

A influência da nicotina na cicatrização de anastomoses do intestino delgado em ratos: angiogênese e miofibroblastos

The influence of nicotine in healing of small bowel anastomoses in rats: angiogenesis and miofibroblasts.

JAMES SKINOVSKY, TCBC-PR¹; OSVALDO MALAFAIA, ECBC-PR²; MAURICIO CHIBATA¹; FERNANDA TSUMANUMA³; FLÁVIO PANEGALLI FILHO³; MARCUS VINÍCIUS DANTAS DE CAMPOS MARTINS, TCBC-RJ⁴.

R E S U M O

Objetivo: conhecer o efeito da nicotina sobre a angiogênese e formação de miofibroblastos em anastomoses do intestino delgado de ratos. **Métodos:** sessenta ratos *Wistar* foram divididos de maneira aleatória em grupos Nicotina(N) e Controle (C), conforme o tratamento proposto. Cada grupo foi subdividido em três subgrupos, de acordo com o intervalo de tempo utilizado para a avaliação (7, 14 ou 28 dias). O grupo N, com 30 animais, recebeu nicotina por via subcutânea, na dose de 2mg/Kg de peso, diluída em 0,3ml de solução salina a 0,9%, em duas aplicações diárias, durante 28 dias prévios à operação e por mais 7, 14 ou 28 dias, conforme o subgrupo. O grupo C (igualmente com 30 animais) recebeu somente a solução salina nas mesmas condições e intervalos de tempo. Após 28 dias efetuou-se, em cada rato, anastomose término-terminal a 10cm da flexura duodenojejunal. Após 7, 14 ou 28 dias da cirurgia, os dez animais de cada subgrupo foram eutanasiados, sendo que as áreas anastomosadas, 1cm proximal a 1cm distal, foram encaminhadas para contagem de vasos sanguíneos e miofibroblastos, através de coloração imuno-histoquímica por aplicação dos anticorpos monoclonais antifator VIII e anti-alfa-actina muscular lisa. **Resultados:** a administração de nicotina levou à diminuição do número de vasos sanguíneos aferidos no 28º dia pós-operatório e do número de miofibroblastos aferidos no sétimo dia após a realização das anastomoses. **Conclusão:** a administração de nicotina foi deletéria sobre a angiogênese e formação de miofibroblastos em anastomoses do intestino delgado de ratos.

Descritores: Cicatrização. Nicotina. Intestino Delgado. Anastomose Cirúrgica. Ratos.

INTRODUÇÃO

Com a crescente preocupação e o debate mundial sobre os efeitos deletérios do tabaco no organismo humano, muita atenção tem sido direcionada às consequências adversas da prática de fumar. Os custos diretos e indiretos relacionados com as doenças ligadas ao tabagismo consomem consideráveis recursos destinados à área de saúde em nosso país. As neoplasias, doenças cardiovasculares e respiratórias associadas com o fumo são bem documentadas. Entretanto, menor atenção tem sido dispensada às complicações cirúrgicas relacionadas ao cigarro¹⁻⁴.

Embora produtos derivados do tabaco sejam consumidos há centenas de anos, somente no Século XX observou-se acentuado aumento no seu consumo, sendo o cigarro a forma mais importante de sua utilização. Sua fumaça tóxica possui mais de 5000 elementos, sendo que a nicotina é o principal componente vasoativo, considerada a causadora da dependência do

fumante, pois reforça e potencializa a vontade de fumar^{3,5,6}.

O chamado tecido de granulação, essencial para o desenvolvimento cicatricial sadio, surge no início da segunda fase da cicatrização, chamada de proliferativa, sendo composto principalmente por vasos sanguíneos neoformados (angiogênese) e fibroblastos modificados, denominados miofibroblastos⁴. Enquanto a angiogênese oferece suporte sanguíneo adequado para o alto nível de atividade metabólica que o processo de cicatrização requer, os miofibroblastos, por sua força contrátil, aproximam as bordas do tecido lesado⁷.

Mosely e Finseth⁸, em 1977, chamaram a atenção, de maneira pioneira, para os efeitos indesejáveis da nicotina na cicatrização dos tecidos. Desde então, diversos estudos clínicos e experimentais vêm tentando explicar essas ações, demonstrando que esta substância ocasiona deficiências em vários fatores envolvidos no processo cicatricial, em áreas tão diversas, como a Cirurgia Plástica⁹ e a Ortopedia.

1 - Curso de Medicina da Universidade Positivo, Curitiba – PR, Brasil; 2 - Departamento de Cirurgia da Universidade Federal do Paraná, Curitiba – PR, Brasil; 3 - Hospital Universitário da Cruz Vermelha – Universidade Positivo, Curitiba – PR, Brasil; 4 - Curso de Medicina da Universidade Estácio de Sá, Rio de Janeiro – RJ, Brasil.

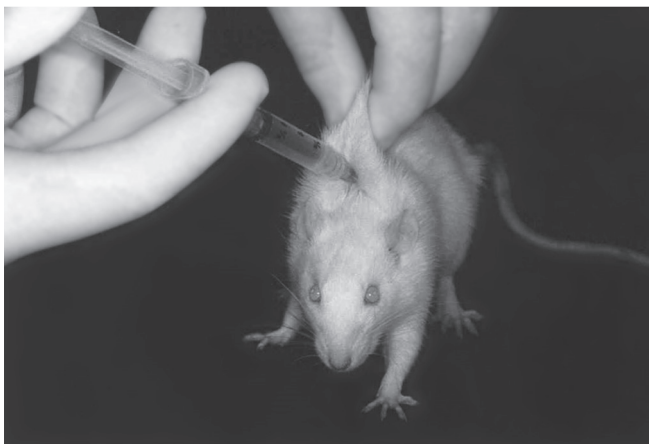


Figura 1 - Administração de nicotina por via subcutânea.

Muito pouco se conhece ainda sobre a influência da nicotina na cicatrização do trato digestivo, assim como, dos possíveis mecanismos de ação envolvidos¹⁰⁻¹³.

O objetivo deste estudo é analisar os efeitos da nicotina no processo cicatricial de anastomoses do intestino delgado de ratos, em relação ao número de vasos sanguíneos e de miofibroblastos presentes no tecido de cicatrização.

MÉTODOS

Os procedimentos experimentais foram realizados no Centro de Pesquisas Cirúrgicas do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná e o estudo imuno-histoquímico, no Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná e no Instituto de Pesquisas Médicas (Ipem) do Hospital Universitário Evangélico de Curitiba, sendo devidamente analisados previamente e aprovados pelos comitês de ética em pesquisa das instituições supracitadas.

Neste estudo foram utilizados 60 ratos machos *Wistar*, com idade variando de 160 a 200 dias (média de 180 dias) e peso entre 270 e 290g, procedentes do Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR), sendo mantidos em ciclo dia/noite de 12 horas e na temperatura ambiente constante de 24°C. Os animais foram alimentados com ração própria para a espécie e tiveram livre acesso à água durante todo o experimento.

Os ratos foram divididos, de maneira aleatória, em dois grupos: Grupo N, com 30 animais, submetidos à aplicação de nicotina; e Grupo C, igualmente com 30

ratos, que serviu como controle. Cada grupo foi dividido em três subgrupos, contendo dez ratos cada. Denominaram-se por N7, N14, N28, C7, C14 e C28, segundo o tempo de avaliação pós-operatória.

No grupo N foi administrada nicotina (Nicotine di-tartrate salt – Sigma, Saint Louis, Missouri, USA) por via subcutânea (figura 1) e na dosagem de 2mg por Kg de peso, duas vezes ao dia (12/12 horas), diluída em 0,3ml de solução fisiológica a 0,9% e ajustada para pH 7,4, por um período inicial de 28 dias prévios ao procedimento cirúrgico. No grupo C procedeu-se de maneira idêntica, substituindo-se a nicotina por solução fisiológica a 0,9%. Os ratos foram pesados semanalmente e a dose de nicotina ajustada, quando necessário. Tal dosagem foi estabelecida após cálculo para que a quantidade de nicotina fosse equivalente a duas carteiras de cigarros por dia em um humano adulto.

No 28º dia de aplicação retirou-se a ração por 12 horas prévias à operação, mantendo-se água com livre acesso. O procedimento operatório aconteceu no dia seguinte.

Os ratos foram submetidos à anestesia inalatória com halotano em campânula fechada. De maneira asséptica realizou-se laparotomia mediana de 4cm de extensão. Foram realizadas anastomoses a 10cm da flexura duodenojejunal, realizando-se secção transversa da alça isolada e anastomose término-terminal, construída com fio de polipropileno 6-0, em plano único de sutura, com pontos totais separados, no total de oito pontos (figura 2). A parede do abdômen foi suturada com dois planos de sutura, em chuleio contínuo, com fio multifilamentar de poliglactina 3-0. Os animais receberam livre acesso à água imediatamente e à ração 12 horas após o procedimento operatório.

A administração de nicotina ou solução fisiológica manteve-se até mesmo no dia da operação e por mais sete, 14 ou 28 dias, conforme o subgrupo do animal e nas mesmas condições já relatadas, quando realizou-se nova anestesia inalatória e retirada do segmento anastomosado, considerando a medida de 1cm proximal e 1cm distal à anastomose realizada, sendo a peça acondicionada em formol tamponado.

Para a coloração imuno-histoquímica aplicaram-se os anticorpos monoclonais antifator VIII (Policlonal, Código 0082 – DakoCytomation – Carpinteria, USA),

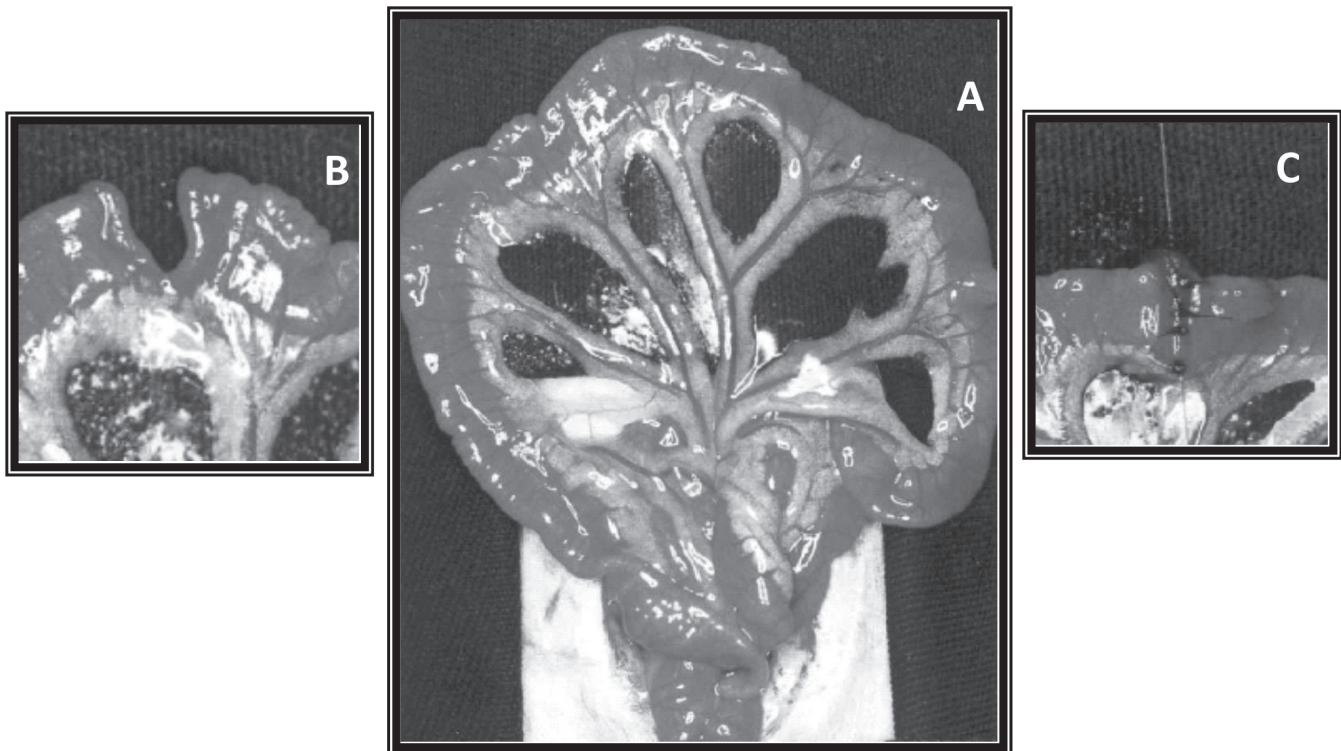


Figura 2 - Construção da anastomose no intestino delgado. A) intestino íntegro; B) secção da alça intestinal; C) confecção da anastomose.

e anti-alfa-actina muscular lisa (Monoclonal, Código M0851 – DakoCytomation – Carpinteria, USA). A positividade para miofibroblastos foi identificada nas áreas de pigmentação acastanhada. Controles positivos e negativos foram utilizados.

Com relação ao número de vasos sanguíneos, a identificação foi efetuada pela contagem das estruturas circulares coradas positivamente pelo anticorpo antifator VIII, que revela as células endoteliais da camada íntima dos vasos. A contagem foi feita na área da anastomose, em uma extensão de 10mm proximal e distalmente a esta (total de 20mm com a anastomose inclusa), utilizando-se objetiva de 10x.

Quanto à quantificação dos miofibroblastos, contou-se as células coradas positivamente pelo anticorpo anti-alfa-actina muscular lisa em um campo de grande aumento (objetiva de 40X), justo anastomótico. As imagens digitalizadas foram capturadas e analisadas pelo programa *Image Pro Plus* (Media Cybernetics, Califórnia, USA), por meio da ferramenta "Measures".

Para cada uma das variáveis quantitativas adotou-se o teste não paramétrico de *Mann-Whitney*, no nível de significância de 5%.

RESULTADOS

A avaliação do número de vasos sanguíneos na área da anastomose nas diversas fases do pós-operatório pode ser vista na tabela 1. A administração de nicotina levou à diminuição do número de vasos sanguíneos aferidos no 28º dia pós-operatório e do número de miofibroblastos aferidos no sétimo dia após a realização das anastomoses.

O aspecto microscópico dos vasos sanguíneos com positividade para antifator VIII é mostrado na figura 3.

A quantificação dos miofibroblastos nas diversas fases do pós-operatório é mostrada na tabela 2. Imagem do miofibroblasto corado pelo anticorpo anti-alfa-actina é vista na figura 4.

DISCUSSÃO

Observou-se neste experimento que a utilização de nicotina, na metodologia determinada, levou à diminuição estatisticamente significativa do número de vasos sanguíneos no 28º dia pós-operatório e do número de miofibroblastos no sétimo dia após a realização das anastomoses. De forma semelhante, diversos estudos an-

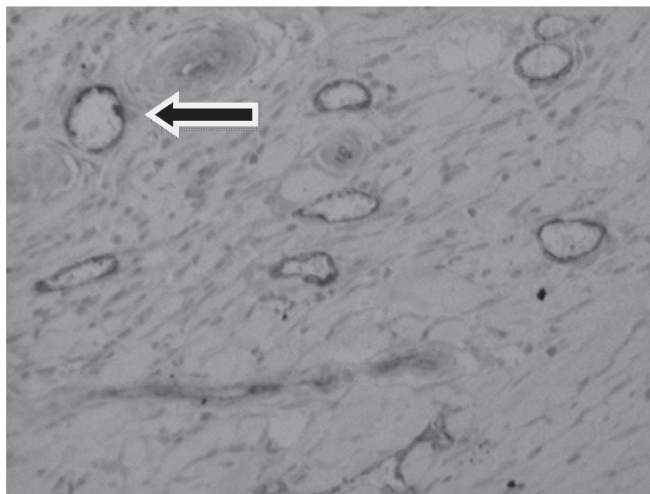


Figura 3 - Vasos sanguíneos com íntima corada em marrom, revelando positividade para antifator VIII (Magnificação original 100X).

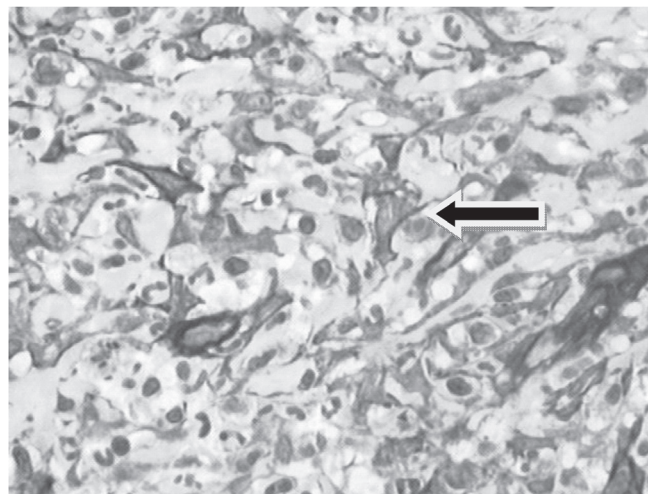


Figura 4 - Miofibroblastos corados em marrom utilizando-se anticorpo anti-alfa-actina muscular lisa, apresentando formato poligonal, com projecões citoplasmáticas e núcleos vesiculosos (Magnificação original 400X).

teriores determinaram que esta droga atua negativamente no processo de cicatrização em diversos tecidos, provocando vasoconstrição tissular, diminuição da proliferação de linfócitos, fibroblastos e colágeno, entre outros¹⁴⁻²¹. Os linfócitos são fonte importante de produção de citocinas indutoras de angiogênese, portanto a diminuição destes, por efeito da nicotina¹⁸, pode levar à diminuição da formação de novos vasos sanguíneos no tecido cicatricial, como observado neste estudo. É importante lembrar que o oxigênio carregado pelos novos vasos é fator fundamental na síntese da proteína colágeno, principal responsável pela resistência no tecido cicatricial. Portanto, diminuição da angiogênese, com consequente déficit de oxigênio no tecido cicatricial pode ser uma das explicações para a diminuição da produção de colágeno e força de ruptura na região de anastomoses intestinais, identificadas por estudos anteriores^{3,7}.

Desta forma, a nicotina pode exercer efeito inibidor sobre a angiogênese através de variados mecanis-

mos: a- inibição dos fatores angiogênicos, seja por ação negativa direta no mecanismo de liberação dos mesmos, seja por ação deletéria nas células que os produzem, como linfócitos e fibroblastos^{5,13,18,19}; b- ação deletéria direta sobre as células endoteliais^{5,11,19}.

A nicotina diminui ainda a formação de fibroblastos no processo cicatricial de anastomoses intestinais, o que explica o déficit da proteína colágeno, principal responsável pela força de ruptura local^{5,13}, pois estas células são a principal fonte de produção daquela proteína. Como os fibroblastos são as células precursoras dos miofibroblastos, cuja principal função é promover a aproximação das bordas da ferida cicatricial, a própria formação destes últimos estaria também comprometida.

A nicotina pode, portanto, exercer efeito negativo sobre a multiplicação dos miofibroblastos através de diferentes mecanismos: a- inibição dos fibroblastos, precursores dos miofibroblastos, seja por ação direta, seja por diminuição da taxa de oxigênio no sítio da lesão,

Tabela 1 - Número de vasos sanguíneos no 7^o, 14^o e 28^o dias de pós-operatório

Número de vasos	Grupo	Média \pm DP	Valor de p
7 dias	Controle	170,89 \pm 57,74	1,0000
	Nicotina	159,33 \pm 72,46	
14 dias	Controle	177,56 \pm 126,66	0,2973
	Nicotina	107,89 \pm 59,24	
28 dias	Controle	118,67 \pm 71,48	0,0027
	Nicotina	62,11 \pm 57,26	

Tabela 2 - Quantificação do número de Miofibroblastos no 7^o, 14^o e 28^o dias de pós-operatório.

Número de miofibroblastos	Grupo	Média \pm DP	Valor de p
7 dias	Controle	19,67 \pm 6,16	0,0206
	Nicotina	13,63 \pm 2,62	
14 dias	Controle	16,75 \pm 6,16	0,6730
	Nicotina	17,89 \pm 5,99	
28 dias	Controle	16,67 \pm 6,06	0,0027
	Nicotina	14,63 \pm 3,89	

dificultando a multiplicação e a função destas células¹³; b- inibição de células produtoras de citocinas estimulantes da proliferação fibroblástica, como os macrófagos e linfócitos¹⁵.

Pelo exposto, diversos podem ser os mecanismos através dos quais a nicotina pode exercer efeitos prejudiciais ao processo cicatricial normal. Estes deverão

ser esclarecidos por futuros estudos, pois ainda não há estudos suficientes e anteriores na literatura que tenham feito esta análise para comparação.

Em conclusão, conforme os dados demonstrados pelo presente estudo, a administração de nicotina foi deletéria sobre a angiogênese e formação de miofibroblastos em anastomoses do intestino delgado de ratos.

ABSTRACT

Objective: to know the effect of nicotine on angiogenesis and myofibroblast formation in anastomoses of the small bowel of rats. **Methods:** we randomly divided 60 Wistar rats into the groups Nicotine (N) and control (C), according to the proposed treatment. Each group was subdivided into three subgroups according to the time interval used for the evaluation (7, 14 or 28 days). The N group with 30 animals received nicotine subcutaneously at a dose of 2mg/kg body weight, diluted in 0.3ml of 0.9% saline, twice daily for 28 days prior to the operation, and for more 7, 14 or 28 days, depending on the subgroup. The C group (also 30 animals) received only saline on the same conditions and time intervals. After 28 days we carried out an end-to-end anastomosis 10cm distal to the duodenojejunal flexure in each rat. After 7, 14 or 28 days after surgery, we euthanized ten animals of each group, sent specimens of the anastomosis areas, 1cm proximal to 1cm distal, to counting of blood vessels and myofibroblasts through immunohistochemical staining by the application of monoclonal anti-factor VIII antibodies and anti-smooth muscle alpha-actin. **Results:** the administration of nicotine led to the decrease in the number of blood vessels measured on the 28th postoperative day and the number of myofibroblasts measured on the seventh day following completion of the anastomoses. **Conclusion:** administration of nicotine was deleterious on angiogenesis and myofibroblast formation in rats' small intestine anastomoses.

Keywords: Wound Healing. Nicotine. Intestine, Small. Anastomosis, Surgical. Rats.

REFERÊNCIAS

1. Bozarth MA, Pudiak CM, Kuolee R. Effect of chronic nicotine on brain stimulation reward. I. Effect of daily injections. *Behav Brain Res.* 1998;96(1-2):185-8.
2. Coelho ICMM. Estudo comparativo das forças e tensão entre as cicatrizes das laparotomias paramedianas e das laparotomias transversas em ratos jovens (*Rattus Norvegicus Albonus*) [dissertação]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica; 1999.
3. Frick WG, Seals RR Jr. Smoking and wound healing: a review. *Tex Dent J.* 1994;111(6):21-3.
4. Silva VLC. Tabagismo: um problema de saúde pública no Brasil. *JBM.* 1990;59(1):14-24.
5. Giannopoulou C, Geinoz A, Cimasoni G. Effects of nicotine on periodontal ligament fibroblasts in vitro. *J Clin Periodontol.* 1999;26(1):49-55.
6. Fletcher HG. The history of nicotine. *J Chem Educ.* 1941;18(7):303-8.
7. Witte MB, Barbul A. General principles of wound healing. *Surg Clin North Am.* 1997;77(3):509-28.
8. Mosely LH, Finseth F. Cigarette smoking: impairment of digital blood flow and wound healing in the hand. *Hand.* 1977;9(2):97-101.
9. Forrest R, Pang Y, Lindsay K. Detrimental effect of nicotine on skin flap viability and blood flow in random skin flap operation on rats and pigs. *Surg Forum.* 1985;36:611-3.
10. Sørensen LT, Toft BG, Rygaard J, Ladelund S, Paddon M, James T, et al. Effect of smoking, smoking cessation, and nicotine patch on wound dimension, vitamin C, and systemic markers of collagen metabolism. *Surgery_2010;148(5):982-90.*
11. Medeiros AC, Carvalho MGF, Medeiros MHO, Uchôa RAC. Efeitos da nicotina na cicatrização intestinal em ratos. *Rev Col Bras Cir.* 1999;26(6):375-8.
12. Adamsons RJ, Musco F, Enquist IF. The relationship of collagen content to wound strength in normal and scorbutic animals. *Surg Gynecol Obstet.* 1964;119:323-9.
13. Skinovsky J, Malafaia O, Matias JEF, Ioshi SO, Chibayta M, Campos ACL, et al. Nicotina interfere na cicatrização de anastomoses do intestino delgado em ratos. *ABCD, arq bras cir dig.* 2001;14(4):151-4.

14. Orgill D, Demling R. Current concepts and approaches to wound healing. *Crit Care Med*. 1988;16(9):899-908.
15. Xanthoulea S, Deliaert A, Romano A, Rensen SS, Buurman WA, van der Hulst RR. Nicotine effect on inflammatory and growth factor responses in murine cutaneous wound healing. *Int Immunopharmacol*. 2013;17(4):1155-64.
16. Watts DT. The effect of nicotine and smoking on the secretion of epinephrine. *Ann N Y Acad Sci*. 1960;90(3):74-80.
17. Hesp FL, Hendriks T, Lubbers EJ, deBoer HH. Wound healing in the intestinal wall. A comparison between ileal and colonic anastomoses. *Dis Colon Rectum*. 1984;27(2):99-104.
18. Neher GH. Nicotine-induced depression of lymphocyte growth. *Toxic Appl Pharmacol*. 1974;27(2):253-8.
19. Tipton DA, Dabbous MK. Effects of nicotine on proliferation and extracellular matrix production of human gingival fibroblasts in vitro. *J Periodontol*. 1995;66(12):1056-64.
20. Benowitz N. Clinical pharmacology of nicotine. *Ann Rev Med*. 1986;37:21-33.
21. Fawcett A, Shembekar M, Church JS, Vashiht R, Springall RG, Nott DM. Smoking, hypertension, and colonic anastomotic healing; a combined clinical and histopathological study. *Gut*. 1996;38(5):714-8.

Recebido em: 23/11/2015

Aceito para publicação em: 13/03/2016

Conflito de interesse: nenhum.

Fonte de financiamento: nenhuma.

Endereço para correspondência:

James Skinovsky

E-mail skinovsky@gmail.com