicatrização é o processo de reparo tecidual no qual o tecido lesado é substituído por tecido conjuntivo fibroso. A falha na cicatrização das feridas é um problema clínico significativo e sua consequência é a deiscência das anastomoses, uma complicação importante em pós-operatório de cirurgias do aparelho digestório. Condições gerais, tais como hipovolemia, podem prejudicar o metabolismo do colágeno e, conseqüentemente, o processo de cicatrização (Laund et al, 2004).

O processo de compreensão do fenômeno de cicatrização das anastomoses intestinais tem mais de 200 anos, mas permanece como um campo vasto de evolução porque, a despeito de várias décadas de pesquisa, existem muitas dúvidas a serem esclarecidas, principalmente do ponto de vista molecular. Com o intuito de auxiliar nesse aspecto, as pesquisas experimentais têm sido aliadas fundamentais.

Em 1812 e 1826, respectivamente, Lembert e Travers iniciaram os estudos sobre anastomoses intestinais em animais e evidenciaram a necessidade da “união adequada das bordas intestinais”, dado esse que se pode traduzir como necessidade de impermeabilidade das anastomoses para obtenção de sucesso cirúrgico. Porém a primeira cirurgia em que se realizou uma anastomose intestinal em seres humanos foi efetuada por Dieffenbach, em 1836, e tratou-se de doente com estrangulamento intestinal (Fraser e Condon, 1980).

Outro princípio fundamental na realização das anastomoses intestinais é a necessidade de inclusão da submucosa na linha de sutura por

ser a camada que possui maior teor de colágeno, proteína que confere sustentação à parede intestinal e é fundamental para o processo cicatricial. Esse preceito foi elaborado por Halsted (1887) e permanece aceito e respeitado até os dias atuais.

Com Goligher et al (1970) muitos conceitos foram firmados e reelaborados, mas o estudo do processo cicatricial, em níveis histológico e molecular ainda permanece obscuro.

Por um longo período de tempo, muitos estudos sobre anastomoses intestinais avaliaram a quantidade de colágeno dos tipos I e III ou de hidroxiprolina nas anastomoses intestinais, relacionando com os fatores que pudessem influenciar sua produção como hipovolemia, infecção, desnutrição, entre outros. No entanto, conforme a revisão bibliográfica ora realizada, aparentemente, nenhum estudo até o momento avaliou a presença ou a função das proteínas do choque térmico nesse processo.

Essas proteínas já foram avaliadas em processos cicatriciais da pele porque Oberringer et al (1995) já inferiram que a cicatrização também é uma forma de estresse e que poderia induzir a expressão da HSP70, fato esse que foi confirmado em seu estudo. Shukla et al (1998) e Laplante et al (1998) também estudaram a expressão da HSP70 em cicatrização de pele e os dados foram positivos.

Sabe-se também que as proteínas do choque térmico, ou HSP, têm papel fundamental na síntese protéica: evitam interações incorretas entre as proteínas; auxiliam na montagem final, síntese, dobramento e degradação e

fazem translocação entre os compartimentos intracelulares, ou seja, atuam como “Protetoras Moleculares”.

Há poucos dados, ou aparentemente nenhum que correlacione Heat Shock Proteins, colágeno e cicatrização de anastomoses, mas a partir dos dados de cicatrização na pele e do envolvimento destas proteínas na síntese de colágeno, pretendeu-se correlacionar, com intuito de compreender melhor o processo cicatricial dessas anastomoses, a expressão da HSP70 com a presença das células inflamatórias e do colágeno, proteína mais importante no processo cicatricial.

A proposta do presente estudo é corolário da necessidade de se reduzir dúvidas sobre o processo molecular da cicatrização das anastomoses intestinais com o intuito de evoluir nesse conhecimento e, assim, tentar reduzir e compreender melhor as complicações.

Para realizar esta pesquisa foi escolhido o rato como animal de experimentação porque as vantagens de sua utilização são conhecidas: rápida e farta obtenção dos animais associada à facilidade de seu controle e manutenção nas gaiolas, além de ótima aceitação da dieta e elevada resistência à infecção (Soares, 1991). Estudos sugerem que devido às similaridades anatômicas e dinâmicas entre ratos e seres humanos, os resultados obtidos nos estudos experimentais de cicatrização, utilizando esse animal, possam ser extrapolados para a prática cirúrgica (Nishihara, Prudden, 1958).

O desenho do estudo foi desenvolvido após análise bibliográfica de outros estudos experimentais sobre anastomoses intestinais. Um dos aspectos mais importantes a se definir foi o período pós-operatório em que os animais seriam reoperados. A maioria dos estudos experimentais sobre anastomoses intestinais avaliou as anastomoses em vários momentos pós-operatórios, inclusive no 7º e 14º dias pós-operatórios. Tiveram por base a avaliação da cicatrização sobre três aspectos principais: o teste de resistência mecânica, o estudo histológico da cicatrização e da determinação do colágeno (Buchmiller-Crair et al, 2001; Martens, Hendriks, 1991; Laund et al, 2004; Rey et al, 2004; Goes et al, 2005; Biondo-Simões et al, 2005). O objetivo deste estudo foi correlacionar a expressão da HSP70, a quantidade de colágeno e a presença das células inflamatórias.

5.1 COMPLICAÇÕES CIRÚRGICAS E AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA DAS ANASTOMOSES INTESTINAIS

Embora a análise das complicações pós-operatórias não tenha sido objetivo deste estudo, observou-se que não houve infecção da ferida operatória. Complicação essa, possível, porque os animais não foram submetidos à antibioticoterapia. Dois fatores podem ser responsabilizados por esse aspecto: a retirada do material fecalóide do local da anastomose durante o procedimento, acarretando diminuição da quantidade de colônias

de bactérias no local, além de a maior resistência à infecção que apresentam os animais de experimentação.

Houve um caso de granuloma de corpo estranho nas incisões, que não era esperado, já que o fechamento da parede abdominal desses animais foi realizado com fio de mononáilon, que é monofilamentar, inabsorvível e sintético e não costuma ocasionar reações do tipo corpo estranho, pois apresenta baixa reação tecidual principalmente em suturas de pele (Ribeiro et al, 2005). Além disso, os fios monofilamentares são preferíveis aos multifilamentares, pois estes favorecem o surgimento de infecções acentuando a resposta inflamatória (Katz et al, 1981). Então, atribuiu-se a presença de pêlos a causa do granuloma de corpo estranho do subcutâneo.

Em 3,2% dos casos, ou seja, em uma das 32 anastomoses realizadas ocorreu fístula anastomótica. Na reoperação desse animal, que pertencia ao grupo controle do lado direito, não se evidenciou contaminação, abscesso e ou líquido livre na cavidade peritoneal. Tratou-se de fístula bloqueada que foi verificada quando da abertura do intestino para fixação da peça. Esse animal não foi retirado da casuística porque a deposição de colágeno poderia ser estrutural e não uniforme e ter um porquê que não se repetiu nos demais indivíduos.

Conforme a literatura, o índice de fístulas em cirurgias de cólon na prática clínica varia de 5 a 10% (Fielding et al, 1980; Beart, Kelly, 1981; McGinn et al, 1985; Fingerhunt et al, 1994). Em estudo experimental em

ratos sobre anastomoses intestinais, envelhecimento e hipotireoidismo, Biondo-Simões et al (2005) não observaram deiscência anastomótica. Buchmiller-Crair et al (2001), estudando anastomoses intestinais e anemia aguda, em coelhos, também não apresentaram nenhum caso de fístula anastomótica. Outros estudos experimentais sobre anastomoses intestinais não relatam as taxas de deiscência anastomótica. Portanto a taxa de fístula encontrada no estudo ora em discussão foi compatível com os dados da literatura e talvez traduza uma resposta cicatricial melhor e provavelmente uniforme desses animais.

Outro fator que pode ter influenciado positivamente o baixo índice de fístulas anastomóticas foi a grande quantidade de aderências que pode significar bloqueio de pequenas fístulas que possam ter ocorrido já que este estudo experimental mostrou taxa elevada de aderências (93,7%), exatamente da mesma maneira que ocorreu no estudo de Biondo-Simões et al (2005), onde as aderências ocorreram em 100% dos casos. Goldsmith (1977) argumentou que quando ocorrem pequenas deficiências de cicatrização, estas podem passar clinicamente despercebidas, quando o omento ou outras vísceras aderem à área comprometida, o que não se confirmou no presente estudo.

Optou-se pela sutura contínua, invertida, em plano único para a realização das anastomoses colônicas, pois é um método simples, rápido e econômico, que promove impermeabilidade com pouca reação inflamatória tecidual e apõe as camadas submucosas, além de ser tão seguro quanto a

sutura com pontos separados (Skakun et al, 1998). Houdart et al (1983) não encontraram diferenças clínicas, histológicas e microangiográficas entre suturas contínuas e com pontos separados, argumentando ainda a redução no número de nós e a rapidez da operação.

As anastomoses em plano único além de serem mais anatômicas apresentam revascularização precoce, são seguras, produzem estreitamento luminal mínimo e oferecem melhores condições para a cicatrização. A sutura em dois planos apresenta fenômenos de reparação mais intensos e conduz a maior fibrose, contudo apresenta maior resistência tênsil quando comparada à sutura em plano único (Naresse, 1985).

Em relação à aproximação das bordas, os piores resultados são relatados quando se utilizam suturas com eversão, que apresentam maiores índices de deiscência do que a sutura por inversão (Bezuti et al, 2002).

Do ponto de vista macroscópico, avaliou-se também o aspecto da anastomose. No 7º dia pós-operatório encontrou-se anastomose ainda não totalmente cicatrizada, com tecido inflamatório frouxo, sem a presença da crista de cicatrização. Diferentemente do 14º dia pós-operatório, quando as anastomoses já estavam adequadamente cicatrizadas e com aspecto típico da crista de cicatrização.

5.2 PESO DOS ANIMAIS

Observou-se diferença estatística entre os grupos submetidos a anastomoses intestinais (controle e desafio) e aqueles não submetidos (grupo branco). A perda de peso provavelmente ocorreu devido ao catabolismo cirúrgico e não à hipovolemia; já que na comparação entre os grupos desafio e branco, a diferença estrutural encontrada foi a presença de anastomoses e não a hipovolemia. Quando foram comparados os grupos controle e desafio, não se verificou diferença entre os resultados, portanto a hipovolemia não ocasionou diferenças estatísticas.

Após qualquer procedimento cirúrgico é estimulada uma cascata metabólica hormonal que acarreta um quadro catabólico importante que é tão mais evidente quanto a intensidade do estímulo ao metabolismo, ou seja, grandes cirurgias estimulam mais que pequenas cirurgias. Provavelmente seja essa a explicação do motivo pelo qual alguns animais perderam peso somente nos casos de cirurgia de grande porte (colectomias) e não de pequeno porte (dissecção venosa).

Encontrou-se diferença estatística entre os pesos dos animais somente na primeira semana pós-operatória e não se repetiu na segunda, sugerindo que o metabolismo pré-operatório retorne aos níveis pré-operatórios nesse período.

5.3 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DAS CÉLULAS INFLAMATÓRIAS

Um dos parâmetros utilizados para avaliação comparativa entre as anastomoses realizadas em ratos normovolêmicos e hipovolêmicos foi a avaliação histológica realizada pela coloração de Hematoxilina-Eosina.

A lesão tecidual com cicatrização em primeira intenção (incisão seguida de sutura) causa a morte de um número limitado de células epiteliais e de tecido conjuntivo, assim como provoca a solução de continuidade da membrana basal epitelial. O espaço da incisão fica repleto de coágulos, fibrina e leucócitos (crosta fibrino-leucocitária). Em 24 horas os neutrófilos migram para as bordas da incisão a fim de remover essa crosta através da fagocitose. A parede intestinal torna-se cada vez mais espessa, pois o aumento da permeabilidade vascular provoca edema e intensa atividade mitótica da membrana basal, assim como migração de grande quantidade de células do processo inflamatório (exsudato) para a região. Aos poucos, o exsudato agudo é gradualmente substituído por exsudato mononuclear (principalmente à custa de macrófagos e linfócitos) e tecido de granulação (neoformação vascular e fibroblastos), além do que se inicia a deposição de colágeno pelos fibroblastos nas margens da incisão. Por volta do 14º dia, já existem sinais de reepitelização. O edema, o infiltrado neutrofilico e a vasodilatação já desapareceram e a deposição de colágeno é intensa. Esse processo evolui até a reepitelização completa (fechamento da solução de continuidade), com conseqüente diferenciação das células do

epitélio seguida de maturação de sua arquitetura. Meses após a lesão tecidual a força de tensão no tecido reparado atinge o máximo (Cotran et al, 1994).

Portanto o processo de cicatrização das anastomoses intestinais é parecido com o processo cicatricial em qualquer outra parte do organismo e depende basicamente das fases de cicatrização que já são muito bem estabelecidas. A fase de proliferação, onde as células inflamatórias são fortemente estimuladas, migram para o local da cicatriz e geram o tão conhecido processo inflamatório. O papel da fase inflamatória, incluindo a migração de leucócitos para os tecidos, já debatido na literatura, determina que os neutrófilos tenham função importante eliminando debris, protegendo da infecção e liberando substâncias promotoras da cicatrização. O deslocamento de neutrófilos inicia-se imediatamente após a lesão tecidual e atinge um pico de concentração em apenas 12 horas (Clark, 1996). Então, a presença das células inflamatórias em uma cicatriz é conceitual. Estão envolvidos nesse processo principalmente os macrófagos, linfócitos e polimorfonucleares e foram estas as células avaliadas neste estudo.

Na análise de estudos prévios, verificou-se que a maneira mais comumente utilizada para avaliar as células inflamatórias foi a escala de Ehrlich-Hunt que utiliza uma avaliação semiquantitativa das células inflamatórias (Ehrlich et al, 1973), ou uma variação desta avaliação, utilizando uma escala com escores.

A partir da avaliação desses dados, optou-se pela utilização dessa mesma escala, porém modificada, pois para cada escore foi determinado previamente junto a um patologista a quantidade de células que seriam contadas por campo em cada nível do escore, conforme demonstrado na metodologia.

As células inflamatórias encontradas nas anastomoses não mostraram diferença estatística entre os grupos estudados.

A necrose tecidual perianastomótica foi raramente encontrada e quando ocorreu esteve relacionada à presença dos fios de sutura. Na cicatriz em boa evolução a parte interna das camadas intestinais - a mucosa, pode ter sofrido algum grau de necrose que já tivesse sido eliminado precocemente à avaliação histológica.

5.4 AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DO COLÁGENO TIPO I E TIPO III

A coloração das fibras de colágeno à microscopia eletrônica no método de Picrossírius depende de sua espessura (Junqueira et al, 1982; Szendroi et al, 1984). Durante a síntese e depósito de colágeno é difícil diferenciar os colágenos tipos I e III, já que as fibras do colágeno tipo III são finas e estão recobertas pelas fibras do colágeno tipo I (Junqueira, Montes, 1983; Stadelmann et al, 1998). Então, devido à dificuldade em distinguir o colágeno tipo I do tipo III durante a fase de colagenização, optou-se pela

quantificação do colágeno total (tipo I + tipo III) que foi observado pelo microscópio de luz polarizada através da coloração de Picrossírus.

Desde 1968, com Constantine, Mowry, sabe-se que a coloração de Picrossírus é adequada para examinar o colágeno em microscópio de luz polarizada devido à sua clássica característica de birrefringência. Rabau, Dayan (1994) demonstraram que o método é útil e eficaz para avaliar os diferentes tipos de colágeno em situações fisiológicas e patológicas da parede intestinal. Whitaker et al (1994) definiram que este método é mais eficaz do que o de Masson para avaliar o colágeno.

As fibras de colágeno são responsáveis pela integridade da parede intestinal; assim sendo o estudo da organização das fibras de colágeno é essencial para compreender o processo de cicatrização das anastomoses intestinais (Hendriks, Mastboon, 1990). Sua síntese decorre da ação dos fibroblastos e torna-se mais intensa aproximadamente do quinto ao sétimo dia de pós-operatório. A força de tensão da ferida aumenta com a formação e aderência das fibras entre si e atinge o máximo entre o décimo - quarto e décimo - sexto dias de pós-operatório (Fauci et al, 1976; Sakalliglu et al, 1994). Esses fatos embasaram a definição dos tempos pós-operatórios de observação das anastomoses.

Utilizou-se o teste estatístico Mann-Whitney para comparar os lados direito e esquerdo da variável colágeno, nos diferentes tempos pós-operatórios. Não se observou nem significância, nem tendência à significância estatística, pois para significância o valor de p deve ser menor

que 0,05 e para tendência entre 0,05 e 0,1. Todavia observou-se que não houve diferença entre os lados e, a partir disso, utilizou-se o teste t-Student para comparar os grupos desafio e controle.

Conforme os resultados demonstrados, a quantidade de colágeno total foi maior no décimo-quarto dia pós-operatório do que na primeira semana, corroborando os dados da literatura, já que se sabe que o estímulo à produção de colágeno se inicia logo após a realização da anastomose, sofre um rápido declínio e por volta do sétimo dia pós-operatório está provavelmente no pico de estimulação. No final da segunda semana de cicatrização essa colagenização está quase totalmente formada, faltando apenas o redirecionamento das fibras colagênicas que foram produzidas desorganizadamente.

Não foi observada diferença estatística em todos os tempos analisados, mas no sétimo dia pós-operatório verificou-se que no grupo desafio, ou seja, nos animais submetidos à hipovolemia, a quantidade de colágeno total das anastomoses esteve diminuída quando comparada aos animais do grupo controle, onde a quantidade de colágeno para esse tempo foi menor. Isso não se repetiu para o tempo de 14 dias pós-operatórios. Entende-se então que o estímulo à produção de colágeno pode ter sido retardado nos animais submetidos ao sangramento, mas que não tenha sido totalmente extinguido. Isso demonstra que pode ter havido prejuízo na cicatrização dessas anastomoses, mas não o suficiente para evoluir com

deiscências e complicações maiores, já que o único animal que apresentou essa complicação não fez parte deste grupo e sim do grupo controle.

É importante salientar que, talvez em situações mais deletérias, com sangramentos mais importantes, isso pudesse realmente ter interferido na cicatrização já que na primeira semana a anastomose intestinal é basicamente mantida pela sutura realizada e pela quantidade de colágeno que já está sendo produzida; logo, se o seu estímulo estiver diminuído, poderá acarretar maiores danos. Também é importante lembrar que não houve diferença significativa entre os lados, mostrando que se houvesse prejuízo cicatricial, não haveria preferência pelos lados direito ou esquerdo.

As anastomoses colônicas, especialmente, no cólon esquerdo estão associadas a risco relativamente alto de deiscências (Greca et al, 2000). Estes autores não evidenciaram diferenças entre as anastomoses realizadas à direita ou à esquerda. De acordo com Ambrosetti et al (1999), na maioria dos casos, a deiscência pode estar diretamente relacionada à hipoperfusão tecidual na linha de anastomose, influenciando assim o processo de cicatrização.

Em estudo experimental em cães, realizado por Greca et al (2000), os animais foram submetidos a choque hipovolêmico; observaram-se diferenças estatísticas entre o grupo experimento e o controle somente quando analisado o colágeno total. Quando foram analisados separadamente os tipos de colágeno (tipo I e tipo III) não se observou

diferença estatística. Este estudo só avaliou a cicatrização no sétimo dia pós-operatório.

5.5 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA HSP70 NO INTESTINO GROSSO DE ANIMAIS SUBMETIDOS E NÃO SUBMETIDOS A SANGRAMENTO PRÉ-OPERATÓRIO

Conforme Morimoto et al, (1990); Feder, Hofmann (1999), as HSPs são geralmente divididas em duas categorias, HSP induzida e HSP constitutiva. Constitutiva, aquela que está presente na célula e induzida aquela que é produzida em grandes quantidades quando submetida a estresse.

Estudos que analisaram a expressão das HSPs no trato gastrointestinal, relacionando-as com as doenças inflamatórias intestinais, verificaram que houve variação em seus níveis de expressão, conforme sua localização (Tanguay et al, 1993; Ludwig et al, 1999). Outros estudos mostraram que a presença de bactérias e a fermentação também podem induzir a expressão de HSP na superfície dos colonócitos (Ren et al, 2001; Kojima et al, 2004).

Arvans et al (2003) verificaram que a expressão da HSP70 é mínima na superfície mucosa ou nas células da lâmina própria, sugerindo que a expressão fisiológica da HSP colônica é seletiva para as células do epitélio

intestinal. Kojima et al (2003) relataram que a expressão da HSP70 e da HSP25 é importante na manutenção da integridade da mucosa colônica e que sua expressão é mantida por estímulos da flora entérica e das células imunológicas da lâmina própria. A partir destes dados, optou-se pela avaliação do epitélio para verificação da expressão da HSP70 no intestino grosso.

Os resultados obtidos neste estudo corroboram os dados da literatura já que a HSP70 estava expressa no intestino grosso dos animais não submetidos à hipovolemia, ou seja, em intestinos normais. Sua expressão foi estatisticamente maior nos animais normovolêmicos quando comparados aos hipovolêmicos, ou seja, o sangramento diminuiu a expressão da HSP70 no intestino grosso. Não há dados na literatura sobre a influência da hipovolemia na expressão das HSPs.

5.6 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA HSP70 NAS ANASTOMOSES INTESTINAIS

Até a presente data não há dados na literatura a respeito da expressão da HSP70 nas anastomoses intestinais. Os dados existentes comentam a cicatrização em feridas de pele e evidenciam que o estímulo à produção de HSP70 inicia-se por volta de 24 horas após a lesão e cai para

os níveis basais em sete ou 14 dias coincidentemente com a adequada cicatrização das feridas (Oberringer et al, 1995).

Conforme a literatura, a HSP70 tem papel fundamental no metabolismo protéico intracelular, destacando sua função na ligação de polipeptídeos recém-sintetizados auxiliando o seu enovelamento, além de controlar a qualidade de algumas proteínas recém-sintetizadas. Isso parece estar relacionado com a cicatrização das anastomoses intestinais, pois é um estímulo à produção de colágeno e, conseqüentemente, enovelamento adequado para que se tenha uma boa cicatrização.

Os resultados desta pesquisa parecem confirmar esses dados já que em todos os grupos, quando compararam-se animais submetidos e não submetidos a anastomoses, a expressão da HSP70 foi maior no grupo com anastomose, ou seja, onde o processo cicatricial estava envolvido, sendo esse fato estatisticamente significativo.

Vale ressaltar que a expressão da HSP70 esteve mais elevada quando a quantidade de colágeno foi menor e vice-versa, apesar de esse dado não ter sido significativo do ponto de vista estatístico. Então, admite-se que a HSP70 esteja envolvida nesse processo cicatricial e possa de alguma forma ainda não muito bem esclarecida participar das fases da cicatrização das anastomoses intestinais.

Por outro lado, quando foram comparados os grupos desafio e controle, ou seja, o mesmo estímulo cicatricial, somado a um estímulo deletério que foi o sangramento, houve tendência à significância estatística

tanto no sétimo quanto no décimo quarto dia pós-operatório somente do lado direito; diferentemente do que ocorreu com o colágeno que apresentou diferença estatística no sétimo dia pós-operatório e em ambos os lados.

Entende-se que essas diferenças não podem ser totalmente esclarecidas com o modelo experimental em pauta, mas já se pode inferir que o processo cicatricial estimula a expressão da HSP70 e que o sangramento aparentemente não consegue interferir nesse fato e que talvez a expressão da HSP70 pode ser um marcador experimental de complicações das anastomoses intestinais.

5.7 AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DA EXPRESSÃO DA HSP70 NO INTESTINO GROSSO COM E SEM ANASTOMOSES INTESTINAIS

Correlacionando os dados, verificou-se que há expressão da HSP70 nos intestinos normais e que ela é marcadamente mais expressa nos intestinos dos animais submetidos a anastomoses e que, interessante, nos intestinos normais dos animais submetidos a sangramento, essa expressão foi menor do que nos animais não submetidos a sangramento; todavia o mesmo fato não foi observado nos animais submetidos a anastomoses. Assim sendo, pressupõe-se que o estímulo do processo cicatricial pode influenciar de maneira mais positiva na expressão da HSP70 do que o estímulo do sangramento pode influenciá-la negativamente.

5.8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

“Das moscas das frutas, às doenças autoimunes e ao câncer, as proteínas chaperonas são moléculas maravilhosas cativando a imaginação de pesquisadores em toda a comunidade científica. Muitas novas avenidas serão abertas através do estudo e do entendimento da resposta celular ao estresse. Estamos apenas começando a portentosa aventura que aguarda nosso descobrimento de como as células lidam com o estresse”.

Wynn et al (1994)

A presente pesquisa, realizada com base experimental pode sugerir que:

A HSP70 está normalmente expressa no intestino grosso e que o estímulo à sua expressão é diminuído pela hipovolemia.

A cicatrização das anastomoses estimula a expressão da HSP70, seja porque a cicatrização é uma situação que simula um estresse celular, seja porque está envolvida na síntese do colágeno.

A expressão da HSP70 pode tornar-se um marcador biológico das complicações das anastomoses intestinais já que sua expressão foi maior quando o colágeno foi menor, apesar de esse dado não ter se mostrado significativo. Ou seja, houve surpresa pela relação inversa entre a expressão da HSP70 e a quantidade de colágeno. Não obstante o objetivo não

ter sido realizar essa verificação, vale ressaltar que se oferece aqui uma abrangente linha de pesquisa a futuros estudiosos.

6. CONCLUSÕES

Com este estudo experimental comparou-se a expressão da HSP70, a quantidade de colágeno e as células inflamatórias nas anastomoses intestinais e concluiu-se que:

- b) A HSP70 está expressa no intestino grosso normal e é afetada pela hipovolemia.
- c) Não houve diferenças significativas entre as anastomoses realizadas à direita e à esquerda quanto à expressão da HSP70, do colágeno e das células inflamatórias.
- d) Na cicatrização das anastomoses há aumento da expressão da HSP70.
- e) A expressão da HSP70 é mais evidente quando a quantidade de colágeno é menor, sugerindo que ela pode ser um potencial marcador biológico experimental das complicações das anastomoses intestinais.

7. REFERÊNCIAS

Abraham E, Stevens P. Effects of granulocyte colony-stimulating factor in modifying mortality from *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia after hemorrhage. Crit Care Med. 1992;20:1127-33.

Ahrendt GM, Tantry US, Barbul A. Intra-abdominal sepsis impairs colonic reparative collagen synthesis. Am J Surg. 1996;171:102-7.

Ambrosetti P, Michel JM, Megevand JM, Morel P. Left colectomy with immediate anastomoses in emergency surgery. Ann Chir. 1999;53(10):1023-8.

Armitage P, Berry G, Matthews JNS. *Statistical methods in medical research*. 3rd ed. Oxford: Blackwell; 1994.

Arvans D, Ren H, Kang LH, Turner JR, Alverdy J, Chang EB. Luminal bacterial flora determines physiological expression of intestinal epithelial cytoprotective heat shock protein 25 and 72 expression. Gastroenterology 2003;124:A484.

Athanassiadou P, Petrakakou E, Sakelariou V, Zerva C, Liossi A, Michalas S, Athanassiades P. Expression of p53, bcl-2 and heat shock protein (hsp72) in malignant and benign ovarian tumours. Eur J Cancer Prev. 1998;7:225-31.

Beart Jr RW, Kelly KA. Randomized prospective evaluation of the EEA staples for colorectal anastomoses. Am J Surg. 1981;141:143-7.

Benjamin IJ, McMillan DR. Stress (heat shock) proteins: molecular chaperones in cardiovascular biology and disease. Circ Res. 1998;83:117-32.

Berman IR, Grosfeld JL, Adelman BA, Rapp RJ, Metz SC, Iliescu H. Influence of local and systemic factors on survival with fecal peritonitis. Surg Forum. 1974;25:367-9.

Bezuti MT, Feres O, Campos AD, Aprilli F, Rocha JJR, Garcia RS, Joviliano OFD. The effect of colon obstruction on colonic anastomotic healing. Acta Cir. Bras. 2002;17(Suppl 3):109-15.

Biondo-Simões MLP, Ioshii SO, Zazula AD, Biondo-Simões R. The healing influenced by hypotireoidism and elderly: study of intestinal anastomosis healing in rats. Acta Cir. Bras. 2005;20(Suppl 1):113-9.

Borges, JC. *Estudos estruturais do sistema do sistema chaperone molecular HSP70 em humanos* [tese]. Campinas: Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas; 2004.

Brasken P, Lehto M, Renvall S. Changes in the connective tissue composition of the submucosal layer of colonic anastomosis. An immunohistologic study in rats. *Acta Chir Scand*. 1989;155:413-9.

Brasken P, Renvall S, Sandberg M. Fibronectin and collagen gene expression in healing experimental colonic anastomoses. *Br J Surg*. 1991;78(9):1048-52.

Brasken P. Healing of experimental colon anastomosis. *Eur J Surg Suppl*. 1991;(566):1-51.

Brown JC, Timpl R. The collagen superfamily. *Int Arch Allergy Immunol*. 1995;107(4): 484-90.

Buchmiller-Crair TL, Kim CS, Won NH, Chopourian HL, Shaw KS, Fonkalsrud EW. Effect of acute anemia on the healing of intestinal anastomosis in the rabbit. *J Trauma*. 2001;51(2):363-8.

Cabin DE, Buchman TG. Molecular biology of circulatory shock. Part III. Human hepatoblastoma (HepG2) cells demonstrate two patterns of shock-induced gene expression that are independent, exclusive, and prioritized. *Surgery*. 1990;108(5):902-12.

Chaudry IH, Ayala A. Mechanism of increased susceptibility to infection following hemorrhage. *Am J Surg*. 1993;165(2A Suppl):59S-67S.

Chaudry IH. Cellular mechanisms in shock and ischemia and their correction. *Am J Physiol*. 1983;245(2):R117-34.

Chu EK, Ribeiro SP, Slutsky AS. Heat stress increases survival rates in lipopolysaccharide-stimulated rats. *Crit Care Med*. 1997;25(10):1727-32.

Chung E, Miller EJ. Collagen polymorphism: characterization of molecules with the chain composition (alpha 1 (3)03 in human tissue. *Science*. 1974;183(130):1200-1.

Clark RAF. Wound repair. Overview and general considerations. In: Clark RAF. *The molecular and cellular biology of wound repair*. 2ed. New York: Plenum Press: 1996, 3-50.

Cohen SR, Cornell CN, Collins MH, Sell JE, Blanc WA, Altman RP. Healing of ischemic colonic anastomoses in rat: role of antibiotic preparation. *Surgery*. 1985;97(4):443-6.

Constantine VS, Mowry RW. Selective staining of human dermal collagen. II. The use of picrossirius red F3BA with polarization microscopy. *J Invest Dermatol*. 1968;50:419-23.

Cotran RS, Robbins SL, Kuman V. *Inflammation and repair*. In: Cotran RS. *Pathologic basis of disease*. 5ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1994, p. 51-92.

Cotran RS, Robbins SL, Kuman V. *Patologia Estrutural e Fucional*. 5a ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan. 1995, p. 78-80.

Craig EA. The heat shock response. *CRC Crit Rev Biochem*. 1985;18:239-80.

Cronin K, Jackson DS, Dunphy JE. Specific activity of hydroxyproline-tritium in the healing colon. *Surg Gynecol Obstet*. 1968;126:1061-5.

Darnell J, Lodish H, Baltimore D. (eds): *Molecular cell biology*. 2 ed. New York: Scientific American Books, 1990: 903-51.

David JC, Grongnet JF, Lalles JP. Weaning effects the expression of heat shock proteins in different regions of the gastrointestinal tract of the piglets. *J Nutr*. 2002;132:2551-61.

David JC, Landry J, Grongnet JF. Perinatal expression of heat-shock protein 27 in brain regions and nonneural tissues of the piglet. *J Mol Neurosci*. 2001;15:109-20.

De Maio A. Heat shock proteins: facts, thoughts, and dreams. *Shock*. 1999;11:1-12.

Deitch EA, Ma L, Ma WJ, Grisham MB, Granger DN, Specian RD, Berg RD. Inhibition of endotoxin-induced bacterial translocation in mice. *J Clin Invest*. 1989;84:36-42.

Eckersley JR, Dudley HA. Wounds and wound healing. *Br Med Bull*. 1988;44: 423-36.

Ehrlich HP, Tarver H, Hunt TK. Effects of vitamin A and glucocorticoids upon inflammation and collagen synthesis. *Ann Surg*. 1973;177:222-7.

Ellis RJ. Proteins as molecular chaperones. *Nature*. 1987;328:378-9.

Epstein Jr EH. (Alpha1(3))3 human skin collagen. Release by pepsin digestion and preponderance in fetal life. *J Biol Chem*. 1974;249:3225-31.

Erata GO, Kanbagli O, Durlanik O, Bulut T, Toker G, Uysal M. Induced oxidative stress and decreased expression of inducible heat shock protein 70 (ihsp 70) in patients with colorectal adenocarcinomas. *Jpn J Clin Oncol* 2005; 35(2):74-8.

Fauci AS, Dale DC, Balow JE. Glucocorticosteroid therapy: mechanisms of action and clinical considerations. *Ann Intern Med*. 1976;84: 304-15.

Feder ME, Hofmann GE. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu Rev Physiol*. 1999;61:243-82.

Feige U, Polla BS. Hsp70 - a multi-gene, multi-structure, multi-function family with potential clinical applications. *Experientia*. 1994;50:979-86.

Fielding LP, Stewart-Brown S, Blesovsky L, Kearney G. Anastomotic integrity after operation for large-bowel cancer: a multicentre study. *Br Med J*. 1980;281:411-4.

Fingerhut A, Elhadad A, Hay JM, Lacaine F, Flamant Y. Infraperitoneal colorectal anastomosis: hand-sewn versus circular staples. A controlled clinical trial. *French Associations for Surgical Research Surgery*. 1994;116: 484-90.

Forrest L. Current concepts in soft connective tissue wound healing. *Br J Surg*. 1983;70:133-40.

Fraser ID, Condon RE. Sutureless bowel anastomosis – an historical perspective. *Wis Med J*. 1980; 79:16-8.

Fuller KJ, Issels RD, Slosman DO, Guillet JG, Soussi T, Polla BS. Cancer and the heat shock response. *Eur J Cancer*. 1994;30A:1884-91.

Georgopoulos C, Welch WJ. Role of major heat shock proteins as molecular chaperones. *Annu Rev Cell Biol*. 1993;9:601-34.

Goes ACAM, Rodrigues LV, Menezes DB, Grangeiro MPF, Cavalcante ARMS. Análise histológica da cicatrização da anastomose colônica, em ratos, sob ação de enema de Aroeira-do-sertão a 10%. *Acta Cir. Bras*. 2005; 20(2):144-51.

Goldsmith, HS. Protection of low rectal anastomosis with intact omentum. *Surg Gynecol Obstet*. 1977;144: 585-6.

Goligher JC, Graham NG, DeDombal FT. Anastomotic dehiscence after anterior resection of rectum and sigmoid. *Br J Surg*. 1970;57:109-18.

Gottrup F. Healing of incisional wounds in stomach and duodenum. A biochemical study. *Am J Surg*. 1980;140:296-301.

Graham MF, Diegelmann RF, Elson CO, Lindblad WJ, Gotschalk N, Gay S, Gay R. Collagen content and types in the intestinal strictures of Crohn's disease. *Gastroenterology*. 1988;94:257-65.

Greca FH, Biondo-Simões MLP, de Paula JB, de Noronha L, Ferreira da Cunha LS, Baggio PV, Bitencourt FO. Correlação entre o fluxo sanguíneo intestinal e a cicatrização de anastomoses colônicas: estudo experimental em cães. *Acta Cir. Bras.* 2000;15(3):88-94.

Guerriero Jr V, Raynes DA. Synthesis of heat stress proteins in lymphocytes from livestock. *J. Anim. Sci.* 1990;68(9):2779-83.

Hawley PR. Causes and prevention of colonic anastomotic breakdown. *Dis Colon Rectum.* 1973;16:272-7.

Hendrick JP, Hartl FU. Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Annu Rev Biochem.* 1993;62:349-84.

Hendriks T, Mastboom WJ. Healing of experimental intestinal anastomoses. Parameters for repair. *Dis Colon Rectum.* 1990;33:891-901.

Herrmann JB, Woodward SC, Pulaski EJ. Healing of colonic anastomoses in the rat. *Surg Gynecol Obstet.* 1964;119:269-75.

Hesp WL, Lubbers EJ, de Boer HH, Hendriks T. Anastomotic insufficiency in small bowel surgery: incidence and treatment. *Langenbecks Arch Chir.* 1986;368:105-11.

Hightower LE, Sadis SE, Takenaka IM. Interactions of vertebrate hsc70 and hsp70 with unfolded proteins and peptides. In: R. Morimoto, A. Tissières and C. Georgopoulos, editors. *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones*. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1994. p.179-207.

Houdart R, Lavergne A, Galian A, Hautefeuille P. Anatomic-pathological evolution of single-layer end-to-end intestinal anastomoses – a study of 210 colonic anastomoses in rat, from end to 180th days. *Gastroenterol Clin Biol.* 1983;7:465-73.

Hunt C, Morimoto RI. Conserved features of eukaryotic hsp70 genes revealed by comparison with nucleotide sequence of human hsp70. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1985;82: 6455-9.

Hunt TK, Hawley PR. Surgical judgement and colonic anastomoses. *Dis Colon Rectum.* 1969;12:167-71.

Institute of Laboratory Animal Resources. Commission on Life Sciences. National Research Council. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. 7 ed. Washington, DC: National Academy press; 1996.

Irvin TT, Golinger JC. A etiology of disruption of intestinal anastomoses. *Br J Surg.* 1973;60: 461-4.

Jaattela M, Wissing D. Emerging role of heat shock proteins in biology and medicine. *Ann Med.* 1992;24:249-58.

Jaattela M. Overexpression of major heat shock protein hsp70 inhibits tumor necrosis factor-induced activation of phospholipase A2. *J Immunol.* 1993;151(8):4286-94.

Jaattela M. Heat shock proteins as cellular lifeguards. *Ann Med.* 1999;31:261-71.

Jacquier- Sarlim MR, Fuller K, Dinh-Xuan AT, Richard MJ, Polla BS. Protective effects of hsp70 in inflammation. *Experientia.* 1994;50:1031-8.

Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica*. 10a edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 2004.

Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. Picrossirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J.* 1979;11:447-55.

Junqueira LC, Cossermelli W, Brentani RR. Differential staining of collagens type I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy. *Arch Histol Jpn.* 1978;41(3):267-74.

Junqueira LC, Montes GS, Sanchez EM. The influence of tissue section thickness on the study of collagen by the Picrossirius-polarization method. *Histochemistry.* 1982;74(1):153-6.

Junqueira LC, Montes GS. Biology of collagen- proteoglycan interaction. *Arch Histol Jpn.* 1983;46(5):589-629.

Katz S, Izhar M, Mirelman D. Bacterial adherence to surgical sutures. A possible factor in suture induced infection. *Ann Surg.* 1981;194: 35-41.

Kaufmann SH. Heat shock proteins and the immune response. *Immunol Today.* 1990;11(4):129-36.

Kiang JG, Tsokos GC. Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry and physiology. *Pharmacol Ther.* 1998;80:183-201.

Klein L, Chandrarajan J. Collagen degradation in rat skin but not in intestine during rapid growth: effect on collagen types I and III from skin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1977;74:1436-9.

Kojima K, Musch MW, Ren H, Boone DL, Hendrickson BA, Ma A, Chang EB. Enteric flora and lymphocyte-derived cytokines determine expression of heat shock proteins in mouse colonic epithelial cells. *Gastroenterology.* 2003;124:1395-407.

Kojima K, Musch MW, Ropeleski MJ, Boone DL, Ma A, Chang EB. *Escherichia coli* LPS induces heat shock protein 25 in intestinal epithelial cells through MAP Kinase activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2004;286(4):G645-52.

Koruda MJ, Rolandelli RH. Experimental studies on the healing of colonic anastomoses. J Surg Res. 1990;48:504-15.

Laplante AF, Moulin V, Auger FA, Landry J, Li H, Morrow G, Tanguay RM, Germain L. Expression of heat shock proteins in mouse skin during wound healing. J Histochem Cytochem. 1998;46(11):1291-301.

Lappas GD, Karl IE, Hotchkiss RS. Effect of the ethanol and sodium arsenite on HSP-72 formation and on survival in a murine endotoxin model. Shock. 1994;2:34-9.

Lauand F, Feres O, Rocha JJR, Campos AD, Carvalho FG. Efeito da hipovolemia sobre a cicatrização de anastomoses colônicas. Estudo experimental em ratos. Rev bras Coloproct. 2004;24(4):317-21.

Lindquist S. The heat-shock response. Annu Rev Biochem. 1986;55:1151-91.

Lindquist S, Craig EA. The heat-shock proteins. Annu Rev Genet. 1988;22:631-77.

Ludwig D, Stahl M, Ibrahim ET, Wenzel BE, Drabicki D, Wecke A, Fellermann K, Stange EF. Enhanced intestinal expression of the heat shock proteins 70 in the patients with inflammatory bowel disease. Dig Dis Sci. 1999;44:1440-7.

Mandai R, Eguchi Y, Tanaka M, Sai Y, Nosaka S. Effects of profound hemodilution on small-intestinal wound healing in rabbits. J Surg Res. 2001;99:107-13.

Marber MS, Mestril R, Chi SH, Sayen MR, Yellon DN, Dillmann WH. Overexpression of the rat inducible 70-kD heat stress protein in a transgenic mouse increases the resistance of the heart to ischemic injury. J Clin Invest. 1995;95:1446-56.

Martens MF, Hendriks T. Postoperative changes in collagen synthesis in intestinal anastomoses of the rat: differences between small and large bowel. Gut. 1991;32:1482-7.

Martinez-Hernandez A. Repair, regeneration and fibrosis. In: Rubin EE, Faber JL, editors. *Pathology*. Philadelphia: Lippincott 1988. p 66-95.

Mayer MP, Brehmer D, Gassler CS, Bukau B. Hsp70 chaperone machines. Adv Protein Chem. 2001;59:1-44.

McGinn FP, Gartell PC, Clifford PC, Brunton FJ. Staples or sutures for low colorectal anastomoses: a prospective randomized trial. Br J Surg. 1985;72:603-5.

Meyer TN, Silva AL. Resposta celular ao estresse. Rev. Assoc. Med. Bras. 1999;45(2):1881-8.

Minossi JG, Naresse LE, Leite CVS, Rodrigues MAM, Angeleli MAY, Curi PR, Kobayasi S. Fecal peritonitis in the rat: alterations of the distal colon wall. A biomechanical and anatomopathologic study. *Acta Cir Bras*. 1994;9:12-8.

Minowada G, Welch WJ. Clinical implications of the stress response. *J Clin Invest*. 1995;95:3-12.

Montes GS, Junqueira LC. The use of Picrossirius-polarization method for the study of the biopathology of the collagen. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1991;86(Suppl 3):1-11.

Moosa Ar, Block GE, Sackier JM. *Complications of Colorrectal Operations*. Bock & Moosaed. Operative Colorrectal Surgery. WB. Saunders Co., 1994.

Morimoto RI, Fodor E. Cell-specific expression of heat shock proteins in chicken reticulocytes and lymphocytes. *J Cell Biol*. 1984;99(6):1316-23.

Morimoto RI, Tissieres A, Georgopoulos C. Progress and perspectives on the biology of heat shock proteins and molecular chaperones. In: Morimoto RI, Tissieres A, Georgopoulos C, eds. *The biology of heat shock proteins and molecular chaperones*. New York: Cold Spring Harbor 1990. p 1-30.

Moseley P. Stress proteins and the immune response. *Immunopharmacology*. 2000;48:299-302.

Moseley PL, Gapen C, Wallen ES, Walter ME, Peterson MW. Thermal stress response induces epithelial permeability. *Am J Physiol*. 1994;267 (2 Pt 1):C425-34.

Naresse LE. *Estudo comparativo da cicatrização de anastomoses em plano único e em dois planos, no intestino delgado do cão. Avaliação anatomopatológica, estudo de força de ruptura e da hidroxiprolina tecidual*. [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, 1985. 104p.

Nefti O, Grongnet JF, David JC. Overexpression of alpha B crystallin in the gastrointestinal tract of the newborn piglet after hipoxia. *Shock*. 2005;24(5): 455-61.

Nishihara G, Prudden JF. A quantitative relationship of wound tensile strenght to length. *Surg Gynecol Obstet*. 1958;107:305-10.

Oberringer M, Baum HP, Jung V, Welter C, Frank J, Kuhlmann M, Mutschler W, Hanselmann RG. Differential expression of heat shock protein 70 in well healing and chronic human wound tissue. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;214(3):1009-14.

Párez-Tamayo R, Monffort I. The susceptibility of hepatic collagen to homologous collagenase in human and experimental cirrhosis of the liver. *Am J Pathol*. 1980;100:427-42.

Peetermans WE. Heat shock proteins in medicine. *Acta Clin Belg.* 1995;50(3):131-6.

Pelham HR. Speculations on the functions of the major heat shock and glucose-regulated proteins. *Cell.* 1986;46:959-61.

Petrof EO, Ciancio MJ, Chang EB. Role and regulation of intestinal epithelial heat shock proteins in health and disease. *Chin J Dig Dis.* 2004;5(2):45-50.

Piez KA. Molecular and aggregate structures of the collagens; in Peiz KA, Reddy AH (eds) *Extracellular Matrix Biochemistry*. New York: Elsevier; 1984. p.1-39.

Pittet JF, Lee H, Morabito D, Howard MB, Welch WJ, Mackersie RC. Serum levels of Hsp72 measured early after trauma correlate with survival. *J Trauma.* 2002;52:611-7.

Podolsky DK. Review article: healing after inflammatory injury - Coordination of a regulatory peptide network. *Aliment Pharmacol Ther.* 2000;14(suppl 1):87-93.

Rabau MY, Dayan D. Polarization microscopy of picrossirius red stained sections: a usefull method for qualitative evaluation of intestinal wall collagen. *Histol Histopathol.* 1994;9(3):525-8.

Ren H, Musch MW, Kojima K , Boone D, Ma A, Chang EB. Short-chain fatty acids induce intestinal epithelial heat shock protein 25 expression in rats and IEC 18 cells. *Gastroenterology.* 2001;121:631-9.

Rey SD, Czeczko NG, Nassif PAN, Ribas-Filho JM, Malafaia O, Grisa L, Torres OJM, Czeczko AEA. Estudo da influência do dreno de Penrose na cicatrização de lesão contaminada no ceco de ratos. *ABCD Arq. Bras. Cir. Dig.* 2004;17(1):29-33.

Ribeiro CM, Silva Jr VA, Silva Neto JC, Vasconcelos BC. Clinical and histopathological study of tissue reactivity to monofilament suture materials: nylon and poliglecaprone 25 in rats. *Acta Cir Bras.* 2005;20(4):284-91.

Ribeiro SP, Villar J, Downey GP, Edelson JD, Slutsky AS. Effects of the stress response in septic rats and LPS-stimulated alveolar macrophages: evidence for TNF- lpha posttranslational regulation. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996;154(6 Pt 1):1843-50.

Ribeiro SP, Villar J, Slutsky AS. Induction of the stress response to prevent organ injury. *New Horiz.* 1995;3:301-11.

Ritossa F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia.* 1962;18:571-3.

Ryan GP. The effect of surrounding infection upon the healing of colonic wounds. *Experimental studies and clinical experiences. Dis Colon Rectum.* 1970;13:124-6.

Sakallioğlu AE, Yagmurlu A, Dindar H, Hasirci N, Renda N, Deveci MS. Sustained local application of low-dose epidermal growth factor on steroid-inhibited colonic wound healing. *J Pediatric Surg.* 1994;39:591-5.

Santarosa M, Favaro D, Quaia M, Galligioni E. Expression of heat shock protein 72 in renal cell carcinoma: possible role prognostic implications in cancer patients. *Eur J Cancer.* 1997;33:873-7.

Santos Jr JCM. Profilaxia das complicações pós-operatórias no tratamento cirúrgico das doenças do intestino grosso: II – Deiscência de anastomose. *Rev bras Coloproct.* 1998;18(1):44-51.

Schrock TR, Deveny CW, Dunphy JE. Factors contributing to leakage of colonic anastomoses. *Ann Surg.* 1973;177:513-8.

Seyer JM, Kang AH, Whitaker JN. The characterization of type I and type III collagen from human peripheral nerve. *Biochim Biophys Acta.* 1977;492:415-25.

Shukla A, Dubey MP, Srivastava R, Srivastava BS. Differential expression of proteins during healing of cutaneous wounds in experimental normal and chronic models. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;244(2):434-9.

Simon MM, Reikerstorfer A, Schwarz A, Krone C, Luger TA, Jäättelä M, Schwarz T. Heat shock protein 70 overexpression affects the response to ultraviolet light in murine fibroblasts. Evidence for increased cell viability and suppression of cytokine release. *J Clin Invest.* 1995;95:926-33.

Skakun GB, Reznick RK, Bailey HR, Smith KW, Max E. The single layer continuous polypropylene colon anastomoses. A prospective assessment using water-soluble contrast enemas. *Dis Colon Rectum.* 1998;31:163-8.

Soares JF, Siqueira AL. *Introdução à estatística médica.* 2 ed. Belo Horizonte: Coopmed; 2002.

Soares LA. *Processo de cicatrização das feridas da parede abdominal: influência da sutura em plano peritoneal com fio de catagute.* Estudo experimental [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 1991.

Stadelman WK, Digenis AG, Tobin GR. Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wound. *Am J Surg.* 1998;176:265-385.

Stumpf M, Klinge U, Mertens PR. Anastomotic leakage in the gastrointestinal tract-repair and prognosis. *Chirurg.* 2004;75(11):1056-62.

Sweat F, Puchtler H, Rosenthal SI. Sirius Red F3BA as a stain for connective tissue. *Arch pathol.* 1964; 78:69-72.

Szendroi M, Vajta G, Kovács L, Achsff Z, Lapis K. Polarization colours of collagen fibres: a sign of collagen production activity in fibrotic processes. *Acta Morphol Hung.* 1984;32:47-55.

Tallot P, Grongnet JF, David JC. Dual perinatal and developmental expression of the small heat shock proteins [FC12]aB - crystalline and HSP27 in different tissues of the developing piglet. *Biol Neonate*. 2003;83:281-8.

Tanguay RM, Wu Y, Khandjian EW. Tissue-specific expression of heat shock proteins of the mouse in the absence of stress. *Dev Genet*. 1993;14:112-8.

Thompson SK, Chang EY, Jobe BA. Clinical review: Healing of gastrointestinal anastomoses, part I. *Microsurgery*, 2006;26(3):131-6.

Thomson HJ, Busuttil A, Eastwood AN, Elton RA. Submucosal collagen changes in the normal colon and in diverticular disease. *Int J Colorectal Dis*. 1987;2:208-13.

Trelstad RL. Human aorta collagen: evidence for three distinct species. *Biochem Biophys. Res Commun*. 1974;57:717-25.

Tsukimi Y, Nakai H, Itoh S, Amagase R, Okabe S. Involvement of heat shock proteins in the healing of acetic acid-induced gastric ulcers in rats. *J Physiol Pharmacol*. 2001;52:391-406.

Udelsman R, Blake MJ, Holbrook NJ. Molecular response to surgical stress: specific and simultaneous heat shock protein induction in the adrenal cortex, aorta and vena cava. *Surgery*. 1991;110(1):125-31.

Udelsman R, Holbrook NJ. Endocrine and molecular responses to surgical stress. *Curr Probl Surg*. 1994;31:658-720.

Uozaki H, Ishida T, Kakiuchi C, Horiuchi H, Gotoh T, Iijima T, Imamura T, Machinami R. Expression of heat shock proteins in osteosarcoma and its relationship to prognosis. *Pathol Res Pract*. 2000;196:665-73.

Vargas DM, Audi L, Carrascosa A. Peptídeos derivados do colágeno: novos marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo. *Rev Ass Med Brasil* 1997;43(4):367-70.

Vigh L, Literati PN, Horvath I, Török Z, Balogh G, Glatz A, Kovács E, Boros I, Ferdinándy P, Farkas B, Jaszlits L, Jednákovits A, Korányi L, Maresca B. Bimoclomol: a nontoxic, hydroxylamine derivative with stress protein-inducing activity and cytoprotective effects. *Nat Med*. 1997;3(10):1150-4.

Villar J, Ribeiro SP, Mullen JB, Kuliszewski M, Post M, Slutsky AS. Induction of the heat shock response reduces the mortality rate and organ damage in sepsis-induced acute lung injury model. *Crit Care Med*. 1994;22:914-21.

Volm M, Koomagi R, Mattern J, Stammers G. Heat shock (hsp70) and resistance proteins in non-small cell lung carcinomas. *Cancer Lett*. 1995;95:195-200.

Whitaker P, Kloner RA, Bougner DR, Fickering JG. Quantitative assessment of myocardial collagen with picrosirius red staining and circulatory polarized light. *Basic Res Cardiol*. 1994;89:397-410.

Wischmeyer PE. Glutamine: the first clinically relevant pharmacological regulator of heat shock protein expression? Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care 2006; 9(3):201-6.

Wise L, McAlister W, Stein T, Schuck P. Studies on the healing of anastomoses of small and large intestines. Surg Gynecol Obstet. 1975;141:190-4.

Witte, Maria B. MD; Barbul, Adrian MD. Repair of full-thickness bowel injury. Crit Care Med. 2003;31(8):S538-46.

Wynn RM, Davie Jr, Cox RP, Chuang DT. Molecular chaperones: heat-shock proteins, foldases and matchmakers. J Lab Clin Med. 1994;124:31-6.

APÊNDICES

ESTUDO HISTOLÓGICO I – HEMATOXILINA-EOSINA ANASTOMOSES

Nº ANIMAL	LADO	GRUPOS	7º PO	14º PO	PMN	LNF	MCF	NECROSE
9	Direito	Desafio	x		3	2	3	Focal
10			x		1	3	3	Ausente
11			x		3	3	3	Ausente
12			x		1	2	3	Ausente
13	Esquerdo		x		2	2	3	Ausente
14			x		3	2	3	Maciça
15			x		2	2	3	Ausente
16			x		3	2	2	Maciça
17	Direito			x	2	3	3	Ausente
18				x	2	3	3	Ausente
19				x	1	2	3	Ausente
20				x	1	1	3	Ausente
21	Esquerdo			x	1	3	3	Ausente
22				x	1	1	3	Ausente
23				x	2	1	3	Ausente
24				x	1	1	3	Ausente
25	Direito	Controle	x		3	2	3	Focal
26			x		1	2	3	Ausente
27			x		2	2	3	Ausente
28			x		2	3	3	Focal
29	Esquerdo		x		1	2	3	Ausente
30			x		1	2	3	Ausente
31			x		1	2	3	Ausente
32			x		1	2	3	Ausente
33	Direito			x	1	3	3	Ausente
34				x	3	2	3	Ausente
35				x	1	1	3	Ausente
36				x	3	2	3	Ausente
37	Esquerdo			x	3	1	1	Ausente
38				x	3	3	2	Ausente
39				x	2	3	3	Ausente
40				x	2	3	3	Ausente

PMN - polimorfonucleares

MCF - macrófagos

LNF – linfócitos

ESTUDO HISTOLÓGICO II – COLÁGENO

ANASTOMOSES – COLORAÇÃO DE PICROSSÍRIUS

Nº ANIMAL	LADO	GRUPO	ÁREA DE COLÁGENO 7º PO	ÁREA DE COLÁGENO 14º PO
9	Direito	Desafio	0,31	
10			0,29	
11			2,09	
12			1,04	
13	Esquerdo		0,69	
14			0,69	
15			0,16	
16			1,6	
17	Direito			4,78
18				2,35
19				12,5
20				3,21
21	Esquerdo			14,38
22				5,96
23				9,5
24				2,25
25	Direito	Controle	1,46	
26			1,47	
27			4,46	
28			1,38	
29	Esquerdo		1,2	
30			3,21	
31			1,04	
32			1,18	
33	Direito			5,19
34				5,58
35				16,58
36				3,24
37	Esquerdo			5,6
38				5,72
39				12,55
40				6,86

DESCRIPTIVOS DOS VALORES DA VARIÁVEL COLÁGENO NAS ANASTOMOSES

DESCRIPTIVO COLÁGENO GRUPO DESAFIO 7 E 14 DIAS

	LADO	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	MÍNIMO	MÁXIMO
Colágeno 7 dias	D	0,9325	0,8469	0,29	2,09
	E	0,7850	0,5980	0,16	1,6
Colágeno 14 dias	D	5,7100	4,6371	2,35	12,5
	E	8,0225	5,1697	2,25	14,38

DESCRIPTIVO COLÁGENO GRUPO CONTROLE 7 E 14 DIAS

	LADO	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	MÍNIMO	MÁXIMO
Colágeno 7 dias	D	2,1925	1,5122	1,38	4,46
	E	1,6575	1,0374	1,04	3,21
Colágeno 14 dias	D	7,6475	6,0423	3,24	16,58
	E	7,6825	3,2943	5,60	12,55

ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO – HSP70 INTESTINO GROSSO

RATOS	GRUPO	LADO	SÉTIMO DIA	DÉCIMO QUARTO DIA
1	Branco	Direito	0,13	
2	Branco	Direito	0,11	
3	Branco	Direito	0,28	
4	Branco	Direito	0,14	
5	Branco	Direito		0,03
6	Branco	Direito		0,08
7	Branco	Direito		6,24
8	Branco	Direito		0,75
1	Branco	Esquerdo	0,28	
2	Branco	Esquerdo	0,14	
3	Branco	Esquerdo	0,03	
4	Branco	Esquerdo	0,1	
5	Branco	Esquerdo		0,12
6	Branco	Esquerdo		0,09
7	Branco	Esquerdo		0,01
8	Branco	Esquerdo		0,31

ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO – HSP70
INTESTINO GROSSO

RATO	GRUPO	LADO	ZERO PO
9	Desafio	Direito	0,03
10	Desafio	Direito	0,35
11	Desafio	Direito	2,41
12	Desafio	Direito	0,53
13	Desafio	Direito	0,06
14	Desafio	Direito	0,44
15	Desafio	Direito	0,3
16	Desafio	Direito	0,32
17	Desafio	Esquerdo	0,35
18	Desafio	Esquerdo	0,15
18	Desafio	Esquerdo	1,64
20	Desafio	Esquerdo	0,64
21	Desafio	Esquerdo	0,44
22	Desafio	Esquerdo	0,63
23	Desafio	Esquerdo	0,2
24	Desafio	Esquerdo	0,18
25	Controle	Direito	3,5
26	Controle	Direito	2,24
27	Controle	Direito	5,98
28	Controle	Direito	3,2
29	Controle	Direito	0,67
30	Controle	Direito	0,52
31	Controle	Direito	0,69
32	Controle	Direito	0,75
33	Controle	Esquerdo	2,94
34	Controle	Esquerdo	9,49
35	Controle	Esquerdo	3,32
36	Controle	Esquerdo	2,6
37	Controle	Esquerdo	2,05
38	Controle	Esquerdo	1,34
39	Controle	Esquerdo	4,02
40	Controle	Esquerdo	1,29

**ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO – HSP70
ANASTOMOSES**

Nº ANIMAL	LADO	GRUPO	ÁREA DE HSP 70 7º PO	ÁREA DE HSP 70 14º PO	
9	Direito	Desafio	8,09		
10			6,44		
11			6,11		
12			6,32		
13	Esquerdo		25,07		
14			17,22		
15			19,55		
16			20,8		
17	Direito			5,58	
18				6,54	
19				6,22	
20				6,66	
21	Esquerdo			2,79	
22				1,45	
23				7,92	
24				10,13	
25	Direito		Controle	21,73	
26				11,35	
27				24,41	
28				6,42	
29	Esquerdo			12,18	
30				30,55	
31				17,03	
32				11,16	
33	Direito			6,4	
34				18,28	
35				7,97	
36				7,85	
37	Esquerdo			2,69	
38				2,43	
39				7,42	
40				3,52	

**DESCRIPTIVOS DOS VALORES DA VARIÁVEL HSP70
NAS ANASTOMOSES**

DESCRIPTIVO HSP70 GRUPO DESAFIO 7 E 14 DIAS

	LADO	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	MÍNIMO	MÁXIMO
HSP70 7 dias	D	6,7400	0,9103	6,11	8,09
	E	20,6600	3,2931	17,22	25,07
HSP70 14 dias	D	6,2500	0,4837	5,58	6,66
	E	5,5725	4,1239	1,45	10,13

DESCRIPTIVO HSP70 GRUPO CONTROLE 7 E 14 DIAS

	LADO	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	MÍNIMO	MÁXIMO
HSP70 7 dias	D	15,9775	8,5041	6,42	24,41
	E	17,7300	8,9221	11,16	30,55
HSP70 14 dias	D	10,1250	5,4833	6,40	18,28
	E	4,0150	2,3171	2,43	7,42

ADERÊNCIAS NAS ANASTOMOSES – ANÁLISE DESCRITIVA

Nº ANIMAL	LADO	GRUPO	ADERÊNCIAS				
			DELGADO	COLON	TESTICULO	MESOCOLON	MESENTÉRIO
9	Direito	Desafio	X			X	
10			X	X		X	
11			X			X	
12							
13	Esquerdo		X			X	
14			X		X	X	
15			X		X		X
16			X			X	
17	Direito						
18			X				
19							
20			X				
21	Esquerdo		X	X			X
22					X	X	
23					X	X	
24					X	X	
25	Direito	Controle	X	X			
26			X	X			
27			X	X			X
28			X	X			X
29	X					X	
30						X	
31	Esquerdo		X			X	
32			X		X	X	
33			X			X	
34			X	X			
35	Direito						
36							
37					X		X
38						X	
39	Esquerdo					X	
40			X			X	

X – presença de aderências

VARIAÇÃO DO PESO NOS ANIMAIS

RATO	GRUPO	PESO ZERO DIAS	PESO 7 DIAS	PESO 14 DIAS
1	Branco	300	296	
2	Branco	290	292	
3	Branco	290	313	
4	Branco	280	291	
5	Branco	280		347
6	Branco	307		310
7	Branco	260		332
8	Branco	282		345
9	Desafio	370	376	
10	Desafio	374	382	
11	Desafio	365	354	
12	Desafio	364	360	
13	Desafio	380	290	
14	Desafio	360	330	
15	Desafio	380	345	
16	Desafio	375	370	
17	Desafio	340		370
18	Desafio	318		342
19	Desafio	325		370
20	Desafio	335		335
21	Desafio	310		330
22	Desafio	322		342
23	Desafio	306		322
24	Desafio	325		379
25	Controle	323	285	
26	Controle	300	275	
27	Controle	330	275	
28	Controle	311	275	
29	Controle	300		354
30	Controle	312		339
31	Controle	330		346
32	Controle	323		338
33	Controle	328	340	
34	Controle	320	283	
35	Controle	309	277	
36	Controle	340	323	
37	Controle	338		354
38	Controle	350		383
39	Controle	309		345
40	Controle	315		330

**ANÁLISE ESTATÍSTICA DA COMPARAÇÃO DA VARIÁVEL COLÁGENO
ENTRE O 7º E O 14º PO NOS GRUPOS DESAFIO E CONTROLE**

		MÉDIA	DESVIO PADRÃO	p
Colágeno 7 dias	Desafio	0,8587	0,6833	0,009*
Colágeno 14 dias		6,8663	4,7114	
		MÉDIA	DESVIO PADRÃO	p
Colágeno 7 dias	Controle	1,9250	1,2341	0,008*
Colágeno 14 dias		7,6650	4,5054	

*p < 0,05

**RESULTADOS DA ANÁLISE ESTATÍSTICA DA COMPARAÇÃO DA
VARIÁVEL COLÁGENO NOS GRUPOS DESAFIO X CONTROLE NO
7º E NO 14º PO**

GRUPO	TEMPO	MEDIA	DESVIO PADRÃO	p
Desafio	7º PO	0,8587	0,6833	0,048*
Controle		1,9250	1,2341	
Desafio	14º PO	6,8663	4,7114	0,734
Controle		7,6650	4,5054	

*p < 0,05

**RESULTADOS DA ANÁLISE ESTATÍSTICA DA VARIÁVEL EXPRESSÃO DA
HSP70 NO INTESTINO GROSSO ENTRE OS GRUPOS DESAFIO E
CONTROLE NO TEMPO ZERO (T-TEST)**

GRUPOS	LADO	TEMPO	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	<i>p</i>
Desafio	Direito	Zero	0,5983	0,9023	0,015*
Controle			2,4000	2,0060	
Desafio	Esquerdo		0,5543	0,5219	0,021*
Controle			3,2138	2,8256	

* $p < 0,05$

**RESULTADOS DA ANÁLISE ESTATÍSTICA DA VARIÁVEL EXPRESSÃO DA
HSP70 ENTRE OS GRUPOS DESAFIO E CONTROLE NOS DIFERENTES
TEMPOS E LADOS**

GRUPOS	LADO	TEMPO	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	<i>p</i>
Desafio	Direito	7º PO	6,7400	0,9103	0,083**
Controle			15,9775	8,5041	
Desafio	Esquerdo		20,6600	3,2931	0,248
Controle			17,7300	8,9221	
Desafio	Direito	14º PO	6,2500	0,4837	0,083**
Controle			10,1250	5,4833	
Desafio	Esquerdo		5,5725	4,1239	0,564
Controle			4,0150	2,3171	

** $p > 0,05$ e $< 0,1$

RESULTADOS DA ANÁLISE ESTATÍSTICA DA COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO DA HSP70 NO INTESTINO GROSSO (ZERO PO) E NAS ANASTOMOSES INTESTINAIS (7º E 14º PO) NOS GRUPOS CONTROLE E DESAFIO

GRUPO	LADO	TEMPO	MÉDIA	DESVIO-PADRÃO	<i>p</i>
Controle	Direito	Zero	2,4000	2,060	0,008*
		7º PO	15,9775	8,5041	
Controle	Esquerdo	Zero	3,2138	2,8256	0,007*
		7º PO	17,7300	8,9221	
Controle	Direito	Zero	2,4000	2,060	0,008*
		14º PO	10,1250	5,4833	
Controle	Esquerdo	Zero	3,2138	2,8256	0,497
		14º PO	4,0150	2,3171	
Desafio	Direito	Zero	0,5983	0,923	0,011
		7º PO	6,7400	0,9103	
Desafio	Esquerdo	Zero	0,5543	0,5219	0,008*
		7º PO	20,6600	3,2931	
Desafio	Direito	Zero	0,5983	0,923	0,011
		14º PO	6,2500	0,4837	
Desafio	Esquerdo	Zero	0,5543	0,5219	0,014
		14º PO	5,5725	4,1239	

*p<0.05