



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Flávio Duarte Sabino

Cicatrização de anastomose colônica reforçada por esponja de colágeno revestida com fatores de coagulação (TachoSil®) em ratos submetidos à quimioterapia intraperitoneal perioperatória precoce com 5-fluorouracil

Rio de Janeiro

2013

Flávio Duarte Sabino

Cicatrização de anastomose colônica reforçada por esponja de colágeno revestida com fatores de coagulação (TachoSil®) em ratos submetidos à quimioterapia intraperitoneal perioperatória precoce com 5-fluorouracil

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Ruy Garcia Marques

Rio de Janeiro

2013

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

S116 Sabino, Flávio Duarte.

Cicatrização de anastomose colônica reforçada por esponja de colágeno revestida com fatores de coagulação (TachoSil[®]) em ratos submetidos a quimioterapia intraperitoneal perioperatória precoce com 5-fluorouracil/ Flávio Duarte Sabino. – 2013.

71 f.

Orientador: Ruy Garcia Marques

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas.

1. Neoplasias do Colo. 2. Quimioterapia – Teses. 3. Fluoracila. 4. Cicatrização. I. Marques, Ruy Garcia. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

CDU 616.348

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Flávio Duarte Sabino

Cicatrização de anastomose colônica reforçada por esponja de colágeno revestida com fatores de coagulação (TachoSil®) em ratos submetidos à quimioterapia intraperitoneal perioperatória precoce com 5-fluorouracil

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 18 de dezembro de 2013.

Orientador: Prof. Dr. Ruy Garcia Marques
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Banca Examinadora: _____
Prof. Dr. Marcos Bettini Pitombo
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Prof. Dr. Marcus Vinicius Motta Valadão da Silva
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Eduardo Haruo Saito
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Rio de Janeiro

2013

DEDICATÓRIA

Ao meu pai Silvio, em reconhecimento a uma vida dedicada à família e ao ensino, e como modelo de pai, homem, e verdadeiro mestre.

AGRADECIMENTOS

Um trabalho como este não seria possível sem a contribuição de várias pessoas, e a elas meus sinceros agradecimentos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ruy Garcia Marques, pela confiança depositada e pela excelência na orientação e auxílio durante a condução e execução deste projeto.

À Prof.^a Dra. Albanita Vianna Oliveira e aos médicos patologistas Carlos Frederico F. Campos e Marcele Nogueira S. Trotte, do Departamento de Histologia e Embriologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, pelo auxílio inestimável na execução do estudo histopatológico.

Ao Dr. Carlos Eduardo Rodrigues Caetano, médico-veterinário, e ao Sr. Domingos Henrique Souza Peçanha, bioterista, ambos do Laboratório de Cirurgia Experimental da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, pelo auxílio na realização dos procedimentos cirúrgicos.

À Clínica Oncotrat e sua equipe farmacêutica pelo fornecimento e manipulação do quimioterápico.

Aos Drs. Lutegard Vieira de Freitas e José Paulo de Jesus pelo apoio e flexibilização de carga horária, fundamentais para a viabilização da execução do projeto.

Aos Drs. Rodrigo Otávio de Castro Araújo e Marco Antônio Guimarães Corrêa Filho pelo companheirismo e constante incentivo.

Aos meus sogros, Wanda e Ricardo Leão, pelo carinho e apoio logístico domiciliar.

Aos meus avós, Léa e Arnóbio (*in memoriam*), cuja dedicação me permitiu chegar até aqui.

À minha mãe, Cléa, e irmãos, Silvia e Bruno, pelo incentivo durante toda minha vida acadêmica.

À minha mulher, Fernanda Leão, e minha filha Estela, pelo apoio incondicional e pela paciência e compreensão das horas roubadas ao seu convívio durante a pós-graduação.

RESUMO

SABINO, Flávio Duarte. *Cicatrização de anastomose colônica reforçada por esponja de colágeno revestida com fatores de coagulação (TachoSil®) em ratos submetidos a quimioterapia intraperitoneal perioperatória precoce com 5-fluorouracil*. 2013. 71 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

A administração intraperitoneal de 5-fluorouracil (5-FU) no pós-operatório imediato reduz a recorrência local e prolonga a sobrevida dos pacientes com câncer colônico. Contudo, esse tratamento também pode prejudicar a cicatrização das anastomoses intestinais. O objetivo deste estudo foi determinar os efeitos da quimioterapia (QT) intraperitoneal (IP) pós-operatória (PO) precoce com o 5-FU e da selagem anastomótica com o TachoSil® sobre o processo de cicatrização de anastomoses colônicas. Quarenta ratos foram divididos em quatro grupos (I - IV, com dez ratos em cada) e submetidos à secção do cólon esquerdo seguida por anastomose. As anastomoses dos ratos dos grupos II e IV foram cobertas com o TachoSil®. Solução salina (2 ml/dia – grupos I e II) ou 5-FU (20 mg/kg/dia – grupos III e IV) foi administrado por via IP uma vez ao dia, desde do procedimento cirúrgico até a morte programada dos animais no quarto dia pós-operatório. Foram realizadas medidas da pressão de ruptura e análise histopatológica das anastomoses. A perda relativa de peso foi significativamente maior nos animais do grupo III comparado a todos os demais grupos ($p=0,0004$). Não houve diferença significativa entre os grupos no que se refere à presença de fístulas, coleções perianastomóticas, sinais de dilatação intestinal pré-anastomótica ou aderências pós-operatórias. A pressão de ruptura foi significativamente menor no grupo III comparada a todos os demais grupos ($p=0,001$). A neoangiogênese foi significativamente menor no grupo III comparada aos grupos I e II ($p=0,05$). A infiltração fibroblástica foi significativamente maior no grupo I e em comparação ao grupo III ($p=0,035$). Não ocorreu diferença significativa entre os grupos no que concerne à presença de infiltração de células inflamatórias e deposição de colágeno. Os dados obtidos permitem concluir que a QT IP precoce com 5-FU afetou negativamente a fase inicial da cicatrização de anastomoses colônicas. Contudo, a selagem com o TachoSil® foi capaz de reverter alguns dos efeitos adversos decorrentes da QT.

Palavras-chave: Cicatrização anastomótica. 5-Fluorouracil. Quimioterapia intraperitoneal. TachoSil. Pressão de ruptura.

ABSTRACT

SABINO, Flávio Duarte. *Healing in colonic anastomosis covered with a Fibrin-thrombin coated sealant (TachoSil®) in rats submitted to early perioperative intraperitoneal chemotherapy with 5-fluorouracil*. 2014. 71 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

The administration of 5-fluorouracil (5-FU) during the early postoperative period can decrease local cancer recurrence but may also cause impairment of the anastomotic healing. This study examined the effects of the use of this therapy and of the anastomotic sealing with a fibrin-collagen patch (TachoSil®) on the healing of colon anastomoses. Forty male rats were divided into four groups (I to IV, 10 rats each) that underwent transection and anastomosis of the left colon. The anastomoses were covered with TachoSil® in groups II and IV. Saline solution (2 ml/day – groups I and II) or 5-FU (20 mg/kg/day; groups III and IV) was administered intraperitoneally (IP) once daily for three days. Bursting pressure (BP) was recorded and the anastomoses were examined macroscopically and graded histologically. The relative weight loss was significantly higher in group III than in the other groups ($p=0.0004$). Anastomotic dehiscence, postoperative adhesion formation, perianastomotic collections, and preanastomotic dilatation did not differ significantly among groups. BP was significantly lower in group III compared to all other groups ($p=0.001$). Neoangiogenesis was significantly lower in group III compared to groups I and II ($p=0.05$). Fibroblastic activity was significantly higher in group I compared to group III ($p=0.035$). Inflammatory cell infiltration and collagen deposition did not differ significantly among groups. Our results shown that the early postoperative IP chemotherapy with 5-FU impaired the healing of colon anastomoses. However, anastomotic sealing with TachoSil® reversed some of the negative effects of this therapy.

Keywords: Anastomotic healing. 5-Fluorouracil. Intraperitoneal chemotherapy.

TachoSil. Bursting pressure.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 – Confeção da anastomose colônica | 25 |
| Figura 2 – Perda relativa de peso..... | 31 |
| Figura 3 - Pressão de ruptura | 33 |
| Figura 4 - Avaliação histopatológica | 36 |
| Figura 5 – Graduação da infiltração de fibroblastos – Fotomicrografias..... | 37 |
| Figura 6 – Graduação da deposição de colágeno – Fotomicrografias..... | 38 |
| Figura 7 – Graduação da neovascularização – Fotomicrografias..... | 39 |
| Figura 8 – Graduação do infiltrado inflamatório – Fotomicrografias..... | 40 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – Escala de graduação de aderências..... | 27 |
| Tabela 2 – Escala de graduação histopatológica..... | 29 |
| Tabela 3 – Medidas das perdas de peso absoluta e relativa | 31 |
| Tabela 4 – Medidas da formação de aderências..... | 32 |
| Tabela 5 – Presença de dilatação pré-anastomótica e coleção perianastomótica.... | 33 |
| Tabela 6 – Medidas da pressão de ruptura..... | 34 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|--------|--|
| 5-FU | 5-fluorouracil |
| QT | Quimioterapia |
| IP | Intraperitoneal |
| PO | Pós-operatória |
| PR | Pressão de ruptura |
| CCR | Câncer colorretal |
| CP | Carcinomatose peritoneal |
| IV | Intravenoso |
| ASC | Área sob a curva |
| DPO | Dia pós-operatório |
| TGI | Trato gastrointestinal |
| EUA | Estados Unidos da América |
| UERJ | Universidade do Estado do Rio de Janeiro |
| SF | Soro fisiológico |
| HE | Hematoxilina-Eosina |
| TM | Tricrômico de Masson |
| PIR | Picrossirius red |
| n | Número de animais |
| ANOVA | Análise de variância |
| Inc | Incorporation |
| DP | Desvio padrão |
| Obj | Objetiva |
| MA | Membrana amniótica |
| GM-CSF | Fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos |
| LV | Leucovorin |
| IGF-I | Fator de crescimento análogo à insulina I |
| DNA | Ácido desoxiribonucléico |
| PDGF | Fator de crescimento derivado das plaquetas |
| TGF | Fator de crescimento transformador |
| MMP | Metaloproteinases de matriz |
| RNA | Ácido ribonucléico |
| RT-PCR | Reação em cadeia da polimerase por transcriptase reversa |

LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|------|------------------------|
| ® | marca registrada |
| ml | mililitro |
| mg | miligramas |
| kg | kilogramas |
| % | percentual |
| g | gramas |
| cm | centímetros |
| mm | milímetros |
| µm | micrómetros |
| °C | graus Celcius |
| mmHg | milímetros de mercúrio |

SUMÁRIO

| | | |
|------|---|----|
| | INTRODUÇÃO | 12 |
| 1 | OBJETIVO | 22 |
| 2 | MÉTODO | 23 |
| 2.1 | Aspectos éticos nos cuidados com animais | 23 |
| 2.2 | Descrição da amostra | 23 |
| 2.3 | Descrição dos grupos de estudo | 23 |
| 2.4 | Descrição do procedimento operatório | 24 |
| 2.5 | Aplicação do TachoSil® | 25 |
| 2.6 | Administração da droga | 26 |
| 2.7 | Estudo <i>post mortem</i> | 26 |
| 2.8 | Análise da evolução do peso corporal | 27 |
| 2.9 | Estudo funcional da anastomose | 27 |
| 2.10 | Análise histopatológica | 28 |
| 2.11 | Análise estatística | 29 |
| 3 | RESULTADOS | 30 |
| 3.1 | Mortalidade | 30 |
| 3.2 | Evolução do peso corporal | 30 |
| 3.3 | Ferida operatória | 32 |
| 3.4 | Fístula anastomótica | 32 |
| 3.5 | Aderências pós-operatórias | 32 |
| 3.6 | Dilatação intestinal pré-anastomótica | 33 |
| 3.7 | Coleções perianastomóticas | 33 |
| 3.8 | Avaliação funcional | 34 |
| 3.9 | Avaliação histopatológica | 35 |
| 4 | DISCUSSÃO | 41 |
| | CONCLUSÕES | 60 |
| | REFERÊNCIAS | 61 |
| | ANEXO – Comitê de ética em pesquisa | 71 |

INTRODUÇÃO

O câncer colorretal (CCR) é o segundo tumor mais prevalente, superado apenas pelo câncer de mama. Globalmente, acredita-se que ocorram cerca de 1.200.000 casos novos por ano, com mortalidade estimada em 609.000.¹ Segundo estatísticas do Instituto Nacional de Câncer, para o Brasil, no ano de 2012, esperam-se 14.180 casos novos de CCR em homens e 15.960 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 15 casos novos a cada 100 mil homens e 16 a cada 100 mil mulheres.²

Para os carcinomas invasivos em estágios I a III, o tratamento cirúrgico é direcionado pelo tamanho e localização tumorais. O procedimento cirúrgico padrão compõe-se de colectomia segmentar associada à ressecção da drenagem linfática regional e reconstrução intestinal imediata por meio de anastomose manual ou mecânica.

Está bem estabelecido que, na ausência de contraindicações médicas, pacientes com linfonodo positivo (estágio III) devem receber quimioterapia (QT) pós-operatória (PO).³ Já a condução ótima dos pacientes em estágio II permanece indefinida, podendo a QT ser indicada na presença de fatores de mau prognóstico, tais como obstrução ou perfuração da parede intestinal, padrão histológico pouco diferenciado e elevação pré ou pós-operatória do antígeno carcinoembrionário.³

A carcinomatose peritoneal (CP), definida como a disseminação e implantação de células neoplásicas através da superfície peritoneal,⁴ está presente em 10% a 15% dos pacientes com CCR no momento do diagnóstico.^{5,6} Ela progride mais rapidamente que as metástases parenquimatosas⁷ e é relativamente insensível à QT paliativa padrão.⁸ Infelizmente, seu diagnóstico pré-operatório é raramente possível, dada a baixa sensibilidade dos exames de imagem⁴ e, uma vez estabelecida, pode causar sintomas incapacitantes e apresenta prognóstico ruim, com sobrevida média de 6 a 8,5 meses.⁹

A CP também pode ser provocada pela esfoliação de células neoplásicas durante o tratamento cirúrgico, resultado da manipulação tumoral e da transecção de vasos sanguíneos e linfáticos,¹⁰ o que faz da superfície peritoneal o segundo sítio mais frequente de falha após a realização de uma ressecção curativa.¹¹

Por esses motivos, interromper a disseminação e prevenir a recidiva peritoneal são importantes objetivos terapêuticos, e isso tem levado alguns grupos de pesquisa a explorar a administração de agentes quimioterápicos diretamente na cavidade peritoneal durante e logo após o procedimento cirúrgico, numa modalidade conhecida como QT intraperitoneal (IP) pós-operatória.¹²⁻¹⁴

O racional farmacológico da QT IP deve ser entendido a partir do conceito de intensificação de dose entre os compartimentos peritoneal e corporal, proporcionado pela presença de uma barreira semipermeável representada pela membrana peritoneal.¹⁵

O peritônio é um órgão tridimensional que recobre a parede abdominal e todos os órgãos da cavidade abdômino-pélvica. Ele é formado por uma camada de células mesoteliais apoiada em uma membrana basal e cinco camadas de tecido conectivo, o qual inclui células intersticiais e uma matriz composta por colágeno, ácido hialurônico e proteoglicanos.¹⁶ A membrana basal funciona como uma barreira à saída de material celular e molecular, que são absorvidos pelo omento e por poros e canais linfáticos localizados sob a superfície diafragmática.⁴

Ao contrário do que se poderia supor, não é a cobertura mesotelial que representa o principal obstáculo ao transporte transperitoneal.¹⁶ Flessner *et al* demonstraram em um modelo experimental com roedores que a remoção do revestimento epitelial não influenciou o trânsito através da membrana peritoneal.¹⁷ Estudos de pesquisa básica sugerem que a parede dos capilares sanguíneos e o interstício circunjacente são os principais responsáveis pela barreira peritônio-plasmática.¹⁸

Muitos quimioterápicos são substâncias de alto peso molecular e, por isso, podem permanecer confinados à cavidade peritoneal por longos períodos.¹⁹ Dedrick *et al* postularam que a permeabilidade peritoneal a drogas hidrofílicas anticâncer deve ser consideravelmente menor que a depuração plasmática dessa mesma droga.²⁰ Isso resulta numa concentração significativamente maior na cavidade peritoneal, quando comparada à concentração plasmática, após a administração IP.¹⁰ Essa é a chamada intensificação da dose entre os compartimentos peritoneal e venoso e constitui-se no princípio farmacológico básico para todas as terapias intraperitoneais.²¹ A dose intensificada proporciona oportunidade única para expor a doença peritoneal a doses muito elevadas de QT, associada a redução na concentração plasmática e, conseqüentemente, a menor toxicidade sistêmica.^{10,15}

A avaliação da eficácia farmacológica dos protocolos de QT IP pode ser feita observando-se a farmacocinética dos compartimentos IP e intravenoso (IV).¹⁵ De um modo simplificado, Ratain & Mick²² definiram a farmacocinética como “o que o corpo faz com a droga”. Em contraposição, a farmacodinâmica se relaciona à dose e à cinética para os efeitos clínicos da droga, como eficácia e toxicidade, ou seja, “o que a droga faz com o corpo”.²³ A forma básica de se representar os dados de farmacocinética é por meio de um gráfico concentração *versus* tempo. Assim, a vantagem farmacológica é quantificada pela determinação da razão entre a área sob a curva (ASC) da exposição IP sobre a ASC da exposição IV, após a administração IP.¹⁵ Os agentes utilizados na QT IP são, em geral, específicos para o ciclo celular, como o 5-FU e os taxanos, e administrados com ou sem a adição de hipertermia, na maior parte dos esquemas, do primeiro ao quinto dia pós-operatório (DPO).¹⁰

Desde sua introdução em 1957, por Heidelberger *et al*²⁴, as fluoropirimidinas permanecem como um dos agentes anti-neoplásicos mais utilizados, mostrando atividade em uma ampla gama de tumores sólidos, incluindo as neoplasias do trato gastrointestinal.²⁵ Praticamente toda a história da quimioterapia para o CCR se deu em torno do uso do 5-FU, que, durante quatro décadas, se constituiu no único quimioterápico disponível para o tratamento dessa neoplasia.²⁶ Ainda atualmente, essa droga se mantém como um dos principais agentes utilizados nos regimes quimioterápicos combinados para tratar o CCR avançado e também como parte da terapia adjuvante para aqueles em estágio precoce.²⁷ O 5-FU é mais comumente empregado por via IV, apesar das vias IP e intraportal também se constituírem em opções para sua administração.²⁸ Por ter metabolização hepática, esse agente pode ter sua dosagem IP aumentada em 50% em relação à dosagem venosa.²⁹ Além disso, quando aplicado pela via IP apresenta alta concentração venosa portal, o que reduz a chance de implantação de células tumorais no fígado.³⁰ Seu espectro de toxicidade é dependente da dosagem e do esquema de aplicação e os principais efeitos colaterais descritos são diarreia, mucosite, mielossupressão³¹ e desnutrição.^{32,33} Por ser um anti-metabólito, o 5-FU interfere mais na síntese protéica do que na mitose celular, o que pode explicar sua ação inibitória sobre a cicatrização das anastomoses intestinais.³⁴

Os órgãos do trato gastrointestinal (TGI) são compostos por quatro camadas, à exceção do esôfago e reto inferior que carecem de serosa. A camada mucosa consiste de um epitélio, geralmente colunar, uma lâmina própria, composta por

tecido conectivo frouxo e a muscular da mucosa. A camada submucosa contém a maior parte do colágeno, além de vasos sanguíneos, linfáticos e fibras nervosas. O colágeno tipo I predomina (68%), seguido pelos tipos III (20%) e V (12%).³⁵ Esta é a camada mais importante para a técnica operatória haja vista que fornece a força tênsil para as anastomoses e serve como ponto de ancoragem para as suturas.³⁶ A muscular própria é constituída primariamente por células musculares lisas entremeadas por uma rede de colágeno e coberta por fina camada de tecido conectivo conhecida como serosa.

Se a mucosa for a única camada lesada, ela cicatriza por rápida proliferação das células epiteliais, que sela o defeito e cria uma barreira contra bactérias, em um processo conhecido como restituição epitelial.^{35,36} Já o processo de cicatrização da espessura completa do TGI, como visto em uma anastomose, é um evento biológico complexo, que pode ser dividido didaticamente em três fases, parcialmente sobrepostas, que são: a inflamatória ou exsudativa, a proliferativa ou de fibroplasia, e a de maturação.

A fase inflamatória se caracteriza pela formação de edema, principalmente na região subepitelial da mucosa e submucosa.³⁷ No início, ocorre uma resposta hemostática com vasoconstrição, seguida por vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, que permitem o afluxo de células inflamatórias para a ferida, por diapedese.^{35,36} Enquanto os neutrófilos predominam nas primeiras 24 horas, os macrófagos são o principal tipo celular após 48 horas e atuam sintetizando e liberando fatores de crescimento que iniciam e amplificam a resposta de cicatrização.^{35,38}

A fase proliferativa se inicia com a chegada dos fibroblastos à ferida, regulada por fatores de crescimento. Eles se tornam o principal tipo celular a partir do quarto DPO e, atuando em conjunto com as células musculares lisas,³⁶ substituem a matriz provisória estabelecida na fase inflamatória por um tecido de granulação rico em colágeno.³⁵ Durante essa etapa, na camada submucosa, o colágeno é tanto sintetizado quanto degradado pela ação das colagenases. Sua síntese é estimulada maximamente após o quarto DPO, atingindo seu pico entre o quinto e o sétimo dias. A angiogênese também ocorre nesta fase para permitir a oxigenação e o fornecimento de nutrientes para o processo reparador.³⁵

Na fase final da cicatrização, há redução do número de macrófagos e fibroblastos, e ocorre a maturação e o remodelamento do colágeno recém-formado,

que se transforma em feixes espessos, o que torna a anastomose mais fina, porém mais forte.^{35,36}

Em modelos experimentais, a maioria dos estudos prévios demonstrou que a cicatrização das anastomoses colônicas foi prejudicada pelo uso perioperatório IP de 5-FU.^{30,32,33,34,39-49} Entretanto, existem outros autores^{50,51} que não evidenciaram tal fato e esse tema ainda permanece controverso na literatura. Esse agente atua retardando tanto a produção quanto a função dos mediadores celulares envolvidos na reparação tecidual, isto é, macrófagos, leucócitos e fibroblastos.³⁹ Uma observação frequente em animais tratados com 5-FU é a leucopenia pós-operatória.⁴¹ A redução quantitativa associada à função diminuída dos leucócitos no local da anastomose, com menor produção local de citocinas,⁴⁰ têm sido descritos como mecanismos prejudiciais ao processo reparador.⁴¹ Além disso, estudos experimentais indicam que o 5-FU também pode influenciar negativamente a capacidade de proliferação e síntese de colágeno pelos fibroblastos, o que pode favorecer o desenvolvimento de fístula anastomótica.⁴⁰

Mesmo com o aperfeiçoamento da técnica operatória e com a disponibilidade de novas tecnologias, a fístula após a ressecção colônica com anastomose primária permanece como um problema clínico frequente e relevante. A prevalência relatada na literatura varia amplamente, de 0,5% a 30%, mas geralmente se situa entre 2% e 5%.⁵²

Além da QT IP, numerosos outros fatores têm sido implicados como predisponentes para as fístulas anastomóticas colônicas. Schrock *et al*, em uma grande análise retrospectiva, identificaram idade avançada, anemia, história de radioterapia, infecção intraperitoneal e altura da anastomose como fatores relacionados ao aumento nas taxas de ocorrência de fístula.⁵³

Simplificadamente, a integridade de uma anastomose pode ser representada pelo equilíbrio entre a lise do colágeno, que ocorre precocemente no processo de cicatrização, e sua síntese, que leva alguns dias para se iniciar.⁵⁴ Dessa forma, durante os primeiros DPOs a anastomose está com força reduzida e nesse período sua integridade depende da formação de um selo de fibrina na superfície serosa, da capacidade de retenção de sutura da parede intestinal, particularmente da submucosa⁵⁴ e do colágeno pré-existente.³⁵ A falha na cicatrização acontece quando as forças radiais superam as forças de resistência representadas pela sutura e pela cicatriz inicial.³⁵ Isso ocorre tipicamente entre o terceiro e o sétimo DPOs e pode

levar a complicações graves, com ameaça à vida, a procedimentos cirúrgicos adicionais e ao aumento do tempo de internação e dos custos hospitalares.

Durante a confecção de uma anastomose, alguns princípios técnicos operatórios básicos devem ser seguidos, tais como propiciar suprimento sanguíneo adequado, minimizar a contaminação, evitar a tensão na linha de sutura e a obstrução distal. Em princípio, parece lógico e até mesmo intuitivo supor que a aplicação de alguma forma de selagem ao redor da sutura manual ou mecânica como forma de reforço poderia ajudar a prevenir a ocorrência de fístulas. Nesse sentido, tem crescido o entusiasmo para o uso de materiais para cobrir a superfície anastomótica, tais como o omento, a dura mater, os enxertos peritoneais livres, a tela de ácido poliglicólico, a membrana amniótica^{33,55-57} e diferentes tipos de selante de fibrina.^{39,58-60} Estes últimos, também conhecidos como cola ou adesivo tissular de fibrina, são derivados de componentes plasmáticos humanos e contêm concentrados de fibrinogênio e trombina. Suas versões iniciais foram desenvolvidas no início do século passado com a descoberta da fibrina, sendo o primeiro adesivo biológico produzido em 1940, pela combinação da trombina bovina com o fibrinogênio plasmático. Desde o final dos anos 1970, esses agentes se tornaram disponíveis para a comercialização na Europa, mas, devido ao risco de transmissão de vírus pelos hemoderivados, somente foram liberados nos EUA em 1998.⁶³ Potencialmente, esses produtos podem contribuir para a cicatrização por: produzir hemostasia local, reduzindo a formação de hematomas; promover boa aproximação tecidual, sem causar pressão e ocluindo microperfurações; causar confinamento intraluminal das bactérias, reduzindo a inflamação perianastomótica;⁶² e propiciar meio favorável à proliferação fibroblástica e estímulo ao influxo de macrófagos, o que promove a angiogênese, a proliferação fibroblástica e a produção de colágeno.⁶³

Apesar da selagem das anastomoses colônicas em situações normais e de alto risco em humanos ter sido defendida como um método de prevenir a ocorrência de fístulas por alguns autores,⁶⁴ os benefícios de sua utilização, assim como os riscos a ela associados ainda permanecem indeterminados. Ademais, os resultados de estudos experimentais são conflitantes⁶⁵ e há poucos estudos clínicos prospectivos e randomizados sobre o assunto.

O Tachosil[®] constitui a terceira geração de uma linha de selantes de fibrina atualmente fabricados pela empresa Takeda, tendo sofrido aprimoramentos importantes ao longo dos anos. Sua primeira versão, no início dos anos 1990, o

TachoComb[®], foi desenvolvido para combinar as propriedades adesivas e hemostáticas dos fatores da coagulação à estabilidade mecânica oferecida pelo colágeno.⁵⁹ Ele consistia de uma esponja de colágeno equino revestido por uma combinação de fibrinogênio humano, trombina e aprotinina bovinas. Posteriormente, o TachoComb[®] deu lugar ao TachoComb H[®] no qual a trombina bovina foi substituída pelo seu correspondente humano. Em 2004, a composição foi novamente alterada pela retirada da aprotinina, sendo então denominado TachoSil[®].⁶⁶ Assim, o TachoSil[®] é composto por uma esponja branca de colágeno tipo I de tendão de cavalo, usado para formar uma estrutura microscópica em favo de mel coberta em uma das faces por fibrinogênio e trombina humanos. Ele pode ser armazenado em temperatura ambiente, vem embalado pronto para uso e é de fácil aplicação.^{66,67}

No momento de sua utilização, o lado revestido, previamente umedecido ou não, deve ser aplicado diretamente sobre o tecido alvo e comprimido por alguns minutos.⁶⁷ Uma vez em contato com fluidos fisiológicos, como sangue e linfa, a cobertura seca se dissolve, libera os fatores de coagulação e o produto se torna ativo. A trombina converte o fibrinogênio em monômeros de fibrina, e estes se polimerizam para formar um coágulo que se ancora na esponja de colágeno.⁶⁶ Além de servir de ponto de apoio ao coágulo e de absorver fluidos da ferida, a esponja tem um papel de selagem, vedando a superfície e tornando-a impermeável a líquidos e ar. Estudos em animais mostraram que, enquanto o coágulo de fibrina é metabolizado por fibrinólise, a esponja de colágeno é degradada por tecido de granulação e convertida em uma pseudocápsula de tecido conectivo endógeno como sinal de reação tipo corpo estranho.⁶¹

O TachoSil[®] vem sendo utilizado em muitas especialidades cirúrgicas e provou ser uma ferramenta valiosa para algumas indicações, especialmente como agente hemostático, em situações de sangramento difuso.⁵⁹ Berdajs *et al* analisaram suas propriedades selantes em um estudo *in vitro* e concluíram que o produto tem a capacidade de vedar pequenas falhas, podendo se constituir em uma boa alternativa para auxílio à hemostasia.⁶⁸ Lacaze *et al*, em um modelo canino experimental, compararam as propriedades adesivas de quatro diferentes selantes de fibrina durante uma hepatectomia parcial. TachoSil[®] e Tissucol[®] (uma cola de fibrina líquida) apresentaram o melhor desempenho.⁶⁹ Maria-Borro *et al*, em uma análise farmacoeconômica para procedimentos cirúrgicos hepáticos, concluíram que o

produto diminuiu o tempo para hemostasia intraoperatória quando comparado ao coagulador de argônio e também reduziu o custo global por intervenção.⁷⁰

Além da ação hemostática, o TachoSil[®] também pode ser utilizado para fornecer vedação tecidual, apoiar suturas, prevenir a formação de aderências e erosões, proteger nervos e ocluir estruturas, como vasos linfáticos, bronquíolos e ductos biliares. Apesar dos bons resultados relatados em diversas situações clínicas, existem poucos estudos em humanos sobre seu uso como selante nas suturas e anastomoses do TGI.

Di Carlo *et al* relataram sua experiência com dois pacientes operados por úlcera péptica perfurada e tratados com sutura primária e reforço com o Tachosil[®], verificando que a esponja melhorou a selagem da sutura tradicional, não esteve associada à complicações e reduziu o tempo operatório.⁷¹ Em pacientes com perfuração esofagiana, Erdogan *et al* compararam o reparo primário simples com o reparo primário reforçado com TachoComb[®]. Apesar do número limitado da amostra e do caráter retrospectivo do estudo, os autores concluíram que, na indisponibilidade de material autólogo para reforço, o TachoComb[®] pode se constituir em boa alternativa para o reforço de suturas esofagianas.⁷² Pilone *et al*, em estudo prospectivo com trinta pacientes, avaliaram a efetividade e a segurança do TachoSil[®] como reforço à linha de sutura gástrica após gastrectomia em manga por via videolaparoscópica. Os autores concluíram que o uso da esponja reduziu o sangramento pós-operatório e provavelmente otimizou a cicatrização.⁷³ Em estudo não randomizado com 63 pacientes, o TachoSil[®] foi utilizado em 24 deles como reforço à linha de sutura anastomótica após cirurgia colorretal. Não houve fístula no grupo de anastomoses seladas e o tempo médio de internação foi inferior neste grupo em comparação ao grupo não selado. Os autores confirmaram a segurança do produto e sugeriram um possível efeito positivo dele sobre processo de cicatrização anastomótica.⁷⁴ Parker *et al* também realizaram estudo não randomizado envolvendo o reforço da anastomose colorretal com o TachoSil[®] após ressecção anterior de reto, por via aberta ou videolaparoscópica, em 25 pacientes. O objetivo primário foi de avaliar a exequibilidade do uso do selante. Os autores concluíram que a aplicação do TachoSil pareceu ser factível e bem tolerada.⁷⁵

Existem seis estudos em modelos experimentais na literatura, com resultados controversos, que avaliaram o efeito do Tachosil[®]/Tachocomb[®] na cicatrização de anastomoses no TGI. Shurkalin *et al* utilizaram o TachoComb[®] como método

alternativo à sutura para o fechamento de perfurações na zona do piloro em dezoito cães e cinco porcos com o objetivo de prevenir a estenose. Os resultados revelaram boa adesividade e propriedades cicatriciais estimuladoras do produto.⁷⁶ Nordentoft *et al* compararam anastomoses de intestino delgado suturadas e seladas ou não com o Tachosil[®] em modelo experimental com 11 porcos. Os animais foram observados por uma a seis semanas e, depois, examinados *in vivo*, sob anestesia geral, quanto à presença de sinais de fístula, peritonite, abscesso, aderências e obstrução. Além disso, o diâmetro das anastomoses foi mensurado por meio de exame radiográfico com contraste baritado. Os autores não encontraram diferenças entre as anastomoses seladas ou não-seladas em relação à enfermidade abdominal, à pressão de ruptura *in vivo*, ao grau de estenose e aos parâmetros histopatológicos.⁷⁷ Chmelnik *et al* utilizaram o TachoSil[®] para reforçar anastomoses de intestino delgado em camundongos, como modelo para cirurgia pediátrica. Os autores observaram dilatação pré-anastomótica severa e maiores taxas de íleo nas anastomoses seladas. Além disso, a esponja não vedou suficientemente as anastomoses com número reduzido de pontos. Dessa forma, o uso do produto em anastomoses de pequeno calibre foi desaconselhado⁶⁰ pelos autores. Outro trabalho investigou o uso do selante em anastomoses esofagogástricas em ratos.⁷⁸ Os resultados sugerem que o TachoSil[®] fornece suporte significativo à anastomose durante seu período inicial de cicatrização, podendo reduzir o risco de fístula. Ozel *et al* avaliaram, também em ratos, a eficácia do TachoComb[®] durante o processo inicial de cicatrização das anastomoses colônicas. Os autores concluíram que o selante apoiou a integridade anastomótica, mas também suscitou reação inflamatória proeminente, o que potencialmente pode aumentar o tempo necessário para que ocorra a cicatrização.⁵⁹ Outro estudo mostrou efeito benéfico da selagem com o TachoSil[®] sobre o processo de cicatrização de anastomoses colônicas incompletas em camundongos. A selagem resultou em redução significativa da letalidade e das taxas de fístula, melhora da força mecânica e dos parâmetros histopatológicos e bioquímicos.⁷⁹

Dessa forma, como os relatos existentes são controversos, tanto com a utilização de animais como com seres humanos, estudos adicionais se justificam para melhor caracterizar a influência do Tachosil[®] no processo de cicatrização das anastomoses digestivas, notadamente em vigência de condições adversas, como a

quimioterapia intraoperatória, circunstância na qual ainda não existem dados na literatura médica.

1 OBJETIVO

Avaliar os efeitos da administração intraperitoneal pós-operatória precoce de 5-FU e da selagem com o TachoSil[®] sobre o processo de cicatrização da anastomose colônica em ratos.

2 MÉTODO

2.1 Aspectos Éticos nos Cuidados com Animais

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cirurgia Experimental da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). O projeto desta pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa com Animais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, da UERJ. Todos os procedimentos seguiram, rigorosamente, a regulamentação existente sobre pesquisa com animais.⁸⁰

2.2 Descrição da amostra

Foram utilizados 40 ratos (*Rattus norvegicus albinus*), machos, jovens, da linhagem Wistar, com peso variando entre 212 e 314 gramas (g), sem sinais físicos de comprometimento da saúde. Todos os animais foram provenientes do Biotério do Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências Médicas da UERJ e receberam ração comercial apropriada para ratos e água *ad libitum*.

Os ratos foram alocados em caixas com até cinco animais e mantidos em ambiente climatizado e com períodos claro-escuro de 12 horas durante todo o experimento.

2.3 Descrição dos grupos de estudo

Os ratos foram aleatoriamente distribuídos em quatro grupos, cada um com dez animais:

- Grupo I (Controle): anastomose colônica sem reforço e injeção IP de soro fisiológico a 0,9% (SF);

- Grupo II (TachoSil[®]): anastomose reforçada com TachoSil[®] e injeção IP de SF;
- Grupo III (5-FU): anastomose sem reforço e injeção IP de 5-FU;
- Grupo IV (TachoSil[®] + 5-FU): anastomose reforçada com TachoSil[®] e injeção IP de 5-FU.

2.4 Descrição do procedimento operatório

O dia do procedimento cirúrgico foi considerado como o marco inicial do experimento. Todas as operações foram executadas pelo mesmo cirurgião com uso de técnica estéril. Não foi realizado jejum pré ou pós-operatório, preparo de cólon ou profilaxia antimicrobiana.

Os animais foram pesados em balança digital e logo após receberam anestesia intramuscular em *bolus* com 0,1 ml/100 g de peso de uma solução de 1,0 ml de quetamina (50 mg/ml) com 1,0 ml de xilazina (20 mg/ml). A seguir, foram imobilizados com fita adesiva em prancha de madeira e submetidos a epilação da região ventral do abdome. Procedeu-se à antissepsia com solução de polivinil-pirrolidona-iodo e colocação do campo cirúrgico fenestrado.

Foi realizada laparotomia mediana com cerca de 4 cm de extensão, interessando pele, plano músculo-aponeurótico e peritônio, com exposição das vísceras abdominais e identificação do cólon descendente. A seguir, o cólon foi seccionado a 4 cm da reflexão peritoneal, com preservação da arcada vascular marginal. Posteriormente, realizou-se anastomose término-terminal com pontos separados, em plano único com fio monofilamentar de polipropileno 5-0 (Ethicon[®]). A anastomose foi realizada por técnica padronizada de cirurgião único, sem o auxílio de lupa e respeitando-se distância de 1-2 mm de cada sutura da margem de ressecção e também entre cada ponto, totalizando 10 a 12 pontos por anastomose (Figura 1 – A, B e C).

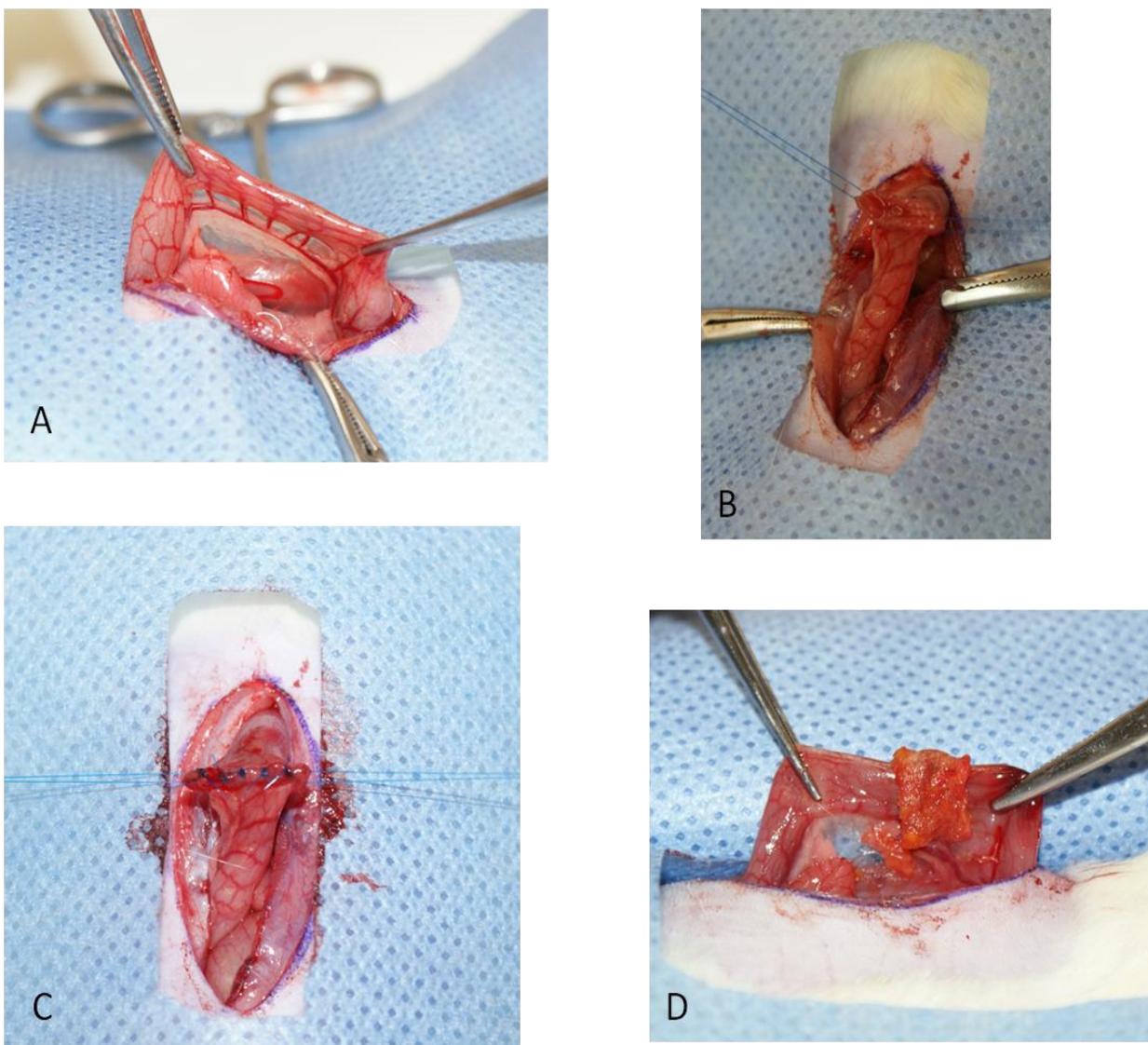
A síntese da parede abdominal e da pele foi realizada em dois planos com fio de náilon monofilamentar 2-0 (Ethicon[®]), em sutura contínua.

Após o procedimento, os animais retornaram às suas caixas, identificadas conforme o grupo e o dia do ato operatório, e tiveram livre acesso à água e à ração.

2.5 Aplicação do TachoSil®

Nos animais dos grupos II e IV, a anastomose foi coberta com uma tira umedecida de TachoSil®, previamente cortada na medida de 1 x 3 cm, que foi aplicada com suave pressão pelo lado revestido e comprimida sobre o sítio anastomótico por um minuto (Figura 1 – D).

Figura 1 - Confeção da anastomose colônica e cobertura com TachoSil®



Legenda: A: Escolha do ponto de secção colônica, com preservação da arcada marginal; B e C: Confeção da anastomose com pontos separados de polipropileno 5.0; D: Cobertura da anastomose com TachoSil®.

2.6 Administração da droga

Nos ratos dos grupos III e IV, o 5-FU, diluído em uma solução de 02 ml, foi aplicado diretamente na cavidade peritoneal por uma injeção em *bolus* na fossa ilíaca direita, em condições de normotermia. As aplicações foram diárias e no mesmo horário, iniciando-se no dia do procedimento cirúrgico e estendendo-se até o terceiro DPO.

A dosagem de 5-FU utilizada foi de 20 mg/dia/ kg de peso corporal. Alternativamente, os animais dos grupos I e II receberam 2 ml de SF.

2.7 Estudo *post-mortem*

No quarto DPO, os animais foram mortos por sobredose anestésica. A ferida operatória foi examinada e, em seguida, aberta mediante duas incisões transversas acima e abaixo da incisão da parede, e uma incisão longitudinal lateral esquerda a esta, unindo as incisões transversas, de forma a expor a cavidade peritoneal. Realizou-se minucioso inventário da cavidade e anotados os achados referentes à presença de coleções perianastomóticas, aderências, sinais de dilatação intestinal pré-anastomótica e de fístula.

As aderências foram classificadas conforme o método proposto por Knighly *et al*⁸¹ (Tabela 1).

A presença de dilatação intestinal pré-anastomótica foi definida como a distensão do cólon proximal à anastomose maior que duas vezes o diâmetro colônico normal, com retorno ao diâmetro habitual após a anastomose.⁸²

Considerou-se como coleção perianastomótica qualquer acúmulo bem delimitado de líquido na região ao redor da anastomose.

Tabela 1 - Escala de graduação de aderências segundo Knighly *et al*⁸¹

| Graduação | Achados operatórios |
|------------------|--|
| 0 | Nenhuma aderência |
| 1 | Aderências mínimas, principalmente entre o omento e a anastomose |
| 2 | Aderências moderadas, isto é, entre a anastomose e o omento ou entre a anastomose e uma alça intestinal ou parede abdominal |
| 3 | Aderências extensas, isto é, entre a anastomose e algumas alças intestinais e a parede abdominal, incluindo a formação de abscesso |

2.8 Análise da evolução do peso corporal

Os animais foram pesados imediatamente antes do procedimento cirúrgico e logo após a sua morte. Para cada animal, calculou-se a diferença entre o peso do início e o do final do experimento, chegando-se ao valor da perda absoluta de peso. Como os animais dos diferentes grupos partiram de pesos iniciais diferentes, calculou-se também a perda relativa de peso corporal em relação ao peso inicial, que foi expressa em termos percentuais.

2.9 Estudo funcional da anastomose

Para a aferição da pressão de ruptura (PR) da anastomose, utilizou-se um sistema simples desenvolvido a partir da observação de outros estudos^{30,82} e composto por um esfigmomanômetro analógico padrão calibrado que foi adaptado para essa finalidade. O mesmo sistema foi utilizado para todas as medições que seguiram uma abordagem padronizada e uniforme.

O segmento colônico contendo a anastomose foi cuidadosamente dissecado e ressecado, observando-se 1 cm de margem proximal e distal à anastomose e em bloco com os tecidos a ele aderidos. O cólon foi, então, cateterizado com a utilização de um cateter de nelaton número 8 e lavado com 20 ml de SF para remoção dos resíduos fecais. Uma das extremidades colônicas foi ocluída pela aplicação de uma pinça hemostática e a outra foi cateterizada por um cateter conectado ao esfigmomanômetro e firmemente atado a ele. A peça foi submergida em SF em um recipiente de vidro transparente e lentamente distendida com ar. A PR foi registrada no momento do aparecimento das primeiras bolhas gasosas.

2.10 Análise histopatológica

Após a medição da PR, as peças foram abertas em sua borda antimesentérica, envelopadas em papel vegetal, acondicionadas em cassetes plásticos identificados por códigos conhecidos somente pelo cirurgião e armazenadas em frascos contendo formol tamponado a 10%. Posteriormente, foram encaminhadas à Disciplina de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da UERJ. Os fragmentos foram, então, preparados para estudo histológico, contendo toda sua extensão e espessura. O preparo histológico da peça cirúrgica obedeceu às seguintes etapas: a) desidratação do tecido pelo processo histotécnico com concentrações progressivas de álcool etílico; b) diafanização em xilol; c) impregnação do tecido em parafina liquefeita; e d) inclusão com formação dos blocos de parafina. As peças contidas nos blocos de parafina tiveram três cortes sequenciais de 3 μ m de espessura, sendo em seguida colocadas em banho-maria à temperatura de 45° C.⁴ Os cortes foram corados pelas técnicas de Hematoxilina-Eosina (HE), Tricrômico de Masson (TM) e Picrossirius red (PIR). A seguir, foram analisados por um patologista experiente, que desconhecia a identidade dos animais, utilizando microscopia óptica convencional.

Pela coloração de HE, foi verificada a morfologia geral das anastomoses e pelas colorações de TM e PIR foi avaliada a distribuição de fibras de colágenas nas áreas de fibrose intersticial.

A avaliação microscópica da cicatrização anastomótica foi realizada pela interpretação dos seguintes parâmetros histológicos: infiltrado de células inflamatórias, presença de neoformação vascular (neoangiogênese), crescimento de fibroblastos e deposição de colágeno. Cada uma dessas variáveis foi graduada histologicamente de forma semiquantitativa, numa escala de 0 a 4, segundo a classificação de Phillips *et al*⁸⁵ modificada por Ehrlich e Hunt (Quadro 2).

Tabela 2 - Escala Numérica de Phillips modificada por Ehrlich e Hunt.⁸³

| Graduação | Achados histopatológicos |
|------------------|-------------------------------------|
| 0 | Nenhuma evidência de celularidade |
| 1 | Evidência ocasional de celularidade |
| 2 | Leve celularidade |
| 3 | Abundante celularidade |
| 4 | Células ou fibras confluentes |

2.11 Análise estatística

Realizou-se análise descritiva da média, desvio padrão, mediana, mínimo e máximo, para dados numéricos e frequência (n), e percentual (%) para dados categóricos.

Para comparação das variáveis numéricas entre os quatro grupos, utilizou-se a análise de variância (ANOVA) de Kruskal-Wallis e o correspondente teste de comparações múltiplas de Dunn (não paramétrico); para variáveis categóricas aplicou-se o teste exato de Fisher. O critério de determinação de significância adotado foi o nível de 5%.

A análise estatística foi processada com a utilização do *software* SAS 6.11 (SAS Institute, Inc., Cary, NC).

3 RESULTADOS

3.1 Mortalidade

Um rato do grupo I (Controle) morreu no quarto DPO. Este animal foi necropsiado, mas nenhuma complicação abdominal foi encontrada e a *causa mortis* permaneceu desconhecida. À exceção deste, os demais ratos apresentaram boa evolução e atividade normal durante os quatro dias do experimento.

3.2 Evolução do peso corporal

Ocorreu perda de peso corporal em todos os animais durante o experimento. A perda média de peso em valores absolutos foi de 28 g, 27 g, 46 g e 36,6 g nos grupos I, II, III e IV, respectivamente. A comparação estatística mostrou que houve diferença significativa nos animais do grupo 5-FU em relação aos dos grupos Controle e TachoSil®.

Em relação aos valores da perda relativa de peso média por grupo, observou-se a seguinte distribuição: 10,8% para o grupo I, 9,6% para o II, 19,4% para o III e 13,8% para o IV. À análise estatística, observou-se que os animais do grupo 5-FU apresentaram perda relativa de peso significativamente maior que os animais de todos os demais grupos ($p= 0,0004$). Contudo, não houve diferença significativa entre os animais dos grupos Controle, 5-FU e 5-FU + TachoSil®.

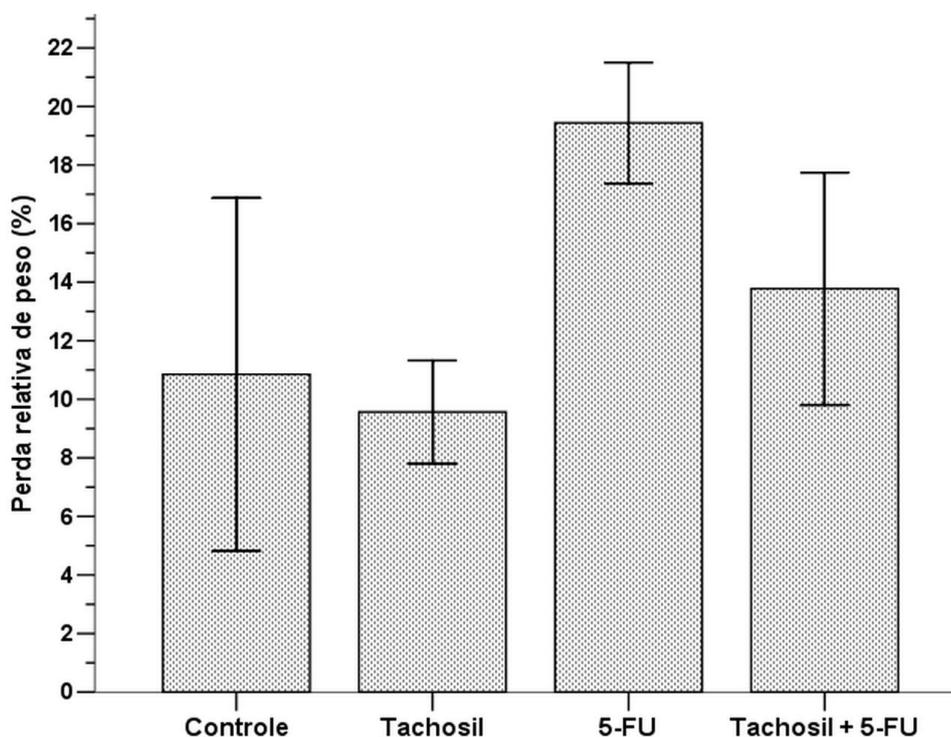
Os pesos inicial e final, assim como as perdas de peso absoluta e relativa estão representados na Tabela 3 e na Figura 2.

Tabela 3 - Medidas das perdas de peso absoluta (g) e relativa (%) nos animais dos diferentes grupos

| Peso | Grupo | n | média | DP | mediana | mínimo | máximo | p valor ^a | diferença significativa ^b |
|--------------------|-------|----|-------|------|---------|--------|--------|------------------------|--------------------------------------|
| Perda absoluta (g) | I | 9 | 28,0 | 21,6 | 22 | 14 | 84 | 0,001 | I ≠ III II ≠ III |
| | II | 10 | 27,0 | 6,6 | 28 | 18 | 40 | | |
| | III | 10 | 46,0 | 8,2 | 47 | 32 | 60 | | |
| | IV | 10 | 36,6 | 16,9 | 33 | 16 | 74 | | |
| Perda relativa (%) | I | 9 | 10,8 | 7,8 | 9 | 5,6 | 31,3 | 0,0004 | I ≠ III II ≠ III III ≠ IV |
| | II | 10 | 9,6 | 2,5 | 9,8 | 5,7 | 13,2 | | |
| | III | 10 | 19,4 | 2,9 | 20 | 14,3 | 23,1 | | |
| | IV | 10 | 13,8 | 5,5 | 12,1 | 6,3 | 24,8 | | |

DP: desvio padrão; ^a ANOVA de Kruskal-Wallis; ^b segundo o teste de comparações múltiplas de Dunn, ao nível de 5%.

Figura 2 - Perda relativa de peso (%) nos animais dos diferentes grupos



Notas: Os dados estão descritos como média \pm DP. Comparação global pelo teste de Kruskal-Wallis, $p=0,0004$.

3.3 Ferida operatória

Não houve complicações de ferida operatória, deiscência ou abscesso, em nenhum dos animais dos grupos de estudo.

3.4 Fístula anastomótica

Não se observou a ocorrência de fístula anastomótica com peritonite difusa em nenhum dos animais.

3.5 Aderências pós-operatórias

Aderências moderadas ou grau 2, envolvendo a região anastomótica e o omento e alças intestinais foram encontradas em todos os ratos, a exceção de dois, um do grupo I (grau 3) e outro do grupo IV (grau 1). Não houve diferença significativa entre os grupos ($p=0,26$) (tabela 4).

Tabela 4 - Medidas da formação de aderências nos animais dos diferentes grupos

| Classificação | Grupo | n | média | DP | mediana | mínimo | máximo | <i>p</i> valor _a |
|------------------------|-------|----|-------|------|---------|--------|--------|-----------------------------|
| Formação de aderências | I | 9 | 2,11 | 0,33 | 2 | 2 | 3 | 0,26 |
| | II | 10 | 2,00 | 0,00 | 2 | 2 | 2 | |
| | III | 10 | 2,00 | 0,00 | 2 | 2 | 2 | |
| | IV | 10 | 1,90 | 0,32 | 2 | 1 | 2 | |

3.6 Dilatação intestinal pré-anastomótica

Observou-se dilatação intestinal à montante da anastomose, de acordo com os critérios previamente determinados, em dois animais dos grupos I e III, em cinco do grupo II e em três do grupo IV. Não houve diferença significativa na análise comparativa entre os grupos ($p=0,57$).

3.7 Coleções perianastomóticas

As coleções perianastomóticas estiveram presentes em 33,3% dos animais do grupo I, 10% do grupo II, 40% do grupo III e 30% do grupo IV. Não houve diferença significativa na comparação entre eles ($p=0,44$). Os dados referentes à dilatação intestinal pré-anastomótica e coleções perianastomóticas estão discriminados na Tabela 5.

Tabela 5 – Presença de dilatação pré-anastomótica e coleção perianastomótica nos animais dos diferentes grupos

| Variável | Grupo I | | Grupo II | | Grupo III | | Grupo IV | | <i>p</i> valor ^a |
|------------------|---------|------|----------|------|-----------|------|----------|------|-----------------------------|
| | n | % | n | % | n | % | n | % | |
| Dilatação | | | | | | | | | |
| presente | 2 | 22,2 | 5 | 50,0 | 2 | 20,0 | 3 | 30,0 | 0,57 |
| ausente | 7 | 77,8 | 5 | 50,0 | 8 | 80,0 | 7 | 70,0 | |
| Coleção | | | | | | | | | |
| presente | 3 | 33,3 | 1 | 10,0 | 4 | 40,0 | 2 | 20,0 | 0,44 |
| ausente | 6 | 66,7 | 9 | 90,0 | 6 | 60,0 | 8 | 80,0 | |

^a Teste exato de Fisher.

3.8 Avaliação funcional

A pressão de ruptura foi medida imediatamente após a morte dos animais e usada como parâmetro da força mecânica da anastomose. Nosso aparelho de medição apresentou funcionamento satisfatório e, em somente um caso do grupo II, a PR não pode ser aferida por problemas técnicos. Os valores globais estão resumidos na Tabela 6, e os valores médios nos diferentes grupos de estudo representados na Figura 3.

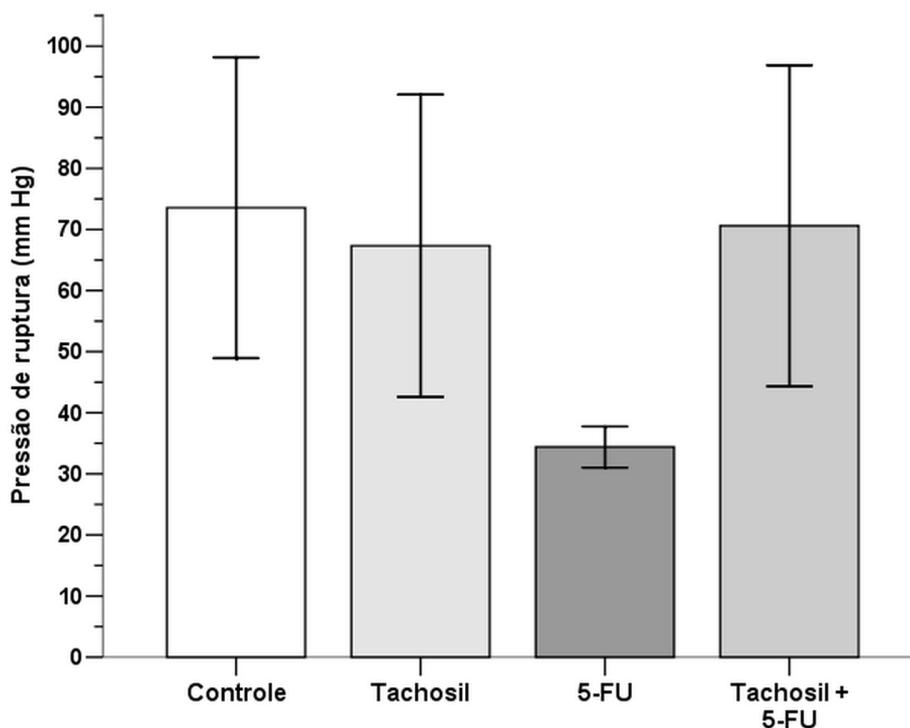
Em todos os casos o local de ruptura ocorreu ao longo da linha de sutura anastomótica. A média das PRs, em mm Hg, foi de 73,6 para o grupo I, 67,3 para o II, 34,4 para o III e 70,6 para o IV. Especificamente, as medidas foram significativamente menores no grupo 5-FU quando comparado aos demais grupos ($p=0,001$). Não houve diferença significativa entre os grupos Controle, TachoSil[®] e TachoSil[®]+5-FU.

Tabela 6 - Medidas da pressão de ruptura (mmHg) nos animais dos diferentes grupos

| Pressão | Grupo | n | média | DP | mediana | mínimo | máximo | p valor ^a | diferença significativa ^b |
|------------|-------|----|-------|------|---------|--------|--------|------------------------|--------------------------------------|
| PR (mm Hg) | I | 9 | 73,6 | 32,0 | 62 | 48 | 136 | 0,001 | I ≠ III |
| | II | 9 | 67,3 | 32,2 | 70 | 30 | 130 | | II ≠ III |
| | III | 10 | 34,4 | 4,7 | 34 | 2 | 40 | | III ≠ IV |
| | IV | 10 | 70,6 | 36,7 | 60 | 30 | 140 | | |

DP: desvio padrão; ^a ANOVA de Kruskal-Wallis; ^b segundo o teste de comparações múltiplas de Dunn, ao nível de 5%.

Figura 3 - Pressão de ruptura (mm Hg) nos animais dos diferentes grupos



Notas: Os dados estão descritos como média \pm DP. Comparação global pelo teste de Kruskal-Wallis, $p=0,001$.

3.9 Avaliação histopatológica

O processo de cicatrização da anastomose colônica foi avaliado pelo infiltrado de células inflamatórias, pela neoformação de vasos sanguíneos, pela deposição de colágeno e pela infiltração fibroblástica.

Os valores médios para cada um desses parâmetros, nos quatro grupos de estudo, estão representados na Figura 4. As Figuras 5, 6, 7 e 8 exemplificam fotomicrografias para cada um dos parâmetros estudado.

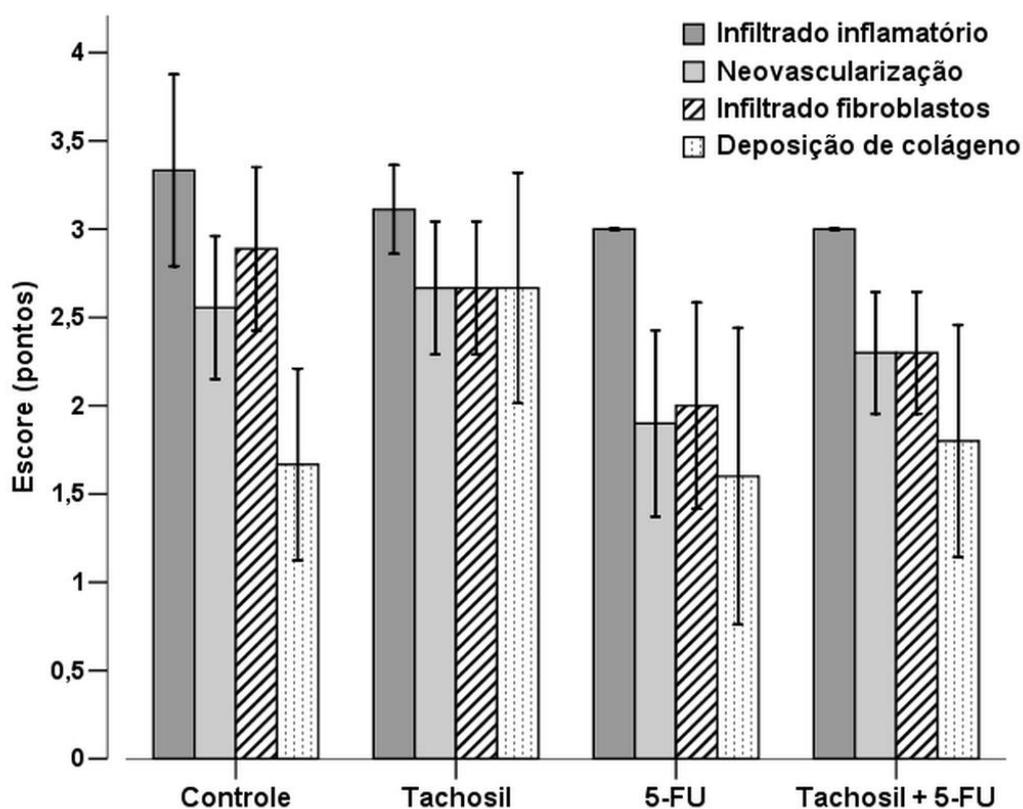
O maior grau de infiltração de células inflamatórias foi visto no grupo I (média de 3,33), seguido pelo grupo II (média de 3,11) e pelos grupos III e IV, ambos com média de 3,0. Contudo, a comparação pareada dos valores médios dos grupos não mostrou a existência de diferenças significativas entre eles ($p=0,16$).

A neoangiogênese foi significativamente menor no grupo III (média de 1,9) comparada aos grupos I (média de 2,56) e II (média de 2,67) ($p=0,05$). Nas demais comparações entre os grupos, a diferença não se mostrou significativa.

O maior grau de infiltração fibroblástica foi encontrado no grupo Controle (média de 2,89), seguido pelos grupos TachoSil® (média de 2,67), TachoSil®+5-FU (média de 2,30) e grupo 5-FU (média de 2,0). A comparação das médias dos grupos, dois a dois, mostrou que houve diferença significativa apenas para a comparação entre o grupo Controle e o grupo 5-FU ($p=0,035$).

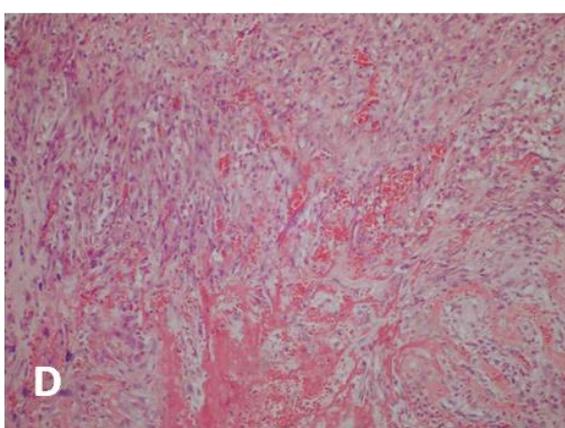
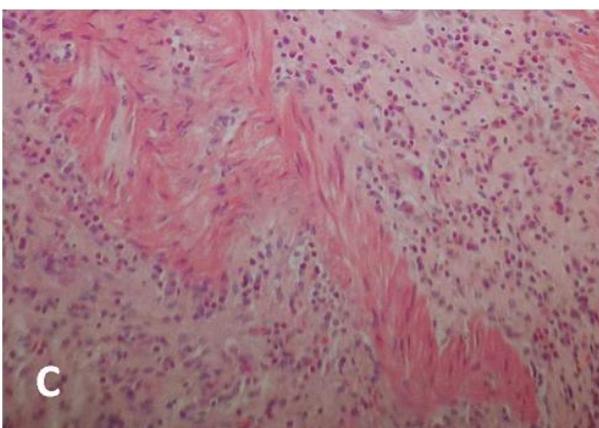
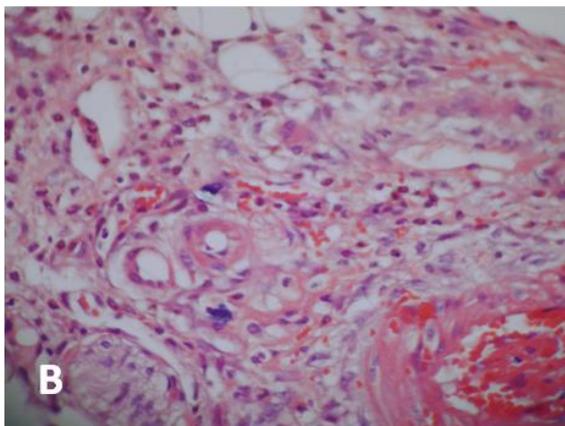
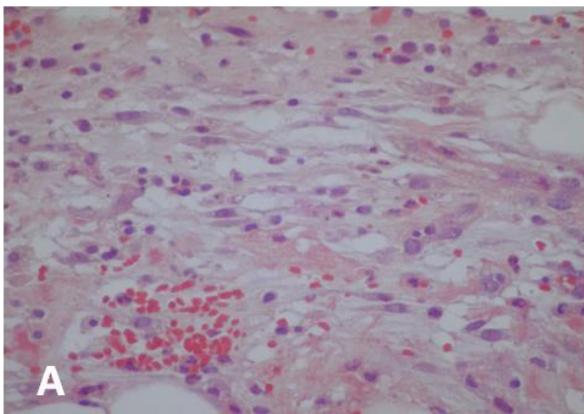
Finalmente, os valores médios referentes à deposição de colágeno foram de 1,67 para o grupo I; 2,67 para o II; 1,6 para o III; e 1,8 para o IV. Apesar dos grupos com anastomoses seladas terem apresentado valores superiores aos demais grupos, especialmente o grupo II, não houve diferença significativa entre eles.

Figura 4 - Avaliação histopatológica nos animais dos diferentes grupos



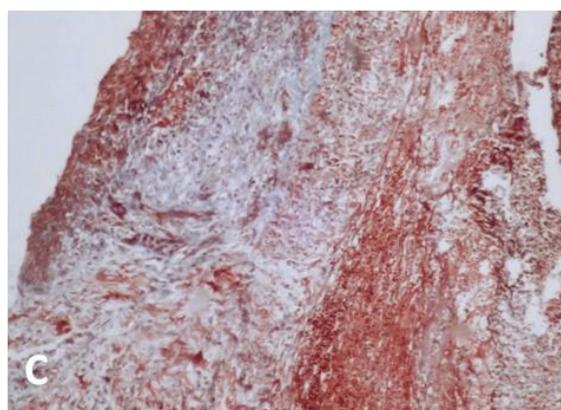
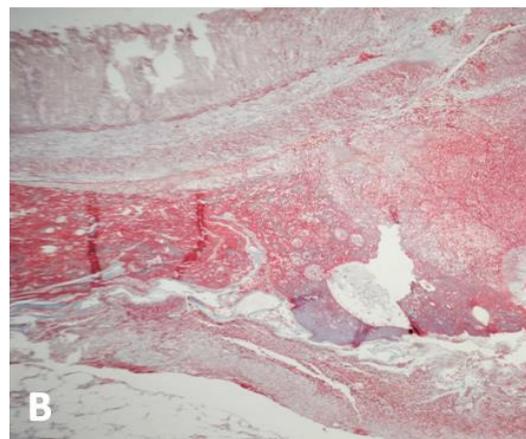
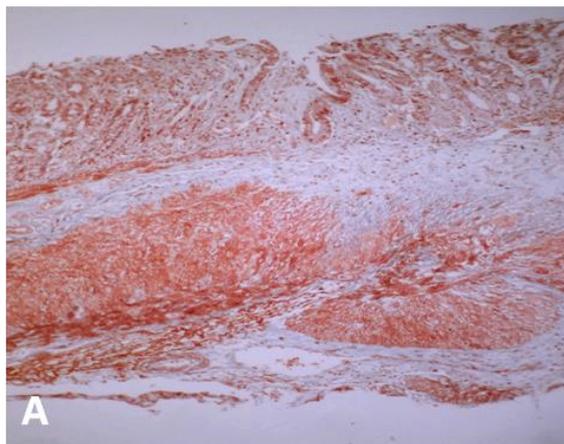
Notas: Os dados estão descritos como médias \pm DP. A comparação global pelo teste de Kruskal-Wallis revelou $p=0,16$ para infiltrado de células inflamatórias, $p=0,05$ para neoangiogênese, $p=0,03$ para infiltrado de fibroblastos, e $p=0,09$ para deposição de colágeno. O teste de comparações múltiplas de Dunn para neoangiogênese revelou diferença significativa para o grupo III *versus* grupo I, e grupo III *versus* grupo II. O teste de comparações múltiplas de Dunn para infiltrado de fibroblastos revelou diferença significativa para o grupo III *versus* grupo I.

Figura 5 - Gradação da infiltração de fibroblastos



Legenda: A: ocasionais fibroblastos (grau 1); B: distribuição leve de fibroblastos (grau 2); C: numerosos fibroblastos, permeados por células inflamatórias (grau 3); D: numerosos fibroblastos, confluindo e formando grupamentos, permeando vasos neoformados (grau 4).
Nota: . Fotomicrografias (Hematoxilina e Eosina, obj x40)

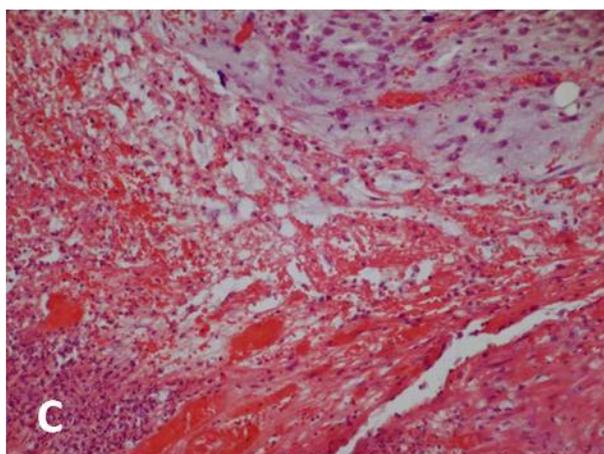
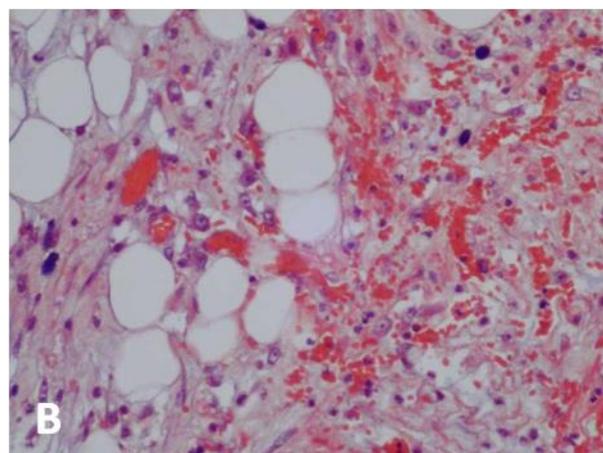
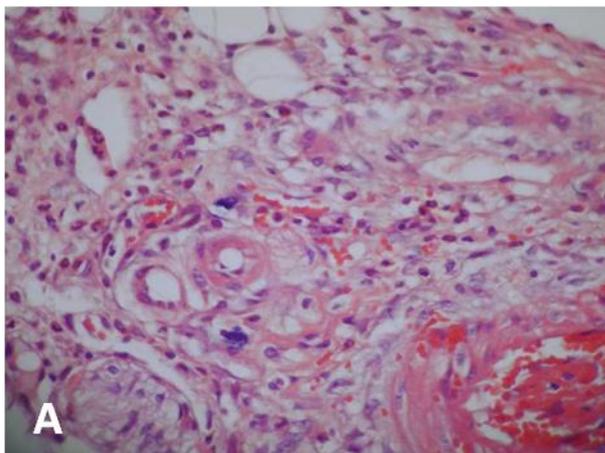
Figura 6 - Graduação da deposição de colágeno



Legenda: A: mínima fibrose parietal corada em azul (grau 1) (Tricrômio de Masson, obj x4); B: fibrose parietal em múltiplos focos, comprometendo toda a espessura da parede intestinal (grau 3) (Tricrômio de Masson, obj x4); C: fibrose parietal em faixas fibrosas confluentes (grau 4)(Tricrômio de Masson, obj x40).

Notas: Fotomicrografias.

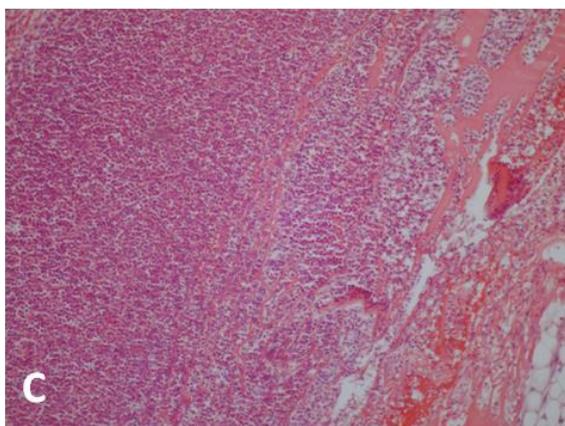
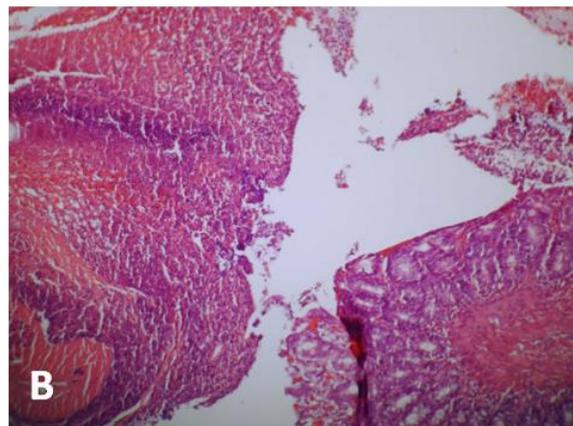
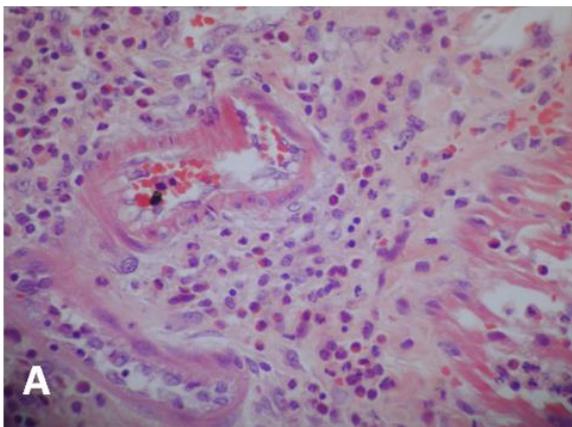
Figura 7 - Gradação da neovascularização



Legenda: A: ocasionais vasos neoformados (grau 1); B: leve expressão de vasos neoformados (grau 2); C: abundante evidência de vasos neoformados (grau 3).

Notas: Fotomicrografias (Hematoxilina e Eosina, obj x40).

Figura 8 - Graduação do infiltrado inflamatório



Legenda: A: leve dispersão de células inflamatórias mono e polimorfonucleares (grau 2) (Hematoxilina e Eosina, obj x40); B: moderada dispersão de células inflamatórias mono e polimorfonucleares (grau 3)(Hematoxilina e Eosina, obj x4); C: intensa concentração confluenta de células inflamatórias mono e polimorfonucleares (grau 4)(Hematoxilina e Eosina, obj x4).

Notas: Fotomicrografias.

DISCUSSÃO

Desde 1990, estudos em cirurgia citorrredutora seguida por quimioterapia IP pós-operatória precoce ou quimioterapia IP com hipertermia vêm proporcionando novas opções de tratamento para pacientes selecionados com CCR avançado.⁸⁴⁻⁸⁷ Essa combinação de tratamentos é efetiva e apresenta taxas de sobrevida em cinco anos próximas a 40%, quando realizada em centros de referência. Esse resultado representa uma verdadeira revolução terapêutica, haja vista que tal sobrevida nunca havia sido antes relatada para pacientes com CP por CCR.⁹ Apesar dessa modalidade de tratamento ainda ser considerada investigacional, ela apresenta algumas vantagens conceituais: destrói células que se disseminaram durante a operação; o tratamento é realizado logo após a cirurgia citorrredutora quando existe um menor volume tumoral; sua ação se inicia antes do processo de cicatrização ocorrer, sendo capaz de eliminar nichos tumorais localizados nos depósitos de fibrina pós-operatórios; o método proporciona uma distribuição mais uniforme da droga na cavidade peritoneal;^{9,15} e ela inibe o desenvolvimento de micrometástases.

A quimioterapia IP adjuvante pode ser administrada imediatamente após a cirurgia citorrredutora sob condições de hipertermia ou ser iniciada no primeiro DPO e continuada por alguns dias, sendo denominada quimioterapia IP pós-operatória precoce. Ambas as técnicas, separadas ou em combinação, são oferecidas atualmente para pacientes com CP de origem colorretal, mas não existem estudos clínicos comparando-as em relação ao impacto na sobrevida.⁸⁸

A adição de hipertermia pode, teoricamente, aumentar a resposta ao tratamento por três mecanismos principais: ação térmica antitumoral direta, potencialização do efeito citotóxico dos agentes quimioterápicos e aumento da penetração destes nos tecidos e nódulos neoplásicos. Contudo, sua realização representa um desafio logístico e o suposto benefício em ganho de sobrevida nunca foi investigado em ensaios randomizados. Além disso, Klaver *et al* demonstraram que as perfusões intraoperatórias normotérmicas e hipertérmicas foram igualmente efetivas em prolongar a sobrevida em ratos com CP.⁸⁹ Outro estudo recente comparou a quimioterapia IP intraoperatória hipertérmica imediata com a quimioterapia IP pós-operatória precoce normotérmica após cirurgia citorrredutora em

ratos com CP, levando à conclusão de que ambas as terapias foram efetivas em prolongar a sobrevivência, mas que houve superioridade do tratamento PO precoce.⁸⁸ Dessa forma, no modelo experimental realizado, optou-se pela administração de 5-FU pela via IP, de forma PO precoce e em condições de normotermia. A dosagem do 5-FU utilizada foi de 20mg/kg/dia. Essa dose já foi testada e amplamente utilizada por outros estudos na literatura que demonstraram ser esta a mais alta dose IP que, em combinação com a cirurgia, não resultou na morte de qualquer animal. Além disso, essa dose corresponde aquela utilizada em humanos, de 500 mg/m².^{40,50,51} Após a ressecção cirúrgica, a restauração da continuidade do TGI por uma anastomose é parte da prática operatória desde seu início mais remoto. Diferentes técnicas e dispositivos têm sido utilizados com o objetivo de promover uma conexão intestinal mais segura e que minimize o risco de fístula. A falha na cicatrização ocorre quando existe uma anormalidade no grau ou na duração de um dos componentes da reparação tecidual e, mesmo quando a técnica cirúrgica é adequada, um percentual pequeno de fístulas é inevitável. Em resumo, essa complicação pode ser o resultado de fatores técnicos, locais ou sistêmicos, isoladamente ou em associação.

Conforme exposto, a quimioterapia IP é um método altamente eficaz para o tratamento local adjuvante dos tumores gastrointestinais, mas coloca a cicatrização anastomótica sob risco aumentado de complicações, pois os agentes quimioterápicos não afetam seletivamente as células malignas. Assim, taxas de ocorrência de fístula de até 20% têm sido descritas dependendo do sítio da anastomose, da magnitude da ressecção e das características individuais dos pacientes.^{47,90} Além do mais, a cicatrização colônica ineficaz pode ter consequências mórbidas, tais como formação de abscessos e necessidade de múltiplas intervenções cirúrgicas, e até mesmo letais, em decorrência da sepse abdominal.

Felizmente, contudo, numerosos materiais aplicados localmente ou administrados sistemicamente tem mostrado resultados encorajadores na prevenção dos efeitos deletérios desse tratamento sobre a cicatrização intestinal.^{39,47,49} Os selantes de fibrina têm sido utilizados amplamente na prática clínica, em cirurgia cardiovascular, no trauma e no fechamento de fístulas. Também estão indicados para reforçar anastomoses do cólon, estômago e delgado, apesar de não haver demonstração de redução significativa nas taxas de ocorrência de fístula.⁹¹ Nesse sentido, o uso já consagrado do TachoSil[®] como apoio à hemostasia, principalmente

em procedimentos cirúrgicos hepáticos, tem sido recentemente ampliado para novos objetivos terapêuticos, entre eles a selagem tecidual de anastomoses. O modelo experimental utilizado é o primeiro a avaliar os efeitos do reforço da anastomose colônica pelo TachoSil[®] em ratos submetidos à administração IP pós-operatória de 5-FU.

Optou-se pela utilização de ratos, pois esses animais apresentam baixo custo, necessitam de pouco espaço, são de fácil manutenção e manipulação e estão prontamente disponíveis em nosso laboratório. Além disso, não existe qualquer peculiaridade anatômica do cólon do rato que o diferencie do seu correspondente no homem e eles, como os seres humanos, também possuem a capacidade de digerir alimentos de origem animal.⁹² Outra vantagem é que o diâmetro colônico permite que a anastomose seja realizada de forma segura por um único cirurgião e sem o auxílio de microscópio.

Antes de iniciar o protocolo definitivo, realizou-se estudo piloto, com o objetivo de aperfeiçoar a técnica da execução da anastomose, da aplicação da esponja de colágeno e da medição da PR. Esse prólogo foi fundamental para padronização do procedimento e permitiu a redução do tempo operatório e o vencimento da curva de aprendizado.

Confeccionamos anastomoses completas, ou tecnicamente suficientes, para maior aproximação com o cenário clínico e de forma já descrita em outros estudos experimentais,^{33,39,40} o que possibilitou a comparação dos resultados obtidos com os existentes na literatura.

Como TachoSil[®] é uma esponja reabsorvível, buscou-se um fio de sutura com características capazes de reduzir a ocorrência de interações indesejadas com ele e, assim, minimizar erros de interpretação. Escolheu-se o polipropileno por trata-se de um material monofilamentar, não absorvível, de alta força tênsil, que causa pouca reatividade tecidual e é facilmente removível.

O momento da morte programada, no quarto DPO, foi selecionado em função da análise da fisiologia do processo de cicatrização das anastomoses intestinais e dos dados presentes na literatura. Alguns modelos experimentais efetuaram a morte dos animais no sétimo DPO ou até mesmo depois.^{32,40,43} Entretanto, nesta fase mais tardia, a anastomose é mais resistente que o tecido intestinal ao seu redor, haja vista que este também participa na reação ao trauma e perde grande parte do seu conteúdo de colágeno. Já o período inicial da cicatrização é caracterizado por

intenso infiltrado de células inflamatórias que, pela ação de proteases, promovem a quebra dos componentes da matriz extracelular,⁵⁹ o que reduz a força da anastomose e aumenta o risco da ocorrência de fístula. Dessa forma, e conforme já assinalado por outros autores, o momento mais adequado para se identificar qualquer diferença na força mecânica de uma anastomose induzida por um fator ou intervenção é o quarto, quinto ou sexto DPOs.⁴¹

Neste estudo, houve apenas uma morte prematura durante o protocolo experimental, o que correspondeu à mortalidade global de 2,5%. Sabe-se que os ratos possuem boa resposta imune⁷⁸ e grande capacidade de resistir à infecção intraperitoneal.⁹² Além disso, o fato de as anastomoses terem sido confeccionadas de forma completa contribuiu para a redução da incidência de complicações, o que também impactou na baixa mortalidade. Este resultado está em concordância com o de outros ensaios experimentais envolvendo quimioterapia IP e anastomose colônica completa em ratos, os quais também relataram índices baixos ou mesmo nulos de mortalidade.^{42,43,50}

Constatou-se perda de peso corporal em todos os animais durante o experimento. Como os ratos partiram de pesos iniciais distintos, com diferença de até 102 g, elegemos o percentual de perda relativa de peso como o parâmetro de comparação mais adequado. Além de náuseas e anorexia, efeitos colaterais comuns a diferentes agentes quimioterápicos, o espectro de toxicidade do 5-FU inclui ainda diarreia e mucosite.⁹³ Esses fatores associados podem resultar em redução da ingestão alimentar e emagrecimento. De fato, observou-se que os animais dos grupos III e IV, além da diarreia, apresentaram perda relativa de peso maior que aqueles dos grupos I e II. Entretanto, essa diferença só foi significativa para os animais do grupo III em comparação aos demais grupos. Ou seja, os animais do grupo IV apresentaram perda relativa de peso equivalente àquela observada nos grupos que não foram submetidos à quimioterapia IP. Por um mecanismo ainda desconhecido, TachoSil[®] foi capaz de proteger os animais da perda de peso induzida pela administração do 5-FU.

A perda de peso pós-operatória dos ratos que recebem 5-FU intraperitoneal já foi observada por outros investigadores,^{30,32,33,40} porém seu efeito prejudicial sobre o processo de cicatrização anastomótica ainda é motivo de debate na literatura.^{33,94} Objetivando elucidar esse assunto, Graf *et al* realizaram experimento em que limitaram a oferta nutricional aos ratos, de modo a tornar sua perda de peso

equiparável àquela observada nos animais tratados com 5-FU, não encontrando diferença na força anastomótica entre o grupo controle e o grupo com restrição da dieta. Entretanto, o grupo que recebeu 5-FU intraperitoneal apresentou força anastomótica significativamente menor quando comparado aos outros dois grupos, o que levou à conclusão de que a perda de peso isoladamente não foi capaz de influenciar a força da anastomose.⁹⁴ Antes deles, Irvin & Hunt já haviam postulado que uma perda de peso transitória inferior a 20% do peso corporal e com duração menor que uma semana não seria, por si, suficiente para causar prejuízo à cicatrização.⁹⁵

O tempo de duração do nosso estudo foi inferior a uma semana e o percentual médio de perda relativa de peso dos grupos ficou entre 9,6 % e 19,4%, o que nos faz concluir que ela não teve influência sobre o processo de cicatrização. Dessa forma, acreditamos que a perda de peso observada após o tratamento com o 5-FU não está relacionada ao prejuízo causado por ele à cicatrização anastomótica, mas parece se constituir em uma consequência dos efeitos adversos provocados por essa droga.

De acordo com Hillan *et al*, os melhores critérios para a avaliação da cicatrização de anastomoses colônicas são demonstrados pelos achados macroscópicos *post-mortem*.⁵¹ Nesse sentido, registrou-se a presença de fístulas, coleções perianastomóticas, sinais de dilatação intestinal pré-anastomótica e também do grau de aderências pós-operatórias.

Em concordância ao verificado por outros autores,⁵⁰ não se observou a presença de fístula anastomótica em qualquer animal, mesmo naqueles que receberam tratamento com 5-FU. Existem algumas características próprias do modelo experimental que podem ter contribuído para esse resultado, dentre as quais se destacam: a utilização de ratos jovens e saudáveis, menos susceptíveis ao desenvolvimento de complicações; a confecção de anastomoses tecnicamente suficientes, com baixo índice de falhas; a resistência natural dos ratos ao desenvolvimento de infecção intra-abdominal e sua capacidade de isolar fístulas pela formação de aderências locais;⁹² a construção das anastomoses com pontos em plano total sem inversão da mucosa, o que pode potencializar a formação de aderências; a alta consistência global das fezes dos roedores, que minimiza o risco de extravazamento fecal; e o fato de as anastomoses terem sido construídas na porção distal do cólon, onde as fezes são ainda mais endurecidas.

Apenas outros dois modelos experimentais avaliaram o uso de TachoSil®/TachoComb® no processo de cicatrização de anastomoses colônicas e ambos relataram resultados positivos com seu emprego. Ozel *et al* demonstraram que o uso de TachoComb® apoiou a integridade da anastomose colônica durante o período precoce da cicatrização intestinal em ratos.⁵⁹ Posteriormente, Pantelis *et al*, em modelo com anastomoses incompletas em camundongos, reportaram altos índices de fístula e de mortalidade, mas que foram reduzidas significativamente pela selagem com TachoSil®. Nesse mesmo estudo, na presença de sepse/peritonite, apesar do uso do selante ter prevenido fístulas em potencial, isso não influenciou o curso da formação de abscessos locais.⁷⁹

Outros tipos de selantes de fibrina também foram empregados com essa finalidade. Um ensaio experimental randomizado aplicou Tissucol® ao redor de anastomoses suficientes, não sendo observados sinais de ocorrência de fístula em nenhum dos grupos, levando à conclusão de que não havia justificativa para seu uso em anastomoses de baixo risco.⁹⁶ Subhas *et al*, combinaram as ações de Tisseel®, um selante de fibrina, e da gentamicina tópica para otimizar a cicatrização de anastomoses colônicas, mas não observaram benefício com a adição do antibiótico.⁹⁷

Numerosos materiais aplicados localmente ou administrados sistemicamente têm mostrado resultados encorajadores na prevenção dos efeitos deletérios da quimioterapia IP com 5-FU sobre a cicatrização das anastomoses colônicas. Em concordância com nossos resultados, Nayci *et al*, que aplicaram estimulação com força eletromagnética sobre a anastomose colônica em ratos, também não relataram a ocorrência de fístula em nenhum dos grupos de estudo.⁵⁰

Tissucol® foi aplicado localmente como reforço à anastomose em três modelos experimentais com ratos que implementaram diferentes esquemas de quimioterapia IP com 5-FU, de forma isolada³⁹ ou em combinação com Leucovorin⁹⁸ ou Interferon.⁴⁰ Em todos eles, a cobertura das anastomoses com a cola as protegeu dos efeitos deletérios do tratamento e preveniu o desenvolvimento de fístulas. Os autores especularam que o efeito protetor poderia estar relacionado à formação de uma barreira física à prova de água em torno da anastomose.

A cobertura da anastomose com membrana amniótica (MA) também foi investigada em ratos e os autores relataram que houve redução da ocorrência de fístulas com o uso do produto.³³ Já Erdem *et al*, também utilizando ratos, não

encontraram diferença na incidência de fístulas com a aplicação local nas anastomoses de fator estimulador de colônia de macrófagos e granulócitos.⁴²

A presença de coleção perianastomótica foi interpretada como consequência do insucesso da cicatrização intestinal, ou seja, secundária à ocorrência de uma fístula que foi parcialmente bloqueada, culminando com a formação de um abscesso. Sabe-se que a infecção local prejudica a cicatrização por prolongar a fase inflamatória e por aumentar a expressão local de proteases, que digerem fatores de crescimento e, assim, retardam a epitelização e a deposição de colágeno.⁹⁹ Neste estudo, não houve diferença significativa entre os grupos quanto à presença de coleções perianastomóticas. De forma semelhante, porém trabalhando com intestino delgado em porcos, Nordentoft *et al* também não encontraram diferença entre as anastomoses seladas ou não-seladas com TachoSil[®] em relação à presença de peritonite ou de abscesso.⁷⁷

Entretanto, duas considerações merecem ser feitas em relação aos resultados obtidos. Houve maior incidência de coleções no grupo 5-FU comparado ao grupo Controle, e também no grupo TachoSil[®] + 5-FU comparado ao grupo TachoSil[®]. Esse achado pode ser indicativo do efeito nocivo da quimioterapia IP sobre o processo de cicatrização da anastomose. Outros estudos já haviam relatado maiores taxas de formação de abscesso nos ratos submetidos à quimioterapia IP. Entretanto, neles, os abscessos foram relacionados à presença de fístulas das anastomoses,^{33,39,48} o que não foi o caso no nosso experimento.

Além disso, comparando-se os grupos Controle e TachoSil[®] e os grupos 5-FU e TachoSil[®] + 5-FU, dois a dois, observou-se que aqueles em que o selante foi utilizado apresentaram menor incidência de coleções perianastomóticas. Assim, pode-se atribuir ao TachoSil[®] um potencial efeito protetor. O mecanismo de selagem é desconhecido, mas poderia envolver a formação de uma barreira física em torno da anastomose, com a oclusão de pequenas falhas entre os pontos da linha de sutura, minimizando o extravasamento de conteúdo fecal.

Considerou-se dilatação intestinal pré-anastomótica o achado clínico de distensão do cólon proximal duas vezes superior ao diâmetro colônico normal, havendo retorno ao diâmetro habitual após a anastomose. Esse critério, fundamentado em um modelo experimental de obstrução,¹⁰⁰ foi adotado previamente em um ensaio experimental com ratos para avaliar o reforço da anastomose colônica com cola de fibrina e/ou esponja de colágeno.⁸²

Ocorreu maior incidência de dilatação intestinal pré-anastomótica nos animais dos grupos II e IV, mas sem significância. Esse resultado está em concordância com o de outros modelos experimentais que utilizaram TachoSil® e outros selantes de fibrina para proteger anastomoses do TGI. Em um modelo experimental com anastomoses de intestino delgado reforçadas com TachoSil® em camundongos, verificou-se dilatação intestinal pré-anastomótica severa e maiores taxas de íleo nas anastomoses reforçadas. Esse fenômeno foi atribuído ao aumento da inflamação provocado pelo selante e também à desproporção entre as espessuras do TachoSil® e da parede intestinal.⁶⁰ Já um estudo em ratos, com a aplicação de TachoSil® em anastomoses esofagogástricas, não relatou aumento dos sinais de obstrução relacionado ao uso do produto. A divergência de resultados foi atribuída à diferença da técnica de aplicação, pelo uso de pequenas tiras ao invés do envelopamento da anastomose, e também pelo fato do estômago ter paredes mais espessas e com camada muscular mais pronunciada que o cólon e o delgado.⁷⁸ Em outro ensaio experimental com porcos envolvendo a selagem de anastomoses de intestino delgado com TachoSil®, os animais foram observados por uma a seis semanas e os autores não encontraram diferenças no tocante ao grau de estenose da anastomose.⁷⁷ Schreinemacher *et al*, também com a utilização de ratos, promoveram a associação de Tisseel Duo® com Tissufleece®, uma esponja de colágeno, para vedar anastomoses colônicas insuficientes. As obstruções intestinais foram mais frequentes nos grupos de anastomoses reforçadas. Os autores especularam que, além da reação inflamatória aumentada, a retração da esponja no curso da cicatrização poderia prejudicar mecanicamente a passagem das fezes.⁸²

Tissucol® foi aplicado sobre anastomoses colônicas e de intestino delgado em ratos por van der Vijver *et al*. A maior parte dos animais do grupo cola mortos no terceiro dia apresentavam sinais de dilatação intestinal pré-anastomótica, com intestinos preenchidos por fezes duras, mas patentes. Esse fenômeno não foi observado nos animais do grupo Controle e também nos ratos mortos no quinto e sétimo dias. Os investigadores hipotetizaram que a cola poderia interferir com o movimento peristáltico do intestino, levando a constipação transitória.⁹⁶

Marjanovic *et al* avaliaram aspectos técnicos e insucessos na pesquisa com anastomoses intestinais em ratos, observando que, em alguns animais em que ocorreu íleo pós-operatório, os achados *post-mortem* revelaram obstrução intestinal por resíduos sólidos de ração ao nível da anastomose. A modificação da dieta, de

sólida para líquida nos primeiros quatro dias, reduziu a incidência da complicação, mas não resolveu o problema completamente. A obstrução passou a ser causada por bezoares sólidos, refletindo a tendência dos roedores de ingerirem fezes ou mesmo maravalha, o que foi solucionado somente quando os animais foram colocados em gaiolas individuais e com grades metálicas no assoalho.¹⁰¹

A tendência ao desenvolvimento de obstrução intestinal nas anastomoses seladas observada neste estudo pode ser entendida a partir da análise dos seguintes aspectos: de forma geral, o primeiro movimento intestinal após procedimentos cirúrgicos sobre o cólon ocorre de maneira retardada;¹⁰² morte dos ratos no quarto DPO, quando ainda existe edema importante da anastomose; oferta de dieta sólida aos animais desde o pós-operatório imediato; confecção das anastomoses na porção distal do cólon, onde a consistência fecal é maior⁹² desproporção entre as espessuras da esponja de colágeno e da parede intestinal dos ratos com potencial prejuízo aos movimentos peristálticos;⁶⁰ envelopamento circunferencial da anastomose pelo TachoSil[®], causando possível estreitamento local; e traumatismo local durante a aplicação do produto, potencializando a formação de edema no sítio anastomótico.

Ressalta-se que, em todos os animais que apresentaram essa complicação, as anastomoses encontravam-se pérvias, ou seja, não havia quadro de obstrução intestinal instalada. Também é difícil de determinar quando e com que magnitude esse estreitamento atinge um ponto crítico a partir do qual passam a ocorrer os sinais e sintomas. É plausível supor que, mesmo que certo grau de estenose da anastomose ocorra durante o período inicial da cicatrização, esse fenômeno seja transitório e regrida após a absorção do TachoSil[®] e a diminuição do edema da anastomose. Assim, a interpretação dos resultados e sua extrapolação para o cenário clínico em seres humanos devem ser realizadas com muita cautela. Além das diferenças existentes entre seres humanos e ratos em relação à espessura da parede do cólon, existem dois estudos clínicos envolvendo a aplicação do TachoSil[®] como selante em anastomoses colônicas e colorretais que não relataram aumento da incidência de quadros intestinais obstrutivos.^{74,75}

Aderências são bandas fibrosas que fazem com que tecidos ou órgãos separados se unam uns aos outros.¹⁰³ Elas são resultado da perda da atividade fibrinolítica normal no peritônio, que leva a formação de estruturas compostas de fibrina que, subsequentemente, se maturam em tecido fibroso rígido e organizado.¹⁰⁴

Após procedimentos cirúrgicos abdominais, elas são encontradas em aproximadamente 60% a 90% dos casos e podem conduzir a diversas complicações, tais como obstrução intestinal, fístulas, esterilidade em mulheres e dificuldade técnicas durante reoperações.⁹⁷

Algumas estratégias têm sido investigadas como forma de prevenção da formação de aderências, entre elas a utilização de barreiras físicas. Nesse sentido, as propriedades anti-adesivas do TachoComb[®]/TachoSil[®] foram investigadas em alguns ensaios experimentais. Osada *et al*, em modelo com coelhos, induziram a formação de aderências abdominais com irritantes químicos e mecânicos, e observaram que TachoComb[®] foi capaz de reduzir sua formação.¹⁰⁵ Getman *et al*, trabalhando com ratos, observaram que o uso de TachoSil[®] preveniu o desenvolvimento de aderências pleurais em uma área de defeito pleural criada por eletrocautério.¹⁰⁶ Schneider *et al* concluíram que TachoComb H[®] reduziu significativamente a extensão, a tenacidade e o tipo de aderências intra-abdominais em coelhos.¹⁰³ Da mesma forma, Dickneite *et al* reportaram que TachoComb[®] foi capaz de reduzir a taxa de ocorrência de aderências após a sutura do corno uterino em coelhas.¹⁰⁷

Contrariamente, um estudo que utilizou TachoComb[®] como apoio à anastomose colônica em ratos relatou aumento da formação de aderências relacionado ao seu uso e considerou isso como uma das principais desvantagens do produto.⁵⁹

Neste estudo, a formação de aderências intra-abdominais pós-operatórias foi quantificada por uma escala numérica validada que serviu como referência para a comparação entre os grupos. Aderências moderadas envolvendo a região da anastomose e o omento/alças intestinais foram encontradas em todos os animais, a exceção de dois. Dessa forma, não houve diferença significativa entre os grupos estudados.

O 5-FU, além do potencial efeito nocivo à cicatrização anastomótica, também é capaz de interferir no sistema fibrinolítico peritoneal. Nesse sentido, alguns autores observaram maiores índices de aderência nos animais com anastomoses não seladas submetidos à quimioterapia IP com essa droga.^{33,98} Entretanto, nesses estudos, esse achado foi associado à presença de fístulas anastomóticas. Como não tivemos fístulas, acreditamos que a discrepância dos nossos resultados com os

da literatura deva-se a esse fato, haja vista que é bem conhecida a relação causal entre insuficiência anastomótica e desenvolvimento de aderências pós-operatórias.

A aferição da PR foi associada à análise dos achados *post-mortem* com o intuito de se ter um parâmetro objetivo da força da anastomose. A PR pode ser definida como a pressão intraluminal na qual a anastomose se rompe³⁶ e reflete a capacidade de resistência das suturas e da cicatriz inicial. Essa medida é considerada como bom marcador da força mecânica^{82,97} e da estabilidade funcional precoce da anastomose,¹⁰¹ sendo apontada como o parâmetro que mais se aproxima do cenário clínico em seres humanos.⁸³

Estudos experimentais demonstraram que, durante o processo de cicatrização das anastomoses do TGI, os valores mais baixos da PR são encontrados nos três primeiros DPOs, ocorrendo, a partir daí, aumento progressivo.³⁶ Assim, na fase inicial, as medidas da PR correspondem a apenas 35-75% dos valores encontrados em intestinos normais.¹⁰⁸ Somente após o sétimo DPO, a PR da anastomose se torna equivalente à do cólon não operado e o rompimento passa a ocorrer fora da linha de sutura.^{35,41} Por conseguinte, essa medida somente é considerada como um parâmetro confiável da força mecânica da anastomose durante a primeira semana pós-operatória.^{36,54,96}

Acredita-se que as aderências possam interferir com a estabilidade funcional da anastomose e, assim, influenciar as medidas da PR.¹⁰¹ Por isso, durante a reoperação dos animais, houve o cuidado de se preservar as aderências locais de tecido gorduroso e/ou de alças intestinais à anastomose, fazendo a ressecção em bloco destas com a peça cirúrgica. Como esperado para o dia escolhido para a morte dos animais, observou-se que todas as anastomoses romperam na linha de sutura, o que está em consonância com dados encontrados na literatura.¹⁰⁹

Os animais do grupo 5-FU apresentaram valores de PR significativamente menores aos observados em todos os demais grupos. Esse achado aponta para um efeito negativo do 5-FU sobre o processo de cicatrização anastomótica, o que está em concordância com os relatos da literatura.^{39,44,47,49} Todavia, a interpretação desses resultados deve ser realizada de maneira criteriosa, uma vez que a estabilidade funcional da anastomose não necessariamente se correlaciona com as alterações de parâmetros estruturais da cicatrização.¹⁰¹ Assim, a redução da PR nesse grupo não se traduziu em maior incidência de abscessos e/ou fístulas, fato este também já relatado anteriormente.^{42,78,82} É bem possível que um período

transitório de redução da força da anastomose não conduza, necessariamente, ao desenvolvimento de complicações, conquanto que ela atinja determinado valor mínimo, ainda indefinido, que preserve a integridade da anastomose.

Não houve diferença significativa nas medidas de PR entre os grupos que utilizaram TachoSil[®]. Isso demonstra que a força mecânica das anastomoses nesses animais foi equivalente, independentemente de terem sido ou não expostos à quimioterapia IP. Dessa forma, pode-se sugerir que TachoSil[®] foi capaz de reverter os efeitos nocivos sobre o processo de cicatrização provocados pelo tratamento quimioterápico. De forma análoga, Verhage *et al* reforçaram anastomoses esofagogástricas em ratos e concluíram que seu uso tornou a anastomose mais forte no seu momento de maior vulnerabilidade.⁷⁸ Van der Ham *et al* também relataram aumento da PR em anastomoses colônicas quatro dias após a operação quando TachoComb[®] foi utilizado.⁶³ Entretanto, neste caso, o benefício se mostrou transitório, pois no sétimo DPO a PR do grupo selado foi inferior à do grupo controle. Os autores atribuíram o resultado ao aumento do infiltrado inflamatório causado pelo produto, o que pode ter prolongado o tempo para cicatrização.

Outros adesivos de fibrina ou a sua associação com outras substâncias também foram utilizados em modelos experimentais para a cobertura de anastomoses colônicas em condições fisiológicas ou em vigência de quimioterapia IP. Kanellos *et al* relataram que a selagem com Tissucol[®] resultou em aumento significativo da PR quando comparado ao grupo controle.¹¹⁰ Em publicações posteriores, pelos mesmos investigadores, o adesivo de fibrina também protegeu a cicatrização da anastomose colônica dos efeitos adversos da injeção perioperatória de 5-FU isolado³⁹ ou da combinação deste com o interferon alfa-2a⁴⁰ ou com o Leucovorin (LV).⁹⁸ Os autores postularam que o mecanismo de selagem da cola poderia estar associado à formação de uma cobertura resistente à água em torno da anastomose, à facilitação da aproximação tecidual, à promoção da cicatrização tissular e à formação de aderências locais, concluindo que a selagem da anastomose a tornou mecanicamente mais forte, o que resultou em aumento da PR. Subhas *et al*, em um estudo com camundongos, demonstraram que o uso da cola aumentou de forma significativa a PR tanto no terceiro quanto no quinto DPOs, mas que a adição de gentamicina não propiciou qualquer ganho adicional de força.⁹⁷ O sucesso do tratamento foi atribuído à redução da formação de hematomas, à oclusão de microperfurações, à boa adaptação aos tecidos e à facilitação à

proliferação fibroblástica proporcionadas pelo selante. Em contraposição, Schreinemacher *et al*, que investigaram a associação de Tisseel Duo[®] com Tissufleece[®] em anastomoses colônicas insuficientes, demonstraram que as PRs não foram diferentes entre os grupos, nem no terceiro nem no sétimo DPOs.⁸²

Além dos adesivos de fibrina, outras intervenções foram exploradas com o objetivo de neutralizar os prejuízos da injeção IP de 5-FU sobre a cicatrização das anastomoses colônicas. Ulugag *et al* relataram que a cobertura anastomótica com MA em ratos foi capaz de aumentar a PR no quarto e oitavo DPOs, revertendo assim os efeitos prejudiciais do tratamento.³³ Nayci *et al*, também em ratos, demonstraram que a estimulação com campos eletromagnéticos promoveu ganho significativo na força da anastomose tanto em condições normais quanto durante a terapia com 5-FU.⁵⁰

Duas outras pesquisas também reportaram que a administração imediata pós-operatória IP de Iloprost, um análogo da prostaglandina I₂, reverteu os efeitos negativos da quimioterapia IP com 5-FU isolado ou associado ao LV.^{30,49} Zacharakis *et al* utilizaram o IGF-I pela via IP e relataram que essa intervenção proporcionou aumento significativo nas medições da PR comparadas às do grupo 5-FU.⁴⁷ O GM-CSF, da mesma forma, foi aplicado localmente nas anastomoses e a conclusão foi que houve aumento da PR e do conteúdo de hidroxiprolina no grupo tratamento.⁴²

A avaliação microscópica do processo de cicatrização anastomótica foi realizada pela interpretação de quatro parâmetros histológicos, graduados de maneira semiquantitativa. Essa metodologia foi amplamente utilizada em estudos similares, possibilitando a comparação dos nossos resultados com os da literatura.

A inflamação caracteriza a fase inicial do processo de cicatrização anastomótica. As células inflamatórias, compostas pelos neutrófilos, macrófagos e linfócitos, predominam durante esse período, mas a contribuição individual de cada uma delas é variável.¹¹¹ No modelo experimental utilizado, não houve diferença significativa entre os grupos com relação à infiltração de células inflamatórias no local da anastomose.

Pode-se analisar esse resultado sob dois aspectos principais. O primeiro deles diz respeito aos possíveis efeitos do 5-FU sobre esse fenômeno, ainda motivo de controvérsia na literatura. Em alguns estudos há relato de redução da contagem de leucócitos nas anastomoses de animais submetidos à ação dessa droga,^{33,34} outros não identificaram diferenças causadas por esse tratamento,^{39,40,98} ou, ainda,

encontraram associação positiva entre a administração do quimioterápico e o aumento da concentração de células inflamatórias no local da anastomose.^{43,47,48} Essa grande heterogeneidade de resultados pode ser atribuída às diferenças metodológicas dos trabalhos, tais como momento e via da administração do quimioterápico, tempo total de tratamento, associação com outras drogas e dia da morte programada.

Outro aspecto ainda não esclarecido é o impacto do reforço das anastomoses intestinais com colas de fibrina sobre a resposta inflamatória durante o processo de cicatrização. Em dois modelos experimentais com ratos foi aplicado Tissucol[®] como reforço à anastomose colônica em vigência de quimioterapia IP com 5-FU.^{39,98} Assim como observado em nossos resultados, os autores não observaram diferença significativa entre os grupos em relação ao grau de infiltração de células inflamatórias nas anastomoses.

Entretanto, quando são analisados os relatos existentes na literatura que tratam especificamente da aplicação de esponjas de colágeno sobre anastomoses do TGI, existe unanimidade em apontar para um aumento da resposta inflamatória local. Chmelnik *et al* investigaram a resposta inflamatória em anastomoses de intestino delgado reforçadas com o TachoSil[®] em camundongos. Esses autores descreveram uma inflamação maciça, com formação de microabscessos, caracterizada pela penetração de células inflamatórias e de bactérias nas cavidades que compõe a estrutura colágena do produto. O achado foi atribuído à contaminação da esponja por bactérias intestinais e associado à aceleração do processo de absorção do selante.⁶⁰ Outro estudo com camundongos envolvendo o uso de TachoSil[®] sobre anastomoses colônicas de alto risco também relatou prolongação da fase inflamatória no grupo de anastomoses seladas.⁷⁹ TachoComb[®] também foi apontado como o responsável pelo aumento significativo do infiltrado de células inflamatórias observado no terceiro DPO dos ratos com anastomoses seladas.⁵⁹ Além do produto, os autores citaram o uso do fio de algodão como o outro possível fator etiológico envolvido, e concluíram que essa reação inflamatória exagerada aumentou o tempo para cicatrização intestinal. Já Schreinemacher *et al* associaram Tisseel Duo[®] e Tissufleece[®] com os mesmos objetivos, observando que o colágeno exógeno provocou intensa reação inflamatória, caracterizada por área de necrose profunda entre a cola e o intestino, e, dessa forma, concluíram não existir benefício com o uso combinado dos biomateriais.⁸²

O aumento do infiltrado de células inflamatórias no local da anastomose é de extrema relevância, pois essas células contêm enzimas proteolíticas que degradam os componentes da matriz extracelular, em especial o colágeno. A lise dessa proteína pode comprometer a integridade da linha de sutura, aumentando o risco de fístula. Além disso, a exacerbação da inflamação no sítio da anastomose também foi associada à elevação da incidência de quadros intestinais obstrutivos, conforme evidenciado anteriormente em ratos.⁶⁰

A neoangiogênese predomina na fase proliferativa, durante a qual ocorre a síntese da matriz extracelular. Ela representa um dos componentes fundamentais para a cicatrização da anastomose, pois ajuda a suprir os tecidos isquêmicos com os nutrientes necessários ao crescimento e à reparação, além de otimizar a oxigenação tecidual.¹¹² Neste estudo, a neovascularização foi significativamente reduzida no grupo 5-FU quando comparada aos grupos Controle e TachoSil[®]. Esse resultado, ratificado por outros autores,^{33,39,43,44,47} ilustra um dos principais mecanismos responsáveis pelos efeitos deletérios provocados pelo 5-FU sobre o processo de cicatrização.

Apesar dos animais que receberam reforço da anastomose com o TachoSil[®] terem apresentado maior grau de neoangiogênese que seus correspondentes (grupo Controle *versus* grupo TachoSil[®] e grupo 5-FU *versus* Grupo 5-FU + TachoSil[®]), essa diferença não foi significativa. Ainda assim, pode-se especular que o produto apresente alguma ação de promoção à angiogênese durante a fase precoce do processo de cicatrização. A MA e outras colas de fibrina, como Tissucol[®] e Tisseel[®], também foram capazes de estimular a neoangiogênese em vigência de QT IP.^{33,39,40,98} O aumento da migração de macrófagos para o local da anastomose, com consequente produção de citocinas mediadoras de neoangiogênese, é considerado o principal mecanismo implicado nesse fenômeno.

Conforme idealizado por Halsted, a força da parede dos órgãos do TGI reside principalmente na rede de fibras de colágeno presente na sua camada submucosa.⁵² De forma análoga, a força mecânica das feridas também é mantida pelo tecido colágeno, considerado como o mais importante elemento para a cicatrização tecidual.⁵⁹ Apesar de muito resistente à ação de enzimas proteolíticas, o colágeno pode ser degradado por uma enzima específica, a collagenase. Durante os primeiros dias de pós-operatório, a atividade dessa enzima é elevada, o que reduz, em muito, a força da anastomose. Nesse período, a integridade da linha de sutura depende,

primariamente, da capacidade de retenção dos pontos pelas fibrilas de colágeno pré-existentes na camada submucosa.³⁵ A partir do terceiro dia, com o início da fase proliferativa, a anastomose começa a ganhar força em função da síntese de colágeno novo pelos fibroblastos e células musculares lisas.^{35,36} Entretanto, o 5-FU pode inibir esse processo por interferir na produção do DNA.^{32,48} Daí, muitos estudos experimentais envolvendo quimioterapia IP com esse agente terem comprovado seus efeitos deletérios sobre a deposição de colágeno durante o processo de cicatrização.^{32,40,43,44} De forma a compensar essa deficiência, TachoSil[®] foi utilizado para cobrir as anastomoses por se tratar de uma esponja de colágeno derivada de tecidos orgânicos, com considerável força de tensão e de baixa antigenicidade.

Neste modelo, observou-se que, apesar do tratamento com 5-FU IP ter reduzido a PR, a deposição de colágeno no sítio da anastomose não acompanhou essa variação. Em outras palavras, a administração do 5-FU não reduziu o conteúdo de colágeno presente na anastomose. Este resultado está em concordância com o de outros estudos da literatura que administraram o 5-FU pela via IP.^{33,39,40,52,98} Schreinemacher *et al* associaram Tisseel Duo[®] e Tissufleece[®] para a selagem de anastomoses colônicas, e também não encontraram diferença entre os grupos em termos da quantidade relativa ou da maturidade do colágeno presente na região perianastomótica.⁸²

A aparente discrepância entre a força mecânica da anastomose, medida pela PR, e a quantidade de colágeno presente na cicatriz pode ser explicada pelo aumento local de outras substâncias,¹¹³ além da imaturidade do colágeno recém formado, cujas propriedades não contribuem para o fortalecimento da parede intestinal.¹⁰⁸

Também, TachoSil[®] não se mostrou capaz de aumentar a formação de colágeno novo na região da anastomose colônica. De forma semelhante, Verhage *et al* também não verificaram diferenças entre grupos de animais submetidos a anastomoses esofagogástricas seladas ou não com TachoSil[®],⁷⁸ sendo o mesmo relatado por Ozel *et al* em anastomoses colônicas.⁵⁹ Esses resultados podem indicar que TachoSil[®] não possui a propriedade de potencializar a deposição de colágeno novo na anastomose durante o processo de cicatrização. Outros estudos envolvendo quimioterapia IP com 5-FU e reforço anastomótico com colas de fibrina também fracassaram em mostrar benefício em estimular a deposição de colágeno na anastomose.^{39,40,98}

Por outro lado, apesar de não haver diferença significativa, observou-se que os animais do grupo II comparados aos do I, e os do grupo IV comparados aos do III, apresentaram maiores índices de deposição de colágeno. Esse achado pode indicar um possível efeito estimulatório do TachoSil[®] e já foi descrito por outros autores. Pantelis *et al* relataram que a selagem provocou aumento dos níveis dos colágenos tipos I e III e também da concentração de hidroxiprolina na área da anastomose.⁷⁹ Novamente, o mecanismo parece envolver o estímulo ao influxo de macrófagos e a conseqüente liberação de fatores que promovem proliferação fibroblástica e produção de colágeno.⁹⁷ Além disso, a fibrina, um dos componentes do TachoSil[®], é considerada como excelente meio de suporte para a migração celular.⁹⁶ Em modelo semelhante ao que utilizamos, os autores relataram maior deposição de colágeno nos grupos com anastomoses seladas pela MA. Além disso, a MA foi capaz tanto de reduzir a lise do colágeno pré-existente quanto de elevar a síntese do colágeno novo nas anastomoses.³³

A fase proliferativa da cicatrização se inicia com a chegada dos fibroblastos ao local da ferida em um processo regulado por fatores de crescimento, tais como o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), o fator de crescimento transformador (TGF) e o fator de crescimento básico fibroblástico (bFGF). Os fibroblastos são elementos essenciais à cicatrização e se tornam o principal tipo celular a partir do quarto DPO. Eles atuam substituindo a matriz provisória estabelecida no período inflamatório por tecido de granulação rico em colágeno.³⁵ Como exposto anteriormente, um dos supostos mecanismos de prejuízo à cicatrização intestinal causada pela administração IP do 5-FU ocorre pela inibição da proliferação desse tipo celular.

Nossos resultados confirmaram relatos anteriores de que o 5-FU tem a capacidade de inibir a proliferação de fibroblastos.^{33,39,43,44,47} Assim, encontrou-se redução significativa da atividade fibroblástica nos animais do Grupo III quando comparados aos do Grupo I. Já a influência dos selantes de fibrina e de outros materiais sobre a atividade fibroblástica durante o processo de cicatrização anastomótica ainda permanece como assunto não resolvido na literatura.

Neste estudo, a presença do TachoSil[®] não estimulou a atividade fibroblástica, como evidenciado pelos resultados com os grupos II e IV. Como já observado, quando TachoSil[®] foi utilizado em anastomoses esofagógicas também não houve aumento da atividade fibroblástica no terceiro, mas somente no

sétimo DPO.⁷⁸ Esse mesmo resultado foi relatado por Hoepfner *et al* em um modelo experimental com o uso de uma matriz de colágeno extraída da derme de porco.¹¹⁴ Tissucol[®] também foi utilizado com fins de vedação da anastomose colônica, em vigência de quimioterapia IP ou não, levando a resultados divergentes quanto à atividade fibroblástica.^{39,40,96,97,98}

Nossos resultados devem ser tomados como alerta sobre os potenciais efeitos deletérios da terapia quimioterápica IP precoce com o 5-FU sobre o processo de cicatrização das anastomoses colônicas, principalmente se houver condições adicionais que ameacem a integridade da anastomose, tais como desnutrição, *diabetes mellitus*, peritonite, idade avançada, entre outros. Nesses casos, o somatório de dois ou mais fatores de risco pode tornar o risco de fístula inaceitável e o adiamento do tratamento adjuvante ou mesmo da confecção da anastomose deve ser considerado.

Do ponto de vista clínico, é indiscutível que o sucesso da cicatrização anastomótica depende primordialmente da técnica operatória, da vascularização intestinal e da ausência de tensão na linha de sutura. O uso dos adesivos tissulares está ganhando cada vez mais espaço na cirurgia gastrointestinal, mas, apesar de anos de pesquisa, os resultados da selagem das anastomoses colônicas permanecem inconclusivos e fundamentados principalmente em estudos em animais.

Apesar dos resultados obtidos proverem subsídios para a utilização do TachoSil[®] como reforço à anastomose colônica em vigência de quimioterapia IP com 5-FU, algumas limitações do presente estudo devem ser apontadas. Primeiramente, o modelo experimental em animais de pequeno porte, particularmente em roedores, tem suas limitações naturais. Dessa forma, o diâmetro reduzido do lúmen intestinal, a fina espessura da parede colônica, além da alta consistência das fezes podem ter se constituído em fatores críticos e impactado no desfecho final. Além disso, a medida do conteúdo de colágeno foi realizada pela análise histológica da deposição do colágeno, ao invés da utilização de avaliações mais complexas, como a atividade das metaloproteinases de matriz (MMP), a razão do colágeno ou o grau de *cross linking*. Também não foram avaliados parâmetros bioquímicos, como a medida da concentração de hidroxiprolina, ou moleculares, como a expressão dos tipos de colágeno (I e III) por isolamento do RNA por técnicas de reação em cadeia da polimerase por transcriptase reversa (RT-PCR). Além disso, o processo de

cicatrização foi analisado de forma pontual e precoce, exclusivamente no quarto DPO e, assim, os resultados em médio e longo prazos permanecem desconhecidos.

Mesmo que os mecanismos celulares precisos pelos quais TachoSil[®] otimize a cicatrização anastomótica não sejam evidentes, o estímulo à neovascularização e potencialização à síntese de colágeno podem estar envolvidos. Independentemente disso, nossos resultados claramente indicam que a melhora do parâmetro funcional (PR) associada à ausência de alterações histológicas no processo cicatricial implicam que o benefício encontrado com o uso do TachoSil[®] pode ser atribuído mais a uma ação mecânica do produto do que, propriamente, a uma resposta celular por ele induzida.

Este estudo deve ser interpretado em caráter preliminar. A segurança e o benefício da utilização do TachoSil[®] como selante em anastomoses gastrointestinais ainda necessita de investigação adicional antes de ser aplicada de forma rotineira no cenário clínico, especialmente pela possibilidade de associação com quadros intestinais obstrutivos. Acredita-se que a continuação dessa linha de pesquisa se impõe por meio da realização de outros modelos experimentais básicos em animais de grande porte, especialmente porcos, com especial atenção ao risco de estenose da anastomose. Nesse caso, uma avaliação endoscópica cuidadosa da anastomose em diversos momentos durante o período pós-operatório deve ser incluída no projeto investigativo.

Apesar dos resultados obtidos não poderem ser extrapolados diretamente para situações clínicas, eles são promissores para a realização de estudos em seres humanos. Dessa forma, ensaios prospectivos e randomizados são necessários para elucidar, de forma conclusiva e inequívoca, os efeitos benéficos sugeridos pela selagem com TachoSil[®] sobre a cicatrização de anastomoses colônicas em vigência de QT intraperitoneal com 5-FU.

CONCLUSÕES

Nossos resultados mostraram que a quimioterapia IP perioperatória precoce com 5-FU afetou negativamente a fase inicial da cicatrização de anastomoses colônicas tecnicamente suficientes em ratos. Esse efeito prejudicial foi caracterizado pela potencialização da perda de peso dos animais, pela redução da força mecânica das anastomoses e pela indução de alterações histológicas no processo de cicatrização.

Entretanto, a aplicação do TachoSil[®] ao redor das anastomoses mostrou-se segura e foi capaz de reverter alguns dos efeitos nocivos provocados por esse tratamento.

REFERÊNCIAS

- 1- Jemal A, Center MM, DeSantis C, Ward EM. Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010 Aug;19(8):1893-907.
- 2- Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro:Inca,2011,118p.
- 3- Libutti SK, Saltz LB, Willett CG. (2011). Cancer of the colon. In: deVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA. *Cancer Principles and Practice of Oncology*, 9th edition, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, pp 1103-1104.
- 4- Royal RE, Pingpank JF Jr. Diagnosis and management of peritoneal carcinomatosis arising from adenocarcinoma of the colon and rectum. *Semin Oncol.* 2008 Apr;35(2):183-91.
- 5- Dawson LE, Russell AH, Tong D, Wisbeck WM. Adenocarcinoma of the sigmoid colon: sites of initial dissemination and clinical patterns of recurrence following surgery alone. *J Surg Oncol.* 1983 Feb;22(2):95-9.
- 6- Russell AH, Tong D, Dawson LE, Wisbeck WM, Griffin TW, Laramore GE, Luk KH. Adenocarcinoma of the retroperitoneal ascending and descending colon: sites of initial dissemination and clinical patterns of recurrence following surgery alone. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1983 Mar;9(3):361-5.
- 7- Sugarbaker PH. Cytoreductive surgery plus hyperthermic perioperative chemotherapy for selected patients with peritoneal metastases from colorectal cancer: a new standard of care or an experimental approach? *Gastroenterol Res Pract.* 2012;2012:309417.
- 8- Seymour MT, Trigonis I, Finan PJ, Halstead F, Dunham R, Wilson G, Farrugia D, Chester JD, King J, Brown CB, Slevin ML, Joel SP. A feasibility, pharmacokinetic and frequency-escalation trial of intraperitoneal chemotherapy in high risk gastrointestinal tract cancer. *Eur J Surg Oncol.* 2008 Apr;34(4):403-9.
- 9- Deraco M, Elias D, Glehen O, Helm CW, Sugarbaker PH, Verwaal VJ. (2011). Peritoneal Surface Malignancy. In: deVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA. *Cancer Principles and Practice of Oncology*, 9th edition, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, pp 2084-2085.
- 10- Sugarbaker PH, Van der Speeten K, Stuart OA. Pharmacologic rationale for treatments of peritoneal surface malignancy from colorectal cancer *World J Gastrointest Oncol.* 2010 Jan 15;2(1):19-30.
- 11- Elias D, Blot F, El Otmany A, Antoun S, Lasser P, Boige V, Rougier P, Ducreux M. Curative treatment of peritoneal carcinomatosis arising from colorectal

cancer by complete resection and intraperitoneal chemotherapy. *Cancer*. 2001 Jul 1;92(1):71-6.

12- Sugarbaker PH, Gianola FJ, Speyer JL, Wesley R, Barofsky I, Myers CE. Prospective randomized trial of intravenous v intraperitoneal 5-FU in patients with advanced primary colon or rectal cancer. *Semin Oncol*. 1985 Sep;12(3 Suppl 4):101-11.

13- Scheithauer W, Kornek G, Rosen H, Sebesta C, Marcell A, Kwasny W, Karall M, Depisch D. Combined intraperitoneal plus intravenous chemotherapy after curative resection for colonic adenocarcinoma. *Eur J Cancer*. 1995 Nov;31A(12):1981-6.

14- Scheithauer W, Kornek GV, Marczell A, Karner J, Salem G, Greiner R, Burger D, Stöger F, Ritschel J, Kovats E, Vischer HM, Schneeweiss B, Depisch D. Combined intravenous and intraperitoneal chemotherapy with fluorouracil + leucovorin vs fluorouracil + levamisole for adjuvant therapy of resected colon carcinoma. *Br J Cancer*. 1998 Apr;77(8):1349-54.

15- Van der Speeten K, Stuart OA, Sugarbaker PH. Pharmacology of perioperative intraperitoneal and intravenous chemotherapy in patients with peritoneal surface malignancy. *Surg Oncol Clin N Am*. 2012 Oct;21(4):577-97.

16- Van der Speeten K, Govaerts K, Stuart OA, Sugarbaker PH. Pharmacokinetics of the perioperative use of cancer chemotherapy in peritoneal surface malignancy patients. *Gastroenterol Res Pract*. 2012;2012:378064.

17- Flessner M, Henegar J, Bigler S, Genous L. Is the peritoneum a significant transport barrier in peritoneal dialysis? *Peritoneal Dialysis Int* 2003;23(6):542-49.

18- Stelin G, Rippe B. A phenomenological interpretation of the variation in dialysate volume with dwell time in CAPD. *Kidney Int* 1990;38(3):147-156.

19- Sugarbaker PH, Graves T, Debruijn EA. Rationale for early postoperative intraperitoneal chemotherapy (EPIC) in patients with advanced gastrointestinal cancer. *Cancer Res*. 1990;50:5790-57-94.

20- Dedrick RL, Myers CE, Bungay PM, et al. Pharmacokinetic rationale for peritoneal drug administration in the treatment of ovarian cancer. *Cancer Treat Rep* 1978;62(1):1-11.

21- Dedrick RL. Theoretical and experimental bases of intra-peritoneal chemotherapy. *Semin Oncol*. 1985;12(3):1-6.

22- Ratain MJ, Mick R. Principles of pharmacokinetics and pharmacodynamics. In: Schilsky RL, Milano GA, Ratain MJ, eds. *Principles of Antineoplastic Drug Development and Pharmacology*. Basic and Clinical Oncology. New York: Marcel Dekker, 1996:123.

- 23- Takimoto CH, Ng CM, Puchalski T. (2011). Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. In: deVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA. Cancer Principles and Practice of Oncology, 9th edition, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, pp 2084-2085.
- 24- Heidelberger C, Chaudhuri NK, Danneberg P, et al. Fluorinated pyrimidines, a new class of tumor-inhibitory compounds. *Nature* 1957;179(4561):663-6.
- 25- Grem JL. 5-Fluorouracil: forty-plus and still ticking. A review of its preclinical and clinical development. *Invest New Drugs*. 2000 Nov;18(4):299-313.
- 26- Libutti SK, Saltz LB, Willett CG. (2011). Cancer of the colon. In: deVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA. Cancer Principles and Practice of Oncology, 9th edition, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, pp 1109-1110.
- 27- André T, Boni C, Navarro M, Tabernero J, Hickish T, Topham C, Bonetti A, Clingan P, Bridgewater J, Rivera F, de Gramont A. Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial. *J Clin Oncol*. 2009 Jul 1;27(19):3109-16.
- 28- Fielding LP, Hittinger R, Grace RH, Fry JS. Randomized controlled trial of adjuvant chemotherapy by portal-vein perfusion after curative resection for colorectal adenocarcinoma. *Lancet*. 1992 Aug 29;340(8818):502-6.
- 29- Sugarbaker PH. (2010). Peritoneal carcinomatosis, sarcomatosis, and mesothelioma: surgical responsibilities. In: Silberman H, Silberman AW. Principles and Practice of Surgical Oncology. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, pp 248-249.
- 30- Bostanoğlu S, Dinçer S, Keskin A, Bostanoğlu A, Dursun A, Serim C. Beneficial effect of Iloprost on impaired colonic anastomotic healing induced by intraperitoneal 5-fluorouracil infusion. *Dis Colon Rectum*. 1998 May;41(5):642-8.
- 31- Moertel CG, Fleming TR, Macdonald JS, Haller DG, Laurie JA, Goodman PJ, Ungerleider JS, Emerson WA, Tormey DC, Glick JH, *et al*. Levamisole and fluorouracil for adjuvant therapy of resected colon carcinoma. *N Engl J Med*. 1990 Feb 8;322(6):352-8.
- 32- Hacıyanlı M, Fuzun M, Unek T, Tokgoz Z. Does the Administration Route of Leucovorin Have Any Influence on the Impairment of Colonic Healing Caused by Intraperitoneal 5-Fluorouracil Treatment? *Eur Surg Res*. 2001;33(2):80-5.
- 33- Uludag M, Ozdilli K, Citgez B, Yetkin G, Ipcioglu OM, Ozcan O, Polat N, Kartal A, Torun P, Isgor A. Covering the colon anastomoses with amniotic membrane prevents the negative effects of early intraperitoneal 5-FU administration on anastomotic healing *Int J Colorectal Dis*. 2010 Feb;25(2):223-32.
- 34- de Waard JW, Wobbes T, de Man BM, van der Linden CJ, Hendriks T. The effects of 5-fluorouracil and interferon-alpha on early healing of experimental intestinal anastomoses. *Br J Cancer*. 1996 Sep;74(5):711-6.

- 35- Thompson SK, Chang EY, Jobe BA. Clinical Review: Healing I Gastrointestinal Anastomoses, Part I. Microsurgery. 2006;26(3):131-6.
- 36- Munireddy S, Kavalukas SL, Barbul A. Intra-abdominal healing: gastrointestinal tract and adhesions. Surg Clin North Am. 2010 Dec;90(6):1227-36
- 37- Thornton FJ, Barbul A. Healing in the gastrointestinal tract. Surg Clin North Am. 1997;77:549-573.
- 38- Martens MF, Hendriks T. Postoperative changes in collagen synthesis in intestinal anastomoses of the rat: differences between small and large bowel. Gut. 1991 Dec;32(12):1482-7.
- 39- Kanellos I, Mantzoros I, Demetriades H, Kalfadis S, Kelpis T, Sakkas L, Betsis D. Healing of colon anastomoses covered with fibrin glue after immediate postoperative intraperitoneal administration of 5-fluorouracil. Dis Colon Rectum. 2004 Apr;47(4):510-5.
- 40- Kanellos D, Blouhos K, Pramateftakis MG, Kanellos I, Demetriades H, Sakkas L, Betsis D. Effect of 5-Fluorouracil plus Interferon on the Integrity of Colonic Anastomoses Covering with Fibrin Glue. World J Surg. 2007 Jan;31(1):186-91.
- 41- Fukuchi SG, Seeburger JL, Parquet G, Rolandelli RH. Influence of 5-Fluorouracil on Colonic Healing and Expression of Transforming Growth Factor Beta 1. J Surg Res. 1999 Jun 15;84(2):121-6.
- 42- Erdem E, Dinç S, Erdem D, Ustün H, Caydere M, Alagöl H. Effects of intraperitoneal chemotherapy and GM-CSF on anastomotic healing: an experimental study in rats. J Surg Res. 2002 Nov;108(1):1-6.
- 43- Pramateftakis MG, Kanellos D, Mantzoros I, Despoudi K, Raptis D, Angelopoulos S, Koliakos G, Zaraboukas T, Lazaridis C. Intraperitoneally administered irinotecan with 5-Fluorouracil impair wound healing of colonic anastomoses in a rat model: an experimental study. Tech Coloproctol. 2011 Oct;15 Suppl 1:S121-5.
- 44- Kanellos D, Pramateftakis MG, Mantzoros I, Zacharakis E, Raptis D, Despoudi K, Zaraboukas T, Koliakos G, Lazaridis H. The Effects of intraperitoneal administration of oxaliplatin and 5-FU on the healing of colonic anastomoses: an experimental study Tech Coloproctol. 2011 Oct;15 Suppl 1:S111-5.
- 45- Weiber S, Graf W, Glimelius B, Jiborn H, Pählman L, Zederfeldt B. Experimental colonic healing in relation to timing of 5-fluorouracil therapy. Br J Surg. 1994 Nov;81(11):1677-80.
- 46- van der Kolk BM, de Man BM, Wobbles T, Hendriks T. Is early post-operative treatment with 5-fluorouracil possible without affecting anastomotic strength in the intestine? Br J Cancer. 1999 Feb;79(3-4):545-50.
- 47- Zacharakis E, Demetriades H, Pramateftakis MG, Lambrou I, Zacharakis E, Zaraboukas T, Koliakos G, Kanellos I, Betsis D. Effect of IGF-I on Healing of Colonic

Anastomoses in Rats Under 5-FU Treatment. *J Surg Res.* 2008 Jan;144(1):138-44.

48- Kanellos I, Kavouni A, Zaraboukas T, Odisseos C, Galovatsea K, Dadoukis I. Influence of intraperitoneal 5-fluorouracil plus folinic acid on the healing of colonic anastomoses in rats. *Eur Surg Res.* 1996;28(5):374-9.

49- Vasiliadis K, Pramateftakis MG, Blouhos K, Mantzoros I, Koliakos G, Zaraboukas T, Kanellos I, Demetriades H, Alamdari DH, Betsis D. Effect of iloprost on impaired anastomotic healing caused by 5-fluorouracil plus leucovorin. *Dis Colon Rectum.* 2007 Jun;50(6):899-907.

50- Nayci A, Cakmak M, Renda N, Aksoyek S, Yucesan S. Effect of electromagnetic fields and early postoperative 5-fluorouracil on the healing of colonic anastomoses. *Int J Colorectal Dis.* 2003 Mar;18(2):136-41.

51- Hillan K, Nordlinger B, Ballet F, Puts JP, Infante R. The healing of colonic anastomoses after early intraperitoneal chemotherapy: an experimental study in rats. *J Surg Res.* 1988 Feb;44(2):166-71.

52- Nasirkhan MU, Abir F, Longo W, Kozol R. Anastomotic disruption after large bowel resection. *World J Gastroenterol.* 2006 Apr 28;12(16):2497-504.

53- Schrock TR, Deveney CW, Dunphy JE. Factor contributing to leakage of colonic anastomoses. *Ann Surg.* 1973 May;177(5):513-8.

54- Kosmidis C, Efthimiadis C, Anthimidis G, Basdanis G, Apostolidis S, Hytioglou P, Vasiliadou K, Prousalidis J, Fahantidis E. Myofibroblasts and colonic anastomosis healing in Wistar rats. *BMC Surg.* 2011 Mar2;11:6.

55- Eryilmaz R, Samuk M, Tortum OB, Akcakaya A, Sahin M, Goksel S. The role of dura mater and free peritoneal graft in the reinforcement of colon anastomosis. *J Invest Surg.* 2007 Jan- Feb;20(1):15-21.

56- Hoepfner J, Crnogorac V, Marjanovic G, Jüttner E, Keck T, Weiser HF, Hopt UT. Small intestinal submucosa for reinforcement of colonic anastomosis. *Int J Colorectal Dis.* 2009 May;24(5):543-50.

57- Henne-Bruns D, Kreischer HP, Schmiegelow P, Kremer B. Reinforcement of colon anastomoses with polyglycolic acid mesh: an experimental study. *Eur Surg Res.* 1990;22(4):224-30.

58- Nursal TZ, Anarat R, Bircan S, Yildirim S, Tarim A, Haberal M. The effect of tissue adhesive, octyl-cyanoacrylate, on the healing of experimental high-risk and normal colonic anastomoses. *Am J Surg.* 2004 Jan;187(1):28-32.

59- Ozel SK, Kazez A, Akpolat N. Does a fibrin-collagen patch support early anastomotic healing in the colon? An experimental study. *Tech Coloproctol.* 2006;10:233-6.

- 60- Chmelnik M, Lasch L, Weih S, Wink E, Romero P, Holland-Cunz S. Anastomotic sealing with a fibrin-coated collagen patch in small-diameter bowel. *Langenbecks Arch Surg*. 2011 Jun;396(5):685-91.
- 61- Erdogan D, van Gulik TM. Evolution of Fibrinogen-Coated Collagen Patch for Use as a Topical Hemostatic Agent *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2008 Apr;85(1):272-8.
- 62- Petrelli NJ, Cohen H, DeRisi D, Ambrus JL, Williams P. The application of tissue adhesives in small bowel anastomoses. *J Surg Oncol*. 1982 Jan;19(1):59-61.
- 63- van der Ham AC, Kort WJ, Weijma IM, van den Ingh HF, Jeekel H. Effect of antibiotics in fibrin sealant on healing colonic anastomoses in the rat. *Br J Surg*. 1992 Jun;79(6):525-8.
- 64- Giuratrabocchetta S, Rinaldi M, Cuccia F, Lemma M, Piscitelli D, Polidoro P, Altomare DF. Protection of intestinal anastomosis with biological glues: an experimental randomized controlled trial. *Tech Coloproctol*. 2011 Jun;15(2):153-8.
- 65- Vakalopoulos KA, Daams F, Wu Z, Timmermans L, Jeekel JJ, Kleinrensink GJ, van der Ham A, Lange JF. Tissue adhesives in gastrointestinal anastomosis: a systematic review. *J Surg Res*. 2013 Apr;180(2):290-300.
- 66- Toro A, Mannino M, Reale G, Di Carlo I. TachoSil use in abdominal surgery: a review. *J Blood Med*. 2011;2:31-6.
- 67- Rickenbacher A, Breitenstein S, Lesurtel M, Frilling A. Efficacy of TachoSil a fibrin-based haemostat in different fields of surgery-a systematic review. *Expert Opin Biol Ther*. 2009 Jul;9(7):897-907.
- 68- Berdajs D, Bürki M, Michelis A, von Segesser LK. Seal properties of TachoSil: in vitro hemodynamic measurements. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2010 Jun;10(6):910-3.
- 69- Lacaze L, Le Dem N, Bubenheim M, Tsilividis B, Mezghani J, Schwartz L, Francois A, Ertaud JY, Bagot d'Arc M, Scotté M. Tensile strength of biological fibrin sealants: a comparative study. *J Surg Res*. 2012 Aug;176(2):455-9.
- 70- Borro JM, Gil AD, Lisart RF, Maestre JA, de Urbina JO, Terrés CR, Santoyo J, Varo E. Pharmacoeconomic analysis of hemostatic treatment in surgery with a fibrinogen and thrombin medicinal sponge. *Spa Res Art*. 2006;3(3):99-107.
- 71- Di Carlo I, Pulvirenti E, Toro A. Use of a fibrinogen- and thrombin-coated patch for peptic ulcer perforation repair. *Hepatogastroenterology*. 2009;56(91-92):575-7.
- 72- Erdogan A, Gurses G, Keskin H, Demircan A. The sealing effect of a fibrin tissue patch on the esophageal perforation area in primary repair. *World J Surg* 2007;31:2199-203.

- 73- Pilone V, Di Micco R, Monda A, Villamaina E, Forestieri P. Use of Tachosil® in bariatric surgery: preliminary experience in control of bleeding after sleeve gastrectomy. *Minerva Chir.* 2012 Jun;67(3):241-8.
- 74- De Stefano A, Bettarini F, Di Mare G, Neri A. Enteric anastomosis and Tachosil®. *Minerva Chir.* 2011 Jun;66(3):183-8.
- 75- Parker MC, Pohlen U, Borel Rinkes IH, Delvin T. The application of TachoSil® for sealing colorectal anastomosis: a feasibility study. *Colorectal Dis.* 2013 Feb;15(2):252-7.
- 76- Shurkalin BK, Gorskiĭ VA, Ettinger AP. Can perforated ulcer not be sutured? *Vestn Khir Im I I Grek.* 2001;160(2):81-6.
- 77- Nordentoft T, Romer J, Sorensen M. Sealing of gastrointestinal anastomoses with a fibrin glue-coated collagen patch: a safety study. *J Invest Surg.* 2007;20:363-9.
- 78- Verhage RJ, Ruiz A, Verheem A, Goldschmeding R, Borel Rinkes IH, van Hillegersberg R. Fibrin-thrombin coated sealant increases strength of esophagogastric anastomoses in a rat model. *J Surg Res.* 2012 Aug;176(2):e57-63.
- 79- Pantelis D, Beissel A, Kahl P, Wehner S, Vilz TO, Kalff JC. The effect of sealing a fixed combination of collagen matrix-bound coagulation factors on the healing of colonic anastomoses in experimental high risk mice models. *Langenbecks Arch Surg.* 2010;395:1039-48.
- 80- Marques RG, Morales MM, Petroianu A. Brazilian law for scientific use of animals. *Acta Cir Bras.* 2009;24(1):69-74.
- 81- Knighthly JJ, Agostino D, Clifton EE. The effect of fibrinolysin and heparin on the formation of peritoneal adhesions. *Surg.* 1962;52:250-8.
- 82- Schreinemacher MH, Bloemen JG, van der Heijden SJ, Gijbels MJ, Dejong CH, Bouvy ND. Collagen fleeces do not improve colonic anastomotic strength but increase bowel obstructions in an experimental rat model. *Int J Colorectal Dis.* 2011 Jun;26(6):729-35.
- 83- Phillips JD, Kim CS, Fonkalsrud EW, Zeng H, Dindar H. Effects of chronic corticosteroids and vitamin A on the healing of intestinal anastomoses. *Am J Surg.* 1992 Jan;163(1):71-7.
- 84- Sugarbaker PH, Jablonski KA. Prognostic features of 51 colorectal and 130 appendiceal cancer patients with peritoneal carcinomatosis treated by cytoreductive surgery and intraperitoneal chemotherapy. *Ann Surg.* 1995 Feb;221(2):124-32.
- 85- Culliford AT, Brooks AD, Sharma S, Saltz LB, Schwartz GK, O'Reilly EM, Ilson DH, Kemeny NE, Kelsen DP, Guillem JG, Wong WD, Cohen AM, Paty PB. Surgical debulking and intraperitoneal chemotherapy for established peritoneal metastases from colon and appendix cancer. *Ann Surg Oncol.* 2001 Dec;8(10):787-95.

- 86- Verwaal VJ, van Ruth S, de Bree E, van Sloothen GW, van Tinteren H, Boot H, Zoetmulder FA. Randomized trial of cytoreduction and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy versus systemic chemotherapy and palliative surgery in patients with peritoneal carcinomatosis of colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2003 Oct 15;21(20):3737-43.
- 87- Franko J, Ibrahim Z, Gusani NJ, Holtzman MP, Bartlett DL, Zeh HJ 3rd. Cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemoperfusion versus systemic chemotherapy alone for colorectal peritoneal carcinomatosis. *Cancer*. 2010 Aug 15;116(16):3756-62.
- 88- Klaver YL, Hendriks T, Lomme RM, Rutten HJ, Bleichrodt RP, de Hingh IH. Intraoperative versus early postoperative intraperitoneal chemotherapy after cytoreduction for colorectal peritoneal carcinomatosis: an experimental study. *Ann Surg Oncol*. 2012 Jul;19 Suppl 3:S475-82.
- 89- Klaver YL, Hendriks T, Lomme RM, Rutten HJ, Bleichrodt RP, de Hingh IH. Hyperthermia and intraperitoneal chemotherapy for the treatment of peritoneal carcinomatosis: an experimental study. *Ann Surg*. 2011 Jul;254(1):125-30.
- 90- Kanellos I, Kazantzidou D, Evangelou I, Galovatsea K, Zaraboukas T, Dadoukis I. Healing of colonic anastomoses after immediate and delayed administration of 5-fluorouracil plus folinic acid. *Eur Surg Res*. 1998;30(5):312-7.
- 91- Eisenberg D. Biological sealants: the next great thing in gastrointestinal surgery? *3J Surg Res*. 2013 Jun 1;182(1):30-1.
- 92- Pommergaard HC, Rosenberg J, Schumacher-Petersen C, Achiam MP. Choosing the Best animal species to mimic clinical colon anastomotic leakage in humans: a qualitative systematic review. *Eur Surg Res*. 2011;47(3):173-81.
- 93- Saif MW, Chu E. (2011). Antimetabolites. In: deVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA. *Cancer Principles and Practice of Oncology*, 9th edition, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, pp 396-97.
- 94- Graf W, Weiber S, Jiborn H, Pählman L, Glimelius B, Zederfeldt B. The roles of nutritional depletion and drug concentration in 5-fluorouracil-induced inhibition of colonic healing. *J Surg Res*. 1994 May;56(5):452-6.
- 95- Irvin TT, Hunt TK. Effect of malnutrition on colonic healing. *Ann Surg*. 1974 Nov;180(5):765-72.
- 96- van der Vijver RJ, van Laarhoven CJ, de Man BM, Lomme RM, Hendriks T. The effect of fibrin glue on the early healing phase of intestinal anastomoses in the rat. *Int J Colorectal Dis*. 2012 Aug;27(8):1101-7.
- 97- Subhas G, Bhullar JS, Cook J, Shah A, Silberberg B, Andrus L, Decker M, Mittal VK. Topical Gentamicin does not provide any additional anastomotic strength when combined with fibrin glue *Am J Surg*. 2011 Mar;201(3):339-43.

- 98- Kanellos I, Christoforidis E, Kanellos D, Pramateftakis MG, Sakkas L, Betsis D. The healing of colon anastomosis covered with fibrin glue after early postoperative intraperitoneal chemotherapy. *Tech Coloproctol.* 2006;10:115-120.
- 99- Robson MC, Steed DL, Franz MG. Wound healing: biologic features and approaches to maximize healing trajectories. *Curr Probl Surg.* 2001 Feb;38(2):72-140.
- 100- Mahdy T, Mohamed G, Elhawary A. A light and scanning electron microscope study of the albino rat ileum after partial obstruction. *Ann Anat.* 2008 Dec 20;190(6):531-40.
- 101- Marjanovic G, Holzner P, Kulemann B, Kuesters S, Karcz WK, Timme S, Zur Hausen A, Baumann T, Hopt UT, Obermaier R, Hoepfner J. Pitfalls and technical aspects during the research of intestinal anastomotic healing in rats. *Eur Surg Res.* 2010;45(3-4):314-20.
- 102- Boeckxstaens GE, de Jonge WJ. Neuroimmune mechanisms in postoperative ileus. *Gut.* 2009 Sep;58(9):1300-11.
- 103- Scheneider A, Bennek J, Olsen K, Weib J, Schmidt W, Rolle U. Experimental study evaluating the effect of a barrier method on postoperative intraabdominal adhesions. *Dig Dis Sci.* 2006 Mar;51(3):566-570.
- 104- Thompson J. Pathogenesis and prevention of adhesion formation. *Dig Surg.* 1998;15:153-57.
- 105- Osada H, Minai M, Yoshida T, Satoh K. Use of fibrin adhesive to reduce post-surgical adhesion reformation in rabbits. *J Int Med Res.* 1999 Sep-Oct;27(5):242-6.
- 106- Getman V, Devyatko E, Wolner E, Aharinejad S, Mueller MR. Fleece bound sealing prevents pleural adhesions. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2006 Jun;5(3):243-46.
- 107- Dickneite G, Rolle U, Rosenthal D. Prevention of gynaecological adhesions using haemostatic fleece in a rabbit model. *J Int Med Res.* 2006 Sep-Oct;34(5):505-13.
- 108- Ersoy E, Akbulut H, Moray G. Effects of oxaliplatin and 5-fluorouracil on the healing of colon anastomoses. *Surg Today.* 2009;39(1):38-43.
- 109- de Waard JW, Wobbles T, de Man BM, van der Linden CJ, Hendriks T. Post-operative levamisole may compromise early healing of experimental intestinal anastomoses. *Br J Cancer.* 1995 Aug;72(2):456-60.

- 110- Kanellos I, Mantzoros I, Goulimaris I, Zacharakis E, Zavitsanakis A, Betsis D. Effects of the use of fibrin glue around the colonic anastomosis of the rat. *Tech Coloproctol.* 2003;7:82.
- 111- Witte MB, Barbul A. General principles of wound healing. *Surg Clin North Am.* 1997 Jun;77(3):509-28.
- 112- Enestvedt CK, Thompson SK, Chang EY, Jobe BA. Clinical review: Healing in gastrointestinal anastomoses, part II. *Microsurgery.* 2006;26(3):137-43.
- 113- Hendriks T, Mastboom WJ. Healing of experimental intestinal anastomoses. Parameters for repair. *Dis Colon Rectum.* 1990 Oct;33(10):891-901.
- 114- Hoepfner J, Willa K, Timme S, Tittelbach-Helmrich D, Hopt UT, Keck T, Marjanovic G. Reinforcement of colonic anastomoses with a collagenous double-layer matrix extracted from porcine dermis. *Eur Surg Res.* 2010;45(2):68-76.

ANEXO - Comitê de ética em pesquisa

Aprovação da Comissão de Ética para o cuidado e uso de animais experimentais – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ.



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCANTARA GOMES

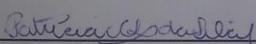


COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS

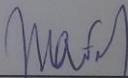
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº CEUA/003/2011 sobre "Cicatrização da anastomose colônica reforçada por esponja de colágeno (Tachosil) após quimioterapia intraperitoneal precoce com 5-fluoracil (5-FU): estudo experimental em ratos", sob a responsabilidade de Ruy Garcia Marques, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEA), em 28/01/2011. Este certificado expira em 28/01/2015.

Rio de Janeiro, 28 de Janeiro de 2011.



Profa. Patricia Cristina Lisboa
CEA/IBRAG/UERJ



Prof. Israel Felzenszwalb
CEA/IBRAG/UERJ

Prof. Patricia Cristina Lisboa da Silva
Sub-Chefe do Deptº de Ciências Fisiológicas
IBRAG/UERJ - Mat. 34765-8

Israel Felzenszwalb
Diretor
IBRAG - UERJ
Mat. 2887-8

/ass