

LEONARDO DE CASTRO DURÃES

**EFEITOS DO DIÓXIDO DE CARBONO E DA PRESSÃO
INTRA-ABDOMINAL NA CICATRIZAÇÃO DE
ANASTOMOSES COLÔNICAS.
ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor.

Área de Concentração: Medicina

Orientador: Prof. Dr. João Batista de Sousa

Brasília-DF
2013

LEONARDO DE CASTRO DURÃES

**EFEITOS DO DIÓXIDO DE CARBONO E DA PRESSÃO
INTRA-ABDOMINAL NA CICATRIZAÇÃO DE
ANASTOMOSES COLÔNICAS.
ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS.**

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

Orientador:

Prof. Dr. João Batista de Sousa – FM - UnB

Examinadores:

Prof. Dra. Sthela Maria Murad Regadas – FM - UFC

Prof. Dr. Antônio Lacerda Filho – FM - UFMG

Prof. Dr. Francisco Sérgio Pinheiro Regadas – FM - UFC

Prof. Dr. Paulo Gonçalves de Oliveira – FM - UnB

Suplente:

Prof. Dra. Fabiana Pirani Carneiro – FM - UnB

DEDICATÓRIA

À Deus, que me abençoa diariamente, permitindo que meus sonhos se tornem realidade.

À minha esposa, Eliana, pelo amor, amizade, compreensão e cumplicidade.

Aos meus filhos, Fernando, Ana e Giovana, por tornar a vida mais alegre e prazerosa.

À minha mãe, pelo apoio e presença constante.

Ao meu pai, que me ensinou a gostar dos estudos.

Ao meu sogro, Prof. Dr. Tarcisio pelo exemplo acadêmico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que me ajudaram na realização deste trabalho:

Ao Professor Doutor João Batista de Sousa, pelos ensinamentos ao longo dos cinco anos de pós-graduação.

Ao Professor Doutor Paulo Gonçalves de Oliveira pela análise crítica da pesquisa e pelo apoio na Universidade.

À Eliana Ferreira Ribeiro Durães pelas fotografias, leitura da histomorfometria do colágeno e apoio logístico.

Aos estudantes de graduação de medicina Pedro Felipe Silva de Freitas, Felipe Augusto Neves Oliveira de Carvalho, Sérgio Andurte Carvalho, pela ajuda nos procedimentos cirúrgicos.

Ao Professor Doutor Ruy de Souza Lino Júnior da Universidade Federal de Goiás pela orientação na análise histomorfométrica do colágeno.

À Professora Doutora Fabiana Pirani Carneiro e membros do Laboratório de Patologia da Unb pela análise histológica e imunohistoquímica.

Ao Professor Doutor Omar Feres e membros do Laboratório de Bioquímica e Transplante Hepático da Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, pela análise da hidroxiprolina.

Ao Biocien/Labocien do Centro Universitário de Brasília – UniCEUB, pelo fornecimento dos ratos de laboratório.

Ao Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília – UnB, e seus membros pela ajuda com os animais.

Ao Centro de Ensino e Tecnologia em Ciências da Saúde (CETREX) pelo empréstimo do insuflador laparoscópico.

Aos colegas de pós graduação Luiz Felipe de Campos Lobato e Patrícia Cristina Alves Ferreira pela ajuda científica e incentivo.

À Dra. Silvana Marques e Silva pelo apoio científico.

Aos colegas médicos coloproctologistas do Hospital Universitário de Brasília, Prof. Rômulo Medeiros de Almeida, Antônio Carlos Nóbrega dos Santos, José Guilherme Filho e residentes pelo convívio.

Aos professores da Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília pelos ensinamentos.

À UnB, universidade da nossa capital, por me acolher.

EPÍGRAFE

“Os únicos limites das nossas realizações de amanhã são as nossas dúvidas e hesitações de hoje.”

Franklin Roosevelt

RESUMO

Introdução: A cirurgia laparoscópica apresenta diversas vantagens em relação a cirurgia aberta, sendo cada vez mais utilizada. Para prover exposição cirúrgica é utilizado pneumoperitônio com dióxido de carbono (CO₂), gerando aumento da pressão abdominal. O CO₂ é utilizado em diversas especialidades médicas para melhorar o processo cicatricial. Os possíveis efeitos benéficos deste gás na cirurgia laparoscópica motivou este estudo.

Objetivo: Verificar os efeitos do CO₂ e da pressão abdominal na cicatrização de anastomoses colônicas em ratos.

Material e método: 70 ratos foram distribuídos em 4 grupos. Foi realizada uma ressecção de segmento colônico proximal à reflexão peritoneal com anastomose colônica término-terminal vídeo-assistida, utilizando um novo modelo experimental, com pneumoperitônio nas pressões de 5 mmHg (grupo I), 12 mmHg (grupo II) ou 20 mmHg (grupo III). A mesma operação foi realizada por laparotomia (grupo IV). Os animais dos grupos I, II e III foram divididos em subgrupos para uso de CO₂ ou hélio para confecção do pneumoperitônio. Os animais foram mortos após 7 dias. Foram avaliados os seguintes parâmetros: óbito, peso, achados intra-operatórios, pressão de ruptura da anastomose, força de ruptura da anastomose, características histopatológicas, histomorfometria do colágeno, dosagem de hidroxiprolina, fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e densidade de microvasos (CD31).

Resultados: A pressão e os gases não influenciaram nos óbitos, nos achados intraoperatórios, na pressão de ruptura da anastomose, na força de ruptura da anastomose, na histopatologia, na dosagem de hidroxiprolina, no VEGF e no CD31. Há uma maior perda de peso na pressão de 20 mmHg em relação a cirurgia aberta ($p=0,037$). Na histomorfometria, o CO₂ aumentou o percentual de colágeno em relação ao hélio na pressão de 20 mmHg ($p=0,004$).

Conclusão: O CO₂ não influenciou na cicatrização de anastomoses em cólon esquerdo de ratos nas pressões de 5 mmHg e 12 mmHg. Na pressão de 20 mmHg, o CO₂ aumentou o percentual do colágeno na região anastomótica em relação ao hélio.

Palavras-chave: Pneumoperitônio, Dióxido de carbono, Hélio, Pressão abdominal, Anastomose, Cicatrização, Cólon, Colágeno.

ABSTRACT

Introduction: Laparoscopic surgery has several advantages over open surgery, being increasingly used. Pneumoperitoneum with carbon dioxide (CO₂) is used to provide surgical exposure, increasing abdominal pressure. CO₂ is used in various medical specialties to improve the healing process. The possibility of beneficial effects caused by this gas in laparoscopic surgery motivated this study.

Objective: To investigate the effects of CO₂ and abdominal pressure on the healing of colonic anastomosis in rats.

Methods: 70 rats were divided in 4 groups. We performed a video-assisted resection of a colonic segment proximal to the peritoneal reflection with an end-to-end colonic anastomosis, using a new experimental model, at pneumoperitoneum pressures of 5 mmHg (group I), 12 mmHg (group II) or 20 mmHg (group III). The same operation was performed by laparotomy (group IV). The animals in groups I, II and III were divided into subgroups to use CO₂ or helium for pneumoperitoneum. The animals were killed after 7 days. We evaluated the following parameters: mortality, weight, intraoperative findings, bursting pressure, breaking strength, histopathologic features, histomorphometry of collagen, serum hydroxyproline, vascular endothelial growth factor (VEGF) and microvessel density (CD31).

Results: Neither the pressure nor the gas influenced in mortality, intraoperative findings, bursting pressure, breaking strength, histopathology, VEGF and CD31. There was a greater weight loss in pneumoperitoneum pressure of 20 mmHg compared to open surgery ($p=0.037$). In histomorphometry, the CO₂ increased the percentage of collagen in relation to helium at a pressure of 20 mmHg ($p=0.004$).

Conclusion: The CO₂ had no effect on anastomotic healing in the left colon of rats at pressures of 5 mmHg and 12 mmHg. At a pressure of 20 mmHg, CO₂ increased the percentage of collagen in the anastomosis compared to helium.

Keywords: Pneumoperitoneum, Carbon dioxide, Helium, Abdominal pressure, Anastomosis, Healing, Colon, Collagen.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ALOCAÇÃO DE ANIMAIS EM GRUPOS E SUBGRUPOS DE ACORDO COM O TRATAMENTO REALIZADO.....	26
FIGURA 2 – ALOJAMENTO DE ANIMAIS DA FACULDADE DE MEDICINA..	28
FIGURA 3 – INTRODUÇÃO DA AGULHA DE VERES PARA REALIZAÇÃO DO PNEUMOPERITÔNIO.....	30
FIGURA 4 – INTRODUÇÃO DO TROCÁTER DE 7 MM ABAIXO DO APÊNDICE XIFÓIDE.....	31
FIGURA 5 – INTRODUÇÃO DO TROCÁTER DE 5 MM INFRA-UMBILICAL SOB VISÃO DIRETA.....	32
FIGURA 6 – INTRODUÇÃO DA PINÇA DE 5 MM PARA MANIPULAÇÃO DAS ESTRUTURAS INTRA-ABDOMINAIS POR LAPAROSCOPIA....	32
FIGURA 7 – MANIPULAÇÃO DE ESTRUTURAS INTRA-ABDOMINAIS POR LAPAROSCOPIA.....	33
FIGURA 8 – ANIMAL DO GRUPO IV SUBMETIDO A LAPAROTOMIA.....	34
FIGURA 9 – IDENTIFICAÇÃO E APREENSÃO DO CÓLON ESQUERDO PRÓXIMO A REFLEXÃO PERITONEAL POR LAPAROSCOPIA	35
FIGURA 10- EXTERIORIZAÇÃO DO SEGMENTO DE CÓLON ESQUERDO PELA INCISÃO DO TROCÁTER INFRA-UMBILICAL	36
FIGURA 11 – RESSECÇÃO DO CÓLON COM TESOURA RETA	37
FIGURA 12 – ANASTOMOSE COLÔNICA TÉRMINO-TERMINAL, SUTURA POSTERIOR CONTÍNUA COM FIO POLIPROPILENO.....	38
FIGURA 13–ANASTOMOSE COLÔNICA TÉRMINO-TERMINAL, SUTURA ANTERIOR CONTÍNUA COM FIO POLIPROPILENO.....	39
FIGURA 14–ASPECTO FINAL DA RECONSTRUÇÃO COLÔNICA.....	40
FIGURA 15–CÓLON ESQUERDO COM SONDA PROXIMAL E RETO LIGADO PARA A REALIZAÇÃO DO TESTE DE PRESSÃO DE RUPTURA ANASTOMÓTICA.....	42

FIGURA 16–SEGMENTO COLÔNICO DIVIDIDO PARA TESTE DE FORÇA DE RUPTURA, EXAME HISTOPATOLÓGICO, HISTOMORFOMÉTRICO, IMUNO-HISTOQUÍMICO E DOSAGEM DE HIDROXIPROLINA	43
FIGURA 17–DETERMINAÇÃO DA PRESSÃO DE RUPTURA DA ANASTOMOSE COM O MANÔMETRO REGISTRADOR Z10.RG.....	45
FIGURA 18–CÓLON ESQUERDO INSUFLADO EM POSIÇÃO ANATÔMICA COM ADERÊNCIAS PARA DETERMINAÇÃO DA PRESSÃO DE RUPTURA DA ANASTOMOSE.....	46
FIGURA 19 –REGISTRO GRÁFICO DA INSUFLAÇÃO E DA PRESSÃO DE RUPTURA DA ANASTOMOSE	
FIGURA 20–APARELHO DE ENSAIO VERTICAL (VERSA TEST) ACOPLADO AO DINAMÔMETRO DIGITAL.....	47
FIGURA 21–SEGMENTO DO CÓLON POSICIONADO NO VERSA TESTE, SENDO REALIZADO O TESTE DE FORÇA DE RUPTURA DA ANASTOMOSE.....	48
FIGURA 22– LÂMINAS CORADAS COM HEMATOXILINA-EOSINA IDENTIFICANDO COLÁGENO (A), FIBROBLASTO (A), NEOVASOS (B), INFILTRADO DE MONONUCLEARES (B), ABSCESSO (C), CORPO ESTRANHO (D), COLÔNIAS BACTERIANAS (E).....	50
FIGURA 23 – ANÁLISE DO PERCENTUAL DE COLÁGENO POR MEIO DO <i>SOFTWARE IMAGE J</i>	51
FIGURA 24 – EXPRESSÃO DE VEGF EM CÉLULAS ENDOTELIAIS, MACRÓFAGOS, LEUCÓCITOS E FIBROBLASTOS – A (100X), B (400X).....	54
FIGURA 25 - EXPRESSÃO DE CD31 EM CÉLULAS ENDOTELIAIS (400X)..	55
FIGURA 26 – CORTES HISTOLÓGICOS DA ÁREA DA ANASTOMOSE COLÔNICA DOS ANIMAIS SUBDIVIDIDOS POR GRUPOS / SUBGRUPOS. HE – 20x.....	72
FIGURA 27– HISTOMORFOMETRIA DAS LÂMINAS CORADAS PELO PICO-SIRIUS COM LUZ POLARIZADA DOS ANIMAIS SUBDIVIDIDOS POR GRUPOS / SUBGRUPOS. HE – 20x.....	74

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 –	MEDIANA E VALORES INTERVALARES DOS PESOS DOS ANIMAIS NO DIA DA OPERAÇÃO E NO DIA DA REOPERAÇÃO.....	58
GRÁFICO 2 –	MEDIANA E VALORES INTERVALARES DA VARIAÇÃO DE PESO DOS ANIMAIS, DISTRIBUÍDOS SEGUNDO A PRESSÃO UTILIZADA.	60
GRÁFICO 3 –	MEDIANA E VALORES INTERVALARES DA VARIAÇÃO DE PESO DOS ANIMAIS, DISTRIBUÍDOS SEGUNDO O GÁS UTILIZADO	61
GRÁFICO 4 –	MEDIANA E VALORES INTERVALARES DA PRESSÃO DE RUPTURA DA ANASTOMOSE DISTRIBUÍDOS POR GRUPO E SUBGRUPO. VALORES EM MMHG.....	66
GRÁFICO 5 –	MEDIANA E VALORES INTERVALARES DA PRESSÃO DE RUPTURA DA ANASTOMOSE DISTRIBUÍDOS PELA PRESSÃO UTILIZADA NO PNEUMOPERITÔNIO. VALORES EM MMHG.....	67
GRÁFICO 6 –	MEDIANA E VALORES INTERVALARES DA PRESSÃO DE RUPTURA DA ANASTOMOSE DISTRIBUÍDOS PELO GÁS UTILIZADO NO PNEUMOPERITÔNIO. VALORES EM MMHG.....	68
GRÁFICO 7 –	MEDIANA E VALORES INTERVALARES DA FORÇA DE RUPTURA DA ANASTOMOSE DISTRIBUÍDOS POR GRUPO E SUBGRUPO. VALORES EM NEWTON.....	69
GRÁFICO 8 –	MEDIANA E VALORES INTERVALARES DA FORÇA DE RUPTURA DA ANASTOMOSE DISTRIBUÍDOS SEGUNDO A PRESSÃO UTILIZADA. VALORES EM NEWTON.....	70
GRÁFICO 9 –	MEDIANA E VALORES INTERVALARES DA FORÇA DE RUPTURA DA ANASTOMOSE DISTRIBUÍDOS SEGUNDO O GÁS UTILIZADO. VALORES EM NEWTON.....	71

GRÁFICO 10 –	MÉDIA E ERRO PADRÃO DO PERCENTUAL DE COLÁGENO NAS FOTOS DA REGIÃO PERIANASTOMÓTICA DAS LÂMINAS CORADAS POR PICROSÍRIUS EM RELAÇÃO AO GRUPO/SUBGRUPO.....	76
GRÁFICO 11 –	MÉDIA E ERRO PADRÃO DO PERCENTUAL DE COLÁGENO NAS FOTOS DA REGIÃO PERIANASTOMÓTICA DAS LÂMINAS CORADAS POR PICROSÍRIUS EM RELAÇÃO A PRESSÃO UTILIZADA.....	77
GRÁFICO 12 –	MÉDIA E ERRO PADRÃO DO PERCENTUAL DE COLÁGENO NAS FOTOS DA REGIÃO PERIANASTOMÓTICA DAS LÂMINAS CORADAS POR PICROSÍRIUS EM RELAÇÃO AO GÁS UTILIZADO.....	78
GRÁFICO 13 –	MÉDIA E ERRO PADRÃO DA CONCENTRAÇÃO DE HIDROXIPROLINA NO DIA DA OPERAÇÃO DISTRIBUÍDOS POR GRUPO E SUBGRUPO. VALORES EM MG/G DE TECIDO.....	80
GRÁFICO 14 –	MÉDIA E ERRO PADRÃO DA CONCENTRAÇÃO DE HIDROXIPROLINA NO DIA DA OPERAÇÃO DISTRIBUÍDOS PELA PRESSÃO UTILIZADA. VALORES EM MG/G DE TECIDO.....	81
GRÁFICO 15 –	MÉDIA E ERRO PADRÃO DA CONCENTRAÇÃO DE HIDROXIPROLINA NO DIA DA OPERAÇÃO DE ACORDO COM O GÁS UTILIZADO. VALORES EM MG/G DE TECIDO.....	82
GRÁFICO 16 –	MÉDIA E ERRO PADRÃO DA CONCENTRAÇÃO DE HIDROXIPROLINA NO DIA DA REOPERAÇÃO DISTRIBUÍDOS POR GRUPO E SUBGRUPO. VALORES EM MG/G DE TECIDO.....	84

GRÁFICO 17 –	MÉDIA E ERRO PADRÃO DA CONCENTRAÇÃO DE HIDROXIPROLINA NO DIA DA REOPERAÇÃO DISTRIBUÍDOS PELA PRESSÃO UTILIZADA. VALORES EM MG/G DE TECIDO.....	85
GRÁFICO 18 –	MÉDIA E ERRO PADRÃO DA CONCENTRAÇÃO DE HIDROXIPROLINA NO DIA DA REOPERAÇÃO DE ACORDO COM O GÁS UTILIZADO. VALORES EM MG/G DE TECIDO.....	86
GRÁFICO 19 –	MÉDIA E ERRO PADRÃO DA CONCENTRAÇÃO DE HIDROXIPROLINA NO DIA DA OPERAÇÃO E NO DIA DA REOPERAÇÃO DISTRIBUÍDOS POR GRUPO E SUBGRUPO. VALORES EM MG/G DE TECIDO.....	87
GRÁFICO 20 –	MÉDIA E ERRO PADRÃO DA CONCENTRAÇÃO DE HIDROXIPROLINA NO DIA DA OPERAÇÃO E NO DIA DA REOPERAÇÃO DISTRIBUÍDOS PELA PRESSÃO UTILIZADA. VALORES EM MG/G DE TECIDO.....	88
GRÁFICO 21 –	MÉDIA E ERRO PADRÃO DA CONCENTRAÇÃO DE HIDROXIPROLINA NO DIA DA OPERAÇÃO E NO DIA DA REOPERAÇÃO DISTRIBUÍDOS PELO GÁS UTILIZADO. VALORES EM MG/G DE TECIDO.....	89

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – VALORES DOS PESOS INICIAL E FINAL DOS ANIMAIS (MÉDIA, MEDIANA, DESVIO PADRÃO, VALORES MÍNIMOS E MÁXIMOS). VALORES EM GRAMAS.....	57
TABELA 2 – DISTRIBUIÇÃO DA MÉDIA E DESVIO PADRÃO DOS PESOS DOS ANIMAIS NO DIA DA OPERAÇÃO, NO DIA DA REOPERAÇÃO E A VARIAÇÃO DO PESO INICIAL E DO PESO FINAL PARA TODOS OS GRUPOS E SUBGRUPOS.....	59
TABELA 3 – DISTRIBUIÇÃO DA MÉDIA E DESVIO PADRÃO DOS PESOS DOS ANIMAIS NO DIA DA OPERAÇÃO, NO DIA DA REOPERAÇÃO E A VARIAÇÃO DO PESO INICIAL E DO PESO FINAL DISTRIBUÍDOS DE ACORDO COM A PRESSÃO DO PNEUMOPERITÔNIO.....	59
TABELA 4 – DISTRIBUIÇÃO DA MÉDIA E DESVIO PADRÃO DOS PESOS DOS ANIMAIS NO DIA DA OPERAÇÃO, NO DIA DA REOPERAÇÃO E A VARIAÇÃO DO PESO INICIAL E DO PESO FINAL DISTRIBUÍDOS DE ACORDO COM O GÁS DO PNEUMOPERITÔNIO.....	61
TABELA 5 – NÚMERO DE ANIMAIS COM ACHADOS INTRA-OPERATÓRIOS POSITIVOS NA RELAPAROTOMIA DE ACORDO COM O GRUPO/SUBGRUPO.....	62
TABELA 6 – NÚMERO DE ANIMAIS COM ACHADOS INTRA-OPERATÓRIOS POSITIVOS NA RELAPAROTOMIA DE ACORDO COM A PRESSÃO UTILIZADA	62
TABELA 7 – NÚMERO DE ANIMAIS COM ACHADOS INTRA-OPERATÓRIOS POSITIVOS NA RELAPAROTOMIA DE ACORDO COM O GÁS UTILIZADO.....	62
TABELA 8 – NÚMERO DE ANIMAIS SEGUNDO OS ESCORES DE NAIR À RELAPAROTOMIA DE ACORDO COM O GRUPO/SUBGRUPO.....	63
TABELA 9 – NÚMERO DE ANIMAIS SEGUNDO OS ESCORES DE NAIR À RELAPAROTOMIA DE ACORDO COM O GÁS UTILIZADO.....	63

TABELA 10–NÚMERO DE ANIMAIS SEGUNDO OS ESCORES DE NAIR À RELAPAROTOMIA DE ACORDO COM A PRESSÃO UTILIZADA.....	63
TABELA 11–NÚMERO DE ANIMAIS DE ACORDO COM A PROPORÇÃO DE COBERTURA DA ANASTOMOSE À RELAPAROTOMIA DE ACORDO COM O GRUPO/SUBGRUPO.....	64
TABELA 12–NÚMERO DE ANIMAIS DE ACORDO COM A PROPORÇÃO DE COBERTURA DA ANASTOMOSE À RELAPAROTOMIA DE ACORDO COM A PRESSÃO UTILIZADA.....	64
TABELA 13–NÚMERO DE ANIMAIS DE ACORDO COM A PROPORÇÃO DE COBERTURA DA ANASTOMOSE À RELAPAROTOMIA DE ACORDO COM O GÁS UTILIZADO.....	64
TABELA 14–VALORES DA PRESSÃO DE RUPTURA DA ANASTOMOSE POR GRUPO/SUBGRUPO (MÉDIA, MEDIANA, DESVIO PADRÃO, VALORES MÍNIMOS E MÁXIMOS). VALORES EM MMHG.....	65
TABELA 15–VALORES DA FORÇA DE RUPTURA DA ANASTOMOSE POR GRUPO/SUBGRUPO (MÉDIA, MEDIANA, DESVIO PADRÃO, VALORES MÍNIMOS E MÁXIMOS). VALORES EM NEWTON.....	69
TABELA 16–VALOR DE <i>P</i> PARA OS DADOS HISTOPATOLÓGICOS SEGUNDO O GRUPO/SUBGRUPO, TIPO DE GÁS UTILIZADO OU PRESSÃO UTILIZADA.....	73
TABELA 17–PERCENTUAL DE COLÁGENO NAS FOTOS DA REGIÃO PERIANASTOMÓTICA DAS LÂMINAS CORADAS POR PICROSÍRIUS EM RELAÇÃO AO GRUPO/SUBGRUPO (MÉDIA, MEDIANA, DESVIO PADRÃO, VALORES MÍNIMOS E MÁXIMOS).....	75
TABELA 18–VALORES DA CONCENTRAÇÃO DE HIDROXIPROLINA NO DIA DA OPERAÇÃO POR GRUPO/SUBGRUPO (MÉDIA, MEDIANA, DESVIO PADRÃO, VALORES MÍNIMOS E MÁXIMOS). VALORES EM MG/G DE TECIDO.....	79

TABELA 19–VALORES DA CONCENTRAÇÃO DE HIDROXIPROLINA NO DIA DA REOPERAÇÃO POR GRUPO/SUBGRUPO (MÉDIA, MEDIANA, DESVIO PADRÃO, VALORES MÍNIMOS E MÁXIMOS). VALORES EM MG/G DE TECIDO.....	83
TABELA.20–EXPRESSÃO DE VEGF DE ACORDO COM O GRUPO/SUBGRUPO.....	89
TABELA 21–EXPRESSÃO DE VEGF DE ACORDO COM A PRESSÃO UTILIZADA.....	90
TABELA 22 – EXPRESSÃO DE VEGF DE ACORDO COM O GÁS UTILIZADO.	90
TABELA 23 – DENSIDADE DE MICROVASOS (CD 31) DE ACORDO COM O GRUPO/SUBGRUPO.....	90
TABELA 24 – DENSIDADE DE MICROVASOS (CD 31) DE ACORDO COM A PRESSÃO UTILIZADA.....	91
TABELA 25– DENSIDADE DE MICROVASOS (CD 31) DE ACORDO COM O GÁS UTILIZADO.....	91

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVO	24
3 MATERIAL E MÉTODO	25
3.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS	25
3.2 ANIMAL DE EXPERIMENTAÇÃO	25
3.3 DESENHO EXPERIMENTAL	25
3.4 PROCEDIMENTO ANESTÉSICO E CIRÚRGICO.....	27
3.4.1 Considerações gerais	27
3.4.2 Anestesia	29
3.4.3 Preparo do campo operatório, pneumoperitônio e introdução dos trocaóteres	29
3.4.4 Ressecção e reconstrução colônica	34
3.4.5 Pneumoperitônio após anastomose e fechamento da parede abdominal	40
3.5 EVOLUÇÃO PÓS-OPERATÓRIA	41
3.6 REOPERAÇÃO E ANÁLISE OPERATÓRIA	41
3.7 ESTUDO DA PRESSÃO DE RUPTURA DA ANASTOMOSE	44
3.8 ESTUDO DA FORÇA DE RUPTURA DA ANASTOMOSE	47
3.9 ESTUDO HISTOPATOLÓGICO	49
3.10 ESTUDO HISTOMORFOMÉTRICO DO COLÁGENO	50
3.11 ESTUDO BIOQUÍMICO	52
3.11.1 Extração de hidroxiprolina	52
3.11.2 Dosagem de hidroxiprolina	53
3.12 ESTUDO IMUNOHISTOQUÍMICO PARA VEGF E CD31.....	53
3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA	55
4 RESULTADOS	57
4.1 ÓBITOS	57
4.2 PESO DOS ANIMAIS	57
4.3 ACHADOS INTRA-OPERATÓRIOS	61
4.4 PRESSÃO DE RUPTURA DA ANASTOMOSE	64
4.5 FORÇA DE RUPTURA DA ANASTOMOSE	68

4.6 ACHADOS HISTOPATOLÓGICOS	71
4.7 HISTOMORFOMETRIA DO COLÁGENO	73
4.8 CONCENTRAÇÃO DE HIDROXIPROLINA	78
4.8.1 Concentração de hidroxiprolina no dia da operação	78
4.8.2 Concentração de hidroxiprolina no dia da reoperação	82
4.8.3 Relação entre a hidroxiprolina no dia da operação e no dia da reoperação	86
4.9 FATOR DE CRESCIMENTO VASCULAR ENDOTELIAL (VEGF).....	89
4.10 DENSIDADE DE MICROVASOS (CD 31).....	90
5 DISCUSSÃO	92
6 CONCLUSÃO	100
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101
APÊNDICES	108
ANEXOS	123

1 INTRODUÇÃO

A introdução da videolaparoscopia na prática médica foi uma grande revolução na cirurgia nos últimos anos. Suas vantagens em relação à cirurgia aberta com menor dor pós operatória, retorno mais rápido da motilidade intestinal, com menor permanência hospitalar, retorno mais rápido ao trabalho e melhor resultado estético levaram à popularização do método (BUUNEN et al., 2009; LACY et al., 2008; KUHRY et al., 2008; JAYNE et al., 2007; VELDKAMP et al., 2005; GUILLOU et al., 2005). Estas vantagens eram atribuídas exclusivamente às pequenas incisões, no entanto o papel do pneumoperitônio com dióxido de carbono (CO₂) está recebendo cada vez mais atenção, apesar de não estar ainda bem esclarecido.

A primeira cirurgia laparoscópica no trato gastrointestinal foi a apendicectomia, em 1983, seguida pela colecistectomia em 1987 (DUBOIS et al., 1991). As primeiras colectomias vídeo-laparoscópicas foram realizadas por Jacobs em 1990 (JACOBS et al., 1991). No Brasil, a primeira intervenção laparoscópica no cólon foi realizada por Regadas no ano seguinte (REGADAS et al., 1992; REGADAS et al., 1995). Após a publicação do estudo COST (CLINICAL OUTCOMES OF SURGICAL THERAPY STUDY GROUP, 2004), que demonstrou resultados oncológicos na colectomia vídeo-laparoscópica semelhantes aos obtidos na cirurgia aberta com melhor evolução pós-operatória, vários cirurgiões se entusiasmaram com o procedimento pela via laparoscópica.

A complicação mais temida na cirurgia colorretal é a deiscência anastomótica, que está intimamente relacionada à deficiência na cicatrização. Esta complicação apresenta alto índice de morbimortalidade. Diversos fatores podem influenciar a cicatrização da anastomose colônica, como preparo de cólon, técnica cirúrgica, estado nutricional, tensão na sutura, sutura manual ou mecânica, infecção e uso de agentes farmacológicos (RAVO, 1988; KORUDA; ROLANDELLI, 1990; SOUSA et al., 1991; OLIVEIRA et al., 1994).

A cicatrização intestinal na cirurgia laparoscópica pode ser influenciado pelo tipo de gás utilizado, pela pressão intra-abdominal e pelo tempo de exposição ao pneumoperitônio.

O pneumoperitônio é utilizado nas colectomias vídeo-laparoscópicas com finalidade de prover exposição cirúrgica adequada por um período prolongado, entre 80 e 360 minutos (JACOB; SALKY, 2005). O dióxido de carbono é o gás escolhido para o pneumoperitônio, por apresentar baixa toxicidade, rápida excreção, baixo custo, baixo risco de embolia gasosa, alta capacidade de compensação pulmonar e não ser inflamável (MYNBAEV et al., 2009; MENES; SPIVAK, 2000).

O CO₂ é um gás de alta solubilidade e alta difusão entre as membranas. Ele é aproximadamente 20 a 25 vezes maior do que a velocidade de difusão do oxigênio. O CO₂ é carregado no sangue na forma de ácido carbônico, bicarbonato iônico ou combinado com a hemoglobina (MENES; SPIVAK, 2000).

O dióxido de carbono é utilizado na medicina desde a idade média, quando os banhos de água carbonada em piscinas naturais de água termal foram utilizados para o tratamento de pacientes com problemas circulatórios. Atualmente o CO₂ é utilizado por várias especialidades médicas como ortopedia, reumatologia, dermatologia, angiologia, anestesia, endoscopia, cirurgia laparoscópica e cirurgia plástica. A atividade terapêutica do CO₂ é determinada pela reação inflamatória local causada pelo gás nos tecidos promovendo a recuperação tecidual (ABRAMO, 2010).

A aplicação transcutânea de CO₂ (carboxiterapia) vem sendo usada na cirurgia plástica e dermatologia com finalidade de melhora estética de celulites, tecidos adiposos localizados, cicatrizes e irregularidades pós lipoaspiração (LEE, 2010; NACH et al., 2010). O uso do CO₂ transcutâneo aumenta a quantidade de capilares na derme, causa vasodilatação e aumenta o fluxo sanguíneo local (SÖNMEZ et al., 2009). Além disso o CO₂ aumenta o colágeno tecidual (FERREIRA et al., 2008). O CO₂ também vem sendo utilizado em úlceras vasculares e pé diabético, acelerando a cicatrização (PIAZZOLLA, 2011).

Na endoscopia alta e baixa, o uso de CO₂ em substituição ao ar ambiente leva a menor dor e desconforto após o exame, elimina o risco de explosões com uso do cautério, possibilita exames radiológicos e de ultrassonografia após o exame endoscópico, além de facilitar a concomitância de cirurgia laparoscópica com a endoscopia (BRETTHAUER, 2010).

Os efeitos do CO₂ na cicatrização da anastomose colônica é controverso. O CO₂, na cirurgia laparoscópica, leva a hipercarbia, acidemia e hipertensão pulmonar (GERGES et al., 2006). A hipercarbia induzida pelo uso de dióxido de carbono leva a vasodilatação periférica, podendo aumentar a oxigenação na região anastomótica, o que poderia melhorar a cicatrização, compensando os efeitos do aumento da pressão abdominal (ROSCH et al., 2004; ROSCH et al., 2005). Este efeito teria portanto semelhança aos efeitos benéficos encontrados no uso do dióxido de carbono na carboxiterapia.

O CO₂ diminui a atividade inflamatória mediada por macrófagos, diminuindo os níveis plasmáticos de TNF alfa e IL-6 (MACHADO et al., 2010; FUENTES et al., 2006). Esta atividade anti-inflamatória pode contribuir com a melhor recuperação nos pacientes operados por cirurgia laparoscópica. Hanly et al. (2003) observaram diminuição da atividade inflamatória e stress per-operatório quando foi utilizado pneumoperitônio na pressão de 3 mmHg com CO₂ em ratos com sepse comparado com pneumoperitônio de 3 mm Hg com hélio e cirurgia aberta.

Alguns autores, no entanto, afirmam que o uso do pneumoperitônio de CO₂ causa um ambiente de hipóxia o que pode piorar a cicatrização intestinal (TYTGAT et al., 2011). Mynbaev et al. (2009) sugeriram que o ambiente de hipóxia melhoraria com o uso de Oxigênio (O₂) associado ao CO₂ no pneumoperitônio. Tytgat et al. (2011) observaram piora da pressão de ruptura da anastomose de intestino delgado em ratos submetidos a pneumoperitônio com CO₂ nas pressões de 5 mm Hg e 10 mm Hg em relação a cirurgia aberta. Neste estudo não foi observado alterações na neoangiogênese ou sinais de isquemia no sítio anastomótico. Matsuzaki et al. (2010) observaram que o CO₂ leva a hipóxia a nível celular na pressão de 15 mmHg em ratos. O mesmo não foi verificado ao se utilizar a pressão de 2 mmHg e 8 mmHg.

Alguns estudos experimentais para verificar qual seria o melhor gás na cirurgia colorretal laparoscópica já foram realizados. O óxido nitroso, ar ambiente, nitrogênio, argônio e hélio podem ser gases alternativos ao CO₂ (MENES; SPIVAK, 2000). O hélio é uma boa alternativa como substituto ao CO₂. Ele é um gás inerte, não leva a retenção de CO₂ e conseqüentemente não leva a acidose, além de não interferir na resposta inflamatória. Goiten et al. (2005) não observaram diferença na perfusão intestinal durante

pneumoperitônio prolongado com CO₂ ou hélio. Rosch et al. (2005) também não observaram diferença em parâmetros histopatológicos e imunohistoquímicos em anastomoses de intestino delgado utilizando-se pneumoperitônio com CO₂ e hélio, comparado com um grupo controle.

O aumento da pressão intra-abdominal, causado pelo pneumoperitônio, leva a efeitos sistêmicos como alterações do equilíbrio ácido-base, de gases sanguíneos, pulmonares e cardiovasculares (SAFRAN; ORLANDO, 1994). No sistema cardiovascular observa-se a diminuição do retorno venoso, diminuição da pré-carga, aumento da resistência vascular sistêmica e pulmonar, aumento da pós-carga e diminuição do débito cardíaco. Entre as alterações pulmonares estão a diminuição da complacência pulmonar e o aumento da resistência do sistema respiratório. Observa-se também redução da perfusão renal, levando a oligúria (SHARMA et al., 1996; GUTT et al., 2004). Outra importante alteração verificada no aumento da pressão intra-abdominal é a diminuição do fluxo sanguíneo esplâncnico, o que poderia ocasionar a isquemia do cólon, prejudicando a cicatrização da anastomose colônica, levando a deiscência (POLAT et al., 2002). A redução da oxigenação intestinal piora o processo cicatricial (POSMA et al., 2007; POSMA et al., 2009; POSMA et al., 2010).

Polat et al. (2002) estudaram cicatrização de anastomoses colônicas em ratos submetidos a pneumoperitônio com CO₂ à pressão de 14 mmHg, 20 mmHg, 25 mmHg e 30 mmHg antes da laparotomia por 60 minutos. Foi demonstrada redução progressiva nos valores da pressão de ruptura da anastomose e piora nos parâmetros histopatológicos de cicatrização com o aumento da pressão intraperitoneal, com diferença estatística a partir de 20 mmHg em relação ao grupo controle.

Avital et al. (2007) mediram parâmetros cardiorrespiratórios em ratos submetidos a pneumoperitônio com 5 mmHg, 8 mmHg e 12 mmHg. Foi demonstrado que as alterações fisiológicas que mais se assemelham àquelas da cirurgia laparoscópica em humanos ocorrem na pressão de 5 mmHg em ratos. As pressões de 8 mmHg e 12 mmHg em ratos se assemelham à hipertensão intra-abdominal. Em outros estudos, os autores também sugerem que pressões de até 6 mmHg em ratos equivalem a pressão intra-abdominal de 12 a 15 mmHg em humanos (BERGUER et al., 1997; ROSCH et al., 2005; GUTT; SCHMANDRA, 1999).

Kologlu et al. (1999) realizaram um estudo em ratos mantidos com pneumoperitônio com ar ambiente sob diferentes pressões após anastomoses colônicas até o 4º dia pós-operatório. Foi verificada menor pressão de ruptura e diminuição da concentração de hidroxiprolina nas anastomoses dos grupos tratados em relação ao grupo controle, sugerindo um retardo no processo cicatricial.

A cicatrização intestinal é um processo complexo, e vários parâmetros podem ser utilizados sua avaliação, entre eles: parâmetros clínicos, mecânicos, histopatológicos, imunohistoquímicos e bioquímicos (HENDRIKS; MASTBOOM, 1990).

Entre os parâmetros mecânicos estão a pressão e a força de ruptura da anastomose. A pressão de ruptura é a medida da resistência da anastomose ao aumento da pressão intra-luminal. A força de ruptura é a medida da resistência da anastomose a forças longitudinais. A pressão de ruptura reflete melhor a força a que a anastomose é submetida fisiologicamente, que pode levar a formação de deiscências (HENDRIKS; MASTBOOM, 1990).

O colágeno é responsável pela resistência da anastomose. Portanto o processo de degradação e síntese de colágeno no pós operatório afetam a anastomose e o risco de deiscência. A hidroxiprolina é um aminoácido presente nas proteínas de colágeno nos tecidos. A concentração de hidroxiprolina está diretamente ligado a quantidade de colágeno presente, no entanto, não está relacionado ao tipo de colágeno (HENDRIKS; MASTBOOM, 1990). Outra forma de avaliar a concentração de colágeno é a histomorfometria com a vantagem de demonstrar o tipo do colágeno (RABAU et al, 1995).

O fator de crescimento vascular (VEGF) é um importante regulador da angiogênese no processo cicatricial, sendo portanto responsável pela diminuição da hipóxia que interfere na viabilidade tecidual, diminuindo risco de deiscência anastomótica (ADAS et al, 2011).

A laparoscopia vem sendo utilizada cada vez mais em cirurgias complexas como as colectomias. Com a utilização crescente, questiona-se os efeitos da pressão abdominal e do CO₂ em anastomoses colônicas. Para estudarmos estes efeitos idealizamos um novo modelo experimental em ratos de fácil reprodução, e utilizamos as pressões e tempos adequados de pneumoperitônio com gases distintos, isolando assim efeitos da pressão e dos

gases. O CO₂ é utilizado em diversas especialidades médicas de forma terapêutica, com finalidade de melhorar processos de cicatrização. Seria este gás também benéfico na cicatrização de anastomoses na cirurgia colorretal? Este trabalho foi idealizado para verificar possíveis efeitos benéficos da utilização do CO₂ na cicatrização de anastomose colônica na cirurgia laparoscópica.

2 OBJETIVO

Avaliar os possíveis efeitos do dióxido de carbono e da pressão intra-abdominal provocada pelo pneumoperitônio na cicatrização de anastomoses realizadas no cólon esquerdo de ratos.

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Cirurgia Experimental da Área de Clínica Cirúrgica da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília – UnB, com colaboração do Laboratório de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília - UnB, do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás – UFG e do Laboratório de Bioquímica e Transplante Hepático da Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

O protocolo de pesquisa foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal – CEUA, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília – UnB (UnBDOC n 73136/2010) . Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as diretrizes do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA.

A redação do trabalho foi realizada de acordo com as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 14724:2011).

3.2 ANIMAL DE EXPERIMENTAÇÃO

Foram utilizados 70 ratos, *Rattus norvegicus*, da linhagem Wistar, machos, com aproximadamente 90 dias de vida e peso de 244 a 420 g. Os ratos foram produzidos e adquiridos do Biocien/Labocien do Centro Universitário de Brasília – UniCEUB.

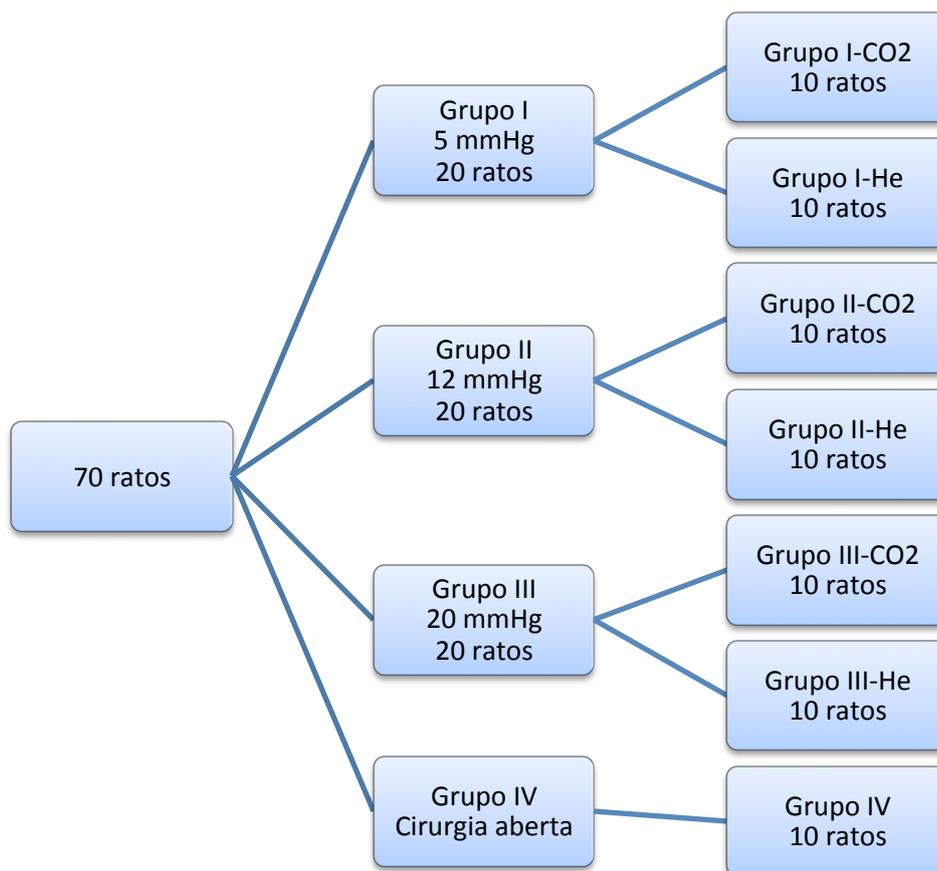
3.3 DESENHO EXPERIMENTAL

Os 70 ratos foram aleatoriamente distribuídos em 3 grupos de 20 animais, de acordo com a pressão utilizada, e 1 grupo controle de 10 animais:

- I – Animais submetidos a pneumoperitônio na pressão de 5 mmHg
- II – Animais submetidos a pneumoperitônio na pressão de 12 mmHg
- III – Animais submetidos a pneumoperitônio na pressão de 20 mmHg
- IV – Animais submetidos a laparotomia

Os animais dos grupos I, II e III foram distribuídos em 2 subgrupos com 10 animais cada, em que o gás utilizado para o pneumoperitônio foi o dióxido de carbono (subgrupos I-CO₂, II-CO₂ e III-CO₂) ou o hélio (subgrupos I-He, II-He e III-He) (figura 1).

FIGURA 1 – ALOCAÇÃO DE ANIMAIS EM GRUPOS E SUBGRUPOS DE ACORDO COM O TRATAMENTO REALIZADO



FONTE: O autor (2013)

Todos os animais foram anestesiados e submetidos a ressecção de segmento colônico de 1 cm, entre 2,5 e 3,5 cm proximalmente à reflexão peritoneal, e reconstrução do trânsito colônico por anastomose término-terminal.

Os animais dos grupos I, II e III foram submetidos a pneumoperitônio com dióxido de carbono ou hélio, a uma pressão de 5, 12 ou 20 mm Hg por 60 minutos antes da ressecção colônica e mais 30 minutos com a mesma pressão após a anastomose.

Os animais do grupo IV foram submetidos a laparotomia 60 minutos antes da ressecção colônica, e a laparorrafia foi realizada 30 minutos após a anastomose.

Todos os animais foram reoperados no sétimo dia pós-operatório para se avaliar achados intraoperatórios (peritonite, abscesso, deiscência de anastomose, obstrução intestinal, aderências intra-abdominais), pressão de ruptura da anastomose, força de ruptura da anastomose, achados histopatológicos, histomorfometria do colágeno, concentração de hidroxiprolina, expressão de VEGF e densidade de microvasos (CD31).

Caso algum animal viesse a óbito antes do sétimo dia pós-operatório por causa não relacionada à anastomose, seria realizada sua substituição.

As operações foram realizadas em sessões, por lotes de sete animais, sendo um de cada subgrupo e um do grupo controle. A ordem das operações foi definida de forma aleatória.

Os animais foram numerados sequencialmente de acordo com a ordem de realização das operações, de 1 a 70.

3.4 PROCEDIMENTO ANESTÉSICO E CIRÚRGICO

3.4.1 Considerações gerais

Os ratos permaneceram no Alojamento de Animais da Faculdade de Medicina, confinados em gaiolas, em lotes de três ou quatro animais, com regime de doze horas de luz artificial e doze horas de escuridão, recebendo dieta padrão de laboratório e água à vontade, por um período de sete dias de aclimatação (figura 2).

FIGURA 2 – ALOJAMENTO DE ANIMAIS DA FACULDADE DE MEDICINA



FONTE: O autor (2013)

Imediatamente antes da indução anestésica, tiveram seus pesos aferidos em balança eletrônica (Marte balança eletrônica modelo AS5500 C, Marte Balanças e Aparelhos de Precisão Ltda – São Paulo, SP) e anotados.

Os procedimentos anestésicos e cirúrgicos foram supervisionados por médicos-veterinários do Laboratório de Cirurgia Experimental.

As operações foram realizadas com material cirúrgico limpo, não esterilizado.

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados pelo mesmo cirurgião.

3.4.2 Anestesia

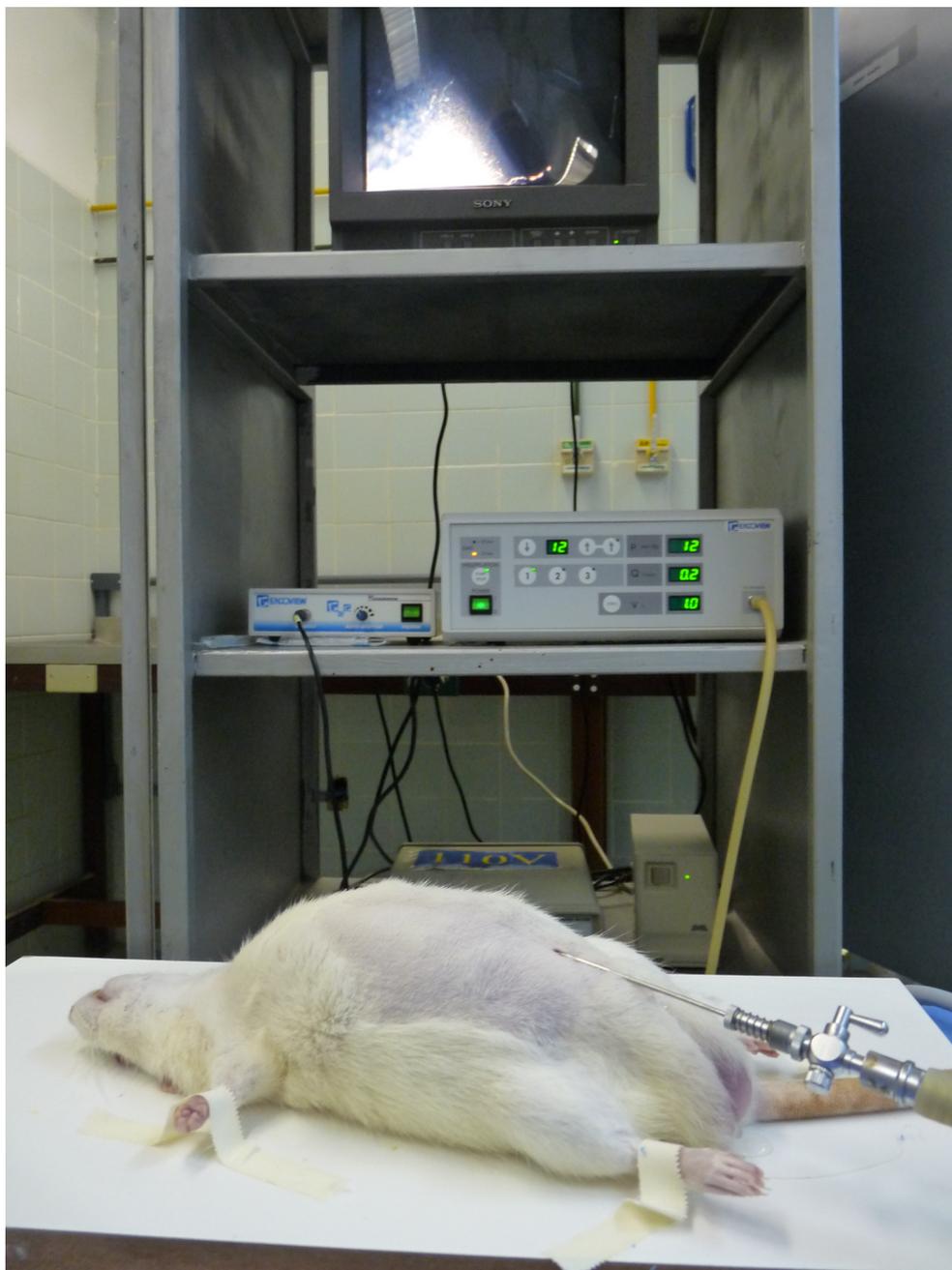
Os animais foram anestesiados com cloridrato de xilazina, na dose de 5 mg/kg peso por via intramuscular e cloridrato de cetamina, na dose de 25 mg/kg peso também por via intramuscular. No período transoperatório doses adicionais de anestésico foram administradas de acordo com as necessidades.

3.4.3 Preparo do campo operatório, pneumoperitônio e introdução dos trocáteres.

Cada animal foi colocado em decúbito dorsal sobre placa de madeira, com seus membros fixados com fita de esparadrapo. Após tricotomia da região abdominal anterior, procedeu-se, então, a antissepsia da pele do abdome com solução de polivinilpirrolidona iodo alcoólico.

Nos grupos I, II e III foi introduzida uma agulha de Veres intraperitonealmente, na linha média, 2 cm abaixo da cicatriz umbilical (figura 3).

FIGURA 3 – INTRODUÇÃO DA AGULHA DE VERES PARA REALIZAÇÃO DO PNEUMOPERITÔNIO



FONTE: O autor (2013)

A seguir, uma mangueira de silicone ligada a um insuflador laparoscópico (Karl Storz) foi acoplada à agulha, sendo iniciado o pneumoperitônio com fluxo de 1 L/min a uma pressão de 5 mmHg, 12 mmHg ou 20 mmHg com gás dióxido de carbono ou hélio, por 60 minutos, de acordo com o subgrupo. Após, foi realizada uma incisão mediana 0,5 cm abaixo do apêndice xifóide, com 0,7 cm de extensão, e introduzido um trocáter de 7 mm (figura 4).

FIGURA 4 – INTRODUÇÃO DO TROCÁTER DE 7 MM ABAIXO DO APÊNDICE XIFÓIDE



FONTE: O autor (2013)

Em seguida foi introduzida a ótica de 7 mm na cavidade peritoneal, acoplada a um conjunto de processadora (Endoview – Recife, PE), fonte de luz (Endoview – Recife, PE) e monitor (Sony) sendo realizado uma laparoscopia de toda a cavidade. A mangueira do insuflador era então trocada para o trocáter supra-umbilical. No local em que foi realizada a punção com agulha de Veres, era introduzido um trocáter de 5 mm, sob visão direta (figura 5).

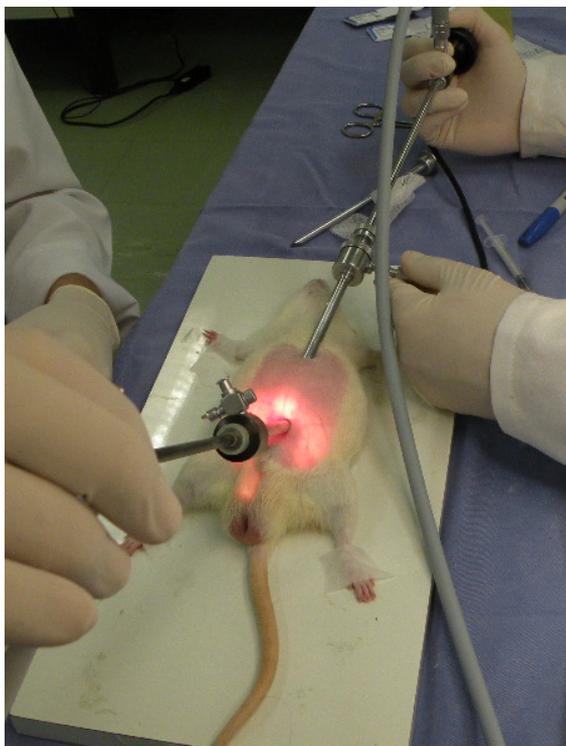
FIGURA 5 – INTRODUÇÃO DO TROCÁTER DE 5 MM INFRA-UMBILICAL SOB VISÃO DIRETA



FONTE: O autor (2013)

Após a introdução do trocáter infra-umbilical, era introduzido uma pinça Maryland de 5 mm (Edlo) neste portal para manipulação e identificação das estruturas abdominais (figuras 6 e 7).

FIGURA 6 – INTRODUÇÃO DA PINÇA DE 5 MM PARA MANIPULAÇÃO DAS ESTRUTURAS INTRA-ABDOMINAIS POR LAPAROSCOPIA



FONTE: O autor (2013)

FIGURA 7 – MANIPULAÇÃO DE ESTRUTURAS INTRA-ABDOMINAIS POR LAPAROSCOPIA



FONTE: O autor (2013)

Nos animais do Grupo IV foi realizada uma incisão mediana com aproximadamente 4 cm de extensão, com sua extremidade caudal a 1 cm da genitália externa do animal. Estes animais assim permaneceram por 60 minutos (figura 8).

FIGURA 8 – ANIMAL DO GRUPO IV SUBMETIDO A LAPAROTOMIA

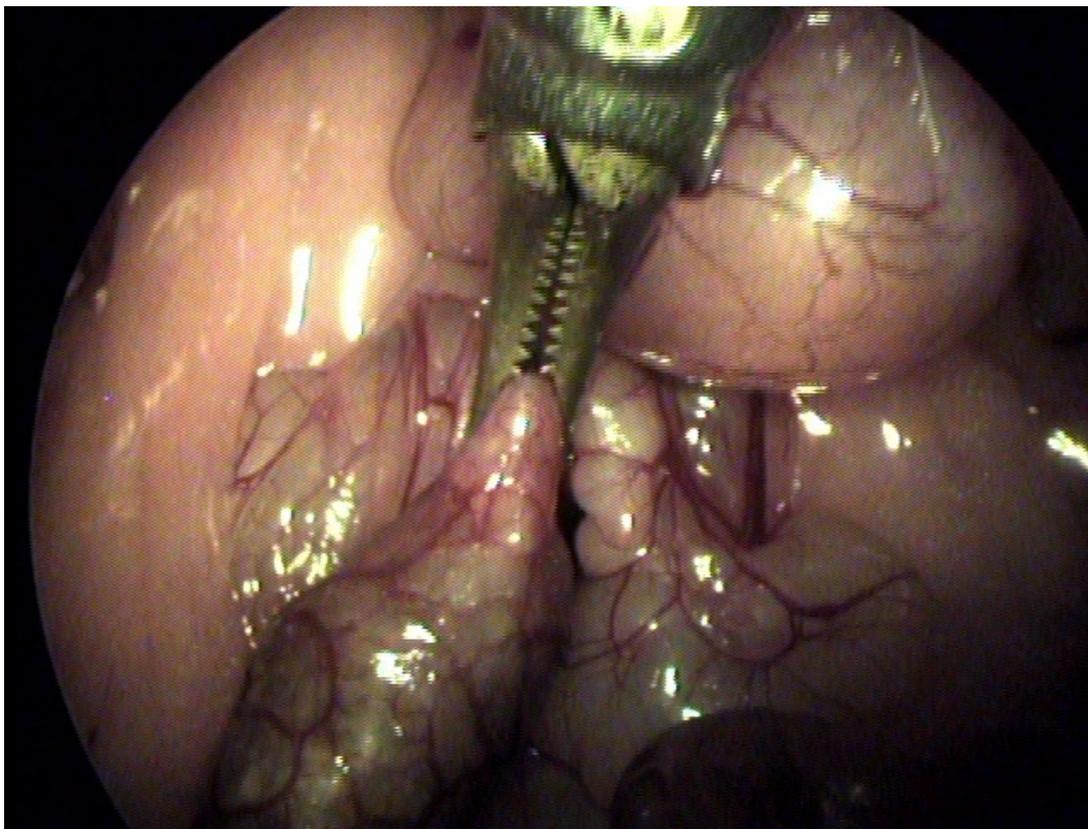


FONTE: O autor (2013)

3.4.4 Ressecção e reconstrução colônica

Nos animais dos grupos I, II e III, era identificado por laparoscopia a reflexão peritoneal. Após 60 minutos de pneumoperitônio, o cólon esquerdo era apreendido com a pinça de 5 mm, 3 cm acima da reflexão peritoneal (figura 9).

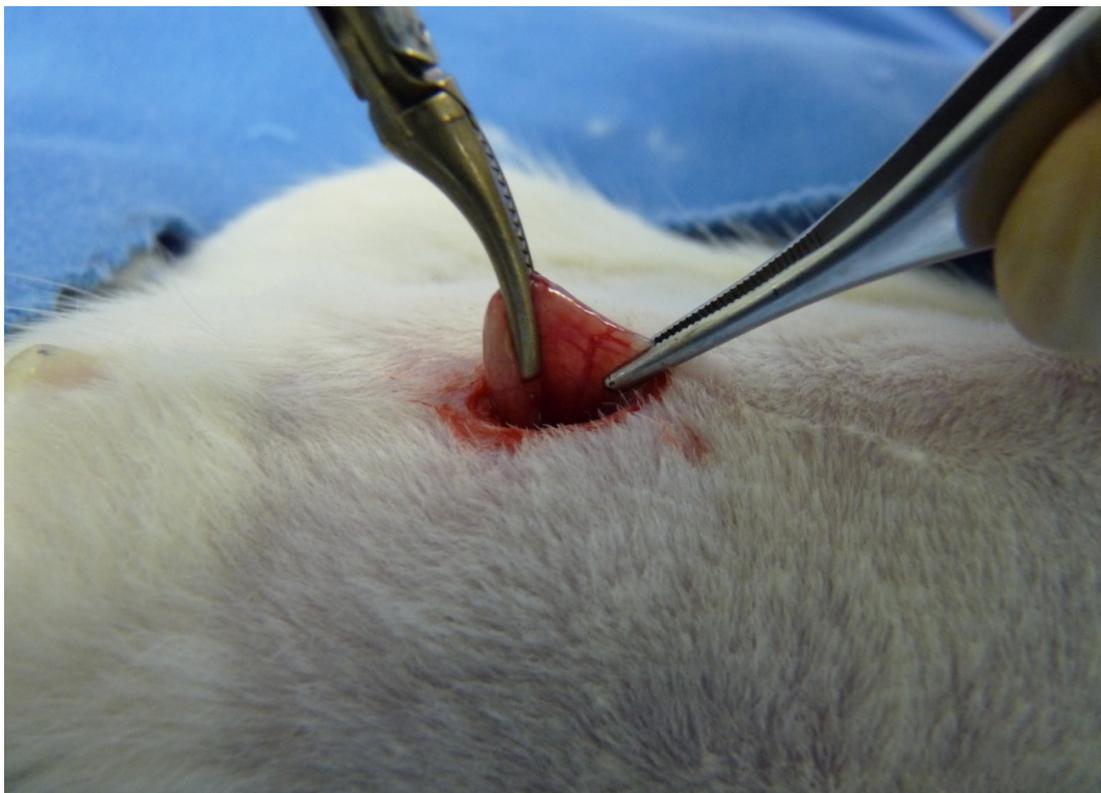
FIGURA 9 – IDENTIFICAÇÃO E APREENSÃO DO CÓLON ESQUERDO PRÓXIMO A REFLEXÃO PERITONEAL POR LAPAROSCOPIA



FONTE: O autor (2013)

O pneumoperitônio era desfeito e o segmento colônico era trazido para fora da cavidade peritoneal (figura 10).

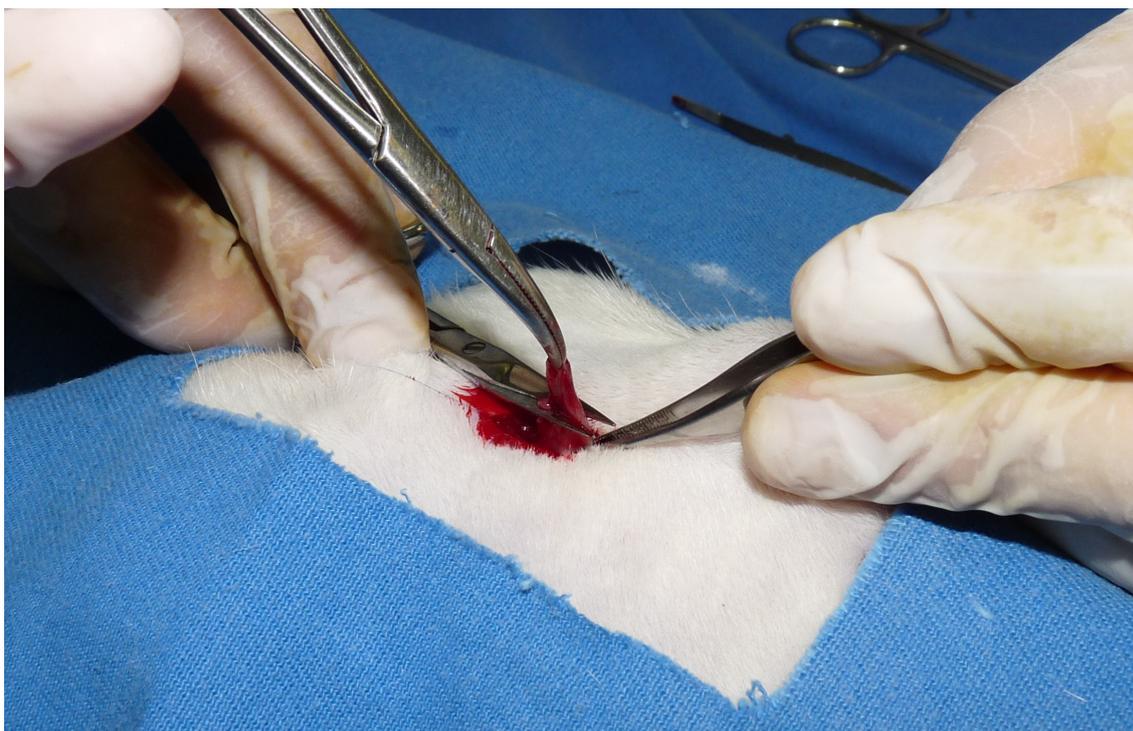
FIGURA 10 – EXTERIORIZAÇÃO DO SEGMENTO DE CÓLON ESQUERDO PELA INCISÃO DO TROCÁTER INFRA-UMBILICAL



FONTE: O autor (2013)

Foi realizada a ressecção de um segmento colônico de 1 cm por secção com tesoura reta entre 2,5 cm e 3,5 cm da reflexão peritoneal (figura 11).

FIGURA 11 – RESSECÇÃO DO CÓLON COM TESOURA RETA



FONTE: O autor (2013)

No grupo IV esta ressecção foi realizada entre 2,5 cm e 3,5 cm da reflexão peritoneal.

O segmento ressecado era lavado em solução de NaCl a 0,9%, e o quadrante mesentérico direito era isolado e imerso em solução de NaCl a 0,9% e congelado a -70°C para ser utilizado posteriormente para estudo da concentração de hidroxiprolina.

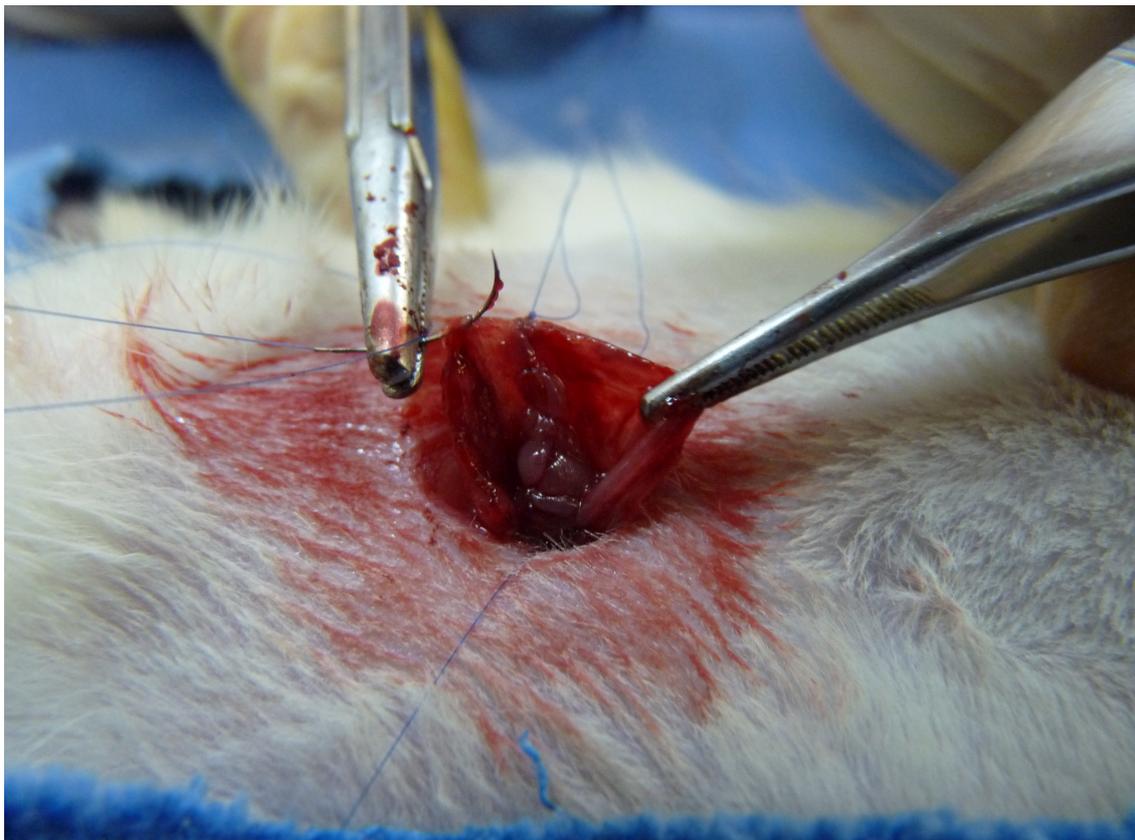
O trânsito colônico era reconstruído com anastomose término-terminal, em plano único, com pontos contínuos, englobando todas as camadas da parede intestinal, utilizando-se fio de polipropileno 6-0 com agulha cilíndrica de 1,3 cm (BRASUTURE – São Sebastião da Grama, SP) (figuras 12, 13 e 14).

FIGURA 12 – ANASTOMOSE COLÔNICA TÉRMINO-TERMINAL, SUTURA POSTERIOR CONTÍNUA COM FIO POLIPROPILENO



FONTE: O autor (2013)

FIGURA 13 – ANASTOMOSE COLÔNICA TÉRMINO-TERMINAL, SUTURA ANTERIOR CONTÍNUA COM FIO POLIPROPILENO



FONTE: O autor (2013)

FIGURA 14 – ASPECTO FINAL DA RECONSTRUÇÃO COLÔNICA



FONTE: O autor (2013)

3.4.5 Pneumoperitônio após anastomose e fechamento da parede abdominal

Nos grupos I, II e III, após o término da reconstrução do trânsito colônico, o trocater infra-umbilical era reintroduzido e o pneumoperitônio era refeito na mesma pressão inicial e mantido por mais 30 minutos.

No grupo controle a cavidade abdominal era mantida aberta por mais 30 minutos, sem exposição de alças intestinais (figura 8).

Após este tempo, nos grupos I, II e III, o pneumoperitônio era desfeito, os trocateres retirados, e era feita a síntese da parede abdominal.

No grupo IV, era feita a síntese da parede abdominal.

A síntese da parede abdominal, em todos os grupos, foi realizada em dois planos – o primeiro, incluindo o peritônio, músculo e aponeurose, com sutura contínua simples e o segundo, o tecido subcutâneo e pele, com sutura contínua, utilizando-se fio de polipropileno 5-0 com agulha cilíndrica de 1,5 cm (BRASUTURE – São Sebastião da Grama, SP).

3.5 EVOLUÇÃO PÓS-OPERATÓRIA

Após a recuperação anestésica os animais foram colocados em gaiolas, em grupos de três ou quatro, com água e ração à vontade. Os animais que morreram foram submetidos à necropsia para determinação da possível causa do óbito, e substituídos.

3.6 REOPERAÇÃO E ANÁLISE OPERATÓRIA

Os animais foram reoperados no sétimo dia pós-operatório. Imediatamente antes da indução anestésica o peso de cada animal foi aferido e anotado (Marte balança eletrônica modelo AS5500 C, Marte Balanças e Aparelhos de Precisão Ltda – São Paulo, SP).

Após anestesia com a mesma forma da operação inicial, foi realizada uma incisão mediana xifo-púbica, que permitiu a visualização completa da cavidade abdominal. Foi pesquisada a presença de sinais de peritonite, abscesso, deiscência de anastomose ou obstrução intestinal.

As aderências intra-abdominais foram avaliadas e quantificadas pelo Escore de Nair (NAIR et al., 1974):

0 – ausência de aderências;

1 – presença de uma única banda entre vísceras ou entre uma víscera e a parede abdominal;

2 – presença de duas bandas entre vísceras ou entre vísceras e a parede abdominal;

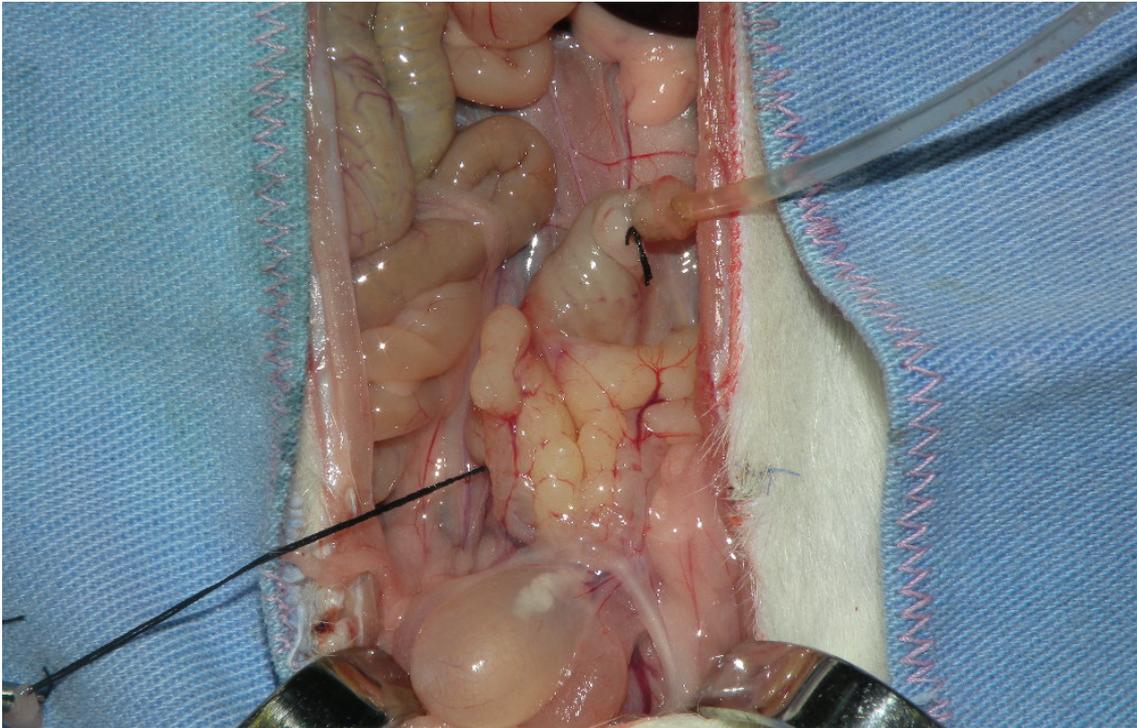
3 – presença de mais de duas bandas entre vísceras ou entre vísceras e a parede abdominal, ou todo o intestino formando uma massa não aderida à parede abdominal;

4 – presença de víscera diretamente aderida à parede abdominal, não importando o número ou extensão das bandas.

Foi feita uma incisão no cólon cerca de 5 cm proximal à anastomose, onde foi introduzido uma sonda de nelaton 10 Fr intraluminal por 1 cm e fixado com fio seda 2-0. Em seguida foi realizado lavagem do cólon de maneira anterógrada com soro fisiológico com mínima pressão após dilatação retal. O

reto superior era então cuidadosamente dissecado, e era realizada uma ligadura com seda 2-0. Era realizado neste momento o teste de pressão de ruptura anastomótica com manômetro registrador Z.10.RG (Zürich) (figura 15).

FIGURA 15 – CÓLON ESQUERDO COM SONDA PROXIMAL E RETO LIGADO PARA A REALIZAÇÃO DO TESTE DE PRESSÃO DE RUPTURA ANASTOMÓTICA



FONTE: O autor (2013)

Em seguida era ressecado um segmento intestinal de 4 cm contendo a anastomose em sua porção central. Foi avaliado o tipo de estrutura aderente e a quantidade das aderências foi graduada de acordo com a proporção da anastomose coberta pelas aderências em:

- 0 – ausência de aderências;
- 1 – até menos de 25%;
- 2 – entre 25% e 50%;
- 3 – entre 50% e 75%;
- 4 – entre 75% e 100%;
- 5 – 100 % de anastomose coberta por aderências.

O segmento ressecado foi seccionado ao meio, longitudinalmente, entre a borda mesentérica e a borda anti-mesentérica. O segmento esquerdo foi submetido ao teste de força de ruptura no aparelho de ensaio vertical

denominado Versa Test (Mecmesin Versa Test, United Kingdom), de capacitação de tração de 2500 N, acoplado a um dinamômetro digital portátil AGF (Panambro Indústria Técnica S.A. – SP). O segmento direito foi dividido ao meio, longitudinalmente em dois fragmentos. O fragmento mesentérico direito foi lavado em solução de NaCl a 0,9%, e imerso em solução de NaCl a 0,9% e congelado a -70°C para dosagem da concentração de hidroxiprolina. O fragmento anti-mesentérico direito foi fixado em formol tamponado a 10% para exame histopatológico, histomorfometria do colágeno e imunohistoquímica (figura 16).

FIGURA 16 – SEGMENTO COLÔNICO DIVIDIDO PARA TESTE DE FORÇA DE RUPTURA, EXAME HISTOPATOLÓGICO, HISTOMORFOMÉTRICO, IMUNO-HISTOQUÍMICO E DOSAGEM DE HIDROXIPROLINA



FONTE: O autor (2013)

Em seguida os animais foram submetidos a eutanásia com superdose de tiobarbiturato etil sódico (Thionembutal, Tiobarbiturato Etil Sódico, Abbott Laboratórios do Brasil Ltda) injetado na veia cava inferior.

3.7 ESTUDO DA PRESSÃO DE RUPTURA DA ANASTOMOSE

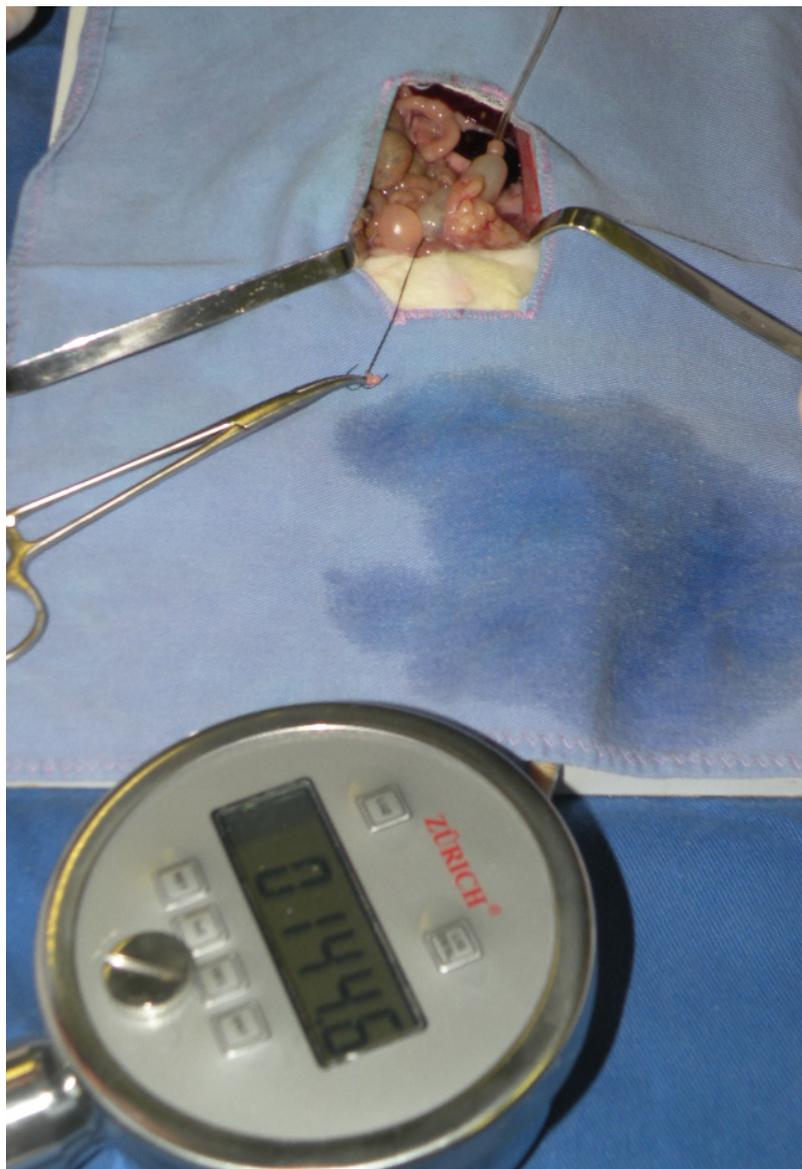
Para a determinação da pressão de ruptura da anastomose, foi utilizado o manômetro registrador Z.10.RG (Zürich).

Com a anastomose *in situ*, foi feita uma incisão no cólon cerca de 5 cm proximal a esta. Foi introduzido uma sonda uretral 10 Fr intraluminal por 1 cm e fixado com fio seda 2-0. Em seguida foi realizada lavagem do cólon de maneira anterógrada com soro fisiológico. Em seguida foi realizada infiltração lenta e cuidadosa de ar para retirada do soro. O reto superior foi então cuidadosamente dissecado para manter todas as aderências à anastomose, e foi ligado, fechando a luz intestinal, com seda 2-0.

Um circuito de três vias foi acoplado à sonda uretral, ao manômetro registrador e a um cilindro de ar comprimido. Um fluxo de 0,5 litro/minuto foi injetado no circuito, até a ruptura da anastomose.

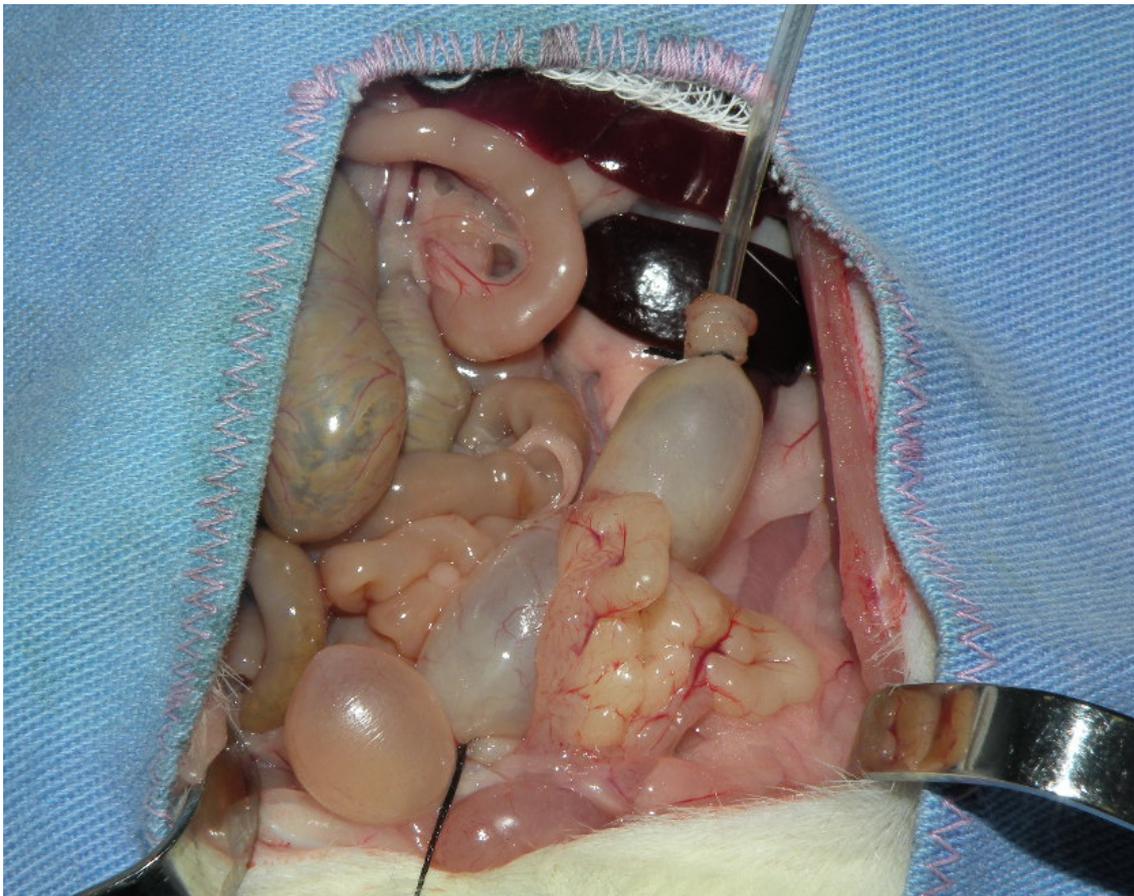
Foi registrada a pressão máxima alcançada no momento da ruptura em mmHg (figuras 17, 18 e 19).

FIGURA 17 – DETERMINAÇÃO DA PRESSÃO DE RUPTURA DA ANASTOMOSE COM O MANÔMETRO REGISTRADOR Z10.RG



FONTE: O autor (2013)

FIGURA 18 – CÓLON ESQUERDO INSUFLADO EM POSIÇÃO ANATÔMICA COM ADERÊNCIAS PARA DETERMINAÇÃO DA PRESSÃO DE RUPTURA DA ANASTOMOSE



FONTE: O autor (2013)

FIGURA 19 – REGISTRO GRÁFICO DA INSUFLAÇÃO E DA PRESSÃO DE RUPTURA DA ANASTOMOSE



FONTE: O autor (2013)

3.8 ESTUDO DA FORÇA DE RUPTURA DA ANASTOMOSE

Para a determinação da força de ruptura da anastomose, foi utilizado o aparelho de ensaio vertical denominado Versa Test (Mecmesin Versa Test, United Kingdom), de capacitação de tração de 2500 N, acoplado a um dinamômetro digital portátil AGF (Panambro Indústria Técnica S.A. – SP) (figura 20).

FIGURA 20 – APARELHO DE ENSAIO VERTICAL (VERSA TEST) ACOPLADO AO DINAMÔMETRO DIGITAL

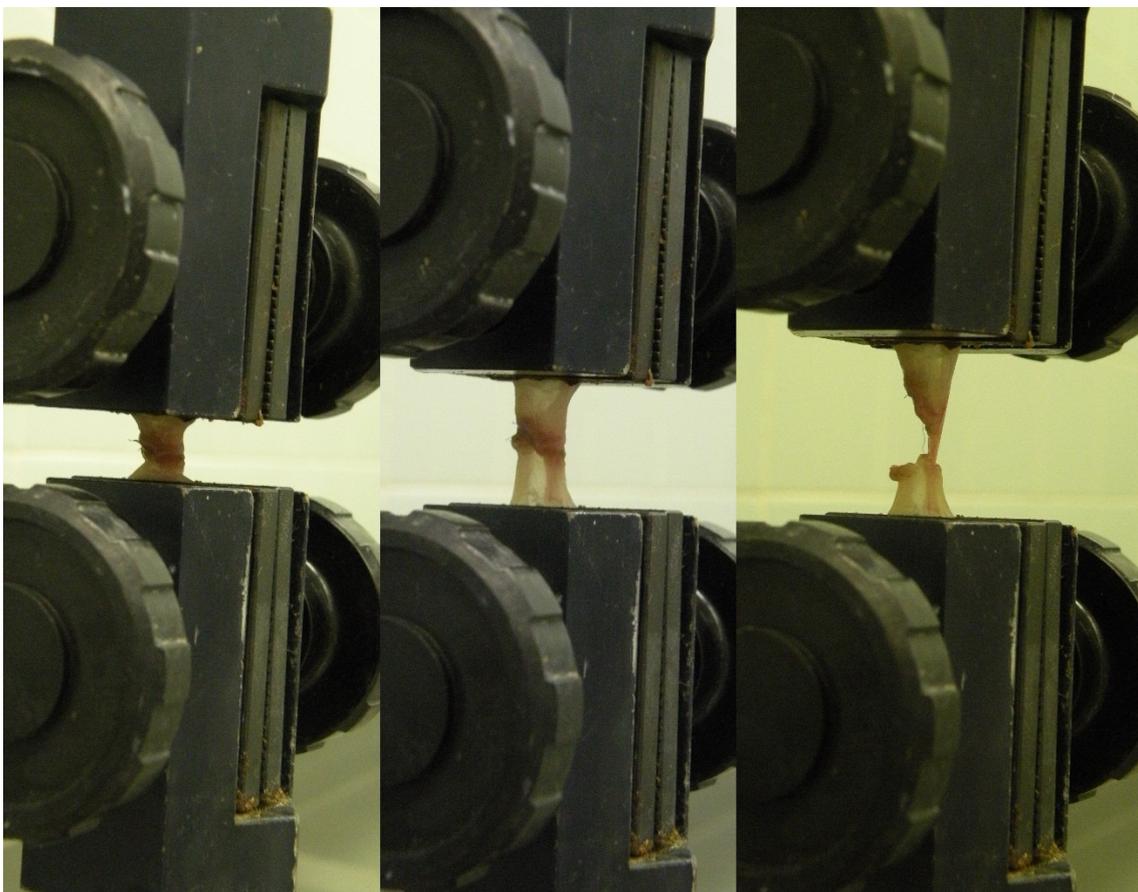


FONTE: O autor (2013)

Foi ressecado um segmento intestinal de 4 cm contendo a anastomose em sua porção central. O segmento foi seccionado ao meio, entre a borda mesentérica e a borda anti-mesentérica. A metade esquerda foi submetida ao teste.

O fragmento retangular extraído foi fixado pelas duas extremidades por meio da pinça superior do dinamômetro e da pinça inferior do Versa Teste com a cicatriz cirúrgica distando 0,5 cm entre as pinças (figura 21).

FIGURA 21 – SEGMENTO DO CÓLON POSICIONADO NO VERSA TESTE, SENDO REALIZADO O TESTE DE FORÇA DE RUPTURA DA ANASTOMOSE



FONTE: O autor (2013)

A velocidade do teste de ruptura foi de 25 mm/min. e o valor de ruptura foi expresso em Newton (N). O dinamômetro foi aferido antes de cada série de medidas. Os testes foram realizados de forma sequencial; do rato 1 ao 70.

3.9 ESTUDO HISTOPATOLÓGICO

As peças, após fixação em formol tamponado a 10 %, foram enviadas ao Laboratório de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade - UnB para o preparo dos blocos de parafina. Foram realizados cortes perpendiculares à zona de anastomose, e corados pela hematoxilina e eosina, conforme a rotina do laboratório.

A avaliação da cicatrização foi realizada por microscopia de luz, por patologista experiente que desconhecia a que grupo de animais provinha o material.

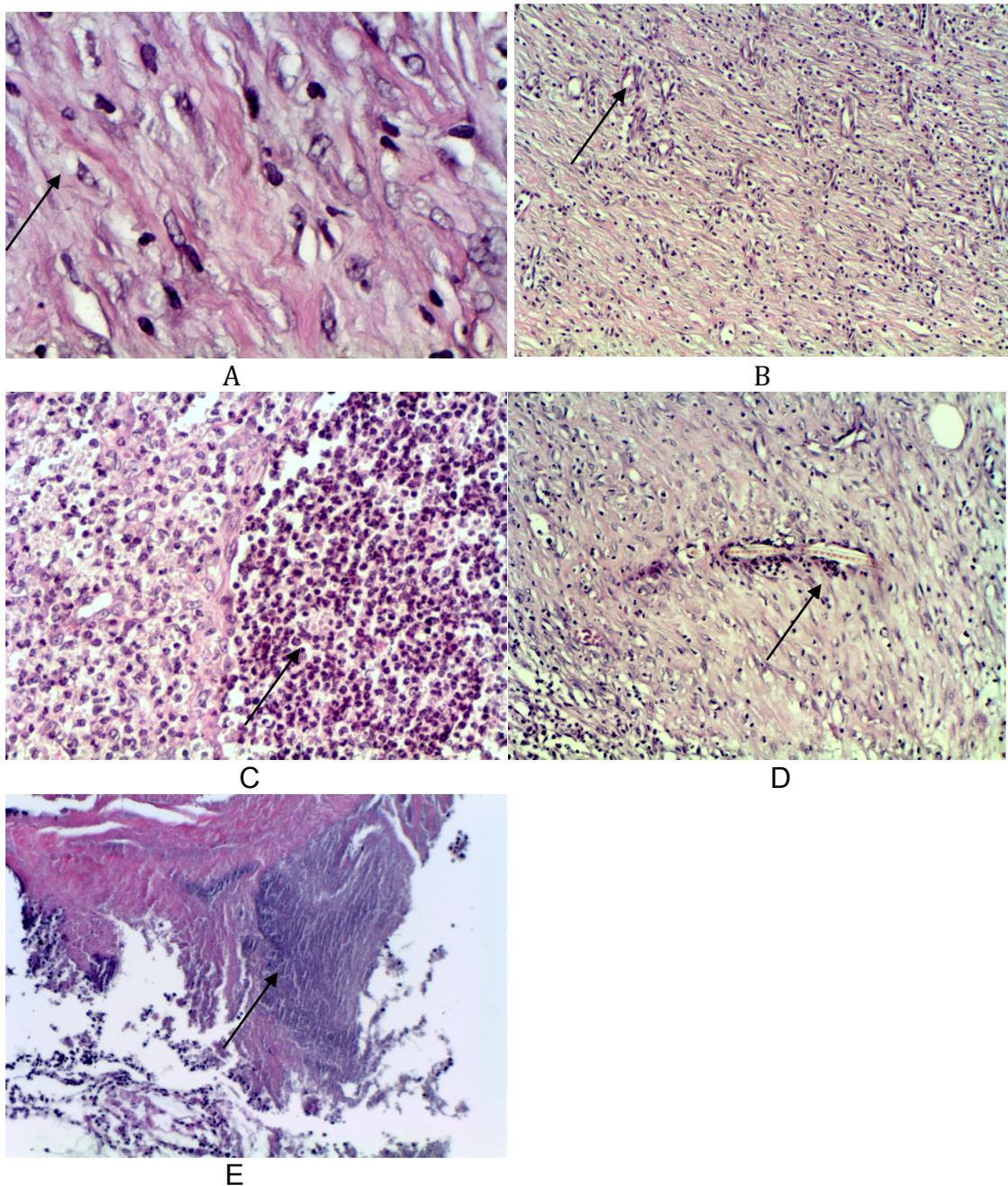
Os seguintes indicadores foram considerados em cada peça:

- 1) Colágeno;
- 2) Fibroblastos;
- 3) Infiltrado Mononuclear;
- 4) Infiltrado Polimorfonuclear;
- 5) Neovascularização;
- 6) Edema;
- 7) Ulceração;
- 8) Necrose;
- 9) Abscesso;
- 10) Colônias Bacterianas;
- 11) Corpo Estranho;
- 12) Crosta Fibrino-Leucocitária.

Os indicadores 1 a 6 foram analisados e classificados em: leve (+), moderado (++) ou intenso (+++).

Os indicadores 7 a 12 foram analisado e classificado em: ausente (-) ou presente (+) (figura 22)

FIGURA 22 – LÂMINAS CORADAS COM HEMATOXILINA-EOSINA IDENTIFICANDO COLÁGENO (A), FIBROBLASTO (A), NEOVASOS (B), INFILTRADO DE MONONUCLEARES (B), ABSCESSO (C), CORPO ESTRANHO (D), COLÔNIAS BACTERIANAS (E)



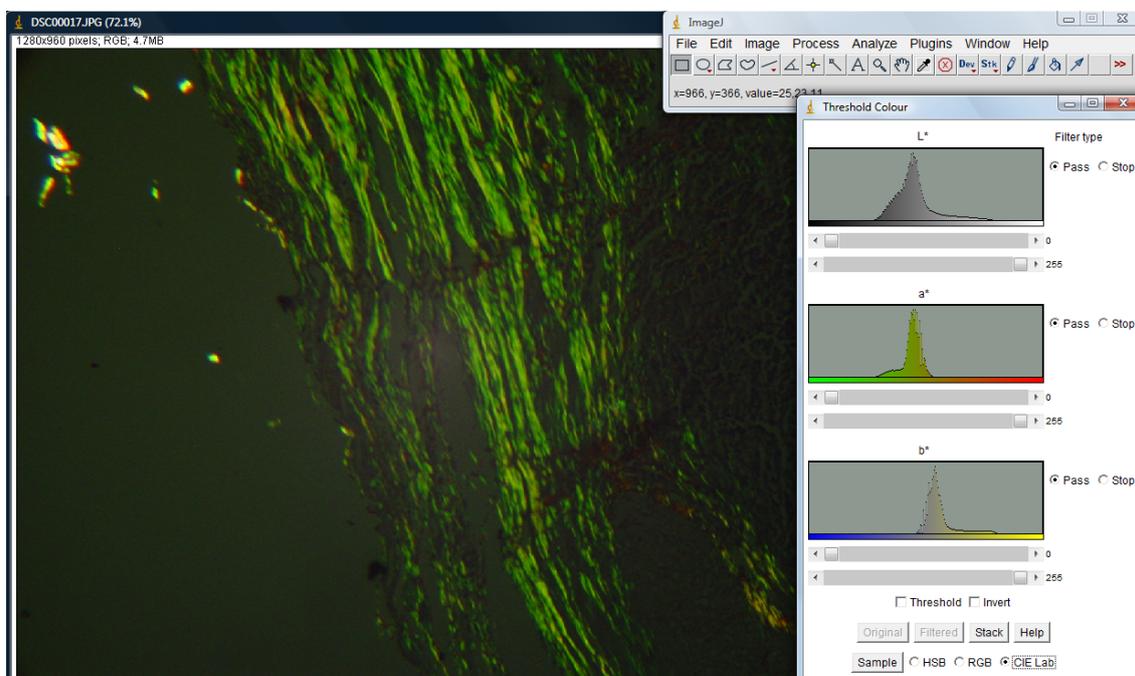
FONTE: O autor (2013)

3.10 ESTUDO HISTOMORFOMÉTRICO DO COLÁGENO

Análise quantitativa por histomorfometria do colágeno presente nas regiões perianastomóticas foi realizada pela avaliação das lâminas coradas pelo *Picro-Sirius*, por meio de sistema digital de análise de imagens. Observou-

se a área total dos campos por microscopia com luz polarizada com objetiva de 10X e a análise foi realizada por um observador que desconhecia de que grupo ou subgrupo de animais a lâmina provinha. A captura das imagens foi obtida utilizando-se uma câmera digital Sony S85 (Tóquio – Japão) acoplada a um Microscópio de luz Zeiss Axion Star (Carl Zeiss Vision – Alemanha). Todas as imagens tiveram uma resolução de 1280 x 960 pixels e foram analisadas por meio do *software Image J* (Wayne Rasband, Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA) por observador diferente do que captou as imagens e que desconhecia de que grupo ou subgrupo de animais as imagens provinham (figura 23).

FIGURA 23 – ANÁLISE DO PERCENTUAL DE COLÁGENO POR MEIO DO SOFTWARE *IMAGE J*



FONTE: O autor (2013)

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

3.11 ESTUDO BIOQUÍMICO

Foram determinadas as concentrações de hidroxiprolina nos dois segmentos intestinais obtidos de cada animal, o primeiro ressecado na operação inicial, ou amostra pré-teste, e o segundo, contendo a anastomose, coletado na reoperação, ou amostra pós-teste.

Os processos de extração e dosagem de hidroxiprolina foram realizados segundo a técnica proposta por Stegemann & Stalder (1967) modificado por Medugorac (1980).

3.11.1 Extração de hidroxiprolina

O tecido passou pelas seguintes etapas:

1- Pesado aproximadamente 100 mg de tecido e colocado em placas de Petri, para secar em estufa a 100°C por 4 horas.

2- Pesado novamente (peso seco) cada tecido e transferido para uma ampola de vidro, adicionando HCl 6N na proporção de 1 ml para cada 10 mg de tecido.

3- Fechadas as ampolas sob chama e colocadas para hidrolisar na estufa, entre 107 e 110°C, por 18 horas.

4- Após esse período, as ampolas foram abertas e o conteúdo foi transferido para balões volumétricos de 50 ml, lavando as ampolas com 1 ou 2 ml de água Milli-Q.

5- Adicionado aos balões cerca de 100 mg de carvão ativado (Merck).

6- Simultaneamente, foi adicionado 20 ml de tampão Citrato/Acetato pH 6,0 e completado o balão para 50 ml com água Milli-Q.

7- Filtrado a solução em proveta, utilizando papel de filtro.

8- Separado parte da solução para dosagem e congelado outra parte.

3.11.2 Dosagem de Hidroxiprolina

O extrato passou pelas seguintes etapas:

1- Em placa leitora de ELISA de 96 poços, foi adicionado 100 µl de cada amostra (em duplicata), 100 µl de água (branco) e 100 µl dos respectivos padrões.

2- Foi adicionado 50 µl de Cloramina T, e deixado à temperatura ambiente por 20 minutos.

3- Adicionado 50 µl da Solução de Erlich (dimetilaminobenzaldeído)

4- Colocado em estufa a 65°C por 15 minutos.

5- Lido em espectrofotômetro Versamax a 550 nm.

6- Comparado os resultados com uma curva padrão de OH-Prolina (Sigma H-7279) nas concentrações de 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20 µg/ml.

3.12 ESTUDO IMUNOHISTOQUÍMICO PARA VEGF E CD31

Lâminas silanizadas com cortes histológicos desparafinizados, reidratados e apresentando espessura de quatro micrômetros foram confeccionadas a partir de blocos de parafina contendo material de biópsia fixado em formol.

a) Para a recuperação antigênica, as lâminas foram incubadas por 45 minutos em steamer a 95-99°C com tampão citrato pH 6.0. Logo após, as lâminas foram resfriadas em temperatura ambiente por 20 minutos;

b) Para a inativação da peroxidase tecidual endógena, as lâminas foram imersas em uma solução de H₂O₂ a 3% em temperatura ambiente por 30 minutos;

c) Após lavagem das lâminas com PBS (*phosphate buffered saline*), estas foram incubadas com os anticorpos primários (VEGF, policlonal, *Diagnostic Biosystems*, diluição 1:60; CD31, clone Mec 13.3, diluição 1/50, BIOCARE MEDICAL) por 30 min, em temperatura ambiente;

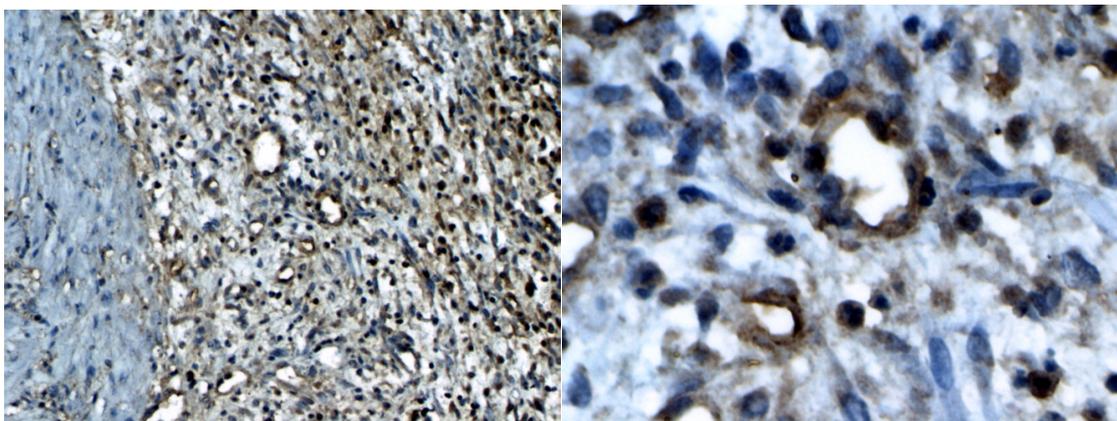
d) Após lavagem das lâminas com PBS, estas foram incubadas com o anticorpo secundário por 30 minutos em temperatura ambiente e

subsequentemente com o complexo estreptavidina-biotina-peroxidase por 30 minutos em temperatura ambiente;

e) Todas as reações foram reveladas utilizando-se a solução cromogênica diaminobenzidina. A contra-coloração foi feita com hematoxilina de Harris. As lâminas foram então desidratadas, diafanizadas e montadas. Amostras de angiossarcoma e pele foram utilizadas como controles positivos para anti-VEGF e anti-CD31 respectivamente.

Foram consideradas células positivas para VEGF os macrófagos, os fibroblastos e as células endoteliais coradas em marrom no citoplasma (figura 24).

FIGURA 24 - EXPRESSÃO DE VEGF EM CÉLULAS ENDOTELIAIS, MACRÓFAGOS, LEUCÓCITOS E FIBROBLASTOS – A (100X), B (400X)



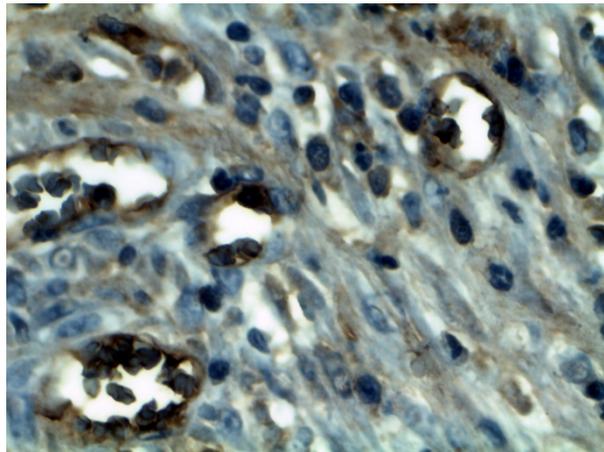
A

B

FONTE: O autor (2013)

A expressão de CD31 foi observada na membrana das células endoteliais (figura 25).

FIGURA 25 - EXPRESSÃO DE CD31 EM CÉLULAS ENDOTELIAIS (400X)



FONTE: O autor (2013)

A expressão de VEGF foi semi-quantificada de acordo com o número de células positivas: -, +, ++, +++. A expressão de CD31 (marcador de células endoteliais) foi usada para auxiliar na semi-quantificação da densidade vascular: -, +, ++, +++ na área da anastomose.

3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram analisados sob o ponto de vista estatístico, utilizando-se os *softwares* SPSS 20.0 (*Special package for social sciences*) e Microsoft Excel.

A análise de variância (ANOVA) com comparações múltiplas de Dunnett foi realizada na análise dos pesos, pressão de ruptura da anastomose, força de ruptura da anastomose e concentração de hidroxiprolina (variáveis paramétricas).

O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para avaliar aderências intra-abdominais, cobertura da anastomose, achados histopatológicos (colágeno; fibroblastos, infiltrado mononuclear, infiltrado polimorfonuclear, neovascularização e edema), estudo histomorfométrico do colágeno e concentração de hidroxiprolina (variáveis não paramétricas).

O teste exato de Fisher foi utilizado para avaliar óbitos, achados intra-operatórios e achados histopatológicos (ulceração, necrose, abscesso, colônias bacterianas, corpo estranho, crosta fibrino-leucocitária).

O teste U de Mann-Whitney foi utilizado para avaliar pressão de ruptura da anastomose, força de ruptura da anastomose, estudo histomorfométrico do colágeno e concentração de hidroxiprolina (variáveis não paramétricas).

O teste t de Student de amostras pareadas foi utilizado para comparar o peso e a concentração de hidroxiprolina dos dias da operação e da reoperação.

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

4 RESULTADOS

4.1 ÓBITOS

Dentre os 70 animais operados, dois morreram durante o experimento (animais 9 e 47). Os dois animais pertenciam ao grupo II-CO2. Ambos morreram no 2º DPO e à necrópsia, não foi possível identificar a causa do óbito. As anastomoses se encontravam íntegras. Apesar dos óbitos terem ocorridos no mesmo grupo, não houve diferença estatística ($p=0,130$).

Já que os óbitos não estavam relacionados à anastomose, os dois animais foram substituídos, conforme programado.

4.2 PESO DOS ANIMAIS

O peso inicial nos 70 animais variou de 244 g a 419,90 g (média de 342,19 g) e o peso na data da reoperação foi de 220 g a 416,10 g (média de 314,33 g) (tabela 1).

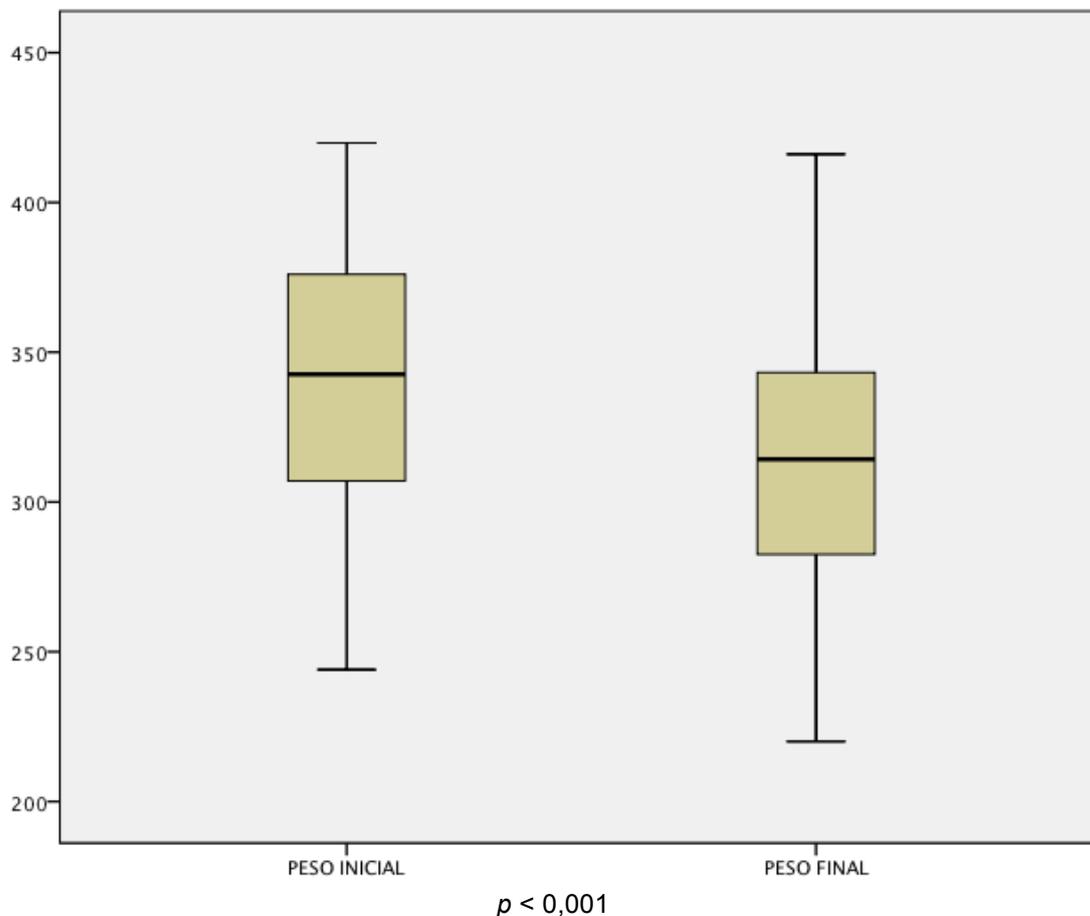
TABELA 1 – VALORES DOS PESOS INICIAL E FINAL DOS ANIMAIS (MÉDIA, MEDIANA, DESVIO PADRÃO, VALORES MÍNIMOS E MÁXIMOS). VALORES EM GRAMAS.

	Peso Inicial	Peso Final
Média	342,19 g	314,33 g
Mediana	342,65 g	314,25 g
Desvio Padrão	44,93 g	40,36 g
Mínimo	244 g	220 g
Máximo	419,90 g	416,10 g

FONTE: O autor (2013)

Houve redução do peso no dia da reoperação em relação ao peso inicial utilizando o teste t de Student para amostras pareadas ($p<0,001$) (gráfico1).

GRÁFICO 1 – MEDIANA E VALORES INTERVALARES DOS PESOS DOS ANIMAIS NO DIA DA OPERAÇÃO E NO DIA DA REOPERAÇÃO.



FONTE: O autor (2013)

Em todos os grupos/subgrupos de animais houve redução de peso no dia da reoperação, em relação ao peso inicial ($p < 0,001$). A evolução dos pesos em cada subgrupo está apresentada na tabela 2 e nos apêndices A a D.

Não houve diferença estatística entre os subgrupos, no peso inicial ($p = 0,871$) e no peso final ($p = 0,981$). Ao se analisar a variação de peso entre a data da operação e a data da reoperação nos subgrupos, não se observou diferença estatística ($p = 0,127$). Também não houve diferença estatística entre o grupo controle e os subgrupos I-CO₂ ($p = 0,998$), I-He ($p = 1,000$), II-CO₂ ($p = 0,411$), II-He ($p = 0,997$), III-CO₂ ($p = 0,377$) e III-He ($p = 0,238$) (tabela 2).

TABELA 2 – DISTRIBUIÇÃO DA MÉDIA E DESVIO PADRÃO DOS PESOS DOS ANIMAIS NO DIA DA OPERAÇÃO, NO DIA DA REOPERAÇÃO E A VARIAÇÃO DO PESO INICIAL E DO PESO FINAL PARA TODOS OS GRUPOS E SUBGRUPOS.

Grupo/Subgrupo	Peso Inicial	Peso Final	Variação de Peso	<i>p</i>
I-CO ₂ (n=10)	332,71 ± 43,28 g	314,32 ± 44,07 g	-18,39 ± 24,07 g	<i>p</i> =0,998
I-He (n=10)	347,73 ± 35,24 g	324,96 ± 39,09 g	-22,77 ± 18,23 g	<i>p</i> =1,000
II-CO ₂ (n=10)	348,66 ± 61,46 g	313,93 ± 50,58 g	-34,73 ± 16,39 g	<i>p</i> =0,411
II-He (n=10)	337,69 ± 38,25 g	312,70 ± 34,06 g	-24,99 ± 16,47 g	<i>p</i> =0,997
III-CO ₂ (n=10)	351,62 ± 48,32 g	316,44 ± 36,46 g	-35,18 ± 20,78 g	<i>p</i> =0,377
III-He (n=10)	348,97 ± 43,28 g	311,59 ± 44,69 g	-37,38 ± 17,94 g	<i>p</i> =0,238
IV (n=10)	327,95 ± 48,27 g	306,39 ± 41,98 g	-21,56 ± 13,38 g	
<i>p</i>	<i>p</i> =0,871	<i>p</i> =0,981	<i>p</i> =0,127	

FONTE: O autor (2013)

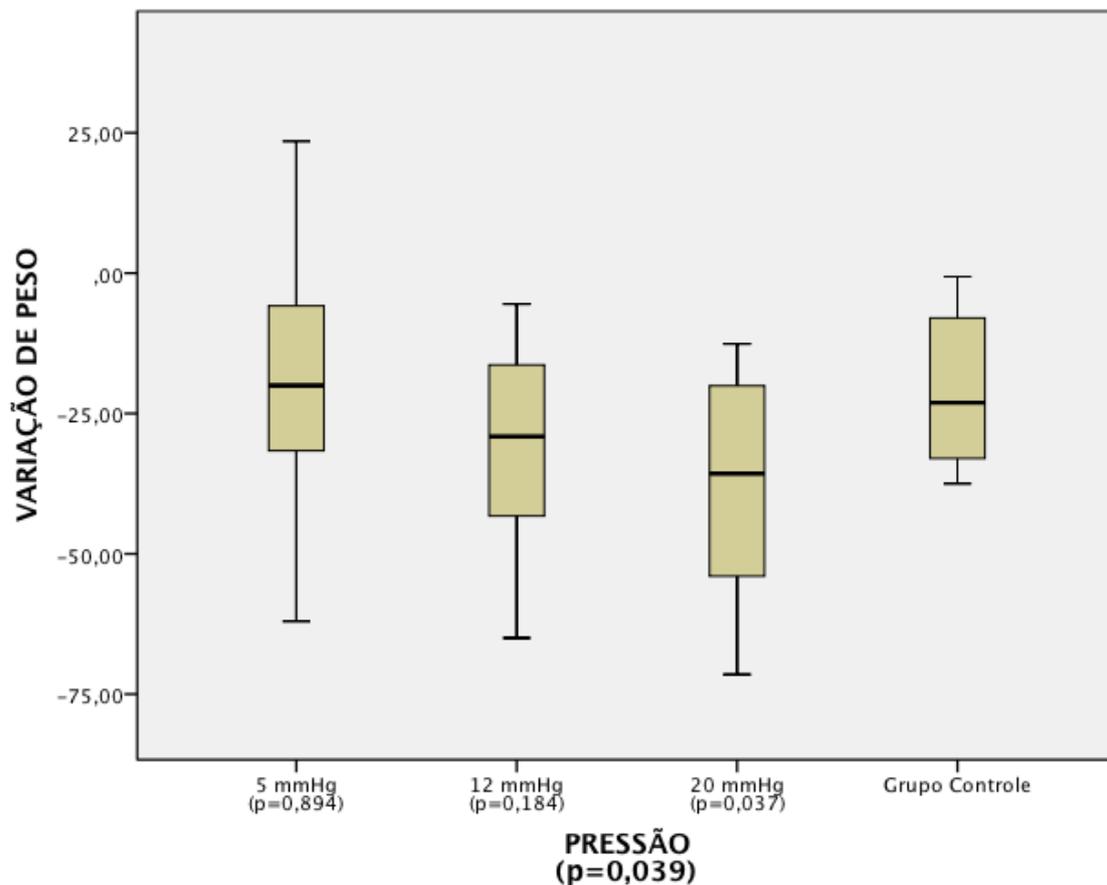
Ao se analisar apenas a influência da pressão no peso, não se considerando o gás utilizado para o pneumoperitônio, não houve diferença estatística no peso inicial (*p*=0,645) e no peso final (*p*=0,868). No entanto, ao se avaliar a variação de peso, observou-se um aumento da perda de peso a medida que se aumenta a pressão (*p*=0,039). Houve diferença estatística entre o grupo submetido a pneumoperitônio de 20 mmHg e o grupo controle (*p*=0,037); e entre o grupo submetido a pneumoperitônio de 5 mmHg e o grupo submetido a pneumoperitônio de 20 mmHg (*p*=0,017) (tabela 3) (gráfico 2).

TABELA 3 – DISTRIBUIÇÃO DA MÉDIA E DESVIO PADRÃO DOS PESOS DOS ANIMAIS NO DIA DA OPERAÇÃO, NO DIA DA REOPERAÇÃO E A VARIAÇÃO DO PESO INICIAL E DO PESO FINAL DE ACORDO COM A PRESSÃO DO PNEUMOPERITÔNIO.

Pressão	Peso Inicial	Peso Final	Variação de Peso	<i>p</i>
5 mmHg (n=20)	340,22 ± 39,18 g	319,64 ± 40,91 g	-20,58 ± 20,90g	<i>p</i> =0,894
12 mmHg (n=20)	343,18 ± 50,14 g	313,32 ± 41,97 g	-29,86 ± 16,76 g	<i>p</i> =0,184
20 mmHg (n=20)	350,30 ± 44,67 g	314,02 ± 39,77 g	-36,28 ± 18,93 g	<i>p</i> =0,037
Controle (n=10)	327,95 ± 48,28 g	306,39 ± 41,98 g	-21,56 ± 13,38 g	
<i>p</i>	<i>p</i> =0,645	<i>p</i> =0,868	<i>p</i> =0,039	

FONTE: O autor (2013)

GRÁFICO 2 – MEDIANA E VALORES INTERVALARES DA VARIAÇÃO DE PESO DOS ANIMAIS, DISTRIBUÍDOS SEGUNDO A PRESSÃO UTILIZADA.



FONTE: O autor (2013)

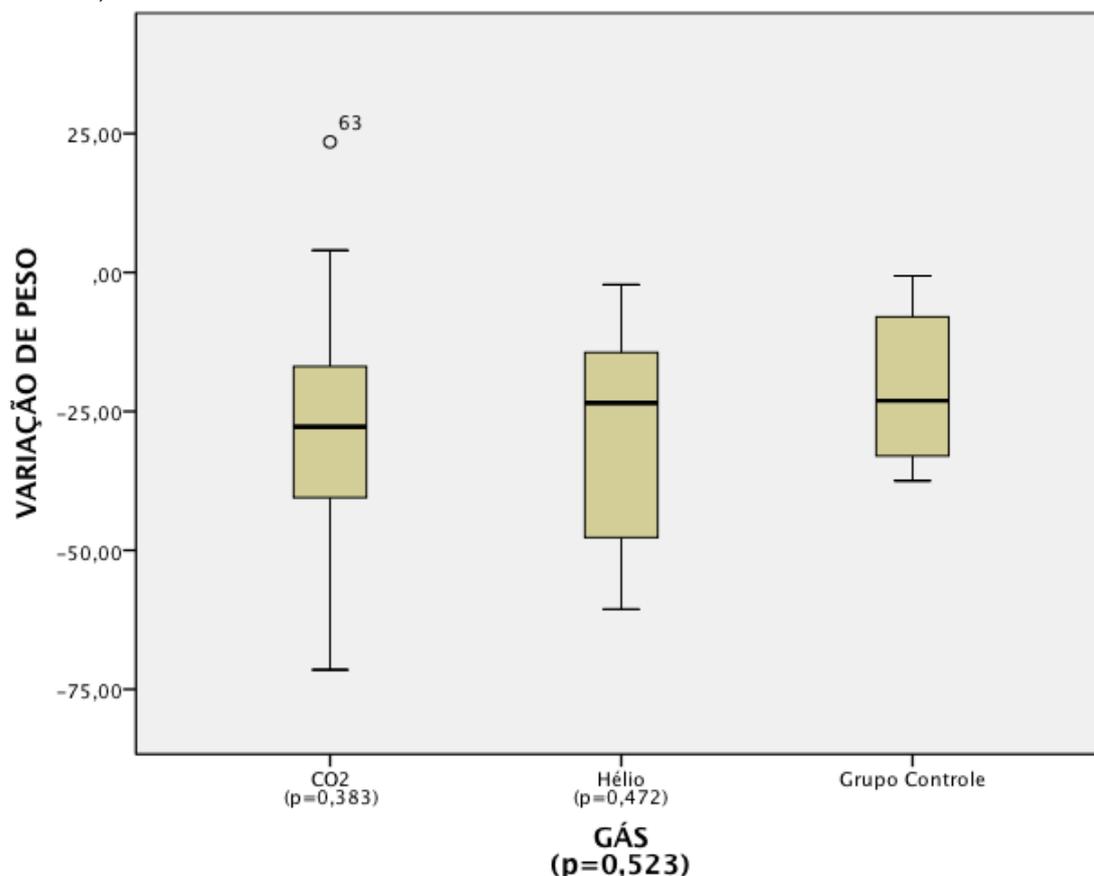
Quando se verificou a influência do tipo de gás utilizado, independente da pressão utilizada, não se observou diferença estatística no peso inicial ($p=0,563$) e no peso final ($p=0,794$). A variação entre o peso final e o peso inicial também não mostrou diferença ($p=0,523$). Não houve diferença estatística entre a cirurgia aberta e o uso do pneumoperitônio com CO₂ ($p=0,383$) ou com hélio ($p=0,472$) (tabela 4) (gráfico 3).

TABELA 4 – DISTRIBUIÇÃO DA MÉDIA E DESVIO PADRÃO DOS PESOS DOS ANIMAIS NO DIA DA OPERAÇÃO, NO DIA DA REOPERAÇÃO E A VARIAÇÃO DO PESO INICIAL E DO PESO FINAL DISTRIBUÍDOS DE ACORDO COM O GÁS DO PNEUMOPERITÔNIO.

Gás	Peso Inicial	Peso Final	Variação de Peso	<i>p</i>
CO ₂ (n=30)	344,33 ± 50,50 g	314,90 ± 42,55 g	-29,43 ± 21,46 g	<i>p</i> =0,383
Hélio (n=30)	344,80 ± 38,05 g	316,42 ± 38,63 g	-28,38 ± 18,16 g	<i>p</i> =0,472
Controle (n=10)	327,95 ± 48,28 g	306,39 ± 41,98 g	-21,56 ± 13,38 g	
	<i>p</i> =0,563	<i>p</i> =0,794	<i>p</i> =0,523	

FONTE: O autor (2013)

GRÁFICO 3 – MEDIANA E VALORES INTERVALARES DA VARIAÇÃO DE PESO DOS ANIMAIS, DISTRIBUÍDOS SEGUNDO O GÁS UTILIZADO.



FONTE: O autor (2013)

4.3 ACHADOS INTRA-OPERATÓRIOS

Na relaparotomia, no 7^o dia pós-operatório, foram identificadas duas deiscências de anastomose bloqueadas por epíplon, uma no subgrupo I-CO₂, e outra no subgrupo III-He (tabela 5). Não houve diferença estatística entre os

subgrupos ($p=1,000$). Não houve casos de deiscência de anastomose livre, com presença de fezes na cavidade abdominal à reoperação.

Houve dois casos de obstrução intestinal, ambos no subgrupo III-CO2. Apesar disso, não houve diferença estatística entre os subgrupos ($p=0,130$) (tabela 5).

Não se observou, na reoperação, presença de peritonite ou abscesso (tabela 5).

TABELA 5 – NÚMERO DE ANIMAIS COM ACHADOS INTRA-OPERATÓRIOS POSITIVOS NA RELAPAROTOMIA DE ACORDO COM O GRUPO/SUBGRUPO.

	Grupo/Subgrupo						<i>p</i>	
	I-CO2 (n=10)	I-He (n=10)	II-CO2 (n=10)	II-He (n=10)	III-CO2 (n=10)	III-He (n=10)		IV (n=10)
Deiscência	1	0	0	0	0	1	0	1,000
Obstrução	0	0	0	0	2	0	0	0,130
Peritonite	0	0	0	0	0	0	0	1,000
Abscesso	0	0	0	0	0	0	0	1,000

FONTE: O autor (2013)

Quando se isolou as variáveis pressão ou gás, não se observou diferenças estatísticas nas deiscências de anastomose, obstrução intestinal, peritonite ou abscesso (tabelas 6 e 7).

TABELA 6 – NÚMERO DE ANIMAIS COM ACHADOS INTRA-OPERATÓRIOS POSITIVOS NA RELAPAROTOMIA DE ACORDO COM A PRESSÃO UTILIZADA.

	Pressão				<i>p</i>
	5 mmHg (n=20)	12 mmHg (n=20)	20 mmHg (n=20)	Controle (n=10)	
Deiscência	1	0	1	0	1,000
Obstrução	0	0	2	0	0,255
Peritonite	0	0	0	0	1,000
Abscesso	0	0	0	0	1,000

FONTE: O autor (2013)

TABELA 7 – NÚMERO DE ANIMAIS COM ACHADOS INTRA-OPERATÓRIOS POSITIVOS NA RELAPAROTOMIA DE ACORDO COM O GÁS UTILIZADO.

	Gás			<i>p</i>
	CO2 (n=30)	Hélio (n=30)	Controle (n=10)	
Deiscência	1	1	0	1,000
Obstrução	2	0	0	0,627
Peritonite	0	0	0	1,000
Abscesso	0	0	0	1,000

FONTE: O autor (2013)

Os valores do escore de Nair segundo o grupo/subgrupo podem ser vistos na tabela 8. Não houve diferença estatística entre os subgrupos ($p=0,882$).

TABELA 8 – NÚMERO DE ANIMAIS SEGUNDO OS ESCORES DE NAIR À RELAPAROTOMIA DE ACORDO COM O GRUPO/SUBGRUPO.

Escore de Nair	Grupo/Subgrupo ($p=0,882$)						
	I-CO2 (n=10)	I-He (n=10)	II-CO2 (n=10)	II-He (n=10)	III-CO2 (n=10)	III-He (n=10)	IV (n=10)
0	6	6	4	4	5	6	4
1	1	2	3	6	4	4	4
2	1	2	2	0	1	0	2
3	2	0	1	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0

FONTE: O autor (2013)

Não houve diferença estatística nos valores do escore de Nair em relação à pressão utilizada ($p=0,669$) (tabela 9) ou em relação ao gás utilizado ($p=0,561$) (tabela 10).

TABELA 9 – NÚMERO DE ANIMAIS SEGUNDO OS ESCORES DE NAIR À RELAPAROTOMIA DE ACORDO COM A PRESSÃO UTILIZADA.

Escore de Nair	Pressão ($p=0,669$)			
	5 mmHg (n=20)	12 mmHg (n=20)	20mmHg (n=20)	Controle (n=10)
0	12	8	11	4
1	3	9	8	4
2	3	2	1	2
3	2	1	0	0
4	0	0	0	0

FONTE: O autor (2013)

TABELA 10 – NÚMERO DE ANIMAIS SEGUNDO OS ESCORES DE NAIR À RELAPAROTOMIA DE ACORDO COM O GÁS UTILIZADO.

Escore de Nair	Gás ($p=0,561$)		
	CO2 (n=30)	Hélio (n=30)	Controle (n=10)
0	15	16	4
1	8	12	4
2	4	2	2
3	3	0	0
4	0	0	0

FONTE: O autor (2013)

Ao se analisar a proporção da anastomose coberta por aderências, não se observou diferença estatística entre os grupos/subgrupos ($p=0,473$) (tabela 11).

TABELA 11 – NÚMERO DE ANIMAIS DE ACORDO COM A PROPORÇÃO DE COBERTURA DA ANASTOMOSE À RELAPAROTOMIA DE ACORDO COM O GRUPO/SUBGRUPO.

Cobertura	Grupo/Subgrupo ($p=0,473$)						
	I-CO2 (n=10)	I-He (n=10)	II-CO2 (n=10)	II-He (n=10)	III-CO2 (n=10)	III-He (n=10)	IV (n=10)
0-25%	3	1	1	3	2	1	0
25-50%	2	3	3	4	2	6	4
50-75%	3	3	3	3	3	1	3
75-100%	1	2	3	0	2	1	2
100%	1	1	0	0	1	1	1

FONTE: O autor (2013)

Não houve diferença estatística na proporção da cobertura da anastomose em relação à pressão utilizada ($p=0,636$) (tabela 12) ou em relação ao gás utilizado ($p=0,377$) (tabela 13).

TABELA 12 – NÚMERO DE ANIMAIS DE ACORDO COM A PROPORÇÃO DE COBERTURA DA ANASTOMOSE À RELAPAROTOMIA DE ACORDO COM A PRESSÃO UTILIZADA.

Cobertura	Pressão ($p=0,636$)			
	5 mmHg (n=20)	12 mmHg (n=20)	20mmHg (n=20)	Controle (n=10)
0-25%	4	4	3	0
25-50%	5	7	8	4
50-75%	6	6	4	3
75-100%	3	3	3	2
100%	2	0	2	1

FONTE: O autor (2013)

TABELA 13 – NÚMERO DE ANIMAIS DE ACORDO COM A PROPORÇÃO DE COBERTURA DA ANASTOMOSE À RELAPAROTOMIA DE ACORDO COM O GÁS UTILIZADO.

Cobertura	Gás ($p=0,377$)		
	CO2 (n=30)	Hélio (n=30)	Controle (n=10)
0-25%	6	5	0
25-50%	7	13	4
50-75%	9	7	3
75-100%	6	3	2
100%	2	2	1

FONTE: O autor (2013)

4.4 PRESSÃO DE RUPTURA DA ANASTOMOSE

A pressão de ruptura das anastomoses dos 70 animais variou de 0 mmHg a 314 mmHg, com média de 193,10 mmHg, mediana de 198,25 mmHg e desvio padrão de 55,56 mmHg. Esses valores por subgrupo podem ser visualizados na tabela 14 e nos apêndices E a H.

TABELA 14 – VALORES DA PRESSÃO DE RUPTURA DA ANASTOMOSE POR GRUPO/SUBGRUPO (MÉDIA, MEDIANA, DESVIO PADRÃO, VALORES MÍNIMOS E MÁXIMOS). VALORES EM MMHG.

	Grupo/Subgrupo ($p=0,786$)						
	I-CO2 (n=10)	I-He (n=10)	II-CO2 (n=10)	II-He (n=10)	III-CO2 (n=10)	III-He (n=10)	IV (n=10)
Média	166,08	199,65	194,75	206,06	189,11	195,84	200,32
Mediana	179,30	207,25	197,85	212,25	187,25	194,5	210,45
Desvio Padrão	83,30	46,45	37,49	49,81	47,39	36,66	77,22
Mínimo	0	113,10	148,80	120,50	112,60	139,60	63,70
Máximo	274,30	256,90	253,40	269,90	271,50	268,60	314,00
p	$p=0,581$	$p=1,000$	$p=1,000$	$p=1,000$	$p=1,000$	$p=0,996$	

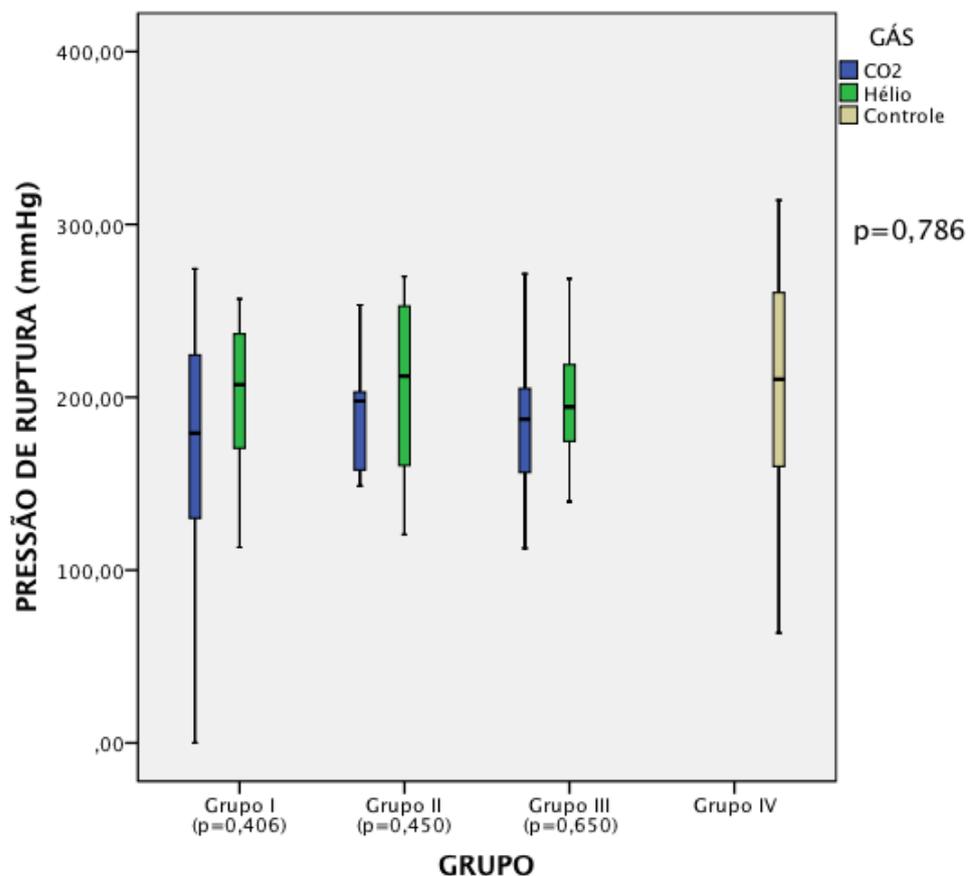
FONTE: O autor (2013)

O animal 39 do subgrupo I-CO2 apresentava uma fístula parcialmente bloqueada, e portanto apresentou o valor da pressão de ruptura da anastomose de 0 mmHg.

Não houve diferença estatística entre os subgrupos ($p=0,786$). Não houve diferença estatística entre o grupo controle e os subgrupos I-CO2 ($p=0,581$), I-He ($p=1,000$), II-CO2 ($p=1,000$), II-He ($p=1,000$), III-CO2 ($p=0,996$) e III-He ($p=1,000$) (tabela 14) (gráfico 4).

Não se observou diferença na pressão de ruptura da anastomose ao se utilizar o hélio ou o CO2 nas pressões de 5 mmHg ($p=0,406$), 12 mmHg ($p=0,450$) ou 20 mmHg ($p=0,650$) (tabela 14) (gráfico 4).

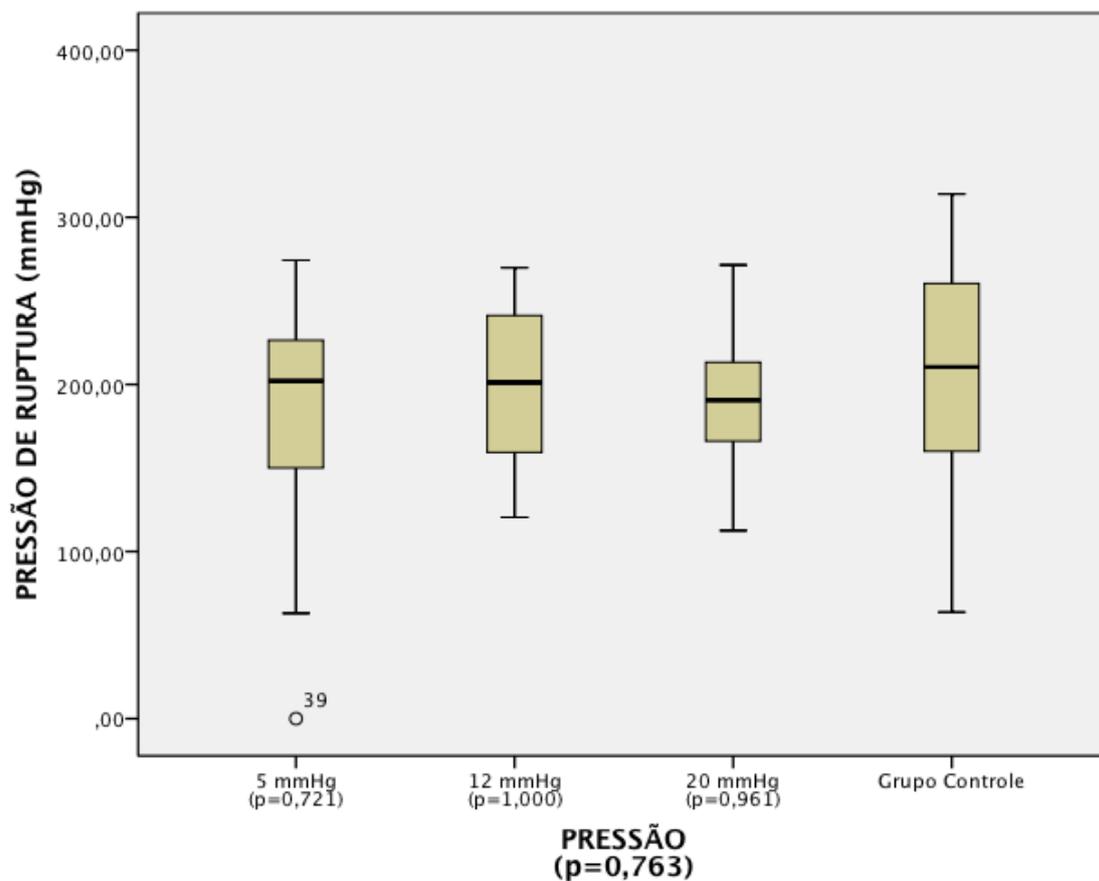
GRÁFICO 4 – MEDIANA E VALORES INTERVALARES DA PRESSÃO DE RUPTURA DA ANASTOMOSE DISTRIBUÍDOS POR GRUPO E SUBGRUPO. VALORES EM MMHG.



FONTE: O autor (2013)

Ao se avaliar somente a pressão utilizada no pneumoperitônio, não importando o tipo de gás utilizado, não houve diferença na pressão de ruptura da anastomose ($p=0,763$). Não houve diferença estatística entre a cirurgia aberta e a utilização de pneumoperitônio de 5 mmHg ($p=0,721$), 12 mmHg ($p=1,000$) e 20 mmHg ($p=0,961$) (gráfico 5).

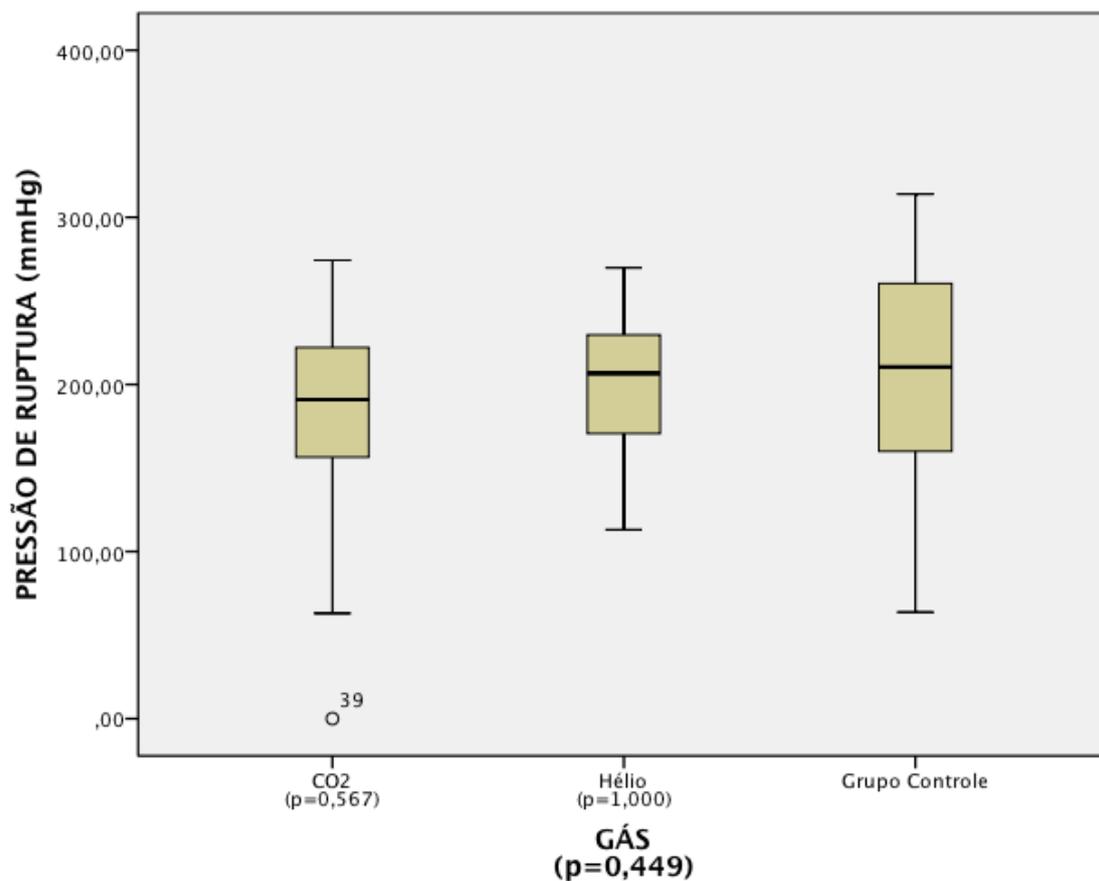
GRÁFICO 5 – MEDIANA E VALORES INTERVALARES DA PRESSÃO DE RUPTURA DA ANASTOMOSE DISTRIBUÍDOS PELA PRESSÃO UTILIZADA NO PNEUMOPERITÔNIO. VALORES EM MMHG.



FONTE: O autor (2013)

Analisando apenas o gás utilizado, não se levando em consideração a pressão do pneumoperitônio, não houve diferença no uso do CO₂ ou hélio na pressão de ruptura da anastomose ($p=0,449$). Não houve diferença estatística entre a cirurgia aberta e a utilização de pneumoperitônio com CO₂ ($p=0,567$) ou hélio ($p=1,000$) (gráfico 6).

GRÁFICO 6 – MEDIANA E VALORES INTERVALARES DA PRESSÃO DE RUPTURA DA ANASTOMOSE DISTRIBUÍDOS PELO GÁS UTILIZADO NO PNEUMOPERITÔNIO. VALORES EM MMHG.



FONTE: O autor (2013)

4.5 FORÇA DE RUPTURA DA ANASTOMOSE

A força de ruptura da anastomose nos 70 animais variou de 0,03 N a 0,56 N, com média de 0,26 N, mediana de 0,25 N e desvio padrão de 0,12 N. Esses valores por subgrupo podem ser visualizados na tabela 15 e nos apêndices I a L.

TABELA 15 – VALORES DA FORÇA DE RUPTURA DA ANASTOMOSE POR GRUPO/SUBGRUPO (MÉDIA, MEDIANA, DESVIO PADRÃO, VALORES MÍNIMOS E MÁXIMOS). VALORES EM NEWTON.

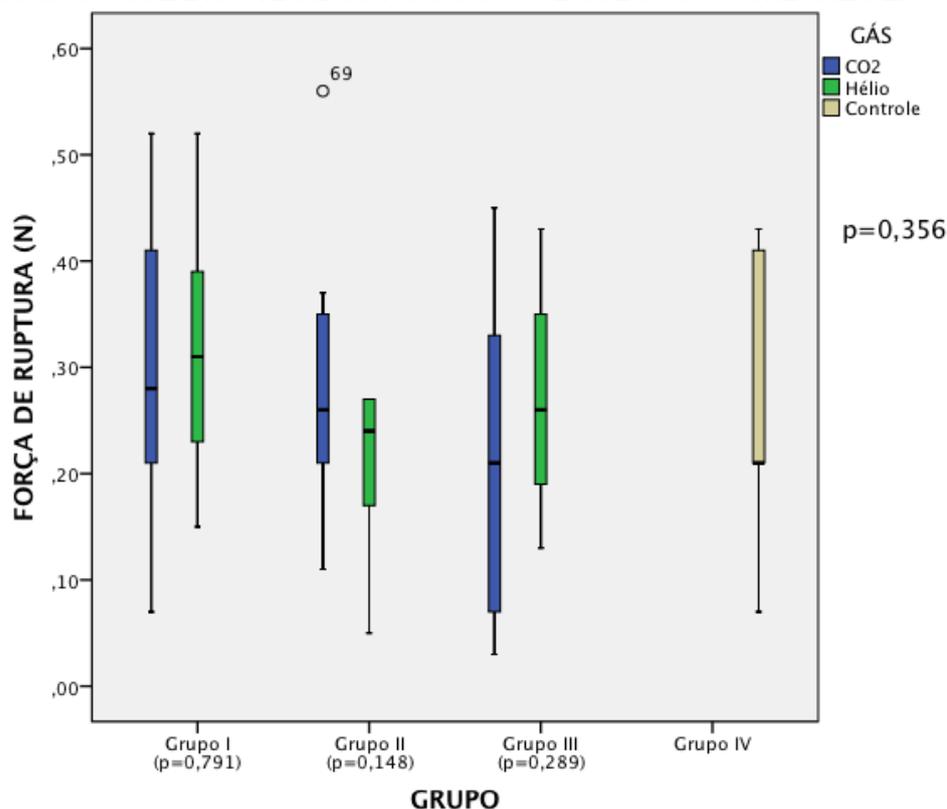
	Grupo/Subgrupo ($p=0,356$)						
	I-CO2 (n=10)	I-He (n=10)	II-CO2 (n=10)	II-He (n=10)	III-CO2 (n=10)	III-He (n=10)	IV (n=10)
Média	0,29	0,31	0,29	0,20	0,21	0,27	0,26
Mediana	0,28	0,31	0,26	0,24	0,21	0,26	0,21
Desvio Padrão	0,13	0,12	0,13	0,08	0,15	0,10	0,14
Mínimo	0,07	0,15	0,11	0,05	0,03	0,13	0,07
Máximo	0,52	0,52	0,56	0,27	0,45	0,43	0,43
p	$p=0,979$	$p=0,821$	$p=0,984$	$p=0,832$	$p=0,907$	$p=0,999$	

FONTE: O autor (2013)

Não houve diferença estatística entre os subgrupos ($p=0,356$). Não houve diferença entre o grupo controle e os subgrupos I-CO2 ($p=0,979$), I-He ($p=0,821$), II-CO2 ($p=0,984$), II-He ($p=0,832$), III-CO2 ($p=0,907$) e III-He ($p=0,999$). (tabela 15) (gráfico 7).

Não houve diferença estatística na força de ruptura comparando-se o hélio ou o CO2 nas pressões de 5 mmHg ($p=0,791$), 12 mmHg ($p=0,148$) ou 20 mmHg ($p=0,289$) (tabela 15) (gráfico 7).

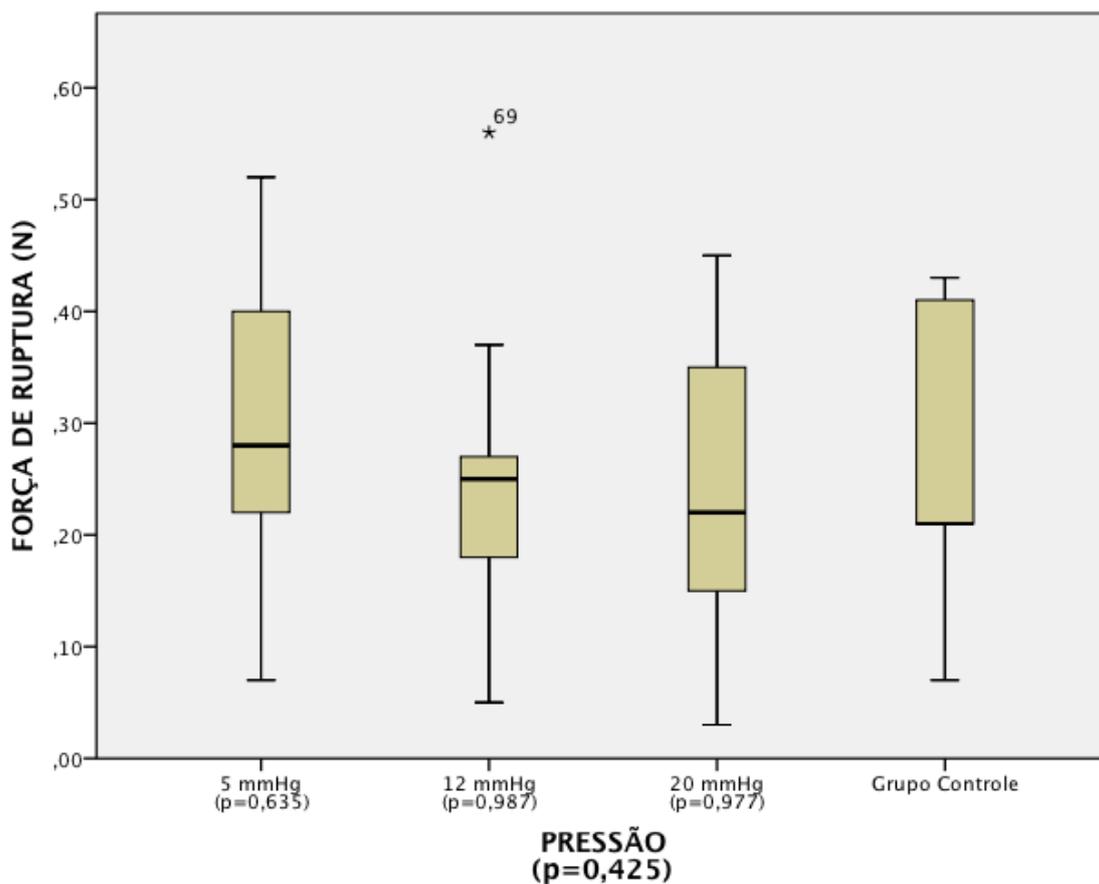
GRÁFICO 7 – MEDIANA E VALORES INTERVALARES DA FORÇA DE RUPTURA DA ANASTOMOSE DISTRIBUÍDOS POR GRUPO E SUBGRUPO. VALORES EM NEWTON.



FONTE: O autor (2013)

Quando analisada a pressão utilizada no pneumoperitônio, não se levando em consideração o gás, não houve diferença estatística da força de ruptura da anastomose ($p=0,425$). Não houve diferença estatística entre a cirurgia aberta e a utilização de pneumoperitônio de 5 mmHg ($p=0,635$), 12 mmHg ($p=0,987$) e 20 mmHg ($p=0,977$) (gráfico 8).

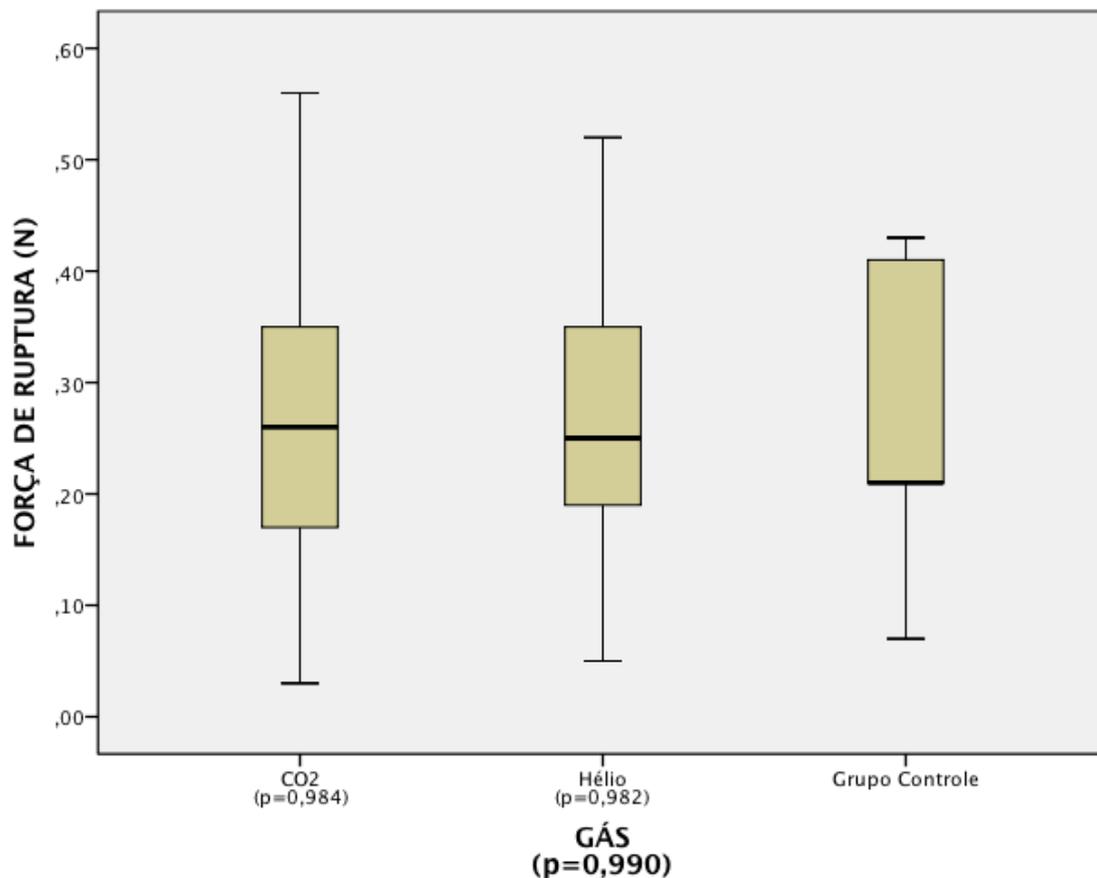
GRÁFICO 8 – MEDIANA E VALORES INTERVALARES DA FORÇA DE RUPTURA DA ANASTOMOSE DISTRIBUÍDOS SEGUNDO A PRESSÃO UTILIZADA. VALORES EM NEWTON.



FONTE: O autor (2013)

Analisando-se separadamente a influência do gás utilizado no pneumoperitônio, não se levando em consideração a pressão utilizada, não se observa diferença estatística ($p=0,990$). Não houve diferença estatística entre a cirurgia aberta e a utilização de pneumoperitônio com CO₂ ($p=0,984$) ou hélio ($p=0,982$) (gráfico 9).

GRÁFICO 9 – MEDIANA E VALORES INTERVALARES DA FORÇA DE RUPTURA DA ANASTOMOSE DISTRIBUÍDOS SEGUNDO O GÁS UTILIZADO. VALORES EM NEWTON.

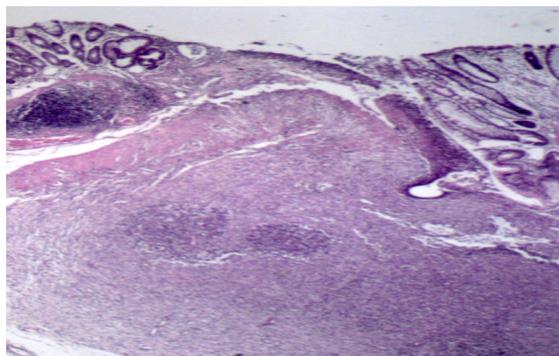


FONTE: O autor (2013)

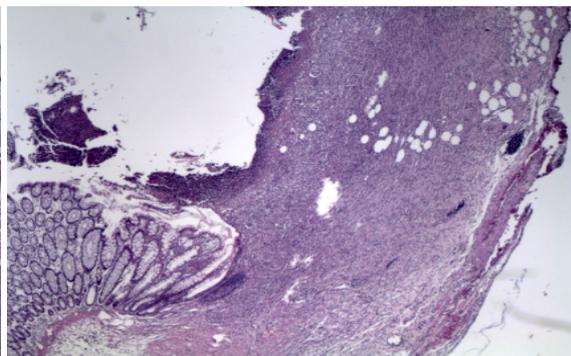
4.6 ACHADOS HISTOPATOLÓGICOS

Não houve diferença estatística ao se analisar os parâmetros histopatológicos tanto por grupo/subgrupo, quanto analisando separadamente o tipo de gás utilizado ou a pressão utilizada (figura 26).

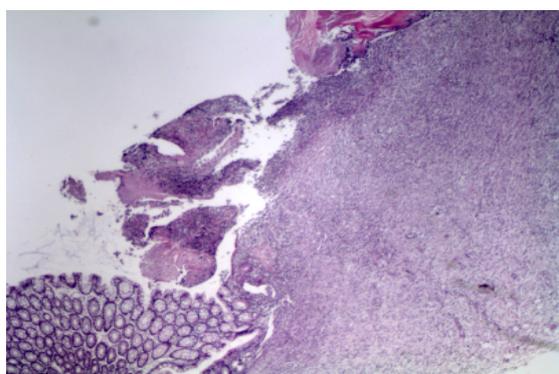
FIGURA 26 – CORTES HISTOLÓGICOS DA ÁREA DA ANASTOMOSE COLÔNICA DOS ANIMAIS SUBDIVIDIDOS POR GRUPOS / SUBGRUPOS. HE – 20x



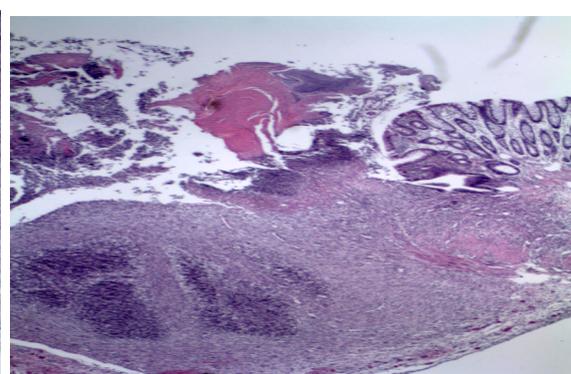
Grupo I CO2



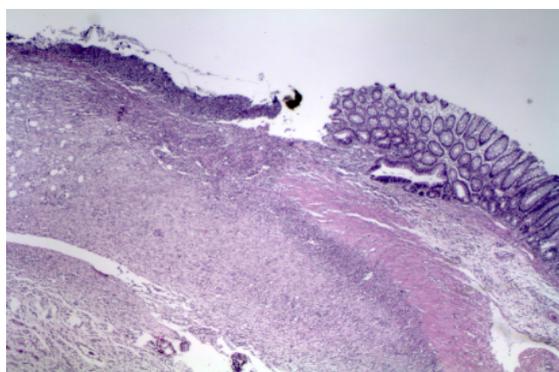
Grupo I He



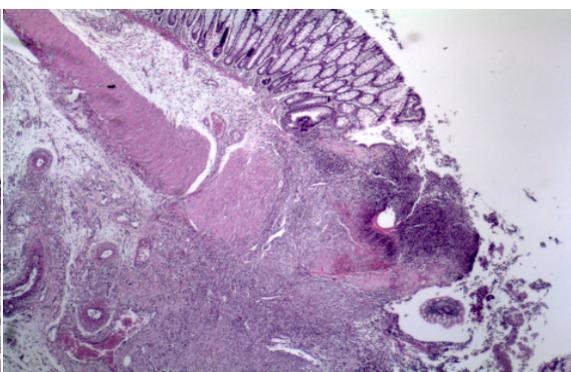
Grupo II CO2



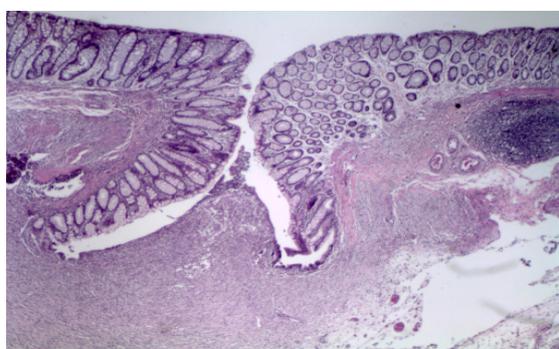
Grupo II He



Grupo III CO2



Grupo III He



Grupo IV

FONTE: O autor (2013)

Os resultados discriminados por animais se encontram nos apêndices M a S. Os resultados estatísticos podem ser vistos na tabela 16.

TABELA 16 – VALOR DE *P* PARA OS DADOS HISTOPATOLÓGICOS SEGUNDO O GRUPO/SUBGRUPO, TIPO DE GÁS UTILIZADO OU PRESSÃO UTILIZADA.

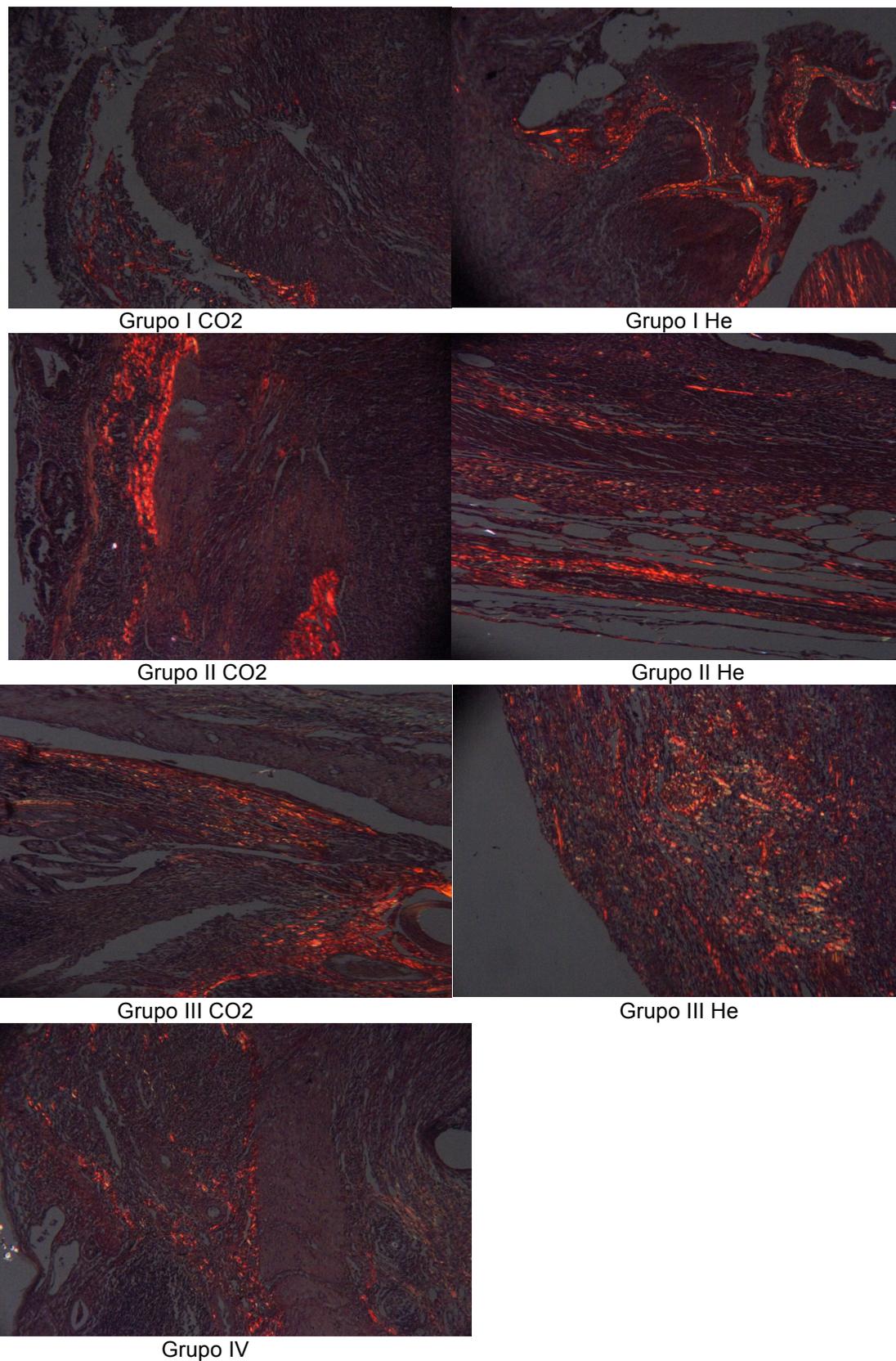
	Grupo/Subgrupo	Gás Utilizado	Pressão Utilizada
Colágeno	0,990	0,537	1,0
Fibroblastos	0,618	0,509	0,916
Infiltrado Mononuclear	1,0	1,0	1,0
Infiltrado Polimorfonuclear	0,437	0,315	0,823
Neovascularização	0,731	0,945	0,814
Edema	1,0	1,0	1,0
Ulceração	1,0	1,0	1,0
Necrose	1,0	1,0	1,0
Abscesso	0,186	0,284	0,900
Colônias Bacterianas	0,663	0,306	0,520
Corpo Estranho	0,869	0,670	0,771
Crosta Fibrino-Leucocitária	1,0	1,0	1,0

FONTE: O autor (2013)

4.7 HISTOMORFOMETRIA DO COLÁGENO

O percentual de colágeno nas fotos da região perianastomótica nas lâminas coradas pelo picrosirius variou de 0% a 11,7%, com média de 1,3% e mediana de 0,7% (figura 27).

FIGURA 27 – HISTOMORFOMETRIA DAS LÂMINAS CORADAS PELO PICRO-SIRIUS COM LUZ POLARIZADA DOS ANIMAIS SUBDIVIDIDOS POR GRUPOS / SUBGRUPOS. HE – 20x.



FONTE: O autor (2013)

Os dados por subgrupo podem ser visualizados na tabela 17 e nos apêndices T a W.

TABELA 17 – PERCENTUAL DE COLÁGENO NAS FOTOS DA REGIÃO PERIANASTOMÓTICA DAS LÂMINAS CORADAS POR PICROSÍRIUS EM RELAÇÃO AO GRUPO/SUBGRUPO (MÉDIA, MEDIANA, DESVIO PADRÃO, VALORES MÍNIMOS E MÁXIMOS).

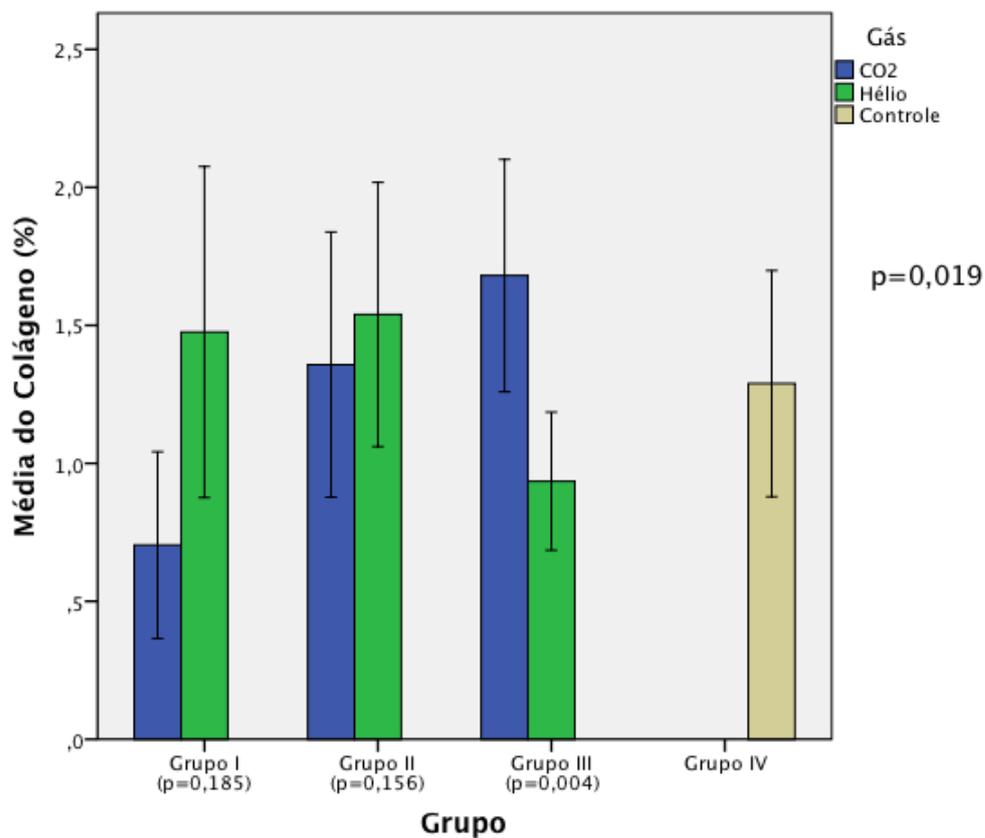
	Grupo/Subgrupo ($p=0,019$)						
	I-CO2 (n=10)	I-He (n=10)	II-CO2 (n=10)	II-He (n=10)	III-CO2 (n=10)	III-He (n=10)	IV (n=10)
Média	0,70	1,48	1,36	1,54	1,68	0,94	1,29
Mediana	0,45	0,80	0,60	1,30	1,40	0,60	0,70
Desvio Padrão	0,86	2,26	1,73	1,37	1,43	1,00	1,37
Mínimo	0	0	0	0,10	0	0	0
Máximo	3,80	11,70	7,80	4,90	5,30	4,40	5,80
p	$p=0,052$	$p=0,619$	$p=0,602$	$p=0,318$	$p=0,179$	$p=0,218$	

FONTE: O autor (2013)

Houve diferença estatística entre os subgrupos ($p=0,019$). Quando analisamos cada grupo separadamente, comparando o gás utilizado, não observamos diferença estatística no uso do hélio ou CO2 na pressão de 5 mmHg ($p=0,185$), ou na pressão de 12 mmHg ($p=0,156$). Já na pressão de 20 mmHg houve maior quantidade de colágeno no subgrupo que utilizou CO2 em relação ao que utilizou hélio ($p=0,004$) (tabela 17) (gráfico 10).

Não observamos diferença estatística entre o grupo controle e os subgrupos I-CO2 ($p=0,052$), I-He ($p=0,619$), II-CO2 ($p=0,602$), II-He ($p=0,318$), III-CO2 ($p=0,179$) e III-He ($p=0,218$) (tabela 17) (gráfico 10).

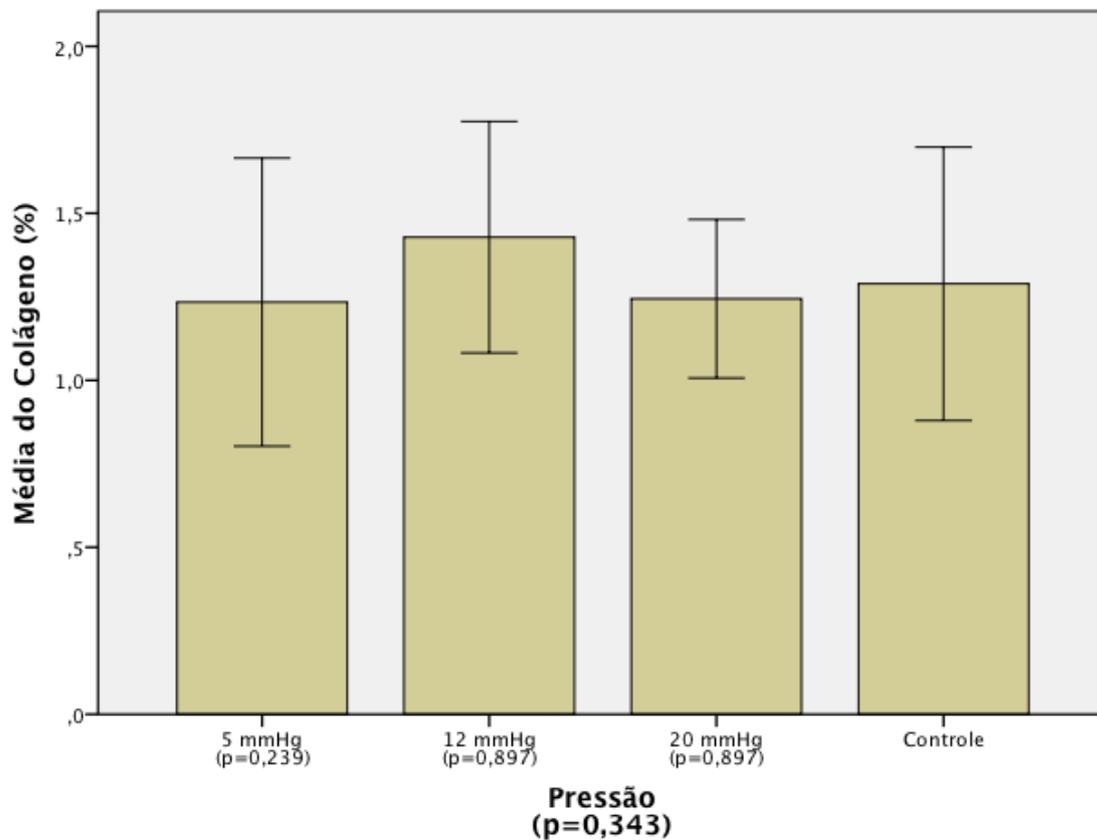
GRÁFICO 10 – MÉDIA E ERRO PADRÃO DO PERCENTUAL DE COLÁGENO NAS FOTOS DA REGIÃO PERIANASTOMÓTICA DAS LÂMINAS CORADAS POR PICROSÍRIUS EM RELAÇÃO AO GRUPO/SUBGRUPO.



FONTE: O autor (2013)

Ao se analisar separadamente a influência da pressão utilizada, não considerando o gás utilizado, não se observou diferença estatística entre os grupos ($p = 0,343$) (gráfico 11). Não se observou diferença estatística entre a cirurgia aberta e a utilização de pneumoperitônio de 5 mmHg ($p = 0,239$), 12 mmHg ($p = 0,897$) e 20 mmHg ($p = 0,897$) (gráfico 11).

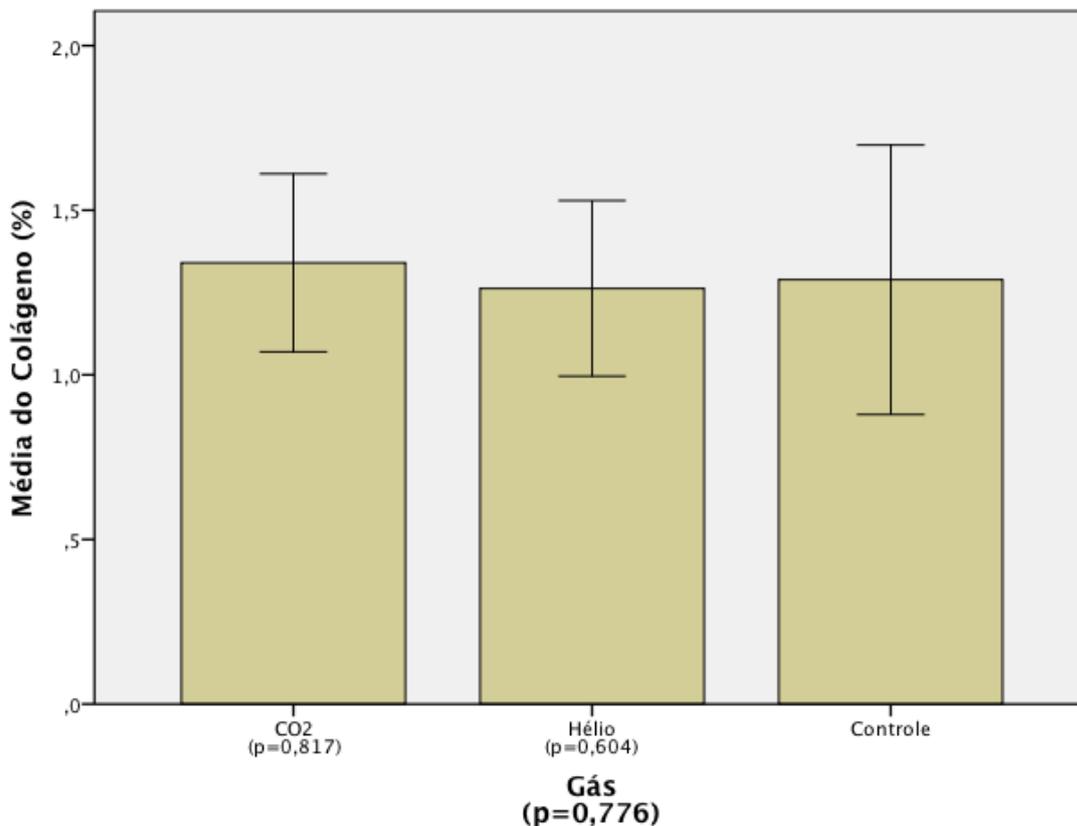
GRÁFICO 11 – MÉDIA E ERRO PADRÃO DO PERCENTUAL DE COLÁGENO NAS FOTOS DA REGIÃO PERIANASTOMÓTICA DAS LÂMINAS CORADAS POR PICROSÍRIUS EM RELAÇÃO A PRESSÃO UTILIZADA.



FONTE: O autor (2013)

Analisando separadamente a influência do gás utilizado, sem levar em consideração a pressão utilizada, não houve diferença estatística entre os grupos ($p=0,776$). Também não se observou diferença estatística entre a cirurgia aberta e a utilização de pneumoperitônio com CO₂ ($p=0,817$) ou hélio ($p=0,604$) (gráfico 12).

GRÁFICO 12 – MÉDIA E ERRO PADRÃO DO PERCENTUAL DE COLÁGENO NAS FOTOS DA REGIÃO PERIANASTOMÓTICA DAS LÂMINAS CORADAS POR PICROSÍRIUS EM RELAÇÃO AO GÁS UTILIZADO.



FONTE: O autor (2013)

4.8 CONCENTRAÇÃO DE HIDROXIPROLINA

4.8.1 Concentração de hidroxiprolina no dia da operação.

A concentração de hidroxiprolina no dia da operação foi medida no segmento colônico retirado após uma hora de pneumoperitônio, não sofrendo portanto influência dos 30 minutos de pneumoperitônio realizado após a anastomose.

A concentração de hidroxiprolina no dia da operação nos 70 animais variou de 0,10 a 1,20 mg/g de tecido. A média foi de 0,49 mg/g, a mediana foi 0,40 mg/g e o desvio padrão foi 0,21 mg/g de tecido. Os dados por subgrupo podem ser visualizados na tabela 18 e nos apêndices X a AA.

TABELA 18 – VALORES DA CONCENTRAÇÃO DE HIDROXIPROLINA NO DIA DA OPERAÇÃO POR GRUPO/SUBGRUPO (MÉDIA, MEDIANA, DESVIO PADRÃO, VALORES MÍNIMOS E MÁXIMOS). VALORES EM MG/G DE TECIDO.

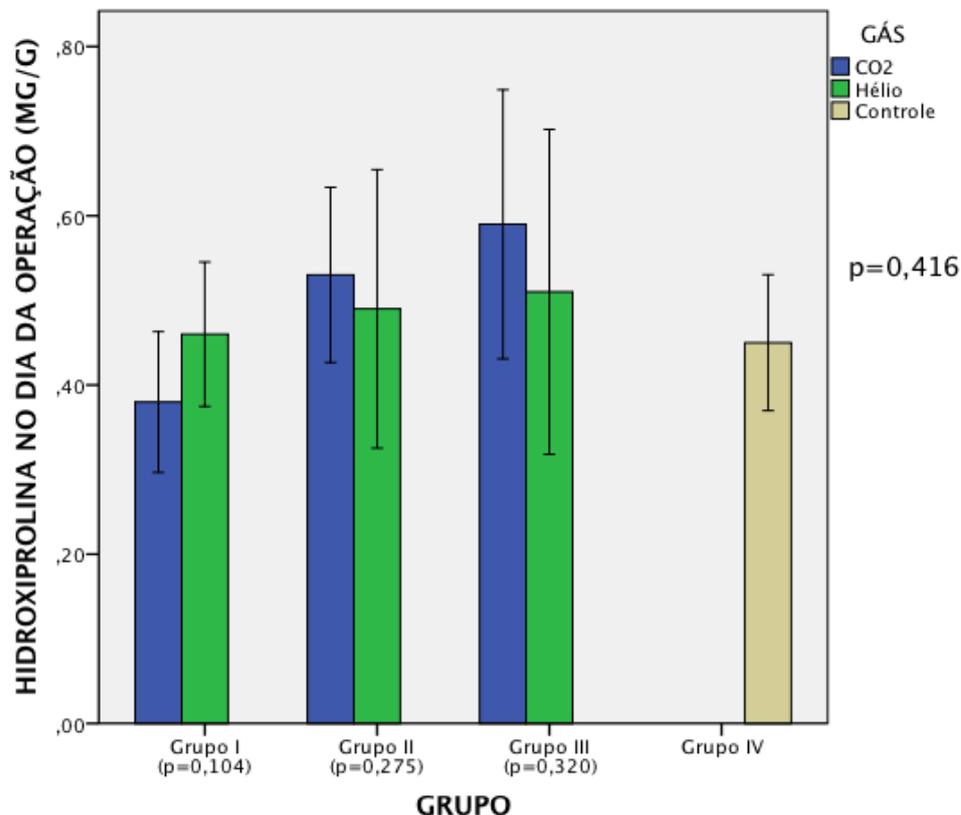
	Grupo/Subgrupo ($p=0,416$)						
	I-CO2 (n=10)	I-He (n=10)	II-CO2 (n=10)	II-He (n=10)	III-CO2 (n=10)	III-He (n=10)	IV (n=10)
Média	0,38	0,46	0,53	0,49	0,59	0,51	0,45
Mediana	0,40	0,40	0,50	0,40	0,55	0,40	0,40
Desvio Padrão	0,13	0,13	0,16	0,26	0,25	0,30	0,13
Mínimo	0,20	0,30	0,30	0,30	0,30	0,10	0,30
Máximo	0,70	0,70	0,80	1,20	1,20	1,10	0,70
p	$p=0,940$	$p=1,000$	$p=0,896$	$p=0,996$	$p=0,467$	$p=0,970$	

FONTE: O autor (2013)

Não houve diferença estatística entre os subgrupos ($p=0,416$). Não houve diferença entre o grupo controle e os subgrupos I-CO2 ($p=0,940$), I-He ($p=1,000$), II-CO2 ($p=0,896$), II-He ($p=0,996$), III-CO2 ($p=0,467$) e III-He ($p=0,970$). (tabela 18) (gráfico 13).

Não houve diferença estatística entre o uso do gás hélio ou CO2 nas pressões de 5 mmHg ($p=0,104$), 12 mmHg ($p=0,275$) e 20 mmHg ($p=0,320$) (tabela 18) (gráfico 13).

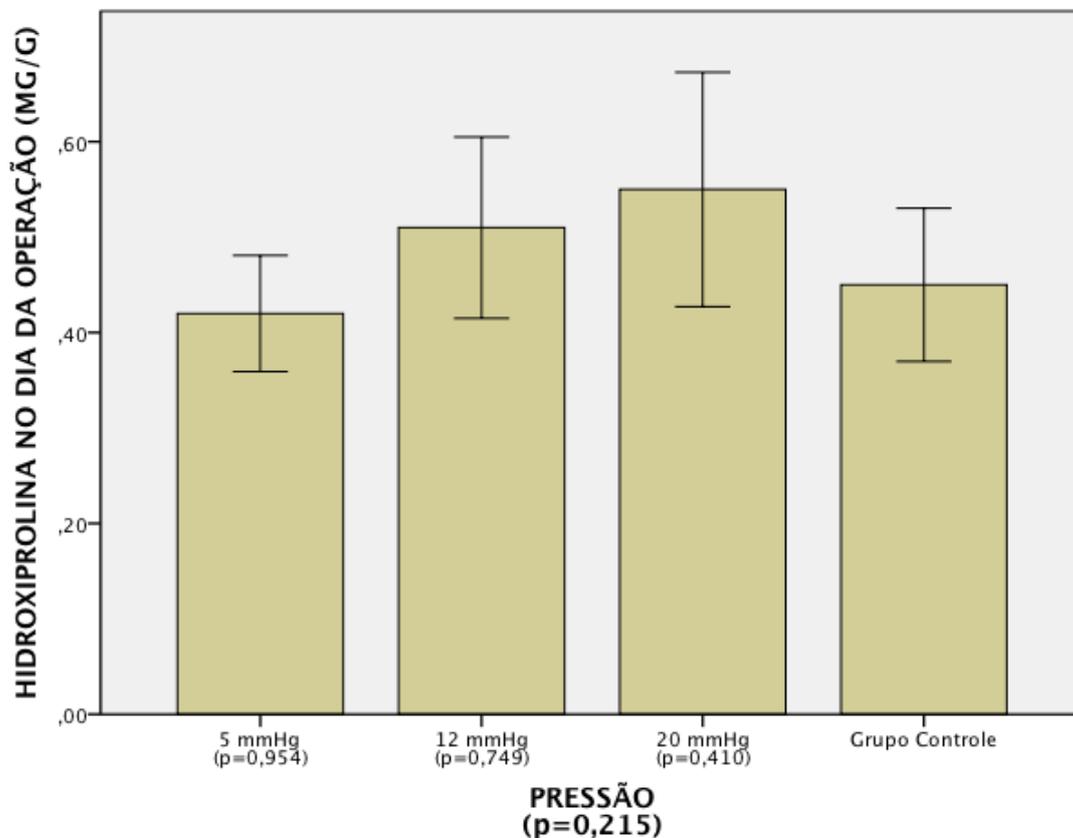
GRÁFICO 13 – MÉDIA E ERRO PADRÃO DA CONCENTRAÇÃO DE HIDROXIPROLINA NO DIA DA OPERAÇÃO DISTRIBUÍDOS POR GRUPO E SUBGRUPO. VALORES EM MG/G DE TECIDO.



FONTE: O autor (2013)

Quando se analisou a pressão utilizada no pneumoperitônio, sem considerar o gás, não houve diferença estatística da concentração de hidroxiprolina no dia da operação ($p=0,215$). Não houve diferença estatística entre a cirurgia aberta e a utilização de pneumoperitônio de 5 mmHg ($p=0,954$), 12 mmHg ($p=0,749$) e 20 mmHg ($p=0,410$) (gráfico 14).

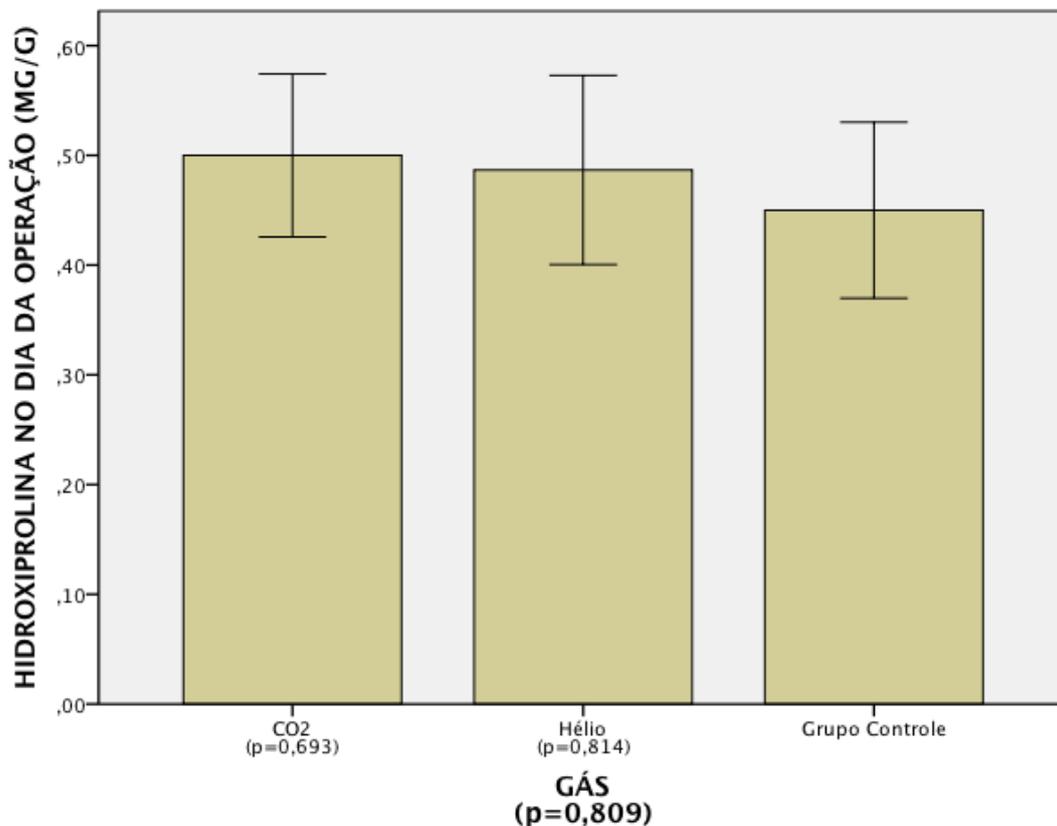
GRÁFICO 14 – MÉDIA E ERRO PADRÃO DA CONCENTRAÇÃO DE HIDROXIPROLINA NO DIA DA OPERAÇÃO DISTRIBUÍDOS PELA PRESSÃO UTILIZADA. VALORES EM MG/G DE TECIDO.



FONTE: O autor (2013)

Ao se analisar separadamente a influência do gás utilizado no pneumoperitônio, não considerando a pressão utilizada, não se observou diferença estatística ($p=0,809$). Não houve diferença estatística entre a cirurgia aberta e a utilização de pneumoperitônio com CO₂ ($p=0,693$) ou hélio ($p=0,814$) (gráfico 15).

GRÁFICO 15 – MÉDIA E ERRO PADRÃO DA CONCENTRAÇÃO DE HIDROXIPROLINA NO DIA DA OPERAÇÃO DE ACORDO COM O GÁS UTILIZADO. VALORES EM MG/G DE TECIDO.



FONTE: O autor (2013)

4.8.2 Concentração de hidroxiprolina no dia da reoperação.

A concentração de hidroxiprolina no dia da reoperação em todos os animais variou de 0,10 a 0,50 mg/g de tecido. A média foi de 0,29 mg/g, a mediana foi 0,3 mg/g e o desvio padrão foi 0,11 mg/g nos 70 animais. Esses dados por subgrupo podem ser visualizados na tabela 19 e nos apêndices X a AA.

TABELA 19 – VALORES DA CONCENTRAÇÃO DE HIDROXIPROLINA NO DIA DA REOPERAÇÃO POR GRUPO/SUBGRUPO (MÉDIA, MEDIANA, DESVIO PADRÃO, VALORES MÍNIMOS E MÁXIMOS). VALORES EM MG/G DE TECIDO.

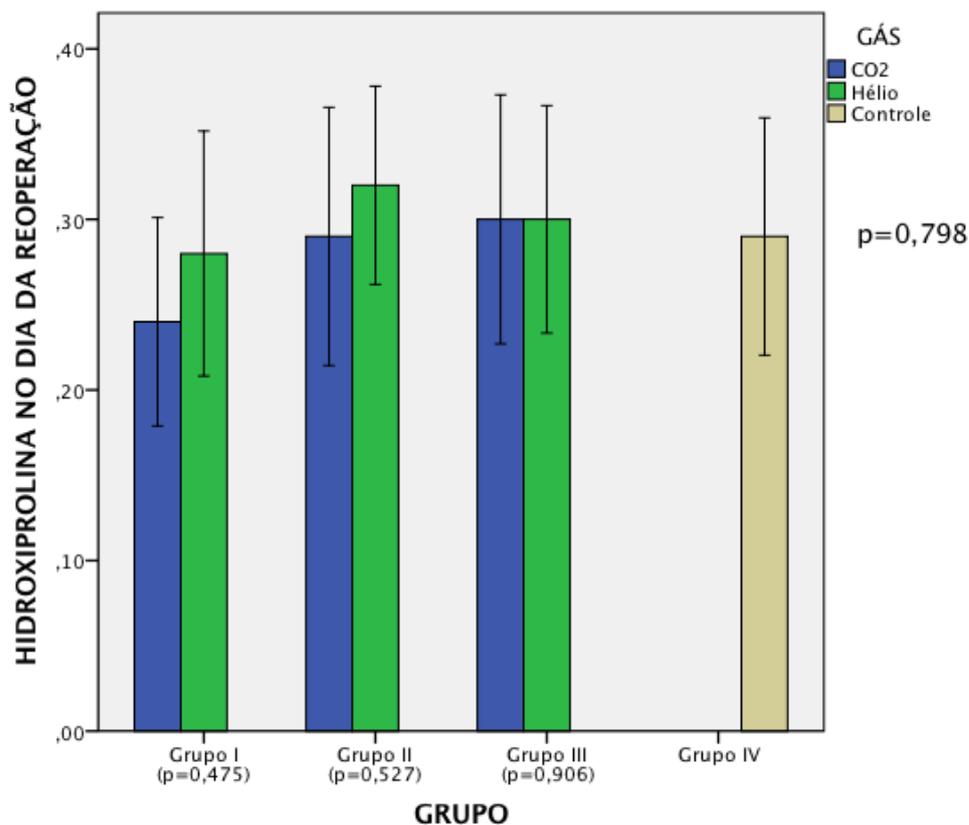
	Grupo/Subgrupo ($p=0,798$)						
	I-CO2 (n=10)	I-He (n=10)	II-CO2 (n=10)	II-He (n=10)	III-CO2 (n=10)	III-He (n=10)	IV (n=10)
Média	0,24	0,28	0,29	0,32	0,30	0,30	0,29
Mediana	0,25	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30
Desvio Padrão	0,97	0,11	0,12	0,92	0,12	0,11	0,11
Mínimo	0,10	0,10	0,10	0,20	0,10	0,20	0,10
Máximo	0,40	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,40
p	$p=0,798$	$p=1,000$	$p=1,000$	$p=0,975$	$p=1,000$	$p=1,000$	

FONTE: O autor (2013)

Não houve diferença estatística entre os subgrupos ($p=0,798$). Não houve diferença entre o grupo controle e os subgrupos I-CO2 ($p=0,798$), I-He ($p=1,000$), II-CO2 ($p=1,000$), II-He ($p=0,975$), III-CO2 ($p=1,000$) e III-He ($p=1,000$). (tabela 19) (gráfico 16).

Não houve diferença estatística entre o uso do gás hélio ou CO2 nas pressões de 5 mmHg ($p=0,475$), 12 mmHg ($p=0,527$) e 20 mmHg ($p=0,906$) (tabela 19) (gráfico 16).

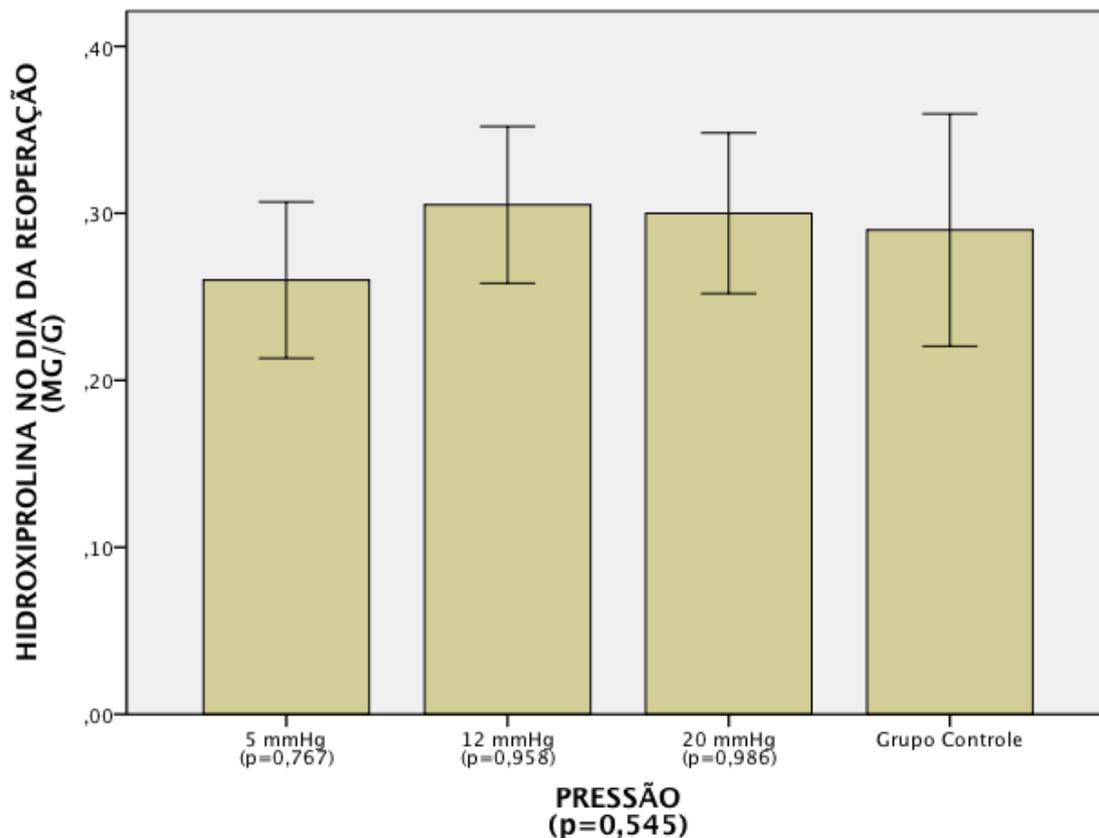
GRÁFICO 16 – MÉDIA E ERRO PADRÃO DA CONCENTRAÇÃO DE HIDROXIPROLINA NO DIA DA REOPERAÇÃO DISTRIBUÍDOS POR GRUPO E SUBGRUPO. VALORES EM MG/G DE TECIDO.



FONTE: O autor (2013)

Ao se analisar separadamente a pressão do pneumoperitônio, independente do gás utilizado, não se verificou diferença estatística na concentração de hidroxiprolina no dia da reoperação ($p=0,545$). Não houve diferença estatística entre a cirurgia aberta e a utilização de pneumoperitônio de 5 mmHg ($p=0,767$), 12 mmHg ($p=0,958$) e 20 mmHg ($p=0,986$) (gráfico 17).

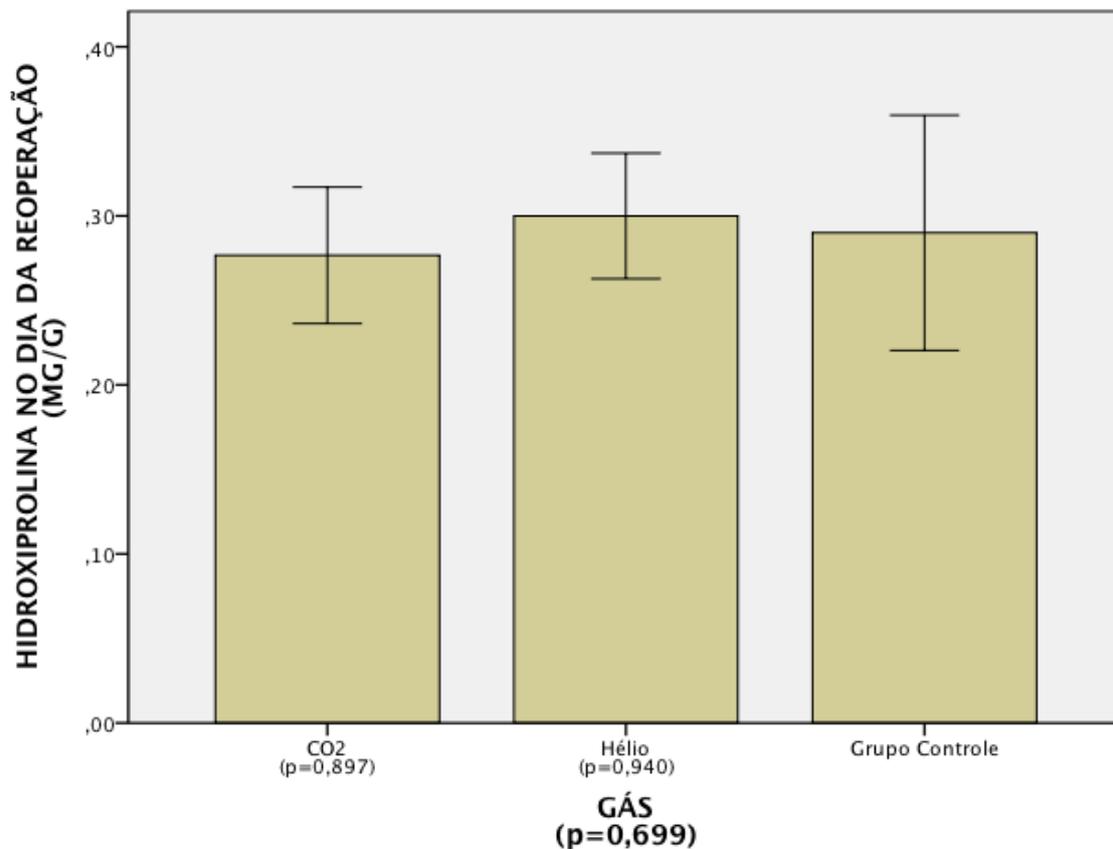
GRÁFICO 17 – MÉDIA E ERRO PADRÃO DA CONCENTRAÇÃO DE HIDROXIPROLINA NO DIA DA REOPERAÇÃO DISTRIBUÍDOS PELA PRESSÃO UTILIZADA. VALORES EM MG/G DE TECIDO.



FONTE: O autor (2013)

Quando se analisou separadamente a influência do gás utilizado no pneumoperitônio, não se levando em consideração a pressão utilizada, não houve diferença estatística no dia da reoperação ($p=0,699$). Não houve diferença estatística entre a cirurgia aberta e a utilização de pneumoperitônio com CO₂ ($p=0,897$) ou hélio ($p=0,940$) (gráfico 18).

GRÁFICO 18 – MÉDIA E ERRO PADRÃO DA CONCENTRAÇÃO DE HIDROXIPROLINA NO DIA DA REOPERAÇÃO DE ACORDO COM O GÁS UTILIZADO. VALORES EM MG/G DE TECIDO.

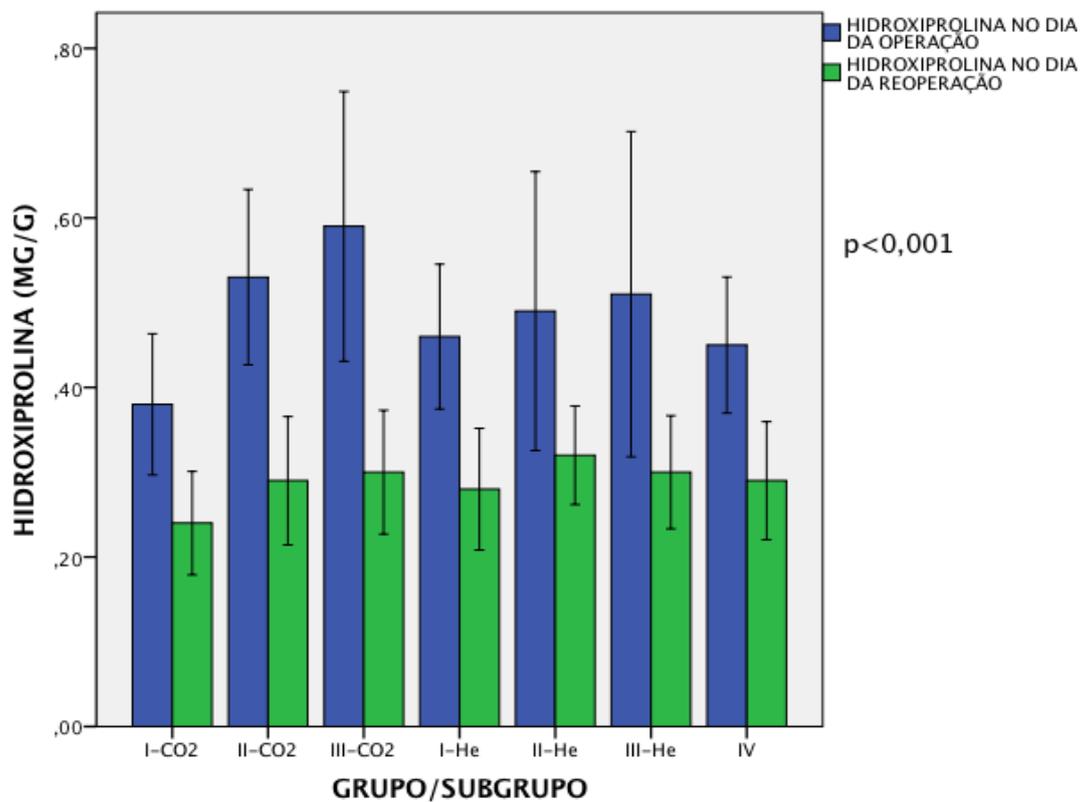


FONTE: O autor (2013)

4.8.3 Relação entre a hidroxiprolina no dia da operação e no dia da reoperação

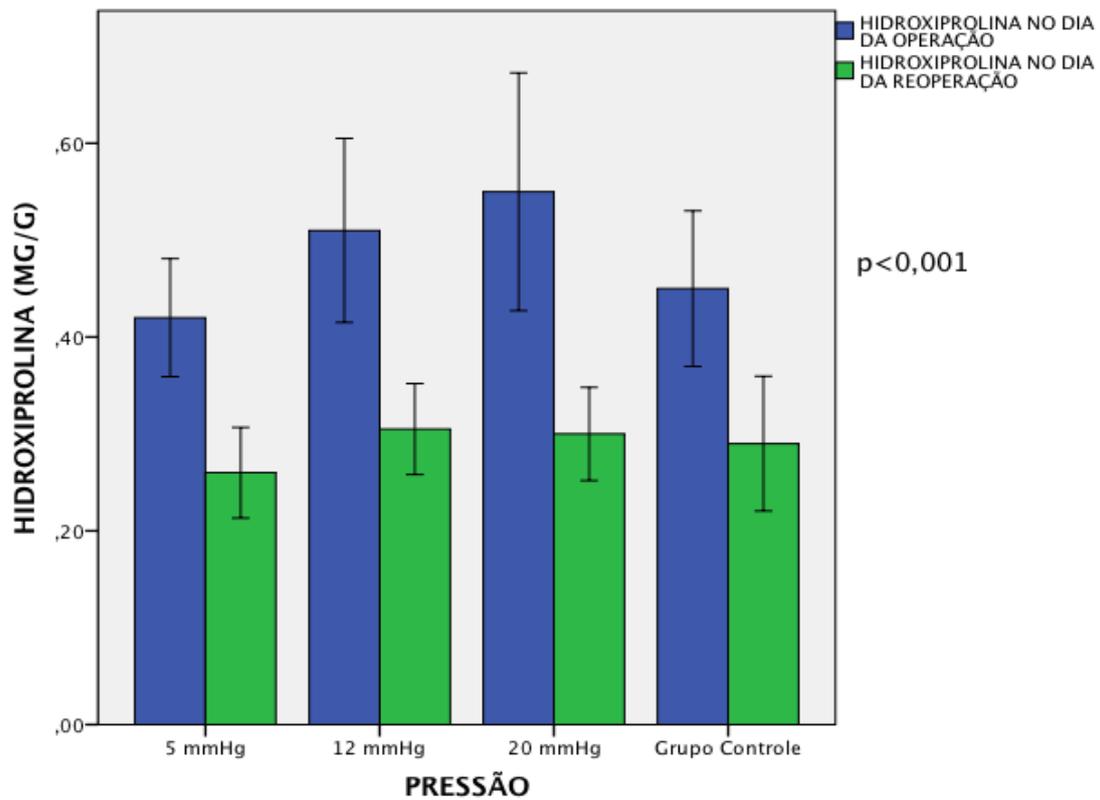
Houve diminuição do valor da hidroxiprolina no dia da reoperação em comparação com o dia da operação em todos os grupos/subgrupos, independente da pressão ou gás utilizado no pneumoperitônio ($p < 0,001$) (gráficos 19 a 21).

GRÁFICO 19 – MÉDIA E ERRO PADRÃO DA CONCENTRAÇÃO DE HIDROXIPROLINA NO DIA DA OPERAÇÃO E NO DIA DA REOPERAÇÃO DISTRIBUÍDOS POR GRUPO E SUBGRUPO. VALORES EM MG/G DE TECIDO.



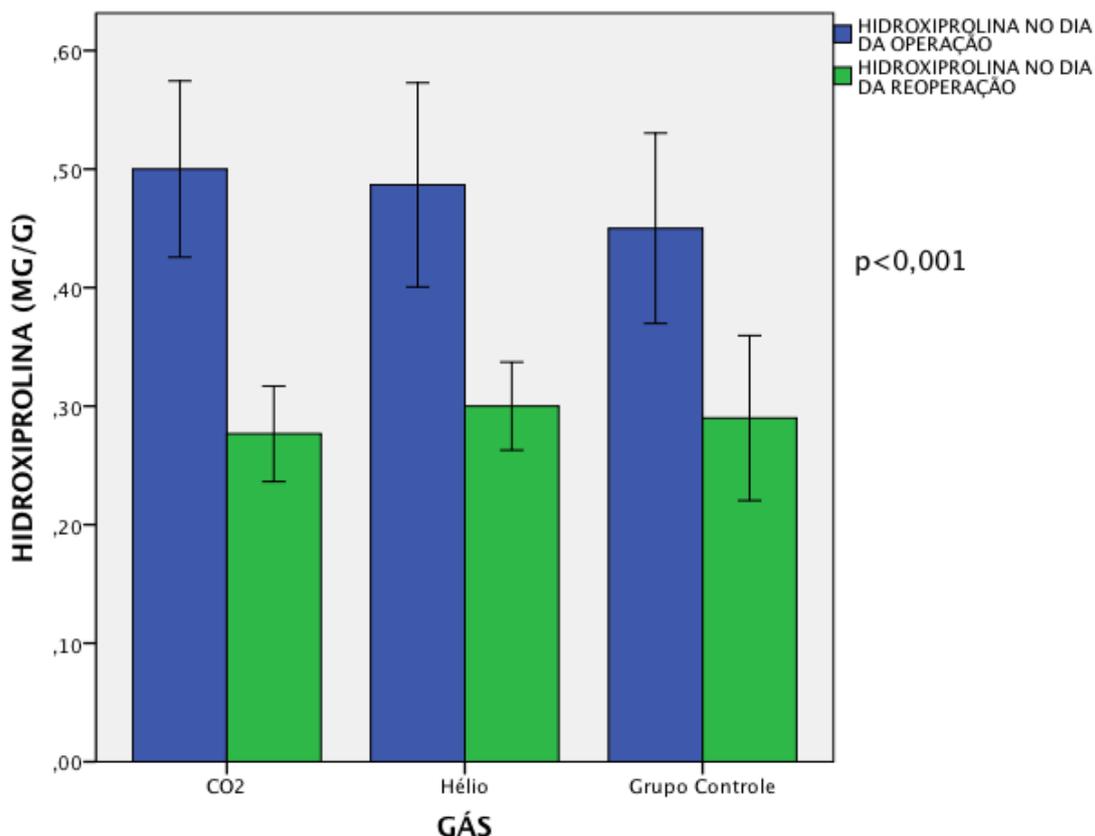
FONTE: O autor (2013)

GRÁFICO 20 – MÉDIA E ERRO PADRÃO DA CONCENTRAÇÃO DE HIDROXIPROLINA NO DIA DA OPERAÇÃO E NO DIA DA REOPERAÇÃO DISTRIBUÍDOS PELA PRESSÃO UTILIZADA. VALORES EM MG/G DE TECIDO.



FONTE: O autor (2013)

GRÁFICO 21 – MÉDIA E ERRO PADRÃO DA CONCENTRAÇÃO DE HIDROXIPROLINA NO DIA DA OPERAÇÃO E NO DIA DA REOPERAÇÃO DISTRIBUÍDOS PELO GÁS UTILIZADO. VALORES EM MG/G DE TECIDO.



FONTE: O autor (2013)

4.9 FATOR DE CRESCIMENTO VASCULAR ENDOTELIAL (VEGF)

Não houve diferença estatística ao se analisar o VEGF por grupo/subgrupo ($p=0,750$). Esses dados por grupo/subgrupo podem ser visualizados na tabela 20 e no apêndices BB a EE.

TABELA 20 – EXPRESSÃO DE VEGF DE ACORDO COM O GRUPO/SUBGRUPO.

VEGF	Grupo/Subgrupo ($p=0,750$)						
	I-CO2 (n=9)	I-He (n=10)	II-CO2 (n=10)	II-He (n=10)	III-CO2 (n=10)	III-He (n=10)	IV (n=9)
Leve	0	0	0	0	0	0	0
Moderada	8	6	8	9	8	8	7
Intensa	1	4	2	1	2	2	2

FONTE: O autor (2013)

Não houve diferença estatística em relação à pressão utilizada ($p=0,856$) (tabela 21) ou em relação ao gás utilizado ($p=0,841$) (tabela 22).

TABELA 21 – EXPRESSÃO DE VEGF DE ACORDO COM A PRESSÃO UTILIZADA.

VEGF	Pressão ($p=0,856$)			
	5 mmHg (n=19)	12 mmHg (n=20)	20mmHg (n=20)	Controle (n=9)
Leve	0	0	0	0
Moderada	14	17	16	7
Intensa	5	3	4	2

FONTE: O autor (2013)

TABELA 22 – EXPRESSÃO DE VEGF DE ACORDO COM O GÁS UTILIZADO.

VEGF	Gás ($p=0,841$)		
	CO2 (n=29)	Hélio (n=30)	Controle (n=9)
Leve	0	0	0
Moderada	24	23	7
Intensa	5	7	2

FONTE: O autor (2013)

4.10 DENSIDADE DE MICROVASOS (CD 31)

Não houve diferença estatística ao se analisar o CD 31 por grupo/subgrupo ($p=0,404$). Esses dados por grupo/subgrupo podem ser visualizados na tabela 23 e no apêndices FF a II.

TABELA 23 – DENSIDADE DE MICROVASOS (CD 31) DE ACORDO COM O GRUPO/SUBGRUPO.

CD 31	Grupo/Subgrupo ($p=0,404$)						
	I-CO2 (n=9)	I-He (n=10)	II-CO2 (n=10)	II-He (n=10)	III-CO2 (n=10)	III-He (n=10)	IV (n=9)
Leve	0	0	0	0	0	0	0
Moderada	9	7	8	8	10	9	8
Intensa	0	3	2	2	0	1	1

FONTE: O autor (2013)

Não houve diferença estatística em relação à pressão utilizada ($p=0,554$) (tabela 24) ou em relação ao gás utilizado ($p=0,331$) (tabela 25).

TABELA 24 – DENSIDADE DE MICROVASOS (CD 31) DE ACORDO COM A PRESSÃO UTILIZADA.

CD 31	Pressão ($p=0,554$)			
	5 mmHg (n=19)	12 mmHg (n=20)	20mmHg (n=20)	Controle (n=9)
Leve	0	0	0	0
Moderada	16	16	19	8
Intensa	3	4	1	1

FONTE: O autor (2013)

TABELA 25 – DENSIDADE DE MICROVASOS (CD 31) DE ACORDO COM O GÁS UTILIZADO.

CD 31	Gás ($p=0,331$)		
	CO2 (n=29)	Hélio (n=30)	Controle (n=9)
Leve	0	0	0
Moderada	27	24	8
Intensa	2	6	1

FONTE: O autor (2013)

5 DISCUSSÃO

Com o advento da cirurgia laparoscópica e sua crescente incorporação à prática médica, os efeitos fisiológicos da pressão e do gás sobre os órgãos abdominais são cada vez mais estudados. Na cirurgia colorretal, são de grande importância os efeitos do pneumoperitônio na anastomose intestinal.

O rato é o animal clássico para pesquisa, pois é de fácil padronização quanto à raça, sexo e peso, além de ter grande resistência a infecções e possuir anatomia bem conhecida. O rato apresenta praticidade para experimentos pela possibilidade de obtenção de animais em número suficiente, com similaridade genética e fisiológica, baixo custo e facilidade de manutenção em biotério (BERGUER; GUTT, 1994; GUTT et al., 1998).

Modelos experimentais de cirurgia laparoscópica em ratos vem sendo utilizados (MEYER et al., 2007; SILVA et al., 2011). Já foram propostos previamente modelos de colectomia laparoscópica em ratos, no entanto há grande dificuldade em executá-los, principalmente no que se refere à anastomose intra-corpórea. Além disso, nestes modelos são necessários materiais especiais para microcirurgia laparoscópica (BERGUER; GUTT, 1994; GUTT et al., 1998; TYTGAT et al., 2012).

O modelo proposto em nosso estudo, mais simples, e com uso de material habitual de cirurgia laparoscópica, permite simular em ratos as condições em que o animal é submetido na retossigmoidectomia videolaparoscópica. Nesta operação, em humanos, é realizado pneumoperitônio para a visualização das estruturas abdominais, dissecação e ligadura dos vasos mesentéricos e liberação do cólon. Após estes tempos operatórios o cólon liberado é exteriorizado por uma pequena incisão abdominal, desfazendo o pneumoperitônio. É realizada a ressecção colônica e a anastomose é preparada ou realizada. O pneumoperitônio é refeito para revisão de hemostasia e confecção da anastomose quando esta ainda não foi realizada. No modelo animal proposto, os mesmos passos foram seguidos.

Nos modelos experimentais até então descritos, há grande dificuldade na abordagem do cólon esquerdo dos ratos. O modelo do presente estudo permitiu a abordagem do reto e sigmóide e a realização da anastomose

extracorpórea facilmente, diferentemente de outros estudos em ratos que abordam o cólon direito ou intestino delgado devido dificuldades técnicas.

Para estudarmos o papel da pressão abdominal e do CO₂ na cicatrização da anastomose colônica idealizamos este estudo, utilizando gases e pressões diferentes. O gás hélio serviu como controle dos efeitos do dióxido de carbono. Utilizamos neste estudo as pressões de 5 mmHg, 12 mmHg e 20 mmHg. A pressão de 5 mmHg é a pressão que no rato correspondente à utilizada em cirurgia laparoscópica em humanos. A pressão de 12 mmHg é a utilizada em cirurgia laparoscópica em humanos, com efeito de hipertensão intra-abdominal em ratos. A pressão de 20 mmHg é uma pressão com efeito de hipertensão intra-abdominal em humanos e ratos, além de prejudicar a cicatrização intestinal em estudos anteriores em ratos (AVITAL et al., 2009; BERGUER et al., 1997; POLAT et al., 2002; MATSUZAKI et al., 2010).

O aumento da pressão abdominal é causado em várias situações clínicas como na ascite, distensão abdominal por íleo ou obstrução mecânica, redução de hérnia gigante, pancreatite, sepse e trauma. Pressões acima de 20 mmHg são denominadas hipertensão intra-abdominal (IVATURY et al., 1997). A hipertensão intra-abdominal cursa com graves efeitos deletérios abdominais e sistêmicos. O aumento da pressão intra-abdominal que causa hipóxia, dificuldade ventilatória, oligúria ou anúria, caracteriza a Síndrome do Compartimento Abdominal, se estes sintomas reduzirem com a descompressão abdominal (IVATURY et al., 1997). A pressão utilizada em cirurgias laparoscópicas em humanos é de 12 a 15 mmHg. Esta pressão permite boa visualização da cavidade peritoneal com poucas alterações metabólicas e cardiovasculares.

Alguns estudos foram realizados para comparar o pneumoperitônio com dióxido de carbono (CO₂) e com hélio. Neuberger et al. (1996) destacaram que o uso do hélio não causa retenção de CO₂ e conseqüente acidose, no entanto o risco de embolia gasosa é maior com este gás. Goiten et al. (2005) demonstraram que a perfusão intestinal não se altera comparando o pneumoperitônio com os dois gases. Rosch et al. (2005) não verificaram alterações na cicatrização intestinal de ratos submetidos a pneumoperitônio com hélio e CO₂.

Utilizamos também um grupo de cirurgia aberta para comparação com os grupos submetidos a pneumoperitônio com CO₂ ou hélio, além de testar a segurança do novo modelo cirúrgico laparoscópico proposto.

A oxigenação adequada é essencial para a perfeita cicatrização de uma anastomose colônica (POSMA et al., 2009). O aumento da pressão abdominal diminui o fluxo esplâncnico, e pode, conseqüentemente, piorar a cicatrização intestinal (ROSCH et al., 2006). Por outro lado, a hipercarbia induzida pelo uso de dióxido de carbono leva a vasodilatação dos vasos mesentéricos, e com isso há aumento da oxigenação na região anastomótica, o que poderia melhorar a cicatrização (ROSCH et al., 2005; ROSCH et al., 2006).

O processo de cicatrização de um tecido é didaticamente dividido em três fases sobrepostas: hemostasia e inflamação, proliferação e maturação. Neste estudo, a anastomose foi avaliada no sétimo dia pós-operatório, ou seja, quando há interposição das fases inflamatória e de proliferação. Hermann et al (1964), estudou a cicatrização de anastomoses colônicas em ratos a intervalos desde três horas até seis meses após a operação. Foi visto que, em ratos, o processo cicatricial apresenta três fases justapostas: exudativa ou resposta inflamatória aguda (zero a quatro dias); proliferativa ou de fibroplasia (três a quatorze dias); e de remodelagem ou de maturidade do colágeno (dez a cento e oitenta dias).

A resposta inflamatória é menor na cirurgia laparoscópica em relação a cirurgia aberta. Esse efeito não pode ser atribuído somente a incisões menores. O CO₂ possui atividade atenuadora da resposta inflamatória (HANLY et al., 2003; SIDO et al., 2004). O CO₂ diminui o pH intracelular e extracelular, o que leva a diminuição da atividade do macrófago, e conseqüentemente diminuição da produção de TNF. Há também diminuição das interleucinas IL-1 e IL-6. Estas alterações não foram observadas quando o hélio ou ar ambiente foram utilizados no pneumoperitônio e também na cirurgia aberta (SIDO et al., 2004). O aumento da citocina pró-inflamatória IL-6 prolonga a fase aguda do processo cicatricial, o que prejudica a cicatrização de anastomoses colônicas (GRECA et al., 2007).

Na cirurgia colorretal, a complicação mais temida é a deiscência de anastomose intestinal, que pode cursar com conseqüências devastadoras para o paciente, com alto índice de morbi-mortalidade (ABBAS, 2010). A incidência

das deiscências anastomóticas na literatura varia de 0 a 35% (HENDRIKS; MASTBOOM, 1990).

O principal parâmetro para se estudar a cicatrização das anastomoses intestinais é o índice de deiscência anastomótica, porém em estudos experimentais no rato o número calculado de animais a ser utilizado seria inviável já que este é um evento pouco incidente. Por isso usamos neste estudo outros parâmetros para verificar a cicatrização: parâmetros clínicos, mecânicos, histopatológicos, bioquímicos, histomorfométricos e imunohistoquímicos.

Os parâmetros clínicos utilizados foram: mortalidade, peso dos animais e achados intra-operatórios.

A mortalidade global no presente estudo foi de 2,86%, estando de acordo com estudos prévios de cicatrização de anastomoses intestinais em ratos, que apresentam taxas de mortalidade entre 0 e 11 % (MASTBOOM et al., 1991). Apesar dos dois óbitos terem sido no mesmo grupo, submetido a pressão de 12mmHg com o dióxido de carbono, não houve diferença estatística entre os grupos. Não foi possível identificar a causa do óbito, e portanto os animais foram substituídos conforme proposto inicialmente, mantendo todos os grupos/subgrupos com 10 animais cada.

Em relação ao peso, no 7º DPO, houve redução do peso em todos os grupos/subgrupos. No entanto esta redução foi maior quando se utilizou a pressão de 20 mmHg. Isto pode ser devido a maior agressão cirúrgica causada por esta pressão no período per-operatório. Polat et al. (2002) encontraram diminuição do peso no 7º DPO nos ratos submetidos a pneumoperitônio nas pressões de 14, 20, 25 e 30 mmHg, porém sem diferença estatística entre os grupos. No entanto, o n é pequeno, com 5 animais apenas, o que pode ter influenciado na ausência de diferença estatística.

Aderências intraperitoneais são causadas principalmente por cirurgias prévias ou doenças inflamatórias (ARUNG et al., 2012). A cirurgia laparoscópica causa aderências abdominais, assim como a cirurgia aberta (JORGENSEN et al., 1995; JACOBI et al., 2001). Na cirurgia laparoscópica, as aderências são devido a isquemia peritoneal e acidose causada pelo pneumoperitônio (ARUNG et al., 2012). Arung et al. (2012) não observaram diferenças entre a quantidade de aderências em cirurgia laparoscópica com

CO₂ ou cirurgia aberta em ratos. No entanto, houve menos aderências utilizando-se ar ambiente para a confecção do pneumoperitônio. Um estudo de aderências intra-abdominais em ratos com peritonite submetidos a colectomia direita mostrou maior quantidade de aderências na cirurgia aberta, comparado a cirurgia laparoscópica utilizando-se hélio ou CO₂ (JACOBI et al., 2001). Neste estudo, tanto confecção do pneumoperitônio com hélio ou CO₂, quanto o uso de diferentes pressões não alteraram a formação de aderências em relação a cirurgia aberta.

Os parâmetros mecânicos são de grande importância para o estudo de anastomoses intestinais. Os dois métodos mais utilizados para testar a resistência tênsil de uma anastomose são a força de ruptura e a pressão de ruptura. Não há consenso na literatura a respeito de qual é o melhor método a ser utilizado. Alguns autores preferem a utilização da força de ruptura, considerando este método preciso e de resultados rápidos (ROSSI et al., 2007). Outros consideram que a pressão de ruptura é mais adequada, por melhor reproduzir as condições a que a anastomose intestinal será submetida no período pós-operatório (HENDRIKS; MASTBOOM, 1990).

O teste da pressão de ruptura é o mais adequado para se avaliar a integridade da anastomose e o risco de fístulas. Estas ocorrem em um ponto da anastomose mais fragilizado, seja devido a uma pequena área de necrose local ou a falha na técnica cirúrgica (IKEUCHI et al., 1999). Estudos prévios demonstram que a pressão de ruptura aumenta progressivamente na primeira semana pós-operatória, indicando que este seria o teste mais adequado para avaliação na fase inflamatória da cicatrização (MANSON et al., 2002). Nesta fase a força de ruptura é constante, não refletindo as mudanças do processo cicatricial intestinal (MANSON et al., 2002).

O teste de força de ruptura da anastomose reflete melhor a anastomose como um todo, sendo mais útil nas fases proliferativas e de maturação (HENDRIKS; MASTBOOM, 1990). A partir da fase proliferativa, a força de ruptura aumenta de forma progressiva (WEIBER et al., 1994). Esta fase coincide com a deposição progressiva de colágeno tipo III e I.

No presente estudo as duas técnicas mecânicas para avaliação da resistência tênsil de anastomose foram utilizadas. Executamos inicialmente o teste de pressão de ruptura com a anastomose *in situ*. Com isso foi possível

manter as aderências intra-abdominais e a contribuição destas para a anastomose. Em seguida realizamos o teste de ruptura da anastomose com 50% da circunferência da anastomose, entre a borda mesentérica e a borda antimesentérica. Desta forma conseguimos realizar no mesmo modelo experimental os dois testes.

Possivelmente a realização inicial do teste de pressão de ruptura da anastomose influenciou os resultados da força de ruptura. No entanto foi possível avaliar a mesma anastomose com os dois testes.

Neste estudo não observamos diferença entre os grupos avaliando-se os parâmetros de resistência da anastomose. Tanto a pressão de ruptura, quanto a força de ruptura da anastomose não foram influenciados pela pressão ou pelo tipo de gás.

O colágeno é o principal responsável pela força anastomótica. Há mais de um século já foi observado que a submucosa é a camada mais forte do intestino, sendo composta quase inteiramente por colágeno (HENDRICKS; MASTBOOM, 1990). Os principais tipos de colágeno são o tipo I e tipo III. O tipo I apresenta fibras largas, mais resistentes a forças mecânicas. Já o tipo III, que aumenta em tecidos em cicatrização, apresenta fibras de pequeno diâmetro, menos resistentes (HENDRICKS; MASTBOOM, 1990).

A síntese de colágeno é influenciada pela resposta inflamatória (ROSCH et al., 2006). O aumento da atividade inflamatória, que ocorre por exemplo na presença de infecção, aumenta a degradação de colágeno, contribuindo com a deiscência anastomótica (HENDRICKS; MASTBOOM, 1990). O aumento da pressão intra-abdominal em ratos acima de 20 mmHg aumenta a atividade inflamatória em estudos experimentais em ratos, piorando a cicatrização (POLAT et al., 2002). Já o CO₂ apresenta uma atividade mediadora do processo inflamatório (HANLY et al., 2003; SIDO et al., 2004). Este efeito do CO₂ poderia atenuar a resposta inflamatória melhorando a qualidade e a quantidade da síntese de colágeno.

Ao se analisar o colágeno por histomorfometria, observamos um aumento da quantidade de colágeno com o uso de CO₂, com diferença estatística em relação ao hélio na pressão de 20 mmHg. Nesta pressão, 20 mmHg, há grande atividade inflamatória (POLAT et al., 2002). O gás hélio não influi na atividade inflamatória (SIDO et al., 2004). A diminuição do colágeno

com o uso do gás hélio na pressão de 20 mmHg pode ser devido ao efeito da atividade inflamatória na síntese do colágeno. O mesmo não foi observado com o uso do CO₂. Possivelmente a ação mediadora deste gás no processo inflamatório preservou a síntese do colágeno, o que explica os nossos achados.

Não verificamos diferença estatística quando utilizamos a hidroxiprolina para medirmos o colágeno. A hidroxiprolina é um aminoácido encontrado nas proteínas do colágeno nos tecidos. A concentração de hidroxiprolina está relacionada com a quantidade de colágeno presente. No entanto, diferentes tipos de colágeno apresentam quantidades diferentes de hidroxiprolina. O colágeno tipo III contém maior quantidade de hidroxiprolina que o colágeno tipo I (HENDRICKS; MASTBOOM, 1990). Isto deve ter influenciado os nossos achados, já que a atividade inflamatória atua na síntese, degradação e no tipo do colágeno presente.

Em 1904, Christian Bohr descreveu a curva de dissociação de oxigênio-hemoglobina e a influência do CO₂ e do pH na liberação de O₂ pela hemoglobina no tecido. A diminuição do pH ocasionado pelo CO₂ potencializa o efeito Bohr no interior da hemácia, desviando para a direita a curva de dissociação do oxigênio da hemoglobina (JENSEN, 2004). A administração transcutânea de CO₂ utiliza este princípio para tratamento de feridas crônicas, isquêmicas, em extremidades, com finalidade de aumentar a oferta de oxigênio tecidual e promover sua cicatrização (BRANDI et al., 2010, ABRAMO; TEIXEIRA, 2011, DURÃES, 2012). A aplicação transcutânea de CO₂ aumenta o número e o diâmetro dos capilares em úlceras crônicas de membros inferiores (ABRAMO; TEIXEIRA, 2011). Seguindo o mesmo conceito, na cirurgia laparoscópica, o CO₂ e a redução do pH poderia aumentar a oferta de oxigênio na anastomose intestinal, além de aumentar a quantidade de vasos. Em nosso estudo, a imunohistoquímica para CD31 não evidenciou aumento da densidade de microvasos com o uso de CO₂ em relação ao gás hélio ou em relação a cirurgia aberta.

O fator de crescimento vascular endotelial é um potente indutor da angiogênese. A hipóxia é um grande indutor da produção de VEGF (LI et al., 2003). Apesar de se acreditar que o CO₂ na laparoscopia pode causar um ambiente de hipóxia, foi demonstrado que a cirurgia laparoscópica leva a um

menor aumento do VEGF no plasma em relação à cirurgia aberta (GOLDFARB et al., 2010). Possivelmente a ação mediadora do CO₂ na resposta inflamatória contribui para este menor aumento do VEGF. Em nosso estudo, no tecido anastomótico, não observamos diferença na expressão de VEGF.

O processo cicatricial é complexo. Neste estudo foram utilizados vários parâmetros de cicatrização para avaliarmos a anastomose colorretal. Verificamos que a pressão de 20 mmHg levou a maior redução de peso dos animais em relação a cirurgia aberta. Não observamos diferença entre o uso de pneumoperitônio com dióxido de carbono, pneumoperitônio com gás hélio, ou na ausência de pneumoperitônio na cirurgia aberta nos achados intra-operatórios e nos parâmetros mecânicos, histopatológicos, imunohistoquímicos e bioquímicos utilizados para a avaliação da anastomose colônica. Verificamos que houve aumento na quantidade de colágeno no estudo histomorfométrico com uso do dióxido de carbono em relação ao gás hélio na pressão de 20 mmHg, possivelmente devido a ação mediadora do CO₂ na resposta inflamatória.

6 CONCLUSÃO

Nas condições experimentais em que o trabalho foi realizado, o pneumoperitônio com dióxido de carbono mostrou-se seguro, não influenciando o processo cicatricial de anastomoses em cólon esquerdo de ratos na pressão intra-abdominal de uso terapêutico, representada por 5 mmHg e em vigência de uma leve hipertensão intra-abdominal, na pressão de 12 mmHg. Em vigência de grande hipertensão intra-abdominal, representada pela pressão de 20 mmHg, à avaliação histomorfométrica, houve um aumento do percentual de colágeno na anastomose em relação ao hélio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, M.A. Anastomotic leak: should we continue to accept the risks? **Dis Colon Rectum**. 2010;53(6):859-860.

ABRAMO, A.C. Infusão controlada do CO₂: carboinsuflação. São Paulo: Ed. Do Autor 2010.

ABRAMO, A.C.; TEIXEIRA, T.T. Carboinsuflação em úlceras crônicas dos membros inferiores. **Rev.Bras. Cir. Plást.** 2011; 26 (2): 105-210

ADAS, G.; PERCEM, A.; ADAS, M.; KEMIK, O.; ARIKAN, S.; USTEK, D.; ÇAKIRIS, A.; ABACI, N.; KEMIK, A.S.; KAMALI, G.; KARAHAN, S.; AKÇAKAYA A.; KARATEPE, O. VEGF-A and FGF gene therapy accelerate healing of ischemic colonic anastomoses (experimental study). **International Journal of Surgery**. 2011; 9: 467-471.

ARUNG, W.; DRION, P.; CHERAMY, J.P.; HONORÉ, P.; MEURISSE, M.; DEFRAIGNE, J.O.; DETRY, O. Intraperitoneal adhesions after open or laparoscopic abdominal procedure: an experimental study in the rat. **J Laparoendosc Adv Surg Tech A**. 2012;22(7):651-7.

AVITAL, S.; ITAH, R.; SZOMSTEN, S.; ROSENTHAL, R.; INBAR, R.; SCKOMIK, Y.; WEINBROUM, A. Correlation of CO₂ pneumoperitoneal pressures between rodents and humans. **Surg Endosc**. 2009;23(1):50-4.

BERGUER, R.; GUTT, C.N. Laparoscopic colon surgery in a rat model. A preliminary report. **Surg Endosc**. 1994; 8: 1195-1197.

BERGUER, R.; CORNELIUS, T.; DALTON, M. The optimum pneumoperitoneum pressure for laparoscopic surgery in the rat model. A detailed cardiorespiratory study. **Surg Endosc**. 1997; 11:915-918.

BRANDI,C.; GRIMALDI,L.; NISI, G; BRAFA, A.; CAMPA, A.; CALABRÒ, M.; CAMPANA, M.; D'ANIELLO, C. The role of carbon dioxide therapy in the treatment of chronic wounds. **In Vivo** 2010; 24:223-226

BRETTTHAUER, M. Turning science into clinical practice – the case of carbon dioxide insufflation. **Endoscopy**. 2010; 42: 1104-1105.

BUUNEN, M.; VELDKAMP, R.; HOP, W.C.; KUHRY, E.; JEEKEL, J.; HAGLIND, E.; PAHLMAN, L.; CUESTA, M.A.; MSIKA, S.; MORINO, M.; LACY, A.; BONJER, H.J. Survival after laparoscopic surgery versus open surgery for colon cancer: long-term outcome of a randomized clinical trial. **Lancet Oncol**. 2009;10(1): 44-52.

CLINICAL OUTCOMES OF SURGICAL THERAPY STUDY GROUP. A comparison of laparoscopically assisted and open colectomy for colon cancer. **N Engl J Med** 2004; 350(20):2050–9.

DUBOIS, F.; BERTHELOT, G.; LEVARD, H. Laparoscopic cholecystectomy: historic perspective and personal experience. **Surg Laparosc Endosc.** 1991;1(1):52-7.

DURÃES, E.F.R. **Efeitos da carboxiterapia na integração de enxertos condrocútâneos em coelhos.** Dissertação (Mestrado) 2012. Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília – UnB.

DURÃES, L.C. **Efeitos do pneumoperitônio com dióxido de carbono na cicatrização de anastomoses colônicas. Estudo experimental em ratos.** Dissertação (Mestrado) 2010. Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília – UnB.

FERREIRA, J.C.T.; HADDAD, A; TAVARES, S.A.N. Increase in collagen turnover induced by intradermal injection of carbon dioxide in rats. **Journal of Drugs in Dermatology.** 2008;7:201-206.

FUENTES, J.M. et al. CO₂ abdominal insufflation pretreatment increases survival after a lipopolysaccharide-contaminated laparotomy. **J Gastrointest Surg.** 2006; 10:32-38.

GERGES, F.J.; KANAZI, G.E.; JABBOUR-KHOURY, SI. Anesthesia for laparoscopy: a review. **J Clin Anesth.** 2006;18(1):67-78.

GOITEN, D.; PAPASAVAS, P.; YEANEY, W.; GAGNÉ, D.; HAYETIAN, F.; CAUSHAJ, P.; KEENAN, R.; LANDRENEAU, R. Microsphere intestinal blood flow analysis during pneumoperitoneum using carbon dioxide and helium. **Surg Endosc.** 2005;19(4):541-5.

GOLDFARB, M.; BROWER, S.; SCHWAITZBERG, S.D. Minimally invasive surgery and cancer: controversies part 1. **Surg Endosc.** 2010; 24: 304-334.

GRECA, F.H.; SOUZA FILHO, Z.A.; GIOVANINI, A.; CAMARGO JUNIOR, C.A.; RUBIN, M.R.; SILVA, R.F. Interleukin-6 (IL-6) influence on colonic anastomosis healing in rats. **Acta Cir Bras.** 2007;22(2):110-4.

GUILLOU, P.J.; QUIRKE, P.; THORPE, H.; WALKER, J.; JAYNE, D.G.; SMITH, A.M.; HEATH, R.M.; BROWN, J.M.; MRC CLASICC TRIAL GROUP. Short-term endpoints of conventional versus laparoscopic-assisted surgery in patients with colorectal cancer (MRC CLASICC trial): multicentre, randomized controlled trial. **Lancet.** 2005; 14-20:365(9472):1718-26.

GUTT, C.N.; ONIU, T.; MEHRABI, A.; SCHEMMER, P.; KASHFI, A.; KRAUS, T.; BUCHLER, M.W. Circulatory and respiratory complications of carbon dioxide insufflations. **Dig Surg.** 2004;21(2):95-105.

GUTT, C.N., SCHMANDRA, T.C. Portal venous flow during CO₂ pneumoperitoneum in the rat. **Surg Endosc.** 1999; 13:902-905.

GUTT, C.N., RIEMER, V., BRIER, C., BERGUER, R., PAOLUCCI, V. Standardized technique of laparoscopic surgery in the rat. **Dig Surg.** 1998; 15:135-139.

HANLY, E.J.; Mendoza-Sagaon, M.; Murata, K.; Hardacre J.M.; De Maio A.; Talamini M.A. CO₂ Pneumoperitoneum modifies the inflammatory response to sepsis. **Annals of Surgery.** 2003; 237(3): 343-350.

HERRMANN JB, WOODWARD SC, PULASKI EJ. Healing of colonic anastomoses in the rat. **Surg Gynecol Obstet.** 1964; 119:269-275.

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

IKEUCHI D, ONODERA H, AUNG T, KAN S, KAWAMOTO K, IMAMURA M, MAETANI. Correlation of tensile strength with bursting pressure in the evaluation of intestinal anastomosis. **Dig Surg.** 1999;16:478-485.

IVATURY, R.R.; DIEBEL, L.; PORTER, J.M.; SIMON, R.J. Intra-abdominal hypertension and the abdominal compartment syndrome. **Surg Clin North Am.** 1997;77(4):783-800.

JACOBS, M.; VERDEJA, J. C.; GOLDSTEIN, H. S. Minimally invasive colon resection (laparoscopic colectomy). **Surg Laparosc Endosc.** 1991;1(3):144-50.

JACOB, B. P.; SALKY, B. Laparoscopic colectomy for colon adenocarcinoma: an 11-year retrospective review with 5-year survival rates. **Surg Endosc.** 2005;19(5):643-9.

JACOBI, C.A.; STERZEL, A.; BRAUMANN, C.; HALLE, E.; STÖBLEIN, R.; KRÄHENBÜHL, L.; MÜLLER, J.M. The impact of conventional and laparoscopic colon resection (CO₂ or helium) on intraperitoneal adhesion formation in a rat peritonitis model. **Surg Endosc.** 2001; 15:380-386.

JAYNE, D.G.; GUILLOU, P.J.; THORPE, H.; QUIRKE, P.; COPELAND, J.; SMITH, A.M.; HEATH, R.M.; BROWN, J.M.; UK MRC CLASICC TRIAL GROUP. Randomized trial of laparoscopic-assisted resection of colorectal carcinoma: 3-year results of the UK MRC CLASICC Trial Group. **J Clin Oncol.** 2007;20;25(21):3061-8.

JENSEN, F.B. Red blood cell ph, the bohr effect, and other oxygenation-linked phenomena in blood O₂ and CO₂ transport. **Acta Physiol Scand** 2004; 182:215-227

JORGENSEN, J.O.; LALAK, N.J.; HUNT, D.R. Is laparoscopy associated with a lower rate of postoperative adhesions than laparotomy? A comparative study in the rabbit. **Aust N Z J Surg.** 1995;65(5):342-4.

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

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

KOLOGLU, M.; SAYEK, I.; KOLOGLU, L.B.; ONAT, D. Effect of persistently elevated intraabdominal pressure on healing of colonic anastomoses. **Am J Surg**. 1999;178(4):293-7.

KORUDA, M. J.; ROLANDELLI, R. H. Experimental studies on the healing of colonic anastomoses. **J Surg Res**. 1990;48(5):504-15.

KUHRY, E.; SCHWENK, W.; GAUPSET, R.; ROMILD, U.; BONJER, J. Long-term outcome of laparoscopic surgery for colorectal cancer: a Cochrane systematic review of randomized controlled trials. **Cancer Treat Rev**. 2008;34(6):498-504.

LACY, A.M.; DELGADO, S.; CASTELLS, A.; PRINS, H.A.; ARROYO, V.; IBARZABAL, A.; PIQUE, J.M. The long-term results of a randomized clinical trial of laparoscopy-assisted versus open surgery for colon cancer. **Ann Surg**. 2008;248(1):1-7

LEE, G.S.K. Carbon dioxide therapy in the treatment of cellulite: an audit of clinical practice. **Aesth Plast Surg**. 2010; 34:239-243.

LI J, ZHANG YP, KIRSNER RS. Angiogenesis in wound repair: angiogenic growth factors and the extracellular matrix. **Microsc Res Tech**. 2003; 60:107-114.

MACHADO, M.C.C. et al. CO₂ abdominal insufflation decreases local and systemic inflammatory response in experimental acute pancreatitis. **Pancreas**. 2010; 32(2): 175-181.

MANSON P, ZHANG XW, JEPPESSON B, THORLACIUS H. Anastomotic Healing in the rat colon: comparison between a radiological method, breaking strength and bursting pressure. **Int J Colorectal Dis**. 2002; 17:420-425.

MATSUZAKI, S., JARDON, K., MALEYSSON, E., D'ARPIANY, F., CANIS, M., BAZIN, J.E., MAGE, G. Carbon dioxide pneumoperitoneum, intraperitoneal ressure, and peritoneal tissue hypoxia: a mouse study with controlled respiratory suppor. **Surg Endosc**. 2010; 24:2871-2880.

MEDUGORAC, I. Collagen content in different areas of normal and hypertrophied rat myocardium. **Cardiov Res**. 1980; 14:551-554.

MENES,T. ; SPIVAK, H. Laparoscopy. Searching for the proper insufflation gas. **Surg Endosc**. 2000; 14:1050-1056.

MEYER, F.; IOSHII, S.O.; CHIN, E.W.K.; ESSER, D.M.; MARCONDES, R.T.; PATRIANI, A.H.; PIMPÃO, B de F. Laparoscopic partial nephrectomy in rats. **Acta Cir. Bras.** 2007;22(2):152-6.

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

MYNBAEV, O.A., ADAMYAN, L.V., MAILOVA, K., VANACKER, B., KONINCKX, P.R. Effects of adding small amounts of oxygen to a carbon dioxide-pneumoperitoneum of increasing pressure in rabbit ventilation models. **Fertility and Sterility.** 2009; 92(2): 778-784.

NACH, R., ZANDIFAR, H., GUPTA, R., HAMILTON, J.S. Subcutaneous carboxytherapy injection for aesthetic improvement of scars. **ENT – Ear, Nose & Throat Journal.** 2010; Feb:64-65.

NAIR, S.K.; BHAT, I.K.; AURORA, A.L. Role of proteolytic enzyme in the prevention of postoperative intraperitoneal adhesion. **Arch Surg** 1974; 108(6): 849-853.

NEUBERGER, T.J.; ANDRUS, C.H.; WITTGEN, C.M.; WADE, T.P.; KAMINSKI, D.L. Prospective comparison of helium versus carbon dioxide pneumoperitoneum. **Gastrointest Endosc.** 1996;43(1):38-41.

OLIVEIRA, P.G.; SOARES, E.G.; APRILLI, F. Influence of misoprostol, a synthetic prostaglandin E1 analog, on the healing of colonic anastomoses in rats. **Dis Colon Rectum.** 1994;37(7):660-663

PIAZZOLA, L.P. **Estudo da evolução de úlceras vasculares sob a ação de carboxiterapia.** Dissertação (Mestrado) 2011. Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília – UnB.

POLAT, C.; ARIKAN, Y.; VATANSEV, C.; AKBULUT, G.; YILMAZ, S.; DILEK, F.H.; GOKÇE, O. The effects of increased intraabdominal pressure on colonic anastomoses. **Surg Endosc.** 2002;16(9):1314-9.

POSMA, L.A.E.; BLEICHRODT, R.P.; VAN GOOR, H.; HENDRIKS, T. Transient profound mesenteric ischemia strongly affects the strength of intestinal anastomoses in the rat. **Dis Colon Rectum.** 2007; 50:1-10.

POSMA, L.A.E.; BLEICHRODT, R.P.; LOMME, R.M.L.M.; DE MAN, B.M.; VAN GOOR, H.; HENDRIKS, T. Early anastomotic repair in the rat intestine is affected by transient preoperative mesenteric ischemia. **J Gastrointest Surg.** 2009; 13:1099-1106.

POSMA, L.A.E.; HENDRIKS, T.; VERHOFSTAD, A.A.J.; DEMAN, B.M.; LOMME, R.M.L.M.; BLEICHRODT, R.P. Reduction of oxygenation and blood flow in pedicled bowel segments in the rat and its consequences for anastomotic healing. **Dis Colon Rectum.** 2010; 53:93-100.

RABAU, M.Y.; HIRSHBERG, A.; HISS, Y.; DAYAN, D. Intestinal anastomosis healing in rat: collagen concentration and histochemical characterization by Picrosirius red staining and polarizing microscopy. **Exp Mol Pathol.** 1995;62(3):160-5.

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

REGADAS, F.S.P.; NICODEMO, A.M.; RODRIGUES, L.V.; GARCIA, J.H.P.; NÓBREGA, A.G.S. Anastomose colorretal por via laparoscópica – apresentação de dois casos e descrição da técnica operatória. **Rev Bras Colo-Proct.** 1992;12(1):21-23.

REGADAS, F.S.P.; RODRIGUES, L.V.; NICODEMO, A.M.; SIEBRA, J.A. Intervenções colorretais videolaparoscópicas. Experiência de 102 casos. **Rev Bras Colo-Proct.** 1995;15(3):110-113.

ROSCH, R.; JUNGE, K.; BINNEBÖSEL, M.; MIRGARTZ, N; KLINGE, U; SCHUMPELICK, V. Impact of pressure and gas type on anastomotic wound healing in rats. **Langenbecks Arch Surg.** 2004; 389: 261-266.

ROSCH, R.; STUMPF, M.; JUNGE, K.; DRINJAKOVIC, D.; SCHACHTRUPP, A.; AFIFY, M.; SCHUMPELICK, V. Influence of pneumoperitoneum on small bowel anastomoses: a histological analysis in the rat model. **J Invest Surg.** 2005;18:63-69.

ROSCH, R.; JUNGE, K.; BINNEBÖSEL, M.; BERTRAM, P.; KLINGE, U; SCHUMPELICK, V. Laparoscopy and collagen metabolism. **Hernia.** 2006; 10:507-510.

ROSSI LF, RAMOS RR, ELY JB, KESTERING DDE M, SOLDI MDA S, BRUM SP, D ACAMPORA AJ. Considerations that may influence the result of trials assessing tensile strength in experimental surgery. **Acta Cir Bras.** 2007;22(6):499-502.

SAFRAN, D. B.; ORLANDO, R. 3rd. Physiologic effects of pneumoperitoneum. **Am J Surg.** 1994;167(2):281-6.

SHARMA, K.C.; BRANDSTETTER, R.D.; BRENSILVER, J.M.; JUNG, L.D. Cardiopulmonary physiology and pathophysiology as a consequence of laparoscopic surgery. **Chest.** 1996;110(3):810-5.

SIDO, B.; TEKLOTE, J.R.; HARTEL, M.; FRIESS, H; BÜCHLER, M.W. Inflammatory response after abdominal surgery. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology.** 2004; 18(3):439-454.

SILVA, J.J.; SILVA, A.L.; PAULO, D.N.S. Subtotal laparoscopic splenectomy in rats with preservation of the inferior pole. **Acta Cir. Bras.** 2011;26(1):44-50.

SÖNMEZ, A. et al. Carbon dioxide therapy increases capillary formation on random pedicled skin flaps in the rat. **Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery**. 2009; 62, e236-e237.

SOUSA, J.B.; SOARES, E.G.; APRILLI, F. Effects of diclofenac sodium on intestinal anastomotic healing. Experimental study on the small intestine of rabbits. **Dis Colon Rectum**. 1991;34(7):613-7.

STEGEMANN, H.; STALDER, K. Determination of hydroxyproline. **Clin Chim Acta**. 1967;18:267-273.

TYTGAT, S; RIJKERS, G.T.; VAN DER ZEE, D.C. The influence of the CO₂ pneumoperitoneum on a rat model of intestinal anastomosis healing. **Surg Endosc**. 2012; 26:1642-1647.

VELDKAMP, R.; KUHRY, E.; HOP, W.C.; JEEKEL, J.; KAZEMIER, G.; BONJER, H.J.; HAGLIND, E.; PAHLMAN, L.; CUESTA, M.A.; MSIKA, S.; MORINO, M.; LACY, A.M.; COLON CANCER LAPAROSCOPIC OR OPEN RESECTION STUDEY (COLOR). Laparoscopic surgery versus open surgery for colon cancer: short-term outcomes of a randomized trial. **Lancet Oncol**. 2005;6(7):477-84.

WEIBER S, JIBORN H, ZEDERFELDT B. Preoperative irradiation and colonic healing. **Eur J Surg** 1994;160:47-51.

APÊNDICES

APÊNDICE A – PESO NO DIA DA OPERAÇÃO E NO DIA DA EUTANÁSIA NOS ANIMAIS DO GRUPO I. PESO EM GRAMAS.

Grupo I					
I-CO2			I-He		
Animal	Peso Inicial	Peso Final	Animal	Peso Inicial	Peso Final
1	269	263	4	296	290,4
8	281	285	11	303	278
16	340	305,5	20	326	273
22	419,9	416,1	28	400	380
29	356	329,5	33	389,2	382
39	340	278	42	356	302,4
48	360	334,3	43	372	343,2
50	303,5	286,6	53	350,5	338,2
63	317,7	341,2	57	321,6	319,4
70	340	304	67	363	343

APÊNDICE B – PESO NO DIA DA OPERAÇÃO E NO DIA DA EUTANÁSIA NOS ANIMAIS DO GRUPO II. PESO EM GRAMAS.

Grupo II					
II-CO2			II-He		
Animal	Peso Inicial	Peso Final	Animal	Peso Inicial	Peso Final
2	244	220	5	276	270,5
9	376	347	12	370	348
15	291	282,5	19	305	251
25	398,5	362,6	26	385	335
30	405	364,5	34	378	347
38	405	340	40	379	348
47	361	311	44	337	322,3
51	286,5	267,3	55	327,8	313,4
61	305,6	276,4	60	309,1	299,8
69	414	368	66	310	292

APÊNDICE C – PESO NO DIA DA OPERAÇÃO E NO DIA DA EUTANÁSIA NOS ANIMAIS DO GRUPO III. PESO EM GRAMAS.

Grupo III					
III-CO2			III-He		
Animal	Peso Inicial	Peso Final	Animal	Peso Inicial	Peso Final
3	259	237,2	6	286	273,4
10	330	317	13	365	344
17	307	283,6	18	290	252
24	398,5	327	27	365	313
32	407	346,9	35	396	370
36	406	367	41	417	377,2
46	371	337,6	45	338	277,4
52	319,5	300,4	54	310,4	262,7
62	348,2	333,7	59	352,3	336,8
68	370	314	64	370	309,4

APÊNDICE D – PESO NO DIA DA OPERAÇÃO E NO DIA DA EUTANÁSIA NOS ANIMAIS DO GRUPO IV. PESO EM GRAMAS.

Grupo IV		
Animal	Peso Inicial	Peso Final
7	261	253
14	283	275
21	272	255
23	349,8	314,5
31	398	360,5
37	400	368
49	312	282,8
56	345,3	330,3
58	339,4	338,8
65	319	286

APÊNDICE E – TESTE DE PRESSÃO DE RUPTURA DA ANASTOMOSE COLÔNICA DOS ANIMAIS DO GRUPO I. VALORES EM MMHG.

Grupo I				
I – CO2			I - He	
Animal	Teste	Animal	Teste	
1	193,6	4	140,2	
8	224,5	11	236,6	
16	159,9	20	170,6	
22	63	28	207,9	
29	165	33	113,1	
39	0	42	249,3	
48	274,3	43	197,7	
50	130	53	206,6	
63	222,1	57	217,6	
70	228,4	67	256,9	

APÊNDICE F – TESTE DE PRESSÃO DE RUPTURA DA ANASTOMOSE COLÔNICA DOS ANIMAIS DO GRUPO II. VALORES EM MMHG.

Grupo II				
II – CO2			II - He	
Animal	Teste	Animal	Teste	
2	149,9	5	229,6	
9	202,8	12	206,7	
15	182,6	19	120,5	
25	203	26	160,6	
30	253,3	34	252,8	
38	148,8	40	269,9	
47	199,6	44	257	
51	196,1	55	148,5	
61	158	60	197,2	
69	253,4	66	217,8	

APÊNDICE G – TESTE DE PRESSÃO DE RUPTURA DA ANASTOMOSE COLÔNICA DOS ANIMAIS DO GRUPO III. VALORES EM MMHG.

Grupo III			
III – CO2		III - He	
Animal	Teste	Animal	Teste
3	176,9	6	218,8
10	143,5	13	174,6
17	198,8	18	192,7
24	112,6	27	179,3
32	188,4	35	223,4
36	251,7	41	196,3
46	271,5	45	268,6
52	186,1	54	157,4
62	205,1	59	207,7
68	156,5	64	139,6

APÊNDICE H – TESTE DE PRESSÃO DE RUPTURA DA ANASTOMOSE COLÔNICA DOS ANIMAIS DO GRUPO IV. VALORES EM MMHG.

Grupo IV	
Animal	Teste
7	160
14	63,7
21	251,4
23	105,8
31	165,4
37	314
49	199,6
56	221,3
58	260,5
65	260,5

APÊNDICE I – TESTE DE FORÇA DE RUPTURA DA ANASTOMOSE COLÔNICA DOS ANIMAIS DO GRUPO I. VALORES EM NEWTON.

Grupo I			
I – CO2		I - He	
Animal	Teste	Animal	Teste
1	0,31	4	0,39
8	0,41	11	0,43
16	0,29	20	0,52
22	0,27	28	0,37
29	0,41	33	0,17
39	0,07	42	0,27
48	0,27	43	0,23
50	0,13	53	0,23
63	0,21	57	0,15
70	0,52	67	0,35

APÊNDICE J – TESTE DE FORÇA DE RUPTURA DA ANASTOMOSE COLÔNICA DOS ANIMAIS DO GRUPO II. VALORES EM NEWTON.

Grupo II				
II – CO2		II - He		
Animal	Teste	Animal	Teste	
2	0,17	5	0,25	
9	0,21	12	0,27	
15	0,25	19	0,19	
25	0,27	26	0,05	
30	0,35	34	0,07	
38	0,37	40	0,27	
47	0,11	44	0,17	
51	0,25	55	0,23	
61	0,33	60	0,25	
69	0,56	66	0,27	

APÊNDICE K – TESTE DE FORÇA DE RUPTURA DA ANASTOMOSE COLÔNICA DOS ANIMAIS DO GRUPO III. VALORES EM NEWTON.

Grupo III				
III – CO2		III – He		
Animal	Teste	Animal	Teste	
3	0,41	6	0,35	
10	0,33	13	0,19	
17	0,07	18	0,35	
24	0,05	27	0,21	
32	0,45	35	0,39	
36	0,11	41	0,43	
46	0,03	45	0,17	
52	0,21	54	0,25	
62	0,23	59	0,13	
68	0,21	64	0,27	

APÊNDICE L – TESTE DE FORÇA DE RUPTURA DA ANASTOMOSE COLÔNICA DOS ANIMAIS DO GRUPO IV. VALORES EM NEWTON.

Grupo IV	
Animal	Teste
7	0,43
14	0,07
21	0,21
23	0,21
31	0,07
37	0,43
49	0,31
56	0,21
58	0,41
65	0,21

APÊNDICE T – DOSAGEM DA HISTOMORFOMETRIA DO COLÁGENO DAS ANASTOMOSES COLÔNICA DOS ANIMAIS DO GRUPO I. VALORES EM PERCENTUAL DE COLÁGENO POR FOTO.

Grupo I								
I-CO2			I-He					
Animal	Foto	Valor	Animal	Foto	Valor	Animal	Foto	Valor
1	1	0,3	4	15	1,1	33	145	0
1	2	0,3	4	16	2,9	33	146	0,5
8	29	0,3	4	17	1,8	33	147	0,3
8	30	1,3	4	18	5,7	33	148	0,4
8	31	0,5	11	37	1,9	42	195	0,1
22	97	1,7	11	38	1,1	42	196	0,1
22	98	0	11	39	1,2	42	197	0
22	99	0,5	20	76	0,1	42	198	0
22	100	0,1	20	77	0	42	199	0
39	180	1,5	20	78	0,1	42	200	1,1
39	181	0,8	20	79	0	42	201	0,3
39	182	0,7	20	80	0	42	202	0,2
39	183	1	20	81	0,2	43	203	1,8
50	229	0	20	82	0,5	43	204	4,9
50	230	0,1	20	83	0,1	43	205	1,7
50	231	0,2	20	84	0	43	206	3,7
50	232	0	20	85	0,1	43	207	2,5
50	233	0	20	86	1,1	53	242	1,3
63	300	0,5	20	87	0,8	53	243	2,9
63	301	0,5	20	88	0	53	244	0,8
63	302	0	20	89	0,7	53	245	0,8
63	303	1,6	20	90	1,3	53	246	2,3
70	321	0,4	20	91	0	53	247	0,3
70	322	2	20	92	0,4	57	270	1,2
70	323	0,2	20	93	0,7	57	271	1,6
70	324	3,8	28	122	2,9	67	310	4,6
			28	123	1,3	67	311	11,7
			28	124	0,8	67	312	10,5
			28	125	1,7			

APÊNDICE U – DOSAGEM DA HISTOMORFOMETRIA DO COLÁGENO DAS ANASTOMOSES COLÔNICA DOS ANIMAIS DO GRUPO II. VALORES EM PERCENTUAL DE COLÁGENO POR FOTO.

Grupo II								
II-CO2			II-He					
Animal	Foto	Valor	Animal	Foto	Valor	Animal	Foto	Valor
2	3	1,3	38	174	0,2	5	19	2,6
2	4	0,9	38	175	0,6	5	20	0,2
2	5	7	38	176	0,1	5	21	1,6
2	6	4,8	38	177	0,4	5	22	0,3
2	7	4,8	38	178	0,1	5	23	0,8
2	8	0,2	38	179	0,4	12	40	2,1
9	32	2,8	47	213	0,4	12	41	1,7
9	33	2,9	47	214	0,4	19	73	1,3
15	57	3,3	47	215	1,5	19	74	3,8
15	58	2,5	47	216	0	19	75	4,3
15	59	1,2	47	217	0,7	26	109	0,6
15	60	1,5	47	218	0	26	110	1,8
25	107	0,7	47	219	0	26	111	0,1
25	108	0,6	47	220	0,2	26	112	0,1
30	126	3,2	51	234	0,6	34	149	0,4
30	127	0,8	51	235	0	34	150	0,4
30	128	7,8	51	236	1,2	34	151	1,8
30	129	0,6	51	237	0,1	40	184	1,3
30	130	1,5	61	288	2	40	185	0,5
30	131	0,4	61	289	2	40	186	1,3
38	168	0,9	61	290	2,6	40	187	3,1
38	169	0,5	61	291	0,1	44	208	0,9
38	170	0,4	61	292	0	44	209	2,5
38	171	0,3	61	293	3,3	55	266	0,4
38	172	0	69	319	0,1	55	267	0,5
38	173	0,2	69	320	2,5	60	282	4,4
						60	283	0,2
						60	284	4,9
						60	285	0,2
						60	286	1,9
						60	287	0,5
						66	308	1,1
						66	309	3,2

APÊNDICE V – DOSAGEM DA HISTOMORFOMETRIA DO COLÁGENO DAS ANASTOMOSES COLÔNICA DOS ANIMAIS DO GRUPO III. VALORES EM PERCENTUAL DE COLÁGENO POR FOTO.

Grupo III											
III-CO2						III-He					
Animal	Foto	Valor	Animal	Foto	Valor	Animal	Foto	Valor	Animal	Foto	Valor
3	9	0,2	36	162	0	6	24	1,1	41	189	1,9
3	10	2,7	36	163	3	6	25	1,6	41	190	0,1
3	11	0,1	36	164	2,1	6	26	0,3	41	191	1
3	12	2,4	36	165	2,1	13	42	0,4	41	192	0,6
3	13	0,7	46	210	0,2	13	43	1,9	41	193	0,8
3	14	2,3	46	211	1	13	44	0	41	194	1,5
10	34	1,2	46	212	0	13	45	0,4	54	248	0,3
10	35	2,8	52	238	0,9	13	46	0,7	54	249	0,7
10	36	1,7	52	239	1,4	13	47	0,3	54	250	1,1
17	61	0,4	52	240	0,5	18	64	0,2	54	251	0,2
17	62	0,1	52	241	1,1	18	65	1,1	54	252	0
17	63	0,1	62	294	0,2	18	66	2,9	54	253	0,5
32	139	3,8	62	295	2,5	18	67	1,1	54	254	0,6
32	140	4,1	62	296	3,6	18	68	0	54	255	0
32	141	4,6	62	297	4,4	18	69	0	54	256	0,2
32	142	2	62	298	1,9	18	70	0,1	54	257	3,2
32	143	0,2	62	299	5,3	18	71	0,1	54	258	0,1
32	144	0,2	68	313	2,2	18	72	1,4	54	259	4,4
36	157	0,7	68	314	2,9	27	113	0	54	260	2,4
36	158	1,6	68	315	0,5	27	114	0,9	54	261	0,1
36	159	0,6	68	316	1,3	27	115	0	54	262	0
36	160	3,1	68	317	0	27	116	0,6	54	263	3
36	161	3,2	68	318	1,4	27	117	0,9	54	264	0,1
						27	118	0,2	54	265	3,3
						27	119	0,9	59	278	1,6
						27	120	0,5	59	279	1,7
						27	121	1	59	280	1,1
						35	152	1,9	59	281	2
						35	153	0,9	64	304	0,6
						35	154	0	64	305	2,6
						35	155	0,7	64	306	0,1
						35	156	0	64	307	2,9
						41	188	0			

APÊNDICE W – DOSAGEM DA HISTOMORFOMETRIA DO COLÁGENO DAS ANASTOMOSES COLÔNICA DOS ANIMAIS DO GRUPO IV. VALORES EM PERCENTUAL DE COLÁGENO POR FOTO.

Grupo III								
Animal	Foto	Valor	Animal	Foto	Valor	Animal	Foto	Valor
7	27	2,9	23	102	0,2	49	222	0
7	28	2,6	23	103	1,5	49	223	1,4
14	48	0,1	23	104	0,8	49	224	0,5
14	49	0,2	23	105	1,2	49	225	0,7
14	50	0	23	106	3,8	49	226	0,1
14	51	0,2	31	132	2,4	49	227	0,8
14	52	0	31	133	1,5	49	228	0
14	53	0,5	31	134	0,5	56	268	3
14	54	0,8	31	135	0,7	56	269	0,7
14	55	0,9	31	136	3,5	58	272	5,8
14	56	0,7	31	137	0,5	58	273	0
21	94	0,4	31	138	4,4	58	274	1,4
21	95	1,9	37	166	0,4	58	275	1,5
21	96	0,4	37	167	3,2	58	276	0,6
23	101	0,8	49	221	0,7	58	277	3,8

APÊNDICE X – DOSAGEM DA HIDROXIPROLINA NO DIA DA OPERAÇÃO E NO DIA DA EUTANÁSIA DOS ANIMAIS DO GRUPO I. VALORES EM MG/G DE TECIDO.

Grupo I					
Animal	I-CO ₂		Animal	I-He	
	Hidroxirolina na operação	Hidroxirolina na eutanásia		Hidroxirolina na operação	Hidroxirolina na eutanásia
1	0,3	0,3	4	0,4	0,4
8	0,4	0,3	11	0,3	0,3
16	0,2	0,4	20	0,5	0,2
22	0,4	0,2	28	0,7	0,3
29	0,7	0,3	33	0,4	0,3
39	0,4	0,3	42	0,4	0,5
48	0,4	0,1	43	0,4	0,3
50	0,4	0,1	53	0,4	0,2
63	0,3	0,2	57	0,7	0,1
70	0,3	0,2	67	0,4	0,2

APÊNDICE Y – DOSAGEM DA HIDROXIPROLINA NO DIA DA OPERAÇÃO E NO DIA DA EUTANÁSIA DOS ANIMAIS DO GRUPO II. VALORES EM MG/G DE TECIDO.

Grupo II					
Animal	II-CO2		Animal	II-He	
	Hidroxirolina na operação	Hidroxirolina na eutanásia		Hidroxirolina na operação	Hidroxirolina na eutanásia
2	0,6	0,4	5	0,3	0,4
9	0,4	0,4	12	0,4	0,4
15	0,3	0,3	19	0,5	0,3
25	0,4	0,2	26	0,5	0,3
30	0,7	0,3	34	0,4	0,3
38	0,7	0,3	40	0,4	0,2
47	0,5	0,5	44	0,3	0,5
51	0,4	0,1	55	1,2	0,2
61	0,5	0,2	60	0,4	0,3
69	0,8	0,2	66	0,5	0,3

APÊNDICE Z – DOSAGEM DA HIDROXIPROLINA NO DIA DA OPERAÇÃO E NO DIA DA EUTANÁSIA DOS ANIMAIS DO GRUPO III. VALORES EM MG/G DE TECIDO.

Grupo III					
Animal	III-CO2		Animal	III-He	
	Hidroxirolina na operação	Hidroxirolina na eutanásia		Hidroxirolina na operação	Hidroxirolina na eutanásia
3	0,3	0,5	6	0,3	0,3
10	0,6	0,4	13	0,4	0,3
17	0,4	0,3	18	0,1	0,2
24	0,7	0,4	27	1,1	0,4
32	0,7	0,3	35	0,4	0,5
36	0,5	0,3	41	0,3	0,3
46	0,4	0,2	45	0,7	0,4
52	0,6	0,1	54	0,9	0,2
62	0,5	0,2	59	0,4	0,2
68	1,2	0,3	64	0,5	0,2

APÊNDICE AA – DOSAGEM DA HIDROXIPROLINA NO DIA DA OPERAÇÃO E NO DIA DA EUTANÁSIA DOS ANIMAIS DO GRUPO IV. VALORES EM MG/G DE TECIDO.

Grupo IV		
Animal	Hidroxirolina na operação	Hidroxirolina na eutanásia
7	0,3	0,4
14	0,7	0,3
21	0,5	0,4
23	0,4	0,4
31	0,6	0,4
37	0,4	0,2
49	0,4	0,1
56	0,4	0,2
58	0,3	0,2
65	0,5	0,3

APÊNDICE BB – EXPRESSÃO DO VEGF DOS ANIMAIS DO GRUPO I.

Grupo I			
I – CO2		I - He	
Animal	Expressão	Animal	Expressão
1	++	4	++
8	++	11	+++
16	++	20	+++
22	++	28	++
29	++	33	+++
39	++	42	+++
48		43	++
50	++	53	++
63	++	57	++
70	+++	67	++

APÊNDICE CC – EXPRESSÃO DO VEGF DOS ANIMAIS DO GRUPO II.

Grupo II			
II – CO2		II - He	
Animal	Expressão	Animal	Expressão
2	++	5	+++
9	++	12	++
15	+++	19	++
25	++	26	++
30	++	34	++
38	++	40	++
47	++	44	++
51	++	55	++
61	++	60	++
69	+++	66	++

APÊNDICE DD – EXPRESSÃO DO VEGF DOS ANIMAIS DO GRUPO III.

Grupo III			
III – CO2		III – He	
Animal	Expressão	Animal	Expressão
3	+++	6	++
10	++	13	++
17	++	18	++
24	++	27	++
32	+++	35	++
36	++	41	+++
46	++	45	++
52	++	54	++
62	++	59	+++
68	++	64	++

APÊNDICE EE – EXPRESSÃO DO VEGF DOS ANIMAIS DO GRUPO IV.

Grupo IV	
Animal	Expressão
7	++
14	+++
21	++
23	++
31	++
37	++
49	++
56	++
58	+++
65	

APÊNDICE FF – DENSIDADE DE MICROVASOS (CD 31) DOS ANIMAIS DO GRUPO I.

Grupo I			
I – CO2		I - He	
Animal	Densidade	Animal	Densidade
1	++	4	++
8	++	11	++
16	++	20	+++
22	++	28	++
29	++	33	+++
39	++	42	+++
48		43	++
50	++	53	++
63	++	57	++
70	++	67	++

APÊNDICE GG – DENSIDADE DE MICROVASOS (CD 31) DOS ANIMAIS DO GRUPO II.

Grupo II			
II – CO2		II - He	
Animal	Densidade	Animal	Densidade
2	++	5	+++
9	++	12	++
15	+++	19	+++
25	++	26	++
30	++	34	++
38	++	40	++
47	++	44	++
51	++	55	++
61	++	60	++
69	+++	66	++

APÊNDICE HH – DENSIDADE DE MICROVASOS (CD 31) DOS ANIMAIS DO GRUPO III.

Grupo III			
III – CO ₂		III – He	
Animal	Densidade	Animal	Densidade
3	++	6	++
10	++	13	++
17	++	18	++
24	++	27	++
32	++	35	++
36	++	41	+++
46	++	45	++
52	++	54	++
62	++	59	++
68	++	64	++

APÊNDICE II – DENSIDADE DE MICROVASOS (CD 31) DOS ANIMAIS DO GRUPO IV.

Grupo IV	
Animal	Densidade
7	++
14	+++
21	++
23	++
31	++
37	++
49	++
56	++
58	++
65	

ANEXOS**ANEXO A – APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA NO USO ANIMAL**

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

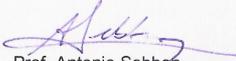
Brasília, 21 de fevereiro de 2011.



DECLARAÇÃO



Declaramos que o projeto intitulado **“EFEITOS DA PRESSÃO INTRA-ABDOMINAL PROVOCADA POR PNEUMOPERITÔNIO COM DIÓXIDO DE CARBONO NA CICATRIZAÇÃO DE ANASTOMOSES COLÔNICAS”**, UnBDOC nº 73136/2010, sob responsabilidade do Prof. Dr. João Batista Sousa, foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.



Prof. Antonio Sebben
Coordenador do CEUA

ANEXO B – DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSES

Os autores afirmam que não houve conflito de interesses (financeiros ou de outra natureza) na realização da pesquisa ou redação desta tese. O estudo não recebeu apoio financeiro de nenhum laboratório ou empresa farmacêutica.